

Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy,
Polish Academy of Sciences



Joanna Majewska

**Molecular and immunological determinants
for T4, A3R and 676Z phages presence
in mice gut**

Doctoral dissertation

Supervisor:

Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska

Laboratory of Phage Molecular Biology

Wrocław, 2023

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



Joanna Majewska

**Molekularne i immunologiczne uwarunkowania
obecności bakteriofagów T4, A3R i 676Z
w jelicie myszy**

Rozprawa doktorska

Promotor:

Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska

Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów

Wrocław, 2023



Studies described in this doctoral dissertation were funded by
the **National Science Centre in Poland** grants

PRELUDIUM 13 grant 2017/25/N/NZ6/02372 “Environment of the gastrointestinal tract
as a source of selective pressure shaping the evolution of T4 phage capsid”

principal investigator: mgr Joanna Majewska

SONATA BIS 1 grant 2012/05/E/NZ6/03314 “Identification of modulatory effects of selected
bacteriophages with therapeutic potential on mammalian cell functions and immunity”

principal investigator: prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska

OPUS 18 grant 2019/35/B/NZ7/01824 “PhageScan: identification of major phage epitopes
affecting human health”

principal investigator: prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska

Pragnę serdecznie podziękować

*Mojej promotor, **prof. dr hab. Krystynie Dąbrowskiej***

*za to, że mogłam być częścią fantastycznego zespołu,
uczestniczyć w ciekawych projektach i pod jej opieką rozwinąć naukowe skrzydła,
a przede wszystkim za cierpliwość przy powstawaniu tej rozprawy doktorskiej*

***Zespołowi Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
i dawnego Samodzielnego Laboratorium Bakteriofagowego***

*za życzliwą atmosferę i wszystkie wspólne dni i wieczory w laboratorium,
za niezliczone naukowe rozmowy, pomoc i wsparcie –
– praca z Wami i wspólne poznawanie coraz nowych aspektów biologii fagów
były prawdziwym przywilejem*

*szczególnie **dr inż. Paulinie Miernikiewicz** – za dzielenie się wiedzą
i co ważniejsze – za przyjaźń, wsparcie i motywację*

*i pani **Dorocie Lecion** – za nieocenioną pomoc*

Moim Rodzicom,

*szczególnie **mojej wspaniałej Mamie**, która od zawsze była moim największym kibicem*

Jowicie i wszystkim przyjaciółom,

na których dobre słowo i życzliwość zawsze mogłam liczyć

*A przede wszystkim **Patrykowi i Tosi***

*za motywację i bezwarunkowe wsparcie na każdym kroku, za wiarę we mnie nawet wtedy,
kiedy mi tej wiary brakowało – dziękuję, że jesteście!*

Table of contents

Streszczenie	2
Summary	6
List of publications	10
Co-authors' declarations.....	11
Publications.....	77
Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood.....	78
Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered <i>per os</i>	96
Evolution of the T4 phage virion is driven by selection pressure from non-bacterial factors.....	121
Conclusions	157

Streszczenie

Bakteriofagi są ważnym składnikiem mikrobiomu ludzi i zwierząt, szczególnie w przewodzie pokarmowym, gdzie stanowią dominującą frakcję wirionów i są zaangażowane w regulację bakteryjnej mikrobioty jelitowej. Obecnie wiele badań nad oddziaływaniami fagów z komórkami i układami ludzi i zwierząt wyraźnie wskazuje, że wpływ fagów na organizmy wyższe zdecydowanie wykracza poza jedynie udział w utrzymaniu równowagi populacji bakterii. Bakteriofagi są również wykorzystywane w terapii pacjentów cierpiących na zakażenia bakteryjne i stanowią jedną z najważniejszych alternatyw dla standardowej antybiotykoterapii, szczególnie w obliczu stale rosnącego problemu antybiooporności. Doustne podanie terapeutycznych preparatów fagowych jest proste, stosunkowo bezpieczne i dobrze tolerowane przez pacjentów, a do jego głównych ograniczeń należy wrażliwość fagów na silnie kwaśne środowisko żołądka. Jest to dominująca droga podania głównie w przypadku zakażeń bakteryjnych obejmujących przewód pokarmowy, ale skuteczność doustnej terapii fagowej wykazano również w infekcjach ogólnoustrojowych, jak np. sepsa. Dodatkowo, doustne podawanie preparatów fagowych może być stosowane wspomagająco przy innych metodach aplikacji. Niezależnie od drogi podania, bakteriofagi – jako cząstki obce dla organizmu człowieka – mogą indukować produkcję swoistych przeciwciał, których obecność może z kolei prowadzić do inaktywacji fagów, przyczyniając się do obniżenia skuteczności leczenia, jednak w oparciu o dotychczasowe doniesienia nie stwierdzono jednoznacznego związku między poziomem przeciwciał swoistych a powodzeniem terapii fagowej. Ważną perspektywą w rozwoju fagoterapii jest obecnie wykorzystanie nowoczesnych technik pozwalających na precyzyjną, celowaną modyfikację fagów w kierunku uzyskania bardziej pożądanых właściwości – np. usunięcia genów odpowiedzialnych za lizogenię czy modyfikacji białek fagowych rozpoznających receptory na powierzchni komórek gospodarza w celu poszerzenia lub zmiany spektrum litycznego. W szerszym kontekście podobne celowane modyfikacje mogą w przyszłości być potencjalnie wykorzystywane także do „sterowania” immunogennością wirionów lub wrażliwością cząstek fagowych na wybrane czynniki zewnętrzne, np. w przewodzie pokarmowym – szczególnie biorąc pod uwagę, że medyczne zastosowania fagów nie ograniczają się jedynie do zwalczania infekcji bakteryjnych, a całe fagi lub modyfikowane kapsydy fagowe są proponowane jako nowoczesne nośniki leków i szczepionek. Dotyczy to szczególnie fagów o dobrze scharakteryzowanej strukturze i właściwościach, jak np. bakteriofag T4. Mimo tak ważnych i różnorodnych ról bakteriofagów, tych naturalnie bytujących w naszym organizmie jak i stosowanych terapeutycznie, czynniki warunkujące obecność i aktywność fagów w przewodzie pokarmowym są nadal niedostatecznie zbadane. Dotyczy to zarówno czynników po stronie organizmów wyższych, jak i molekularnych właściwości samych wirionów fagowych.

Celem rozprawy doktorskiej była identyfikacja wybranych immunologicznych i molekularnych czynników wpływających na obecność i aktywność bakteriofagów w przewodzie pokarmowym człowieka i zwierząt – zarówno w kontekście indukcji przez fagi swoistych przeciwciał i ich potencjalnej roli w ograniczaniu biodostępności fagów, jak również w kontekście tego, jak białka strukturalne fagów mogą przyczyniać się do immunogenności wirionów, a także kształtować odporność fagów na czynniki

charakterystyczne dla specyficznego mikrośrodowiska przewodu pokarmowego, takie jak temperatura, kwaśne i zasadowe pH czy obecność proteolitycznych enzymów trawiennych.

W badaniach będących przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej zostały wykorzystane trzy bakteriofagi ogonkowe – T4, A3R i 676Z – reprezentujące ten sam typ morfologii (myovirus) i klasyfikowane wcześniej jako przedstawiciele rodziny *Myoviridae* w obrębie rzędu *Caudovirales*. W związku z reorganizacją taksonomii wirusów bakteryjnych w celu odzwierciedlenia faktycznych powiązań filogenetycznych, a nie jedynie podobieństwa morfologicznego, obecnie bakteriofagi te są klasyfikowane w obrębie klasy *Caudoviricetes* i rodzin *Straboviridae* (T4) i *Herelleviridae* (A3R i 676Z). Bakteriofag T4 jest modelowym bakteriofagiem infekującym bakterie *Escherichia coli*, naturalnie występującym w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt. Należy on do najbardziej złożonych wirusów, a jego białka strukturalne, ich organizacja i wzajemne oddziaływania są dobrze scharakteryzowane. W kontekście niniejszej rozprawy doktorskiej szczególnie ważne są cztery białka główki faga T4: główne białko kapsydowe (gp23), białko wierzchołkowe główki (gp24) oraz dwa białka dekoratywne Hoc i Soc, a także białko gp12 budujące haczyki płytki podstawowej i zaangażowane w wiązanie receptorów na powierzchni komórek gospodarza. Bakteriofagi A3R i 676Z charakteryzują się wysokim stopniem podobieństwa, wykazują specyficzność wobec *Staphylococcus aureus* i są od lat stosowane w Ośrodku Terapii Fagowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN jako bakteriofagi terapeutyczne. Ich struktura białkowa jest słabiej scharakteryzowana, jednak niedawne badania z wykorzystaniem techniki immuno-TEM pozwoliły na eksperymentalne potwierdzenie przewidywanych funkcji i lokalizacji wybranych białek strukturalnych.

Rozprawę doktorską stanowi cykl trzech powiązanych tematycznie publikacji oryginalnych. Pierwsza publikacja (*Viruses*, 2015, 7(8):4783-99) obejmuje badania indukcji przeciwciał swoistych przez modelowego bakteriofaga T4 podawanego w wodzie pitnej w modelu mysim; było to pierwsze badanie kinetyki odpowiedzi humoralnej podczas długotrwałego doustnego podawania preparatów fagowych. Zaobserwowałam indukcję odpowiedzi humoralnej we krwi (swoiste przeciwciała IgG), a także – znacznie później – w przewodzie pokarmowym (swoiste przeciwciała IgA). Efekt ten był zależny od dawki, a poziom przeciwciał swoistych u myszy immunizowanych relatywnie wysoką dawką faga T4 *per os* był wyraźnie niższy niż w przypadku immunizacji podskórnej, co wskazuje na stosunkowo niską efektywność indukcji odpowiedzi humoralnej przez fagi w modelu podania doustnego. Co ważne, jednoczesna ocena zmian poziomu przeciwciał swoistych oraz ocena próbek kału myszy pod kątem obecności aktywnych fagów T4 i występowania izolatów *E. coli* opornych na faga pozwoliły zidentyfikować sekrecję swoistych przeciwciał IgA jako główny czynnik ograniczający aktywność faga T4 w przewodzie pokarmowym, istotniejszy niż dominacja izolatów bakterii opornych na faga. Porównując poziomy przeciwciał swoistych wobec pięciu wybranych białek strukturalnych faga T4 – gp23, gp24, Hoc, Soc i gp12 – zaobserwowałam istotny wzrost jedynie w przypadku białek Hoc i gp12, tym samym wskazując na udział tych dwóch białek w indukcji odpowiedzi humoralnej na faga w badanym modelu. Następnie na przykładzie antygeny peptydowego pochodzącego z wirusa Ebola zademonstrowałam, że w modelu podania doustnego możliwa jest także indukcja w przewodzie pokarmowym sekrecyjnych przeciwciał IgA swoistych wobec obcego antygeny prezentowanego na powierzchni kapsydu faga T4

w fuzji ze wskazanym jako immunogenne białkiem Hoc. Obserwacja ta może mieć znaczenie w kontekście potencjalnego zastosowania cząstek fagowych jako nośników leków i szczepionek.

W drugiej publikacji (Frontiers in Immunology, 2019, 10:2607) podjęłam próbę odpowiedzi na pytanie, czy obserwacje oparte o wyniki uzyskane dla modelowego bakteriofaga T4 mają charakter uniwersalny i czy można je odnieść do innych bakteriofagów, szczególnie reprezentujących podobny typ morfologii, ale infekujących odległy filogenetycznie gatunek bakterii, znacznie mniej licznie niż *E. coli* reprezentowany w normalnej mikrobiocie przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt. W tym celu przeprowadziłam analogiczną jak w przypadku faga T4 immunizację myszy preparatami bakteriofagów gronkowcowych A3R i 676Z. Ponieważ obydwie te bakteriofagi są wykorzystywane jako fagi terapeutyczne w leczeniu zakażeń *S. aureus* u pacjentów Ośrodka Terapii Fagowej, uzyskane w ramach tych badań wyniki mają również potencjalne znaczenie kliniczne. Podobnie jak dla bakteriofaga T4, także w przypadku fagów A3R i 676Z stwierdziłam indukcję odpowiedzi humoralnej we krwi i w przewodzie pokarmowym i podobną kinetykę zmian poziomów przeciwciał swoistych – tym razem jednak w osoczu zaobserwowałam także nieznaczny, choć statystycznie istotny wzrost poziomu swoistych przeciwciał IgM. Ponownie zaobserwowałam też korelację pomiędzy zmianami poziomu swoistych przeciwciał klasy IgA a wykrywaniem fagów w kale myszy, co potwierdziło rolę sekrecyjnych przeciwciał IgA jako głównego czynnika ograniczającego aktywność fagów w przewodzie pokarmowym. Porównanie poziomu przeciwciał swoistych wobec wirionów fagów A3R i 676Z uzyskanych w badanym modelu podania *per os* i w wyniku immunizacji dootrzewnowej również wykazało niższy poziom odpowiedzi humoralnej w przypadku podania doustnego, co dodatkowo potwierdziła słabsza inaktywacja fagów A3R i 676Z po inkubacji z osoczem myszy immunizowanych *per os*.

Co ciekawe, porównanie immunogenności trzech wybranych białek strukturalnych – głównego białka kapsydowego (Mcp) budującego główkę bakteriofagów A3R i 676Z, białka TmpH wchodzącego w skład struktury ogonka oraz białka gpORF096 zlokalizowanego w obrębie płytki podstawowej i najprawdopodobniej zaangażowanego w rozpoznawanie receptorów na powierzchni komórek bakteryjnych – wykazało znaczne różnice względem wyników uzyskanych dla badanych białek strukturalnych faga T4. W przypadku bakteriofagów gronkowcowych, zaobserwowałam wyraźny wzrost poziomu przeciwciał swoistych wobec białka Mcp, świadczący o jego immunogenności w badanym modelu, natomiast białko gpORF096 okazało się nieimmunogenne. Wyraźny wzrost poziomu przeciwciał swoistych zaobserwowałam również w przypadku białka tuby ogonka TmpH. Obserwacje te sugerują, że o ile ogólna kinetyka indukcji przeciwciał swoistych ma uniwersalny charakter, to rola poszczególnych białek strukturalnych we wzbudzaniu odpowiedzi humoralnej może znacząco różnić się u poszczególnych fagów.

Poza kinetyką indukcji przeciwciał, w pracy zbadałam również translokację bakteriofagów A3R i 676Z z przewodu pokarmowego do krwioobiegu w modelu mysim. Uzyskane wyniki wskazywały na słabe i nieregularne przenikanie aktywnych cząstek fagowych do krwi i brak wyraźnej zależności pomiędzy liczbą wykrywanych fagów a zastosowaną dawką czy wcześniejszym wprowadzeniem substancji neutralizujących kwaśne środowisko żołądka.

Miana aktywnych fagów w próbkach krwi były też znacznie niższe niż oczekiwane wartości oszacowane w oparciu o zaproponowany w pracy model matematyczny.

W obu powyższych publikacjach skupiłam się głównie na zależnościach pomiędzy fagami a elementami odpowiedzi humoralnej przeciwko fagom, jednak wpływ organizmów wyższych na przeżywalność fagów nie ogranicza się wyłącznie do czynników immunologicznych. Dlatego też w trzeciej publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej (*Microbiology Spectrum*, 2023, przyjęta) podjęłam temat bezpośredniego wpływu czynników charakterystycznych dla środowiska przewodu pokarmowego na aktywność fagów na przykładzie modelowego bakteriofaga T4. Stanowiło to odniesienie do perspektywy ewolucyjnej, w której skład białkowy główki faga mógł – przynajmniej do pewnego stopnia – ukształtować się w odpowiedzi na presję specyficznych warunków w przewodzie pokarmowym zwierząt i człowieka: temperaturę, kwaśne i zasadowe pH oraz obecność proteolitycznych enzymów trawiennych i żółci. W celu określenia roli białek główki bakteriofaga T4 – gp24, Hoc i Soc – w odporności wirionów na te czynniki, skonstruowałam panel mutantów faga T4 nieposiadających jednego, dwóch lub wszystkich trzech spośród tych białek. Do uzyskania panelu mutantów została wykorzystana homologiczna rekombinacja i metody selekcji oparte o techniki mikrobiologiczne lub reakcję PCR, a skład białkowy główki fagów zweryfikowałam w teście ELISA. Mutanty nieposiadające w strukturze główki wyspecjalizowanego białka wierzchołkowego gp24 okazały się bardziej wrażliwe na kwaśne pH i aktywność proteolitycznych enzymów trawiennych – pepsyny i α -chymotrypsyny. Dodatkowo, mutanty pozbawione jednocześnie gp24 i Soc były bardziej wrażliwe na temperaturę 37°C. Uzyskane wyniki wskazują na kluczową rolę gp24 w odporności faga T4 na warunki środowiska – w tym środowiska przewodu pokarmowego – jednocześnie wspierając postulowaną wcześniej rolę białka Soc jako molekularnego kleju, stabilizującego kapsyd. Co więcej, porównanie denaturacji termicznej białek gp24, gp23 i dwóch wariantów białka gp23 posiadających mutacje typu bypass-24 (mutacje te pozwalają gp23 na tworzenie – poza heksamerami – również pentamerów, zastępujących pentamery gp24 na wierzchołkach kapsydu, tym samym kompensując letalny dla faga brak gp24) wykazało wyjątkową stabilność gp24 i brak wyraźnych różnic pomiędzy białkiem gp23 i jego dwoma wariantami.

Podsumowując, cel pracy doktorskiej został osiągnięty. W toku badań określiłam kinetykę zmian poziomów przeciwciał swoistych w odpowiedzi na doustne podawanie bakteriofagów w modelu mysim i wskazałam swoiste przeciwciała sekrecyjne klasy IgA jako główny czynnik ograniczający aktywność bakteriofagów w przewodzie pokarmowym, istotniejszy niż pojawienie się w populacji bakterii o fenotypie oporności na faga. Wykazałam też, że białka strukturalne bakteriofagów w różnym stopniu przyczyniają się do indukcji przez wiriony odpowiedzi humoralnej, a immunogenność białek budujących struktury o tej samej lub podobnej funkcji (np. główne białko kapsydowe czy białka płytki podstawowej zaangażowane w oddziaływanie z komórkami gospodarza) może być różna u różnych fagów mimo reprezentowania przez nie tego samego typu morfologii. Dodatkowo, na przykładzie faga T4 wykazałam, że złożony skład białkowy kapsydu – w szczególności obecność wyspecjalizowanego białka wierzchołkowego – odpowiada za odporność fagów na czynniki charakteryzujące m.in. środowisko przewodu pokarmowego, co może sugerować potencjalną rolę przewodu pokarmowego w ukierunkowaniu ewolucji struktury wirionów fagowych.

Summary

Bacteriophages are an important component of human and animal microbiota, particularly in the gastrointestinal tract, where they constitute the dominant fraction of the virome and are involved in the regulation of bacterial gut microbiota. Recent studies of phage interactions with human and animal systems clearly indicate that the ways in which phages affect higher organisms go far beyond merely maintaining the balance of bacterial populations. Bacteriophages are also used for therapeutic purposes to treat patients suffering from bacterial infections and are considered one of the most important and promising alternatives to standard antibiotic therapy, especially in the face of the constant alarming spread of antibiotic resistance. Oral administration of therapeutic phage preparations is simple, relatively safe, and well-tolerated by patients and its major limitations include phage sensitivity to the highly acidic stomach environment. It is the dominant delivery route mostly in bacterial gastrointestinal infections, yet oral phage therapy has also been successfully applied to treat systemic infections, such as, e.g., sepsis. Moreover, oral administration of phage preparations can be used adjuvantly with other delivery routes. Regardless of the administration route, bacteriophages—being foreign particles—can induce the production of specific antibodies, which in turn may lead to the inactivation of phages, contributing to the diminished effectiveness of the treatment. However, based on the data reported to date, no clear correlation between the level of specific antibodies and the success of phage therapy has been demonstrated. The recent rapid development of novel techniques for precise, targeted modifications of bacteriophages opens up new prospects for phage therapy as it allows for the construction of phages with more desirable properties, e.g., removing genes involved in the process of lysogeny or modifying phage proteins involved in bacterial cell recognition and binding in order to shift or expand the lytic spectrum. In a wider context, similar targeted modifications could potentially be used in the future to manipulate the immunogenicity of phage virions or the susceptibility of phage particles to certain environmental factors, e.g., in the gastrointestinal tract, especially since medical applications of phages are not restricted to combating bacterial infections – whole phage particles and modified phage capsids have been proposed as drug carriers and vaccine platforms. This is particularly relevant in the case of phages that are thoroughly characterized in terms of their protein structure and phage particle properties, such as model bacteriophage T4. However, despite the important and potentially diverse roles of bacteriophages in human health—both administered therapeutically and naturally occurring as part of our microbiota—the factors involved in phage presence, persistence, and activity in the gastrointestinal tract are still underexplored. This includes both factors related to human and animal organisms as well as the molecular properties of phage virions themselves.

The objective of the doctoral dissertation was to identify selected immunological and molecular factors that affect the presence and activity of bacteriophages in the animal gastrointestinal tract – both in terms of the phage’s ability to induce the production of specific antibodies and the potential impact of those antibodies on the bioavailability of phages and in the context of how individual structural proteins of the phage contribute to the immunogenicity of the whole virion and also shape its resistance to environmental factors that

characterize the gastrointestinal tract microenvironment, such as temperature, acidic and alkaline pH, and the presence of proteolytic digestive enzymes.

Three tailed bacteriophages—T4, A3R, and 676Z—were used in the research described herein, all representing the myovirus morphotype and previously classified as members of the *Myoviridae* family within the order *Caudovirales*. With the ongoing major changes to the bacteriophage taxonomy aiming to reflect actual phylogenetic relationships rather than morphological similarities, these phages are now placed in the class *Caudoviricetes* and the families *Straboviridae* (T4) and *Herelleviridae* (A3R and 676Z). Bacteriophage T4 is a model phage infecting *Escherichia coli* and is naturally present in the gastrointestinal tract of animals and humans as part of their normal microbiota. It is one of the most complex viruses, well-characterized in terms of its structural proteins, their organization, and interactions. Out of more than 40 proteins forming mature T4 phage virions, five are relevant in the context of this dissertation: four head proteins, namely major capsid protein (gp23), head vertex protein (gp24), Hoc, and Soc; and gp12, forming the short tail fibers of the phage baseplate and involved in the recognition and binding to the receptors on the surface of host bacterial cells. Bacteriophages A3R and 676Z both represent the genus *Kayvirus* and have a high degree of similarity. They are specific to *Staphylococcus aureus* and have been used as therapeutic phages at the Phage Therapy Unit of the Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy. Their protein structure is less thoroughly characterized, yet in recent studies predicted structural function and localization within the virion were experimentally confirmed for several proteins with the use of immune-TEM.

The proposed doctoral dissertation comprises a series of three thematically related research articles. In the first publication (*Viruses*, 2015, 7(8):4783-99), in a first study of humoral response kinetics during a very long-term oral application of phage preparations, a mouse model of the induction of phage-specific antibodies by the model bacteriophage T4 administered in drinking water was investigated. The induction of humoral response in the blood (phage-specific IgG antibodies) and, much later, also in the gastrointestinal tract (phage-specific secretory IgA antibodies) was observed. The effect was dose-dependent, and the level of phage-specific antibodies in mice immunized *per os* with a relatively high T4 phage dose was significantly lower than in the case of subcutaneous immunization, indicating that in the model of oral administration, phage particles are weakly effective in inducing the humoral response. Importantly, a parallel assessment of the changes in phage-specific antibody levels and the evaluation of fecal samples regarding the presence of active phages and *E. coli* isolates resistant to T4 phage identified the production of secretory phage-specific IgA antibodies as a major factor limiting the activity of T4 phage in the gastrointestinal tract, far more important than the dominance of phage-resistant bacterial isolates. In the comparison of the levels of antibodies specific to five selected T4 structural proteins—gp23, gp24, Hoc, Soc, and gp12—a significant increase was detected only in the cases of Hoc and gp12, indicating their contribution to the induction of the humoral response in the investigated model. Finally, in the analogous model of oral administration of phage particles, an exemplary peptide antigen derived from the Ebola virus was used to demonstrate that induction of secretory IgA antibodies specific to a foreign antigen presented on the surface of the T4 phage capsid as a fusion with Hoc protein is also

possible. This observation may be relevant in the context of the potential application of phage particles as vaccine platforms or drug nanocarriers.

The second publication (Frontiers in Immunology, 2019, 10:2607) addressed the question of whether the observations previously made for the model bacteriophage T4 are universal and could be applied to other phages, particularly those representing the same morphotype but infecting a phylogenetically distant bacterial species far less abundantly than *E. coli* present within the normal microbiota of the gastrointestinal tract of animals and humans. Therefore, a mouse model of oral administration of therapeutic staphylococcal bacteriophages A3R and 676Z was established, analogous to that for the T4 phage. As both bacteriophages have been applied to treat staphylococcal infections at the Phage Therapy Unit, the results obtained in this study could have potential clinical implications. As in the case of bacteriophage T4, induction of phage-specific humoral response in the blood and in the gut was observed for phages A3R and 676Z, along with comparable antibody kinetics; however, a slight yet statistically significant increase of phage-specific IgM antibodies was detected this time. Importantly, changes in phage-specific IgA levels again correlated with the presence and absence of active phage particles in the fecal samples, which confirmed the role of secretory IgA as the major factor limiting phage activity in the gastrointestinal tract. Comparison of A3R and 676Z phage-specific antibody levels measured in the oral administration model and as a result of intraperitoneal immunization also showed a less prominent humoral response in the case of oral treatment, further supported by significantly weaker inactivation of phages after incubation with plasma collected from the mice immunized *per os*.

Interestingly, studies of the immunogenicity of three selected structural proteins—major capsid protein (Mcp) building the head of bacteriophages A3R and 676Z, tail morphogenetic protein H (Tmph), and gpORF096 located in the baseplate region and most likely involved in the bacterial cell surface recognition and binding—showed striking differences with regard to the results obtained for the T4 structural proteins. In the case of staphylococcal bacteriophages, a marked increase in the level of antibodies specific to Mcp was observed, indicating its immunogenic properties in the investigated model. Conversely, gpORF096 turned out to be nonimmunogenic. A significant increase in specific antibody levels was also observed for the tail sheath protein Tmph. These observations suggest that while the general schema of specific antibody induction following oral phage administration appears to be universal, the role of individual proteins in eliciting the humoral response may vary greatly between different phages.

Besides the antibody kinetics, phages A3R and 676Z were also investigated regarding their translocation from the gastrointestinal tract to the circulation in a mouse model. The results indicated poor and irregular translocation of active phage particles to the blood and a lack of clear correlation between detected phage titers in the blood and the administered phage dose or previous neutralization of the acidic contents of the stomach. Active phage titers in the blood were also significantly lower than the range expected based on the mathematical model proposed in the article.

The first two publications focused primarily on the interdependence of phages and the elements of the antiphage humoral response. However, factors affecting phage survival are not limited

to immunology-related ones. Therefore, the third and final article of the series (Microbiology Spectrum, 2023, in press) addressed the direct influence of factors typical for the gastrointestinal tract environment on phage activity using the model bacteriophage T4 as an example. In these studies, an evolutionary perspective was considered, in which the protein composition of the capsid could have been—at least partially—shaped in response to the selection pressure exerted by the specific conditions within the gastrointestinal tract of animals and humans: temperature, acidic and alkaline pH, and the presence of proteolytic digestive enzymes and bile. To identify the role that T4 phage head proteins gp24, Hoc, and Soc have in the resistance of phage particles to those factors, a panel of T4 phage variants deficient in one, two, or all three of these proteins was constructed. Homologous recombination followed by selection based on either microbiological techniques or PCR was applied to obtain the mutants, and their protein composition was verified using ELISA. The mutants lacking the specialized head vertex protein gp24 were more sensitive to low pH and the activity of proteolytic enzymes pepsin and α -chymotrypsin. Moreover, variants simultaneously deficient in both gp24 and Soc were less stable at 37°C. These results indicate the key role of gp24 in the T4 phage withstanding environmental conditions, including those present in the gastrointestinal tract, and support the previously postulated role of Soc as molecular glue that stabilizes the capsid. Additionally, recombinant proteins gp24, gp23, and two gp23 variants with single bypass-24 mutations (these mutations allow gp23 to form, besides the typical hexamers, also pentamers that replace gp24 pentamers at the capsid vertices, compensating for the lack of gp24, otherwise lethal for the phage) were compared in terms of thermal denaturation, revealing remarkable stability of gp24 and no significant differences between the wild-type gp23 and its two variants, which further supports the importance of gp24.

In conclusion, the objective of the doctoral dissertation has been achieved. Over the course of the presented studies, the kinetics of phage-specific antibody production in response to oral administration of phage preparations were determined in a mouse model. Secretory IgA antibodies were indicated as the major factor limiting the activity of bacteriophages in the gastrointestinal tract, much more important than the selection of bacteria with a phage-resistant phenotype. It was also demonstrated that phage structural proteins differ in terms of their contribution to the induction of the anti-phage humoral response, and the individual immunogenicity of proteins of identical or highly similar structural function (e.g., major capsid protein or baseplate proteins involved in the interactions with the host cell) could vary in different phages despite them representing the same morphotype. Additionally, with the example of the T4 phage, it was demonstrated that the complex protein composition of the capsid—in particular the presence of the specialized head vertex protein—determines the phage's resistance to external factors, including those related to gastrointestinal tract conditions, which could indicate the potential role of the gastrointestinal microenvironment in directing the evolution of phage virions.

List of publications

1. **Majewska J**, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Ciekot J, Owczarek B, Kopciuch A, Wojtyna K, Harhala M, Mąkosza M, Dąbrowska K. Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood. *Viruses*, 2015, 7(8):4783-99.
<http://doi.org/10.3390/v7082845>
IF = 3.042; 30 pts. MEiN
2. **Majewska J**, Kaźmierczak Z, Lahutta K, Lecion D, Szymczak A, Miernikiewicz P, Drapała J, Harhala M, Marek-Bukowiec K, Jędruchiewicz N, Owczarek B, Górski A, Dąbrowska K. Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered *per os*. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10:2607.
<http://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02607>
IF = 5.085; 140 pts. MEiN
3. **Majewska J***, Miernikiewicz P, Szymczak A, Kaźmierczak Z, Goszczyński TM, Owczarek B, Rybicka I, Ciekot J, Dąbrowska K*. Evolution of the T4 phage virion is driven by selection pressure from non-bacterial factors. *Microbiology Spectrum*, 2023 (accepted for publication on July 25th 2023). * corresponding authors
IF = 3.700; 100 pts. MEiN

Co-authors' declarations

Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław


Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Ciekot J, Owczarek B, Kopciuch A, Wojtyna K, Harhala M, Mąkosza M, Dąbrowska K. *Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood*. *Viruses*, 2015, 7(8):4783-99

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	50%	<p>Przygotowanie lizatów faga T4 oraz – w oparciu o kompetywny phage display – lizatu faga EB1-T4 prezentującego antygen peptydowy w fuzji z białkiem Hoc; oczyszczanie preparatów fagowych metodą powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej; potwierdzenie obecności antygeny EB1 na powierzchni faga EB1-T4 (ELISA); wykonanie oznaczeń poziomu endotoksyn w oczyszczonych preparatach fagowych.</p> <p>Nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy wyższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi; wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 we krwi (IgG, IgM) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy immunizowanych (ELISA) w zależności od dawki i drogi podania preparatu fagowego.</p> <p>Immunizacja myszy modyfikowanym bakteriofagiem T4 prezentującym na powierzchni kapsydu wirusowy antygen peptydowy EB1, pobieranie próbek oraz oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 i wobec antygeny EB1 w osoczu i w kale.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; udział w przygotowaniu manuskryptu.</p>
Weronika Beta	8%	<p>Wsparcie techniczne w procesowaniu próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach miana fagów w próbkach krwi i kału metodami mikrobiologicznymi i oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p> <p>Produkcja rekombinowanego białka gp12 w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanego produktu białkowego.</p>
Dorota Lecion	6%	<p>Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Mikrobiologiczna ocena próbek kału myszy immunizowanych <i>per os</i> preparatem faga T4 pod kątem obecności wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w szczególności <i>E. coli</i>. Przygotowanie izolatów do identyfikacji metodą spektrometrii masowej. Ocena izolatów <i>E. coli</i> pod kątem wrażliwości na bakteriofaga T4.</p>



Katarzyna Hodyra-Stefaniak	4%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Anna Kłopot	4%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych.
Zuzanna Kaźmierczak	3%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Paulina Miernikiewicz	3%	Przeprowadzenie podskórnej immunizacji myszy preparatem faga T4 oraz doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp12, Hoc i Soc. Udział w analizie danych eksperymentalnych.
Agnieszka Piotrowicz	3%	Przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Udział w produkcji rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczaniu uzyskanych produktów białkowych.
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białkowych polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatów faga T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Agnieszka Kopciuch	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatu faga EB1-T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Karolina Wojtyna	1%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt.
Marek Harhala	1%	Wsparcie merytoryczne w analizie statystycznej wyników, udział w przygotowaniu rycin Figure 1 i 3.
Mateusz Mąkosa	1%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy.
Krystyna Dąbrowska	13%	Przygotowanie konstruktów plazmidowych opartego o wektor ekspresyjny pCDF-Duet-1, wykorzystanego później w metodzie phage display do uzyskania bakteriofaga T4 prezentującego antygen EB1 w fuzji z białkiem Hoc. Koncepcja i projekt doświadczeń, nadzór nad planowaniem i przebiegiem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, przygotowanie tekstu manuskryptu.

Joanna Majerska
 (podpis)

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Ciekot J, Owczarek B, Kopciuch A, Wojtyna K, Harhala M, Mąkosza M, Dąbrowska K.
Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood.
Viruses, 2015, 7(8):4783-99

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	50%	<p>Przygotowanie lizatów faga T4 oraz – w oparciu o kompetytywny phage display – lizatu faga EB1-T4 prezentującego antygen peptydowy w fuzji z białkiem Hoc; oczyszczanie preparatów fagowych metodą powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej; potwierdzenie obecności antygenu EB1 na powierzchni faga EB1-T4 (ELISA); wykonanie oznaczeń poziomu endotoksyn w oczyszczonych preparatach fagowych.</p> <p>Nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy wyższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi; wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 we krwi (IgG, IgM) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy immunizowanych (ELISA) w zależności od dawki i drogi podania preparatu fagowego.</p> <p>Immunizacja myszy modyfikowanym bakteriofagiem T4 prezentującym na powierzchni kapsydu wirusowy antygen peptydowy EB1, pobieranie próbek oraz oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 i wobec antygenu EB1 w osoczu i w kale.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; udział w przygotowaniu manuskryptu.</p>
Weronika Beta	8%	<p>Wsparcie techniczne w procesowaniu próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach miana fagów w próbkach krwi i kału metodami mikrobiologicznymi i oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p> <p>Produkcja rekombinowanego białka gp12 w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanego produktu białkowego.</p>
Dorota Lecion	6%	<p>Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Mikrobiologiczna ocena próbek kału myszy immunizowanych <i>per os</i> preparatem faga T4 pod kątem obecności wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w szczególności <i>E. coli</i>. Przygotowanie izolatów do identyfikacji metodą spektrometrii masowej. Ocena izolatów <i>E. coli</i> pod kątem wrażliwości na bakteriofaga T4.</p>
Katarzyna Hodyra-Stefaniak	4%	<p>Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p>

Mu

Anna Kłopot	4%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych.
Zuzanna Kaźmierczak	3%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Paulina Miernikiewicz	3%	Przeprowadzenie podskórnej immunizacji myszy preparatem faga T4 oraz doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp12, Hoc i Soc. Udział w analizie danych eksperymentalnych.
Agnieszka Piotrowicz	3%	Przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Udział w produkcji rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczaniu uzyskanych produktów białkowych.
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białkowych polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatów faga T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Agnieszka Kopciuch	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatu faga EB1-T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Karolina Wojtyna	1%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt.
Marek Harhala	1%	Wsparcie merytoryczne w analizie statystycznej wyników, udział w przygotowaniu rycin Figure 1 i 3.
Mateusz Mąkosa	1%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy.
Krystyna Dąbrowska	13%	Przygotowanie konstruktów plazmidowego opartego o wektor ekspresyjny pCDF-Duet-1, wykorzystanego później w metodzie phage display do uzyskania bakteriofaga T4 prezentującego antygen EB1 w fuzji z białkiem Hoc. Koncepcja i projekt doświadczeń, nadzór nad planowaniem i przebiegiem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, przygotowanie tekstu manuskryptu.

Nerouika Kępcio

(podpis)

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Ciekot J, Owczarek B, Kopciuch A, Wojtyna K, Harhala M, Mąkosza M, Dąbrowska K. *Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood.* Viruses, 2015, 7(8):4783-99

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	50%	<p>Przygotowanie lizatów faga T4 oraz – w oparciu o kompetywny phage display – lizatu faga EB1-T4 prezentującego antygen peptydowy w fuzji z białkiem Hoc; oczyszczanie preparatów fagowych metodą powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej; potwierdzenie obecności antygenu EB1 na powierzchni faga EB1-T4 (ELISA); wykonanie oznaczeń poziomu endotoksyn w oczyszczonych preparatach fagowych.</p> <p>Nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy wyższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi; wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 we krwi (IgG, IgM) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy immunizowanych (ELISA) w zależności od dawki i drogi podania preparatu fagowego.</p> <p>Immunizacja myszy modyfikowanym bakteriofagiem T4 prezentującym na powierzchni kapsydu wirusowy antygen peptydowy EB1, pobieranie próbek oraz oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 i wobec antygenu EB1 w osoczu i w kale.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; udział w przygotowaniu manuskryptu.</p>
Weronika Beta	8%	<p>Wsparcie techniczne w procesowaniu próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach miana fagów w próbkach krwi i kału metodami mikrobiologicznymi i oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p> <p>Produkcja rekombinowanego białka gp12 w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanego produktu białkowego.</p>
Dorota Lecion	6%	<p>Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Mikrobiologiczna ocena próbek kału myszy immunizowanych <i>per os</i> preparatem faga T4 pod kątem obecności wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w szczególności <i>E. coli</i>. Przygotowanie izolatów do identyfikacji metodą spektrometrii masowej. Ocena izolatów <i>E. coli</i> pod kątem wrażliwości na bakteriofaga T4.</p>

Katarzyna Hodyra-Stefaniak	4%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Anna Kłopot	4%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych.
Zuzanna Kaźmierczak	3%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Paulina Miernikiewicz	3%	Przeprowadzenie podskórnej immunizacji myszy preparatem faga T4 oraz doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp12, Hoc i Soc. Udział w analizie danych eksperymentalnych.
Agnieszka Piotrowicz	3%	Przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Udział w produkcji rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczaniu uzyskanych produktów białkowych.
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białkowych polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatów faga T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Agnieszka Kopciuch	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatu faga EB1-T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Karolina Wojtyna	1%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt.
Marek Harhala	1%	Wsparcie merytoryczne w analizie statystycznej wyników, udział w przygotowaniu rycin Figure 1 i 3.
Mateusz Mąkosa	1%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy.
Krystyna Dąbrowska	13%	Przygotowanie konstruktów plazmidowych opartego o wektor ekspresyjny pCDF-Duet-1, wykorzystanego później w metodzie phage display do uzyskania bakteriofaga T4 prezentującego antygen EB1 w fuzji z białkiem Hoc. Koncepcja i projekt doświadczeń, nadzór nad planowaniem i przebiegiem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, przygotowanie tekstu manuskryptu.

D. Gajon

(podpis)

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Ciekot J, Owczarek B, Kopciuch A, Wojtyna K, Harhala M, Mąkosza M, Dąbrowska K.
Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood.
Viruses, 2015, 7(8):4783-99

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	50%	<p>Przygotowanie lizatów faga T4 oraz – w oparciu o kompetytywny phage display – lizatu faga EB1-T4 prezentującego antygen peptydowy w fuzji z białkiem Hoc; oczyszczanie preparatów fagowych metodą powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej; potwierdzenie obecności antygenu EB1 na powierzchni faga EB1-T4 (ELISA); wykonanie oznaczeń poziomu endotoksyn w oczyszczonych preparatach fagowych.</p> <p>Nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy wyższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi; wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 we krwi (IgG, IgM) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy immunizowanych (ELISA) w zależności od dawki i drogi podania preparatu fagowego.</p> <p>Immunizacja myszy modyfikowanym bakteriofagiem T4 prezentującym na powierzchni kapsydu wirusowy antygen peptydowy EB1, pobieranie próbek oraz oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 i wobec antygenu EB1 w osoczu i w kale.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; udział w przygotowaniu manuskryptu.</p>
Weronika Beta	8%	<p>Wsparcie techniczne w procesowaniu próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach miana fagów w próbkach krwi i kału metodami mikrobiologicznymi i oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p> <p>Produkcja rekombinowanego białka gp12 w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanego produktu białkowego.</p>
Dorota Lecion	6%	<p>Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Mikrobiologiczna ocena próbek kału myszy immunizowanych <i>per os</i> preparatem faga T4 pod kątem obecności wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w szczególności <i>E. coli</i>. Przygotowanie izolatów do identyfikacji metodą spektrometrii masowej. Ocena izolatów <i>E. coli</i> pod kątem wrażliwości na bakteriofaga T4.</p>
Katarzyna Hodyra-Stefaniak	4%	<p>Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p>

Anna Kłopot	4%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych.
Zuzanna Kaźmierczak	3%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Paulina Miernikiewicz	3%	Przeprowadzenie podskórnej immunizacji myszy preparatem faga T4 oraz doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp12, Hoc i Soc. Udział w analizie danych eksperymentalnych.
Agnieszka Piotrowicz	3%	Przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Udział w produkcji rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczaniu uzyskanych produktów białkowych.
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białkowych polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatów faga T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Agnieszka Kopciuch	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatu faga EB1-T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Karolina Wojtyła	1%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt.
Marek Harhala	1%	Wsparcie merytoryczne w analizie statystycznej wyników, udział w przygotowaniu rycin Figure 1 i 3.
Mateusz Mąkosa	1%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy.
Krystyna Dąbrowska	13%	Przygotowanie konstruktów plazmidowych opartego o wektor ekspresyjny pCDF-Duet-1, wykorzystanego później w metodzie phage display do uzyskania bakteriofaga T4 prezentującego antygen EB1 w fuzji z białkiem Hoc. Koncepcja i projekt doświadczeń, nadzór nad planowaniem i przebiegiem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, przygotowanie tekstu manuskryptu.

Krystyna Dąbrowska
(podpis)

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Ciekot J, Owczarek B, Kopciuch A, Wojtyna K, Harhala M, Mąkosza M, Dąbrowska K. *Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood*. *Viruses*, 2015, 7(8):4783-99

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	50%	<p>Przygotowanie lizatów faga T4 oraz – w oparciu o kompetywny phage display – lizatu faga EB1-T4 prezentującego antygen peptydowy w fuzji z białkiem Hoc; oczyszczanie preparatów fagowych metodą powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej; potwierdzenie obecności antygeny EB1 na powierzchni faga EB1-T4 (ELISA); wykonanie oznaczeń poziomu endotoksyn w oczyszczonych preparatach fagowych.</p> <p>Nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy wyższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi; wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 we krwi (IgG, IgM) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy immunizowanych (ELISA) w zależności od dawki i drogi podania preparatu fagowego.</p> <p>Immunizacja myszy modyfikowanym bakteriofagiem T4 prezentującym na powierzchni kapsydu wirusowy antygen peptydowy EB1, pobieranie próbek oraz oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 i wobec antygeny EB1 w osoczu i w kale.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; udział w przygotowaniu manuskryptu.</p>
Weronika Beta	8%	<p>Wsparcie techniczne w procesowaniu próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach miana fagów w próbkach krwi i kału metodami mikrobiologicznymi i oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p> <p>Produkcja rekombinowanego białka gp12 w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanego produktu białkowego.</p>
Dorota Lecion	6%	<p>Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Mikrobiologiczna ocena próbek kału myszy immunizowanych <i>per os</i> preparatem faga T4 pod kątem obecności wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w szczególności <i>E. coli</i>. Przygotowanie izolatów do identyfikacji metodą spektrometrii masowej. Ocena izolatów <i>E. coli</i> pod kątem wrażliwości na bakteriofaga T4.</p>
Katarzyna Hodyra-Stefaniak	4%	<p>Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p>

Anna Kłopot	4%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych.
Zuzanna Kaźmierczak	3%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Paulina Miernikiewicz	3%	Przeprowadzenie podskórnej immunizacji myszy preparatem faga T4 oraz doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp12, Hoc i Soc. Udział w analizie danych eksperymentalnych.
Agnieszka Piotrowicz	3%	Przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Udział w produkcji rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczaniu uzyskanych produktów białkowych.
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białkowych polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatów faga T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Agnieszka Kopciuch	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatu faga EB1-T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Karolina Wojtyna	1%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt.
Marek Harhala	1%	Wsparcie merytoryczne w analizie statystycznej wyników, udział w przygotowaniu rycin Figure 1 i 3.
Mateusz Mąkosa	1%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy.
Krystyna Dąbrowska	13%	Przygotowanie konstruktów plazmidowego opartego o wektor ekspresyjny pCDF-Duet-1, wykorzystanego później w metodzie phage display do uzyskania bakteriofaga T4 prezentującego antygen EB1 w fuzji z białkiem Hoc. Koncepcja i projekt doświadczeń, nadzór nad planowaniem i przebiegiem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, przygotowanie tekstu manuskryptu.

Anna Kłopot

(podpis)

Ośrodek Badawczo-Rozwojowy
Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu
ul. H. Kamińskiego 73a
51-124 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Ciekot J, Owczarek B, Kopcuch A, Wojtyna K, Harhala M, Mąkosza M, Dąbrowska K. *Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood*. *Viruses*, 2015, 7(8):4783-99

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	50%	<p>Przygotowanie lizatów faga T4 oraz – w oparciu o kompetytywny phage display – lizatu faga EB1-T4 prezentującego antygen peptydowy w fuzji z białkiem Hoc; oczyszczanie preparatów fagowych metodą powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej; potwierdzenie obecności antygeny EB1 na powierzchni faga EB1-T4 (ELISA); wykonanie oznaczeń poziomu endotoksyn w oczyszczonych preparatach fagowych.</p> <p>Nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy wyższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi; wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 we krwi (IgG, IgM) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy immunizowanych (ELISA) w zależności od dawki i drogi podania preparatu fagowego.</p> <p>Immunizacja myszy modyfikowanym bakteriofagiem T4 prezentującym na powierzchni kapsydu wirusowy antygen peptydowy EB1, pobieranie próbek oraz oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 i wobec antygeny EB1 w osoczu i w kale.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; udział w przygotowaniu manuskryptu.</p>
Weronika Beta	8%	<p>Wsparcie techniczne w procesowaniu próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach miana fagów w próbkach krwi i kału metodami mikrobiologicznymi i oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p> <p>Produkcja rekombinowanego białka gp12 w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanego produktu białkowego.</p>
Dorota Lecion	6%	<p>Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Mikrobiologiczna ocena próbek kału myszy immunizowanych <i>per os</i> preparatem faga T4 pod kątem obecności wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w szczególności <i>E. coli</i>. Przygotowanie izolatów do identyfikacji metodą spektrometrii masowej. Ocena izolatów <i>E. coli</i> pod kątem wrażliwości na bakteriofaga T4.</p>

Katarzyna Hodyra-Stefaniak	4%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Anna Kłopot	4%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych.
Zuzanna Kaźmierczak	3%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Paulina Miernikiewicz	3%	Przeprowadzenie podskórnej immunizacji myszy preparatem faga T4 oraz doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp12, Hoc i Soc. Udział w analizie danych eksperymentalnych.
Agnieszka Piotrowicz	3%	Przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Udział w produkcji rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczaniu uzyskanych produktów białkowych.
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białkowych polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatów faga T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Agnieszka Kopciuch	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatu faga EB1-T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Karolina Wojtyna	1%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt.
Marek Harhala	1%	Wsparcie merytoryczne w analizie statystycznej wyników, udział w przygotowaniu rycin Figure 1 i 3.
Mateusz Mąkosa	1%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy.
Krystyna Dąbrowska	13%	Przygotowanie konstruktów plazmidowych opartego o wektor ekspresyjny pCDF-Duet-1, wykorzystanego później w metodzie phage display do uzyskania bakteriofaga T4 prezentującego antygen EB1 w fuzji z białkiem Hoc. Koncepcja i projekt doświadczeń, nadzór nad planowaniem i przebiegiem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, przygotowanie tekstu manuskryptu.

Zuzanna Kaźmierczak

(podpis)

Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Ciekot J, Owczarek B, Kopciuch A, Wojtyna K, Harhala M, Mąkosza M, Dąbrowska K. *Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood*. *Viruses*, 2015, 7(8):4783-99

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	50%	<p>Przygotowanie lizatów faga T4 oraz – w oparciu o kompetywny phage display – lizatu faga EB1-T4 prezentującego antygen peptydowy w fuzji z białkiem Hoc; oczyszczanie preparatów fagowych metodą powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej; potwierdzenie obecności antygenu EB1 na powierzchni faga EB1-T4 (ELISA); wykonanie oznaczeń poziomu endotoksyn w oczyszczonych preparatach fagowych.</p> <p>Nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy wyższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi; wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 we krwi (IgG, IgM) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy immunizowanych (ELISA) w zależności od dawki i drogi podania preparatu fagowego.</p> <p>Immunizacja myszy modyfikowanym bakteriofagiem T4 prezentującym na powierzchni kapsydu wirusowy antygen peptydowy EB1, pobieranie próbek oraz oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 i wobec antygenu EB1 w osoczu i w kale.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; udział w przygotowaniu manuskryptu.</p>
Weronika Beta	8%	<p>Wsparcie techniczne w procesowaniu próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach miana fagów w próbkach krwi i kału metodami mikrobiologicznymi i oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p> <p>Produkcja rekombinowanego białka gp12 w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanego produktu białkowego.</p>
Dorota Lecion	6%	<p>Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Mikrobiologiczna ocena próbek kału myszy immunizowanych <i>per os</i> preparatem faga T4 pod kątem obecności wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w szczególności <i>E. coli</i>. Przygotowanie izolatów do identyfikacji metodą spektrometrii masowej. Ocena izolatów <i>E. coli</i> pod kątem wrażliwości na bakteriofaga T4.</p>

Katarzyna Hodyra-Stefaniak	4%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Anna Kłopot	4%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych.
Zuzanna Kaźmierczak	3%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Paulina Miernikiewicz	3%	Przeprowadzenie podskórnej immunizacji myszy preparatem faga T4 oraz doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp12, Hoc i Soc. Udział w analizie danych eksperymentalnych.
Agnieszka Piotrowicz	3%	Przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Udział w produkcji rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczaniu uzyskanych produktów białkowych.
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białkowych polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatów faga T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Agnieszka Kopciuch	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatu faga EB1-T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Karolina Wojtyna	1%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt.
Marek Harhala	1%	Wsparcie merytoryczne w analizie statystycznej wyników, udział w przygotowaniu rycin Figure 1 i 3.
Mateusz Mąkosa	1%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy.
Krystyna Dąbrowska	13%	Przygotowanie konstruktów plazmidowego opartego o wektor ekspresyjny pCDF-Duet-1, wykorzystanego później w metodzie phage display do uzyskania bakteriofaga T4 prezentującego antygen EB1 w fuzji z białkiem Hoc. Koncepcja i projekt doświadczeń, nadzór nad planowaniem i przebiegiem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, przygotowanie tekstu manuskryptu.

Paulina Miernikiewicz

(podpis)

(brak afiliacji)

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Ciekot J, Owczarek B, Kopciuch A, Wojtyna K, Harhala M, Mąkosza M, Dąbrowska K. *Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood*. *Viruses*, 2015, 7(8):4783-99

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	50%	<p>Przygotowanie lizatów faga T4 oraz – w oparciu o kompetytywny phage display – lizatu faga EB1-T4 prezentującego antygen peptydowy w fuzji z białkiem Hoc; oczyszczanie preparatów fagowych metodą powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej; potwierdzenie obecności antygeny EB1 na powierzchni faga EB1-T4 (ELISA); wykonanie oznaczeń poziomu endotoksyn w oczyszczonych preparatach fagowych.</p> <p>Nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy wyższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi; wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 we krwi (IgG, IgM) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy immunizowanych (ELISA) w zależności od dawki i drogi podania preparatu fagowego.</p> <p>Immunizacja myszy modyfikowanym bakteriofagiem T4 prezentującym na powierzchni kapsydu wirusowy antygen peptydowy EB1, pobieranie próbek oraz oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 i wobec antygeny EB1 w osoczu i w kale.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; udział w przygotowaniu manuskryptu.</p>
Weronika Beta	8%	<p>Wsparcie techniczne w procesowaniu próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach miana fagów w próbkach krwi i kału metodami mikrobiologicznymi i oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p> <p>Produkcja rekombinowanego białka gp12 w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanego produktu białkowego.</p>
Dorota Lecion	6%	<p>Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Mikrobiologiczna ocena próbek kału myszy immunizowanych <i>per os</i> preparatem faga T4 pod kątem obecności wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w szczególności <i>E. coli</i>. Przygotowanie izolatów do identyfikacji metodą spektrometrii masowej. Ocena izolatów <i>E. coli</i> pod kątem wrażliwości na bakteriofaga T4.</p>
Katarzyna Hodyra-Stefaniak	4%	<p>Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p>

A. Konopka

Anna Kłopot	4%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych.
Zuzanna Kaźmierczak	3%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Paulina Miernikiewicz	3%	Przeprowadzenie podskórnej immunizacji myszy preparatem faga T4 oraz doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp12, Hoc i Soc. Udział w analizie danych eksperymentalnych.
Agnieszka Piotrowicz	3%	Przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Udział w produkcji rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczaniu uzyskanych produktów białkowych.
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białkowych polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatów faga T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Agnieszka Kopciuch	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatu faga EB1-T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Karolina Wojtyna	1%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt.
Marek Harhala	1%	Wsparcie merytoryczne w analizie statystycznej wyników, udział w przygotowaniu rycin Figure 1 i 3.
Mateusz Mąkosa	1%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy.
Krystyna Dąbrowska	13%	Przygotowanie konstruktów plazmidowego opartego o wektor ekspresyjny pCDF-Duet-1, wykorzystanego później w metodzie phage display do uzyskania bakteriofaga T4 prezentującego antygen EB1 w fuzji z białkiem Hoc. Koncepcja i projekt doświadczeń, nadzór nad planowaniem i przebiegiem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, przygotowanie tekstu manuskryptu.

A. Kłopotka.....

(podpis)

Laboratorium Chemii Biomedycznej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Ciekot J, Owczarek B, Kopciuch A, Wojtyna K, Harhala M, Mąkosza M, Dąbrowska K. *Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood*. *Viruses*, 2015, 7(8):4783-99

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	50%	<p>Przygotowanie lizatów faga T4 oraz – w oparciu o kompetywny phage display – lizatu faga EB1-T4 prezentującego antygen peptydowy w fuzji z białkiem Hoc; oczyszczanie preparatów fagowych metodą powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej; potwierdzenie obecności antygenu EB1 na powierzchni faga EB1-T4 (ELISA); wykonanie oznaczeń poziomu endotoksyn w oczyszczonych preparatach fagowych.</p> <p>Nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy wyższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi; wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 we krwi (IgG, IgM) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy immunizowanych (ELISA) w zależności od dawki i drogi podania preparatu fagowego.</p> <p>Immunizacja myszy modyfikowanym bakteriofagiem T4 prezentującym na powierzchni kapsydu wirusowy antygen peptydowy EB1, pobieranie próbek oraz oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 i wobec antygenu EB1 w osoczu i w kale.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; udział w przygotowaniu manuskryptu.</p>
Weronika Beta	8%	<p>Wsparcie techniczne w procesowaniu próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach miana fagów w próbkach krwi i kału metodami mikrobiologicznymi i oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p> <p>Produkcja rekombinowanego białka gp12 w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanego produktu białkowego.</p>
Dorota Lecion	6%	<p>Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Mikrobiologiczna ocena próbek kału myszy immunizowanych <i>per os</i> preparatem faga T4 pod kątem obecności wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w szczególności <i>E. coli</i>. Przygotowanie izolatów do identyfikacji metodą spektrometrii masowej. Ocena izolatów <i>E. coli</i> pod kątem wrażliwości na bakteriofaga T4.</p>

JC

Katarzyna Hodyra-Stefaniak	4%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Anna Kłopot	4%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych.
Zuzanna Kaźmierczak	3%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Paulina Miernikiewicz	3%	Przeprowadzenie podskórnej immunizacji myszy preparatem faga T4 oraz doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp12, Hoc i Soc. Udział w analizie danych eksperymentalnych.
Agnieszka Piotrowicz	3%	Przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Udział w produkcji rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczaniu uzyskanych produktów białkowych.
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białkowych polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatów faga T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Agnieszka Kopciuch	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatu faga EB1-T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Karolina Wojtyna	1%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt.
Marek Harhala	1%	Wsparcie merytoryczne w analizie statystycznej wyników, udział w przygotowaniu rycin Figure 1 i 3.
Mateusz Mąkosa	1%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy.
Krystyna Dąbrowska	13%	Przygotowanie konstruktów plazmidowych opartego o wektor ekspresyjny pCDF-Duet-1, wykorzystanego później w metodzie phage display do uzyskania bakteriofaga T4 prezentującego antygen EB1 w fuzji z białkiem Hoc. Koncepcja i projekt doświadczeń, nadzór nad planowaniem i przebiegiem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, przygotowanie tekstu manuskryptu.

.....

 (podpis)

Laboratorium Bakteriofagowe
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Ciekot J, Owczarek B, Kopciuch A, Wojtyna K, Harhala M, Mąkosza M, Dąbrowska K.
Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood.
Viruses, 2015, 7(8):4783-99

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	50%	Przygotowanie lizatów faga T4 oraz – w oparciu o kompetytywny phage display – lizatu faga EB1-T4 prezentującego antygen peptydowy w fuzji z białkiem Hoc; oczyszczanie preparatów fagowych metodą powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej; potwierdzenie obecności antygeny EB1 na powierzchni faga EB1-T4 (ELISA); wykonanie oznaczeń poziomu endotoksyn w oczyszczonych preparatach fagowych. Nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy wyższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi; wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 we krwi (IgG, IgM) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy immunizowanych (ELISA) w zależności od dawki i drogi podania preparatu fagowego. Immunizacja myszy modyfikowanym bakteriofagiem T4 prezentującym na powierzchni kapsydu wirusowy antygen peptydowy EB1, pobieranie próbek oraz oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 i wobec antygeny EB1 w osoczu i w kale. Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; udział w przygotowaniu manuskryptu.
Weronika Beta	8%	Wsparcie techniczne w procesowaniu próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach miana fagów w próbkach krwi i kału metodami mikrobiologicznymi i oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy. Produkcja rekombinowanego białka gp12 w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanego produktu białkowego.
Dorota Lecion	6%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Mikrobiologiczna ocena próbek kału myszy immunizowanych <i>per os</i> preparatem faga T4 pod kątem obecności wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w szczególności <i>E. coli</i> . Przygotowanie izolatów do identyfikacji metodą spektrometrii masowej. Ocena izolatów <i>E. coli</i> pod kątem wrażliwości na bakteriofaga T4.

Katarzyna Hodyra-Stefaniak	4%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Anna Kłopot	4%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych.
Zuzanna Kaźmierczak	3%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Paulina Miernikiewicz	3%	Przeprowadzenie podskórnej immunizacji myszy preparatem faga T4 oraz doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp12, Hoc i Soc. Udział w analizie danych eksperymentalnych.
Agnieszka Piotrowicz	3%	Przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Udział w produkcji rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczaniu uzyskanych produktów białkowych.
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białkowych polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatów faga T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Agnieszka Kopciuch	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatu faga EB1-T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Karolina Wojtyna	1%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt.
Marek Harhala	1%	Wsparcie merytoryczne w analizie statystycznej wyników, udział w przygotowaniu rycin Figure 1 i 3.
Mateusz Mąkosa	1%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy.
Krystyna Dąbrowska	13%	Przygotowanie konstruktów plazmidowych opartego o wektor ekspresyjny pCDF-Duet-1, wykorzystanego później w metodzie phage display do uzyskania bakteriofaga T4 prezentującego antygen EB1 w fuzji z białkiem Hoc. Koncepcja i projekt doświadczeń, nadzór nad planowaniem i przebiegiem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, przygotowanie tekstu manuskryptu.

.....
Owczarek
 (podpis)

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Ciekot J, Owczarek B, Kopciuch A, Wojtyna K, Harhala M, Mąkosza M, Dąbrowska K.
Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood.
Viruses, 2015, 7(8):4783-99

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	50%	<p>Przygotowanie lizatów faga T4 oraz – w oparciu o kompetytywny phage display – lizatu faga EB1-T4 prezentującego antygen peptydowy w fuzji z białkiem Hoc; oczyszczanie preparatów fagowych metodą powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej; potwierdzenie obecności antygeny EB1 na powierzchni faga EB1-T4 (ELISA); wykonanie oznaczeń poziomu endotoksyn w oczyszczonych preparatach fagowych.</p> <p>Nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy wyższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi; wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 we krwi (IgG, IgM) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy immunizowanych (ELISA) w zależności od dawki i drogi podania preparatu fagowego.</p> <p>Immunizacja myszy modyfikowanym bakteriofagiem T4 prezentującym na powierzchni kapsydu wirusowy antygen peptydowy EB1, pobieranie próbek oraz oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 i wobec antygeny EB1 w osoczu i w kale.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; udział w przygotowaniu manuskryptu.</p>
Weronika Beta	8%	<p>Wsparcie techniczne w procesowaniu próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach miana fagów w próbkach krwi i kału metodami mikrobiologicznymi i oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p> <p>Produkcja rekombinowanego białka gp12 w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanego produktu białkowego.</p>
Dorota Lecion	6%	<p>Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Mikrobiologiczna ocena próbek kału myszy immunizowanych <i>per os</i> preparatem faga T4 pod kątem obecności wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w szczególności <i>E. coli</i>. Przygotowanie izolatów do identyfikacji metodą spektrometrii masowej. Ocena izolatów <i>E. coli</i> pod kątem wrażliwości na bakteriofaga T4.</p>
Katarzyna Hodyra-Stefaniak	4%	<p>Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p>

Anna Kłopot	4%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych.
Zuzanna Kaźmierczak	3%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Paulina Miernikiewicz	3%	Przeprowadzenie podskórnej immunizacji myszy preparatem faga T4 oraz doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp12, Hoc i Soc. Udział w analizie danych eksperymentalnych.
Agnieszka Piotrowicz	3%	Przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Udział w produkcji rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczaniu uzyskanych produktów białkowych.
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białkowych polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatów faga T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Agnieszka Kopciuch	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatu faga EB1-T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Karolina Wojtyna	1%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt.
Marek Harhala	1%	Wsparcie merytoryczne w analizie statystycznej wyników, udział w przygotowaniu rycin Figure 1 i 3.
Mateusz Mąkosa	1%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy.
Krystyna Dąbrowska	13%	Przygotowanie konstruktu plazmidowego opartego o wektor ekspresyjny pCDF-Duet-1, wykorzystanego później w metodzie phage display do uzyskania bakteriofaga T4 prezentującego antygen EB1 w fuzji z białkiem Hoc. Koncepcja i projekt doświadczeń, nadzór nad planowaniem i przebiegiem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, przygotowanie tekstu manuskryptu.

Agnieszka Kopciuch

(podpis)

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Ciekot J, Owczarek B, Kopciuch A, Wojtyna K, Harhala M, Mąkosza M, Dąbrowska K. *Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood*. *Viruses*, 2015, 7(8):4783-99

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	50%	<p>Przygotowanie lizatów faga T4 oraz – w oparciu o kompetytywny phage display – lizatu faga EB1-T4 prezentującego antygen peptydowy w fuzji z białkiem Hoc; oczyszczanie preparatów fagowych metodą powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej; potwierdzenie obecności antygenu EB1 na powierzchni faga EB1-T4 (ELISA); wykonanie oznaczeń poziomu endotoksyn w oczyszczonych preparatach fagowych.</p> <p>Nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy wyższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi; wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 we krwi (IgG, IgM) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy immunizowanych (ELISA) w zależności od dawki i drogi podania preparatu fagowego.</p> <p>Immunizacja myszy modyfikowanym bakteriofagiem T4 prezentującym na powierzchni kapsydu wirusowy antygen peptydowy EB1, pobieranie próbek oraz oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 i wobec antygenu EB1 w osoczu i w kale.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; udział w przygotowaniu manuskryptu.</p>
Weronika Beta	8%	<p>Wsparcie techniczne w procesowaniu próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach miana fagów w próbkach krwi i kału metodami mikrobiologicznymi i oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p> <p>Produkcja rekombinowanego białka gp12 w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanego produktu białkowego.</p>
Dorota Lecion	6%	<p>Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Mikrobiologiczna ocena próbek kału myszy immunizowanych <i>per os</i> preparatem faga T4 pod kątem obecności wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w szczególności <i>E. coli</i>. Przygotowanie izolatów do identyfikacji metodą spektrometrii masowej. Ocena izolatów <i>E. coli</i> pod kątem wrażliwości na bakteriofaga T4.</p>
Katarzyna Hodyra-Stefaniak	4%	<p>Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p>

Anna Kłopot	4%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych.
Zuzanna Kaźmierczak	3%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Paulina Miernikiewicz	3%	Przeprowadzenie podskórnej immunizacji myszy preparatem faga T4 oraz doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp12, Hoc i Soc. Udział w analizie danych eksperymentalnych.
Agnieszka Piotrowicz	3%	Przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Udział w produkcji rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczaniu uzyskanych produktów białkowych.
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białkowych polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatów faga T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Agnieszka Kopciuch	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatu faga EB1-T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Karolina Wojtyła	1%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt.
Marek Harhala	1%	Wsparcie merytoryczne w analizie statystycznej wyników, udział w przygotowaniu rycin Figure 1 i 3.
Mateusz Mąkosa	1%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy.
Krystyna Dąbrowska	13%	Przygotowanie konstruktów plazmidowego opartego o wektor ekspresyjny pCDF-Duet-1, wykorzystanego później w metodzie phage display do uzyskania bakteriofaga T4 prezentującego antygen EB1 w fuzji z białkiem Hoc. Koncepcja i projekt doświadczeń, nadzór nad planowaniem i przebiegiem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, przygotowanie tekstu manuskryptu.

Karolina Wojtyła

 (podpis)

Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Ciekot J, Owczarek B, Kopciuch A, Wojtyna K, Harhala M, Mąkosza M, Dąbrowska K. *Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood*. *Viruses*, 2015, 7(8):4783-99

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	50%	<p>Przygotowanie lizatów faga T4 oraz – w oparciu o kompetytywny phage display – lizatu faga EB1-T4 prezentującego antygen peptydowy w fuzji z białkiem Hoc; oczyszczanie preparatów fagowych metodą powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej; potwierdzenie obecności antygenu EB1 na powierzchni faga EB1-T4 (ELISA); wykonanie oznaczeń poziomu endotoksyn w oczyszczonych preparatach fagowych.</p> <p>Nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy wyższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi; wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 we krwi (IgG, IgM) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy immunizowanych (ELISA) w zależności od dawki i drogi podania preparatu fagowego.</p> <p>Immunizacja myszy modyfikowanym bakteriofagiem T4 prezentującym na powierzchni kapsydu wirusowy antygen peptydowy EB1, pobieranie próbek oraz oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 i wobec antygenu EB1 w osoczu i w kale.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; udział w przygotowaniu manuskryptu.</p>
Weronika Beta	8%	<p>Wsparcie techniczne w procesowaniu próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach miana fagów w próbkach krwi i kału metodami mikrobiologicznymi i oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p> <p>Produkcja rekombinowanego białka gp12 w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanego produktu białkowego.</p>
Dorota Lecion	6%	<p>Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Mikrobiologiczna ocena próbek kału myszy immunizowanych <i>per os</i> preparatem faga T4 pod kątem obecności wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w szczególności <i>E. coli</i>. Przygotowanie izolatów do identyfikacji metodą spektrometrii masowej. Ocena izolatów <i>E. coli</i> pod kątem wrażliwości na bakteriofaga T4.</p>

Katarzyna Hodyra-Stefaniak	4%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Anna Kłopot	4%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych.
Zuzanna Kaźmierczak	3%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Paulina Miernikiewicz	3%	Przeprowadzenie podskórnej immunizacji myszy preparatem faga T4 oraz doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp12, Hoc i Soc. Udział w analizie danych eksperymentalnych.
Agnieszka Piotrowicz	3%	Przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Udział w produkcji rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczaniu uzyskanych produktów białkowych.
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białkowych polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatów faga T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Agnieszka Kopciuch	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatu faga EB1-T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Karolina Wojtyna	1%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt.
Marek Harhala	1%	Wsparcie merytoryczne w analizie statystycznej wyników, udział w przygotowaniu rycin Figure 1 i 3.
Mateusz Mąkosa	1%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy.
Krystyna Dąbrowska	13%	Przygotowanie konstruktów plazmidowych opartego o wektor ekspresyjny pCDF-Duet-1, wykorzystanego później w metodzie phage display do uzyskania bakteriofaga T4 prezentującego antygen EB1 w fuzji z białkiem Hoc. Koncepcja i projekt doświadczeń, nadzór nad planowaniem i przebiegiem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, przygotowanie tekstu manuskryptu.


(podpis)

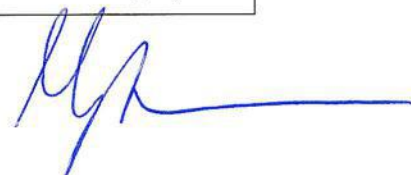
Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Ciekot J, Owczarek B, Kopciuch A, Wojtyna K, Harhala M, Mąkosza M, Dąbrowska K. *Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood.* Viruses, 2015, 7(8):4783-99

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	50%	<p>Przygotowanie lizatów faga T4 oraz – w oparciu o kompetytywny phage display – lizatu faga EB1-T4 prezentującego antygen peptydowy w fuzji z białkiem Hoc; oczyszczanie preparatów fagowych metodą powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej; potwierdzenie obecności antygenu EB1 na powierzchni faga EB1-T4 (ELISA); wykonanie oznaczeń poziomu endotoksyn w oczyszczonych preparatach fagowych.</p> <p>Nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy wyższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi; wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 we krwi (IgG, IgM) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy immunizowanych (ELISA) w zależności od dawki i drogi podania preparatu fagowego.</p> <p>Immunizacja myszy modyfikowanym bakteriofagiem T4 prezentującym na powierzchni kapsydu wirusowy antygen peptydowy EB1, pobieranie próbek oraz oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 i wobec antygenu EB1 w osoczu i w kale.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; udział w przygotowaniu manuskryptu.</p>
Weronika Beta	8%	<p>Wsparcie techniczne w procesowaniu próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach miana fagów w próbkach krwi i kału metodami mikrobiologicznymi i oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p> <p>Produkcja rekombinowanego białka gp12 w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanego produktu białkowego.</p>
Dorota Lecion	6%	<p>Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Mikrobiologiczna ocena próbek kału myszy immunizowanych <i>per os</i> preparatem faga T4 pod kątem obecności wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w szczególności <i>E. coli</i>. Przygotowanie izolatów do identyfikacji metodą spektrometrii masowej. Ocena izolatów <i>E. coli</i> pod kątem wrażliwości na bakteriofaga T4.</p>
Katarzyna Hodyra-Stefaniak	4%	<p>Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p>



Anna Kłopot	4%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych.
Zuzanna Kaźmierczak	3%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Paulina Miernikiewicz	3%	Przeprowadzenie podskórnej immunizacji myszy preparatem faga T4 oraz doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp12, Hoc i Soc. Udział w analizie danych eksperymentalnych.
Agnieszka Piotrowicz	3%	Przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Udział w produkcji rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczaniu uzyskanych produktów białkowych.
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białkowych polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatów faga T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Agnieszka Kopciuch	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatu faga EB1-T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Karolina Wojtyła	1%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt.
Marek Harhala	1%	Wsparcie merytoryczne w analizie statystycznej wyników, udział w przygotowaniu rycin Figure 1 i 3.
Mateusz Mąkosa	1%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy.
Krystyna Dąbrowska	13%	Przygotowanie konstruktów plazmidowych opartego o wektor ekspresyjny pCDF-Duet-1, wykorzystanego później w metodzie phage display do uzyskania bakteriofaga T4 prezentującego antygen EB1 w fuzji z białkiem Hoc. Koncepcja i projekt doświadczeń, nadzór nad planowaniem i przebiegiem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, przygotowanie tekstu manuskryptu.

Mateusz Mąkosa

(podpis)

Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Oświadczenie

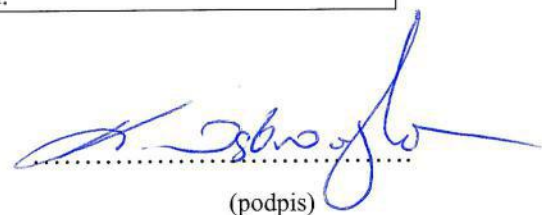
Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Ciekot J, Owczarek B, Kopciuch A, Wojtyna K, Harhala M, Mąkosza M, Dąbrowska K. *Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood*. *Viruses*, 2015, 7(8):4783-99

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	50%	<p>Przygotowanie lizatów faga T4 oraz – w oparciu o kompetytywny phage display – lizatu faga EB1-T4 prezentującego antygen peptydowy w fuzji z białkiem Hoc; oczyszczanie preparatów fagowych metodą powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej; potwierdzenie obecności antygenu EB1 na powierzchni faga EB1-T4 (ELISA); wykonanie oznaczeń poziomu endotoksyn w oczyszczonych preparatach fagowych.</p> <p>Nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy wyższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi; wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 we krwi (IgG, IgM) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy immunizowanych (ELISA) w zależności od dawki i drogi podania preparatu fagowego.</p> <p>Immunizacja myszy modyfikowanym bakteriofagiem T4 prezentującym na powierzchni kapsydu wirusowy antygen peptydowy EB1, pobieranie próbek oraz oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 i wobec antygenu EB1 w osoczu i w kale.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; udział w przygotowaniu manuskryptu.</p>
Weronika Beta	8%	<p>Wsparcie techniczne w procesowaniu próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach miana fagów w próbkach krwi i kału metodami mikrobiologicznymi i oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.</p> <p>Produkcja rekombinowanego białka gp12 w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanego produktu białkowego.</p>
Dorota Lecion	6%	<p>Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Mikrobiologiczna ocena próbek kału myszy immunizowanych <i>per os</i> preparatem faga T4 pod kątem obecności wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w szczególności <i>E. coli</i>. Przygotowanie izolatów do identyfikacji metodą spektrometrii masowej. Ocena izolatów <i>E. coli</i> pod kątem wrażliwości na bakteriofaga T4.</p>

Katarzyna Hodyra-Stefaniak	4%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Anna Kłopot	4%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych.
Zuzanna Kaźmierczak	3%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu i kale myszy.
Paulina Miernikiewicz	3%	Przeprowadzenie podskórnej immunizacji myszy preparatem faga T4 oraz doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp12, Hoc i Soc. Udział w analizie danych eksperymentalnych.
Agnieszka Piotrowicz	3%	Przeprowadzenie doświadczenia immunizacji myszy niższą dawką preparatu faga T4 podawanego w wodzie pitnej. Udział w produkcji rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, Hoc i Soc w systemie bakteryjnym i oczyszczaniu uzyskanych produktów białkowych.
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białkowych polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatów faga T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Agnieszka Kopciuch	1%	Wykonanie etapu wstępnego oczyszczania lizatu faga EB1-T4 polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Sepharose 4B.
Karolina Wojtyna	1%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt.
Marek Harhala	1%	Wsparcie merytoryczne w analizie statystycznej wyników, udział w przygotowaniu rycin Figure 1 i 3.
Mateusz Mąkosa	1%	Wsparcie techniczne w wykonaniu doświadczeń mających na celu oznaczenie poziomu przeciwciał swoistych wobec faga T4 w osoczu myszy.
Krystyna Dąbrowska	13%	Przygotowanie konstruktów plazmidowego opartego o wektor ekspresyjny pCDF-Duet-1, wykorzystanego później w metodzie phage display do uzyskania bakteriofaga T4 prezentującego antygen EB1 w fuzji z białkiem Hoc. Koncepcja i projekt doświadczeń, nadzór nad planowaniem i przebiegiem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, przygotowanie tekstu manuskryptu.



(podpis)

Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:


Majewska J, Kaźmierczak Z, Lahutta K, Lecion D, Szymczak A, Miernikiewicz P, Drapała J, Harhala M, Marek-Bukowiec K, Jędruchiewicz N, Owczarek B, Górski A, Dąbrowska K. *Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered per os*. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10:2607

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	60%	<p>Przygotowywanie lizatów fagowych i oczyszczanie preparatów metodą dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej.</p> <p>Zaplanowanie, nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczeń immunizacji myszy preparatami bakteriofagów A3R i 676Z podawanymi w wodzie pitnej oraz doświadczeń dotyczących translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwi. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi (w trakcie immunizacji <i>per os</i> oraz w doświadczeniach związanych z translokacją bakteriofagów); wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów A3R i 676Z we krwi (IgG, IgM, IgA) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec fagów w osoczu myszy immunizowanych w zależności od drogi podania preparatów fagowych (ELISA) oraz blokującego wpływu próbek osocza myszy immunizowanych na aktywność fagów (łącznie z optymalizacją doświadczenia w celu doboru odpowiedniego rozcieńczenia osocza – Supplementary Figure 7).</p> <p>Udział w dootrzewnowej immunizacji myszy preparatami fagowymi oraz w immunizacjach służących uzyskaniu referencyjnych próbek osocza o wysokim poziomie przeciwciał swoistych wobec całych wirionów fagowych. Immunizacja myszy preparatem owoalbuminy w celu uzyskania surowicy referencyjnej.</p> <p>Analiza składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – izolacja DNA, amplifikacja regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowanie bibliotek i oznaczenie stężenia z wykorzystaniem qPCR, sekwencjonowanie NGS oraz analiza wyników.</p> <p>Wsparcie w procesie produkcji i oczyszczania rekombinowanych białek fagowych. Wykonanie pomiaru opłaszczenia dołków płytki 96-dołkowej preparatami białek fagowych i białka referencyjnego.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; przygotowanie tekstu manuskryptu.</p>

Zuzanna Kaźmierczak	8%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych. Dootrzewnowa immunizacja myszy preparatami fagowymi oraz immunizacja myszy preparatami fagowymi i preparatami rekombinowanych białek fagowych w celu uzyskania próbek referencyjnych.
Karolina Lahutta	3%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Dorota Lecion	3%	Wsparcie techniczne w przygotowywaniu lizatów fagowych oraz w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Ocena próbek kału pod kątem obecności bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i> metodami mikrobiologicznymi.
Aleksander Szymczak	2%	Udział w analizie składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – udział w izolacji DNA, amplifikacji regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowaniu i oznaczeniu stężenia bibliotek, sekwencjonowaniu NGS oraz analizie uzyskanych wyników.*
Paulina Miernikiewicz	2%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Jarosław Drapała	2%	Opracowanie modelu matematycznego translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwioobiegu oraz przygotowanie rycin związanych z modelem matematycznym (Supplementary Figure 3, 4 i 5).
Marek Harhala	1%	Opracowanie i optymalizacja metody oznaczania ilościowego białka związanego do powierzchni dołków płytki 96-dołkowej z wykorzystaniem CBQCA Protein Quantitation Kit.
Karolina Marek- Bukowiec	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent oraz analizy wyników.
Natalia Jędruchniewicz	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania lizatów fagowych i preparatów białek rekombinowanych w oparciu o chromatografię sitową oraz oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o chromatografię jonowymienną.
Andrzej Górski	1%	Wsparcie merytoryczne w przygotowaniu tekstu publikacji.
Krystyna Dąbrowska	15%	Koncepcja doświadczeń, nadzór nad planowaniem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* W publikacji przedstawiono reprezentatywne wyniki jednej z dwóch analiz mikrobiomu bakteryjnego wykonanej przez Joannę Majewską. Wyniki drugiej analizy (nieprzedstawione w niniejszej publikacji) wchodziły w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Aleksandra Szymczaka na Uniwersytecie Łódzkim we współpracy z IITD PAN i obronionej w 2018 roku.


(podpis)

Ośrodek Badawczo-Rozwojowy
Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu
ul. H. Kamińskiego 73a
51-124 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Kaźmierczak Z, Lahutta K, Lecion D, Szymczak A, Miernikiewicz P, Drapała J, Harhala M, Marek-Bukowiec K, Jędruchniewicz N, Owczarek B, Górski A, Dąbrowska K. *Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered per os*. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10:2607

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	60%	<p>Przygotowywanie lizatów fagowych i oczyszczanie preparatów metodą dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej.</p> <p>Zaplanowanie, nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczeń immunizacji myszy preparatami bakteriofagów A3R i 676Z podawanymi w wodzie pitnej oraz doświadczeń dotyczących translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwi. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi (w trakcie immunizacji <i>per os</i> oraz w doświadczeniach związanych z translokacją bakteriofagów); wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów A3R i 676Z we krwi (IgG, IgM, IgA) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec fagów w osoczu myszy immunizowanych w zależności od drogi podania preparatów fagowych (ELISA) oraz blokującego wpływu próbek osocza myszy immunizowanych na aktywność fagów (łącznie z optymalizacją doświadczenia w celu doboru odpowiedniego rozcieńczenia osocza – Supplementary Figure 7).</p> <p>Udział w dootrzewnowej immunizacji myszy preparatami fagowymi oraz w immunizacjach służących uzyskaniu referencyjnych próbek osocza o wysokim poziomie przeciwciał swoistych wobec całych wirionów fagowych. Immunizacja myszy preparatem owoalbuminy w celu uzyskania surowicy referencyjnej.</p> <p>Analiza składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – izolacja DNA, amplifikacja regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowanie bibliotek i oznaczenie stężenia z wykorzystaniem qPCR, sekwencjonowanie NGS oraz analiza wyników.</p> <p>Wsparcie w procesie produkcji i oczyszczania rekombinowanych białek fagowych. Wykonanie pomiaru oplaszczania dołków płytki 96-dołkowej preparatami białek fagowych i białka referencyjnego.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; przygotowanie tekstu manuskryptu.</p>

Zuzanna Każmierczak	8%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych. Dootrzewnowa immunizacja myszy preparatami fagowymi oraz immunizacja myszy preparatami fagowymi i preparatami rekombinowanych białek fagowych w celu uzyskania próbek referencyjnych.
Karolina Lahutta	3%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Dorota Lecion	3%	Wsparcie techniczne w przygotowywaniu lizatów fagowych oraz w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Ocena próbek kału pod kątem obecności bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i> metodami mikrobiologicznymi.
Aleksander Szymczak	2%	Udział w analizie składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – udział w izolacji DNA, amplifikacji regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowaniu i oznaczeniu stężenia bibliotek, sekwencjonowaniu NGS oraz analizie uzyskanych wyników.*
Paulina Miernikiewicz	2%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Jarosław Drapała	2%	Opracowanie modelu matematycznego translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwioobiegu oraz przygotowanie rycin związanych z modelem matematycznym (Supplementary Figure 3, 4 i 5).
Marek Harhala	1%	Opracowanie i optymalizacja metody oznaczania ilościowego białka związanego do powierzchni dołków płytki 96-dołkowej z wykorzystaniem CBQCA Protein Quantitation Kit.
Karolina Marek- Bukowiec	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent oraz analizy wyników.
Natalia Jędruchniewicz	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania lizatów fagowych i preparatów białek rekombinowanych w oparciu o chromatografię sitową oraz oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o chromatografię jonowymienną.
Andrzej Górski	1%	Wsparcie merytoryczne w przygotowaniu tekstu publikacji.
Krystyna Dąbrowska	15%	Koncepcja doświadczeń, nadzór nad planowaniem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* W publikacji przedstawiono reprezentatywne wyniki jednej z dwóch analiz mikrobiomu bakteryjnego wykonanej przez Joannę Majewską. Wyniki drugiej analizy (nieprzedstawione w niniejszej publikacji) wchodziły w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Aleksandra Szymczaka na Uniwersytecie Łódzkim we współpracy z IITD PAN i obronionej w 2018 roku.

Zuzanna Każmierczak

(podpis)

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Kaźmierczak Z, Lahutta K, Lecion D, Szymczak A, Miernikiewicz P, Drapała J, Harhala M, Marek-Bukowiec K, Jędruchniewicz N, Owczarek B, Górski A, Dąbrowska K. *Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered per os*. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10:2607

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	60%	<p>Przygotowywanie lizatów fagowych i oczyszczanie preparatów metodą dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej.</p> <p>Zaplanowanie, nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczeń immunizacji myszy preparatami bakteriofagów A3R i 676Z podawanymi w wodzie pitnej oraz doświadczeń dotyczących translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwi. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi (w trakcie immunizacji <i>per os</i> oraz w doświadczeniach związanych z translokacją bakteriofagów); wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów A3R i 676Z we krwi (IgG, IgM, IgA) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec fagów w osoczu myszy immunizowanych w zależności od drogi podania preparatów fagowych (ELISA) oraz blokującego wpływu próbek osocza myszy immunizowanych na aktywność fagów (łącznie z optymalizacją doświadczenia w celu doboru odpowiedniego rozcieńczenia osocza – Supplementary Figure 7).</p> <p>Udział w dootrzewnowej immunizacji myszy preparatami fagowymi oraz w immunizacjach służących uzyskaniu referencyjnych próbek osocza o wysokim poziomie przeciwciał swoistych wobec całych wirionów fagowych.</p> <p>Immunizacja myszy preparatem owoalbuminy w celu uzyskania surowicy referencyjnej.</p> <p>Analiza składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – izolacja DNA, amplifikacja regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowanie bibliotek i oznaczenie stężenia z wykorzystaniem qPCR, sekwencjonowanie NGS oraz analiza wyników.</p> <p>Wsparcie w procesie produkcji i oczyszczania rekombinowanych białek fagowych. Wykonanie pomiaru opłaszczenia dołków płytki 96-dołkowej preparatami białek fagowych i białka referencyjnego.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; przygotowanie tekstu manuskryptu.</p>
Zuzanna Kaźmierczak	8%	<p>Produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych.</p> <p>Dootrzewnowa immunizacja myszy preparatami fagowymi oraz immunizacja myszy preparatami fagowymi i preparatami rekombinowanych białek fagowych w celu uzyskania próbek referencyjnych.</p>

Karolina Lahutta	3%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Dorota Lecion	3%	Wsparcie techniczne w przygotowywaniu lizatów fagowych oraz w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Ocena próbek kału pod kątem obecności bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i> metodami mikrobiologicznymi.
Aleksander Szymczak	2%	Udział w analizie składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – udział w izolacji DNA, amplifikacji regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowaniu i oznaczeniu stężenia bibliotek, sekwencjonowaniu NGS oraz analizie uzyskanych wyników.*
Paulina Miernikiewicz	2%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Jarosław Drapała	2%	Opracowanie modelu matematycznego translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwioobrotu oraz przygotowanie rycin związanych z modelem matematycznym (Supplementary Figure 3, 4 i 5).
Marek Harhala	1%	Opracowanie i optymalizacja metody oznaczania ilościowego białka związanego do powierzchni dołków płytki 96-dołkowej z wykorzystaniem CBQCA Protein Quantitation Kit.
Karolina Marek-Bukowiec	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent oraz analizy wyników.
Natalia Jędruchniewicz	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania lizatów fagowych i preparatów białek rekombinowanych w oparciu o chromatografię sitową oraz oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o chromatografię jonowymienną.
Andrzej Górski	1%	Wsparcie merytoryczne w przygotowaniu tekstu publikacji.
Krystyna Dąbrowska	15%	Koncepcja doświadczeń, nadzór nad planowaniem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* W publikacji przedstawiono reprezentatywne wyniki jednej z dwóch analiz mikrobiomu bakteryjnego wykonanej przez Joannę Majewską. Wyniki drugiej analizy (nieprzedstawione w niniejszej publikacji) wchodziły w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Aleksandra Szymczaka na Uniwersytecie Łódzkim we współpracy z IITD PAN i obronionej w 2018 roku.

.....
Krzysztof Hojty
 (podpis)

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Kaźmierczak Z, Lahutta K, Lecion D, Szymczak A, Miernikiewicz P, Drapała J, Harhala M, Marek-Bukowiec K, Jędruchniewicz N, Owczarek B, Górski A, Dąbrowska K. *Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered per os*. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10:2607

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	60%	<p>Przygotowywanie lizatów fagowych i oczyszczanie preparatów metodą dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej.</p> <p>Zaplanowanie, nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczeń immunizacji myszy preparatami bakteriofagów A3R i 676Z podawanymi w wodzie pitnej oraz doświadczeń dotyczących translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwi. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi (w trakcie immunizacji <i>per os</i> oraz w doświadczeniach związanych z translokacją bakteriofagów); wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów A3R i 676Z we krwi (IgG, IgM, IgA) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec fagów w osoczu myszy immunizowanych w zależności od drogi podania preparatów fagowych (ELISA) oraz blokującego wpływu próbek osocza myszy immunizowanych na aktywność fagów (łącznie z optymalizacją doświadczenia w celu doboru odpowiedniego rozcieńczenia osocza – Supplementary Figure 7).</p> <p>Udział w dootrzewnowej immunizacji myszy preparatami fagowymi oraz w immunizacjach służących uzyskaniu referencyjnych próbek osocza o wysokim poziomie przeciwciał swoistych wobec całych wirionów fagowych. Immunizacja myszy preparatem owoalbuminy w celu uzyskania surowicy referencyjnej.</p> <p>Analiza składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – izolacja DNA, amplifikacja regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowanie bibliotek i oznaczenie stężenia z wykorzystaniem qPCR, sekwencjonowanie NGS oraz analiza wyników.</p> <p>Wsparcie w procesie produkcji i oczyszczania rekombinowanych białek fagowych. Wykonanie pomiaru opłaszczenia dołków płytki 96-dołkowej preparatami białek fagowych i białka referencyjnego.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; przygotowanie tekstu manuskryptu.</p>

Zuzanna Kaźmierczak	8%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych. Dootrzewnowa immunizacja myszy preparatami fagowymi oraz immunizacja myszy preparatami fagowymi i preparatami rekombinowanych białek fagowych w celu uzyskania próbek referencyjnych.
Karolina Lahutta	3%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Dorota Lecion	3%	Wsparcie techniczne w przygotowywaniu lizatów fagowych oraz w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Ocena próbek kału pod kątem obecności bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i> metodami mikrobiologicznymi.
Aleksander Szymczak	2%	Udział w analizie składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – udział w izolacji DNA, amplifikacji regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowaniu i oznaczeniu stężenia bibliotek, sekwencjonowaniu NGS oraz analizie uzyskanych wyników.*
Paulina Miernikiewicz	2%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Jarosław Drapała	2%	Opracowanie modelu matematycznego translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwioobiegu oraz przygotowanie rycin związanych z modelem matematycznym (Supplementary Figure 3, 4 i 5).
Marek Harhala	1%	Opracowanie i optymalizacja metody oznaczania ilościowego białka związanego do powierzchni dołków płytki 96-dołkowej z wykorzystaniem CBQCA Protein Quantitation Kit.
Karolina Marek-Bukowiec	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent oraz analizy wyników.
Natalia Jędruchniewicz	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania lizatów fagowych i preparatów białek rekombinowanych w oparciu o chromatografię sitową oraz oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o chromatografię jonowymienną.
Andrzej Górski	1%	Wsparcie merytoryczne w przygotowaniu tekstu publikacji.
Krystyna Dąbrowska	15%	Koncepcja doświadczeń, nadzór nad planowaniem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* W publikacji przedstawiono reprezentatywne wyniki jednej z dwóch analiz mikrobiomu bakteryjnego wykonanej przez Joannę Majewską. Wyniki drugiej analizy (nieprzedstawione w niniejszej publikacji) wchodziły w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Aleksandra Szymczaka na Uniwersytecie Łódzkim we współpracy z IITD PAN i obronionej w 2018 roku.

.....*D. Lecion*.....

(podpis)

Arthritis and Clinical Immunology Research Program
Oklahoma Medical Research Foundation
Oklahoma City, United States

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

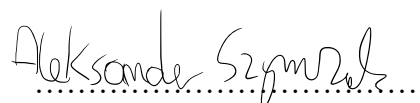
Majewska J, Kaźmierczak Z, Lahutta K, Lecion D, Szymczak A, Miernikiewicz P, Drapała J, Harhala M, Marek-Bukowiec K, Jędruchniewicz N, Owczarek B, Górski A, Dąbrowska K. *Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered per os*. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10:2607

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	60%	<p>Przygotowywanie lizatów fagowych i oczyszczanie preparatów metodą dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej.</p> <p>Zaplanowanie, nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczeń immunizacji myszy preparatami bakteriofagów A3R i 676Z podawanymi w wodzie pitnej oraz doświadczeń dotyczących translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwi. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi (w trakcie immunizacji <i>per os</i> oraz w doświadczeniach związanych z translokacją bakteriofagów); wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów A3R i 676Z we krwi (IgG, IgM, IgA) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec fagów w osoczu myszy immunizowanych w zależności od drogi podania preparatów fagowych (ELISA) oraz blokującego wpływu próbek osocza myszy immunizowanych na aktywność fagów (łącznie z optymalizacją doświadczenia w celu doboru odpowiedniego rozcieńczenia osocza – Supplementary Figure 7).</p> <p>Udział w dootrzewnowej immunizacji myszy preparatami fagowymi oraz w immunizacjach służących uzyskaniu referencyjnych próbek osocza o wysokim poziomie przeciwciał swoistych wobec całych wirionów fagowych. Immunizacja myszy preparatem owoalbuminy w celu uzyskania surowicy referencyjnej.</p> <p>Analiza składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – izolacja DNA, amplifikacja regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowanie bibliotek i oznaczenie stężenia z wykorzystaniem qPCR, sekwencjonowanie NGS oraz analiza wyników.</p> <p>Wsparcie w procesie produkcji i oczyszczania rekombinowanych białek fagowych. Wykonanie pomiaru opłaszczenia dołków płytki 96-dołkowej preparatami białek fagowych i białka referencyjnego.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; przygotowanie tekstu manuskryptu.</p>

Zuzanna Kaźmierczak	8%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych. Dootrzewnowa immunizacja myszy preparatami fagowymi oraz immunizacja myszy preparatami fagowymi i preparatami rekombinowanych białek fagowych w celu uzyskania próbek referencyjnych.
Karolina Lahutta	3%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Dorota Lecion	3%	Wsparcie techniczne w przygotowywaniu lizatów fagowych oraz w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Ocena próbek kału pod kątem obecności bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i> metodami mikrobiologicznymi.
Aleksander Szymczak	2%	Udział w analizie składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – udział w izolacji DNA, amplifikacji regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowaniu i oznaczeniu stężenia bibliotek, sekwencjonowaniu NGS oraz analizie uzyskanych wyników.*
Paulina Miernikiewicz	2%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Jarosław Drapała	2%	Opracowanie modelu matematycznego translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwioobiegu oraz przygotowanie rycin związanych z modelem matematycznym (Supplementary Figure 3, 4 i 5).
Marek Harhala	1%	Opracowanie i optymalizacja metody oznaczania ilościowego białka związanego do powierzchni dołków płytki 96-dołkowej z wykorzystaniem CBQCA Protein Quantitation Kit.
Karolina Marek- Bukowiec	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent oraz analizy wyników.
Natalia Jędruchiewicz	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania lizatów fagowych i preparatów białek rekombinowanych w oparciu o chromatografię sitową oraz oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o chromatografię jonowymienną.
Andrzej Górski	1%	Wsparcie merytoryczne w przygotowaniu tekstu publikacji.
Krystyna Dąbrowska	15%	Koncepcja doświadczeń, nadzór nad planowaniem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* W publikacji przedstawiono reprezentatywne wyniki jednej z dwóch analiz mikrobiomu bakteryjnego wykonanej przez Joannę Majewską. Wyniki drugiej analizy (nieprzedstawione w niniejszej publikacji) wchodziły w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Aleksandra Szymczaka na Uniwersytecie Łódzkim we współpracy z IITD PAN i obronionej w 2018 roku.



(podpis)

Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Kaźmierczak Z, Lahutta K, Lecion D, Szymczak A, Miernikiewicz P, Drapała J, Harhala M, Marek-Bukowiec K, Jędruchniewicz N, Owczarek B, Górski A, Dąbrowska K. *Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered per os*. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10:2607

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	60%	<p>Przygotowywanie lizatów fagowych i oczyszczanie preparatów metodą dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej.</p> <p>Zaplanowanie, nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczeń immunizacji myszy preparatami bakteriofagów A3R i 676Z podawanymi w wodzie pitnej oraz doświadczeń dotyczących translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwi. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi (w trakcie immunizacji <i>per os</i> oraz w doświadczeniach związanych z translokacją bakteriofagów); wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów A3R i 676Z we krwi (IgG, IgM, IgA) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec fagów w osoczu myszy immunizowanych w zależności od drogi podania preparatów fagowych (ELISA) oraz blokującego wpływu próbek osocza myszy immunizowanych na aktywność fagów (łącznie z optymalizacją doświadczenia w celu doboru odpowiedniego rozcieńczenia osocza – Supplementary Figure 7).</p> <p>Udział w dootrzewnowej immunizacji myszy preparatami fagowymi oraz w immunizacjach służących uzyskaniu referencyjnych próbek osocza o wysokim poziomie przeciwciał swoistych wobec całych wirionów fagowych. Immunizacja myszy preparatem owoalbuminy w celu uzyskania surowicy referencyjnej.</p> <p>Analiza składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – izolacja DNA, amplifikacja regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowanie bibliotek i oznaczenie stężenia z wykorzystaniem qPCR, sekwencjonowanie NGS oraz analiza wyników.</p> <p>Wsparcie w procesie produkcji i oczyszczania rekombinowanych białek fagowych. Wykonanie pomiaru opłaszczenia dołków płytki 96-dołkowej preparatami białek fagowych i białka referencyjnego.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; przygotowanie tekstu manuskryptu.</p>

Zuzanna Kaźmierczak	8%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych. Dootrzewnowa immunizacja myszy preparatami fagowymi oraz immunizacja myszy preparatami fagowymi i preparatami rekombinowanych białek fagowych w celu uzyskania próbek referencyjnych.
Karolina Lahutta	3%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Dorota Lecion	3%	Wsparcie techniczne w przygotowywaniu lizatów fagowych oraz w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Ocena próbek kału pod kątem obecności bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i> metodami mikrobiologicznymi.
Aleksander Szymczak	2%	Udział w analizie składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – udział w izolacji DNA, amplifikacji regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowaniu i oznaczeniu stężenia bibliotek, sekwencjonowaniu NGS oraz analizie uzyskanych wyników.*
Paulina Miernikiewicz	2%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Jarosław Drapała	2%	Opracowanie modelu matematycznego translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwioobiegu oraz przygotowanie rycin związanych z modelem matematycznym (Supplementary Figure 3, 4 i 5).
Marek Harhala	1%	Opracowanie i optymalizacja metody oznaczania ilościowego białka związanego do powierzchni dołków płytki 96-dołkowej z wykorzystaniem CBOCA Protein Quantitation Kit.
Karolina Marek- Bukowiec	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent oraz analizy wyników.
Natalia Jędruchniewicz	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania lizatów fagowych i preparatów białek rekombinowanych w oparciu o chromatografię sitową oraz oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o chromatografię jonowymienną.
Andrzej Górski	1%	Wsparcie merytoryczne w przygotowaniu tekstu publikacji.
Krystyna Dąbrowska	15%	Koncepcja doświadczeń, nadzór nad planowaniem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* W publikacji przedstawiono reprezentatywne wyniki jednej z dwóch analiz mikrobiomu bakteryjnego wykonanej przez Joannę Majewską. Wyniki drugiej analizy (nieprzedstawione w niniejszej publikacji) wchodziły w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Aleksandra Szymczaka na Uniwersytecie Łódzkim we współpracy z IITD PAN i obronionej w 2018 roku.

Paulina Miernikiewicz

(podpis)

Katedra Informatyki i Inżynierii Systemów
Wydział Informatyki i Telekomunikacji
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Stanisława Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Kaźmierczak Z, Lahutta K, Lecion D, Szymczak A, Miernikiewicz P, Drapała J, Harhala M, Marek-Bukowiec K, Jędruchniewicz N, Owczarek B, Górski A, Dąbrowska K. *Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered per os*. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10:2607

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	60%	<p>Przygotowywanie lizatów fagowych i oczyszczanie preparatów metodą dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej.</p> <p>Zaplanowanie, nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczeń immunizacji myszy preparatami bakteriofagów A3R i 676Z podawanymi w wodzie pitnej oraz doświadczeń dotyczących translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwi. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi (w trakcie immunizacji <i>per os</i> oraz w doświadczeniach związanych z translokacją bakteriofagów); wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów A3R i 676Z we krwi (IgG, IgM, IgA) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec fagów w osoczu myszy immunizowanych w zależności od drogi podania preparatów fagowych (ELISA) oraz blokującego wpływu próbek osocza myszy immunizowanych na aktywność fagów (łącznie z optymalizacją doświadczenia w celu doboru odpowiedniego rozcieńczenia osocza – Supplementary Figure 7).</p> <p>Udział w dootrzewnowej immunizacji myszy preparatami fagowymi oraz w immunizacjach służących uzyskaniu referencyjnych próbek osocza o wysokim poziomie przeciwciał swoistych wobec całych wirionów fagowych. Immunizacja myszy preparatem owoalbuminy w celu uzyskania surowicy referencyjnej.</p> <p>Analiza składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – izolacja DNA, amplifikacja regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowanie bibliotek i oznaczenie stężenia z wykorzystaniem qPCR, sekwencjonowanie NGS oraz analiza wyników.</p> <p>Wsparcie w procesie produkcji i oczyszczania rekombinowanych białek fagowych. Wykonanie pomiaru opłaszczenia dołków płytki 96-dołkowej preparatami białek fagowych i białka referencyjnego.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; przygotowanie tekstu manuskryptu.</p>

Drapała J.

Zuzanna Każmierczak	8%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych. Dootrzewnowa immunizacja myszy preparatami fagowymi oraz immunizacja myszy preparatami fagowymi i preparatami rekombinowanych białek fagowych w celu uzyskania próbek referencyjnych.
Karolina Lahutta	3%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Dorota Lecion	3%	Wsparcie techniczne w przygotowywaniu lizatów fagowych oraz w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Ocena próbek kału pod kątem obecności bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i> metodami mikrobiologicznymi.
Aleksander Szymczak	2%	Udział w analizie składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – udział w izolacji DNA, amplifikacji regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowaniu i oznaczeniu stężenia bibliotek, sekwencjonowaniu NGS oraz analizie uzyskanych wyników.*
Paulina Miernikiewicz	2%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Jarosław Drapała	2%	Opracowanie modelu matematycznego translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwioobiegu oraz przygotowanie rycin związanych z modelem matematycznym (Supplementary Figure 3, 4 i 5).
Marek Harhala	1%	Opracowanie i optymalizacja metody oznaczania ilościowego białka związanego do powierzchni dołków płytki 96-dołkowej z wykorzystaniem CBQCA Protein Quantitation Kit.
Karolina Marek- Bukowiec	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent oraz analizy wyników.
Natalia Jędruchiewicz	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania lizatów fagowych i preparatów białek rekombinowanych w oparciu o chromatografię sitową oraz oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o chromatografię jonowymienną.
Andrzej Górski	1%	Wsparcie merytoryczne w przygotowaniu tekstu publikacji.
Krystyna Dąbrowska	15%	Koncepcja doświadczeń, nadzór nad planowaniem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* W publikacji przedstawiono reprezentatywne wyniki jednej z dwóch analiz mikrobiomu bakteryjnego wykonanej przez Joannę Majewską. Wyniki drugiej analizy (nieprzedstawione w niniejszej publikacji) wchodziły w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Aleksandra Szymczaka na Uniwersytecie Łódzkim we współpracy z IITD PAN i obronionej w 2018 roku.


(podpis)

Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
 Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
 im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
 ul. Rudolfa Weigla 12
 53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Kaźmierczak Z, Lahutta K, Lecion D, Szymczak A, Miernikiewicz P, Drapała J, Harhala M, Marek-Bukowiec K, Jędruchiewicz N, Owczarek B, Górski A, Dąbrowska K. *Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered per os*. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10:2607

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	60%	<p>Przygotowywanie lizatów fagowych i oczyszczanie preparatów metodą dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej.</p> <p>Zaplanowanie, nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczeń immunizacji myszy preparatami bakteriofagów A3R i 676Z podawanymi w wodzie pitnej oraz doświadczeń dotyczących translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwi. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi (w trakcie immunizacji <i>per os</i> oraz w doświadczeniach związanych z translokacją bakteriofagów); wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów A3R i 676Z we krwi (IgG, IgM, IgA) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec fagów w osoczu myszy immunizowanych w zależności od drogi podania preparatów fagowych (ELISA) oraz blokującego wpływu próbek osocza myszy immunizowanych na aktywność fagów (łącznie z optymalizacją doświadczenia w celu doboru odpowiedniego rozcieńczenia osocza – Supplementary Figure 7).</p> <p>Udział w dootrzewnowej immunizacji myszy preparatami fagowymi oraz w immunizacjach służących uzyskaniu referencyjnych próbek osocza o wysokim poziomie przeciwciał swoistych wobec całych wirionów fagowych. Immunizacja myszy preparatem owoalbuminy w celu uzyskania surowicy referencyjnej.</p> <p>Analiza składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – izolacja DNA, amplifikacja regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowanie bibliotek i oznaczenie stężenia z wykorzystaniem qPCR, sekwencjonowanie NGS oraz analiza wyników.</p> <p>Wsparcie w procesie produkcji i oczyszczania rekombinowanych białek fagowych. Wykonanie pomiaru opłaszczenia dołków płytki 96-dołkowej preparatami białek fagowych i białka referencyjnego.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; przygotowanie tekstu manuskryptu.</p>

Zuzanna Kaźmierczak	8%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych. Dootrzewnowa immunizacja myszy preparatami fagowymi oraz immunizacja myszy preparatami fagowymi i preparatami rekombinowanych białek fagowych w celu uzyskania próbek referencyjnych.
Karolina Lahutta	3%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Dorota Lecion	3%	Wsparcie techniczne w przygotowywaniu lizatów fagowych oraz w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Ocena próbek kału pod kątem obecności bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i> metodami mikrobiologicznymi.
Aleksander Szymczak	2%	Udział w analizie składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – udział w izolacji DNA, amplifikacji regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowaniu i oznaczeniu stężenia bibliotek, sekwencjonowaniu NGS oraz analizie uzyskanych wyników.*
Paulina Miernikiewicz	2%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Jarosław Drapała	2%	Opracowanie modelu matematycznego translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwioobiegu oraz przygotowanie rycin związanych z modelem matematycznym (Supplementary Figure 3, 4 i 5).
Marek Harhala	1%	Opracowanie i optymalizacja metody oznaczania ilościowego białka związanego do powierzchni dołków płytki 96-dołkowej z wykorzystaniem CBQCA Protein Quantitation Kit.
Karolina Marek-Bukowiec	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent oraz analizy wyników.
Natalia Jędruchniewicz	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania lizatów fagowych i preparatów białek rekombinowanych w oparciu o chromatografię sitową oraz oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o chromatografię jonowymienną.
Andrzej Górski	1%	Wsparcie merytoryczne w przygotowaniu tekstu publikacji.
Krystyna Dąbrowska	15%	Koncepcja doświadczeń, nadzór nad planowaniem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* W publikacji przedstawiono reprezentatywne wyniki jednej z dwóch analiz mikrobiomu bakteryjnego wykonanej przez Joannę Majewską. Wyniki drugiej analizy (nieprzedstawione w niniejszej publikacji) wchodziły w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Aleksandra Szymczaka na Uniwersytecie Łódzkim we współpracy z IITD PAN i obronionej w 2018 roku.


.....
(podpis)

25.07.2023 r.

Karolina Marek-Bukowiec

Ośrodek Badawczo-Rozwojowy
Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu
ul. H. Kamieńskiego 73a
51-124 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Kaźmierczak Z, Lahutta K, Lecion D, Szymczak A, Miernikiewicz P, Drapała J, Harhala M, Marek-Bukowiec K, Jędruchniewicz N, Owczarek B, Górski A, Dąbrowska K. *Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered per os*. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10:2607

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	60%	<p>Przygotowywanie lizatów fagowych i oczyszczanie preparatów metodą dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej.</p> <p>Zaplanowanie, nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczeń immunizacji myszy preparatami bakteriofagów A3R i 676Z podawanymi w wodzie pitnej oraz doświadczeń dotyczących translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwi. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi (w trakcie immunizacji <i>per os</i> oraz w doświadczeniach związanych z translokacją bakteriofagów); wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów A3R i 676Z we krwi (IgG, IgM, IgA) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec fagów w osoczu myszy immunizowanych w zależności od drogi podania preparatów fagowych (ELISA) oraz blokującego wpływu próbek osocza myszy immunizowanych na aktywność fagów (łącznie z optymalizacją doświadczenia w celu doboru odpowiedniego rozcieńczenia osocza – Supplementary Figure 7).</p> <p>Udział w dootrzewnowej immunizacji myszy preparatami fagowymi oraz w immunizacjach służących uzyskaniu referencyjnych próbek osocza o wysokim poziomie przeciwciał swoistych wobec całych wirionów fagowych. Immunizacja myszy preparatem owoalbuminy w celu uzyskania surowicy referencyjnej.</p> <p>Analiza składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – izolacja DNA, amplifikacja regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowanie bibliotek i oznaczenie stężenia z wykorzystaniem qPCR, sekwencjonowanie NGS oraz analiza wyników.</p> <p>Wsparcie w procesie produkcji i oczyszczania rekombinowanych białek fagowych. Wykonanie pomiaru opłaszczenia dołków płytki 96-dołkowej preparatami białek fagowych i białka referencyjnego.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; przygotowanie tekstu manuskryptu.</p>

KMB

Zuzanna Każmierczak	8%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych. Dootrzewnowa immunizacja myszy preparatami fagowymi oraz immunizacja myszy preparatami fagowymi i preparatami rekombinowanych białek fagowych w celu uzyskania próbek referencyjnych.
Karolina Lahutta	3%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Dorota Lecion	3%	Wsparcie techniczne w przygotowywaniu lizatów fagowych oraz w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Ocena próbek kału pod kątem obecności bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i> metodami mikrobiologicznymi.
Aleksander Szymczak	2%	Udział w analizie składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – udział w izolacji DNA, amplifikacji regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowaniu i oznaczeniu stężenia bibliotek, sekwencjonowaniu NGS oraz analizie uzyskanych wyników.*
Paulina Miernikiewicz	2%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Jarosław Drapała	2%	Opracowanie modelu matematycznego translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwioobiegu oraz przygotowanie rycin związanych z modelem matematycznym (Supplementary Figure 3, 4 i 5).
Marek Harhala	1%	Opracowanie i optymalizacja metody oznaczania ilościowego białka związanego do powierzchni dołków płytki 96-dołkowej z wykorzystaniem CBQCA Protein Quantitation Kit.
Karolina Marek- Bukowiec	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent oraz analizy wyników.
Natalia Jędruchniewicz	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania lizatów fagowych i preparatów białek rekombinowanych w oparciu o chromatografię sitową oraz oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o chromatografię jonowymienną.
Andrzej Górski	1%	Wsparcie merytoryczne w przygotowaniu tekstu publikacji.
Krystyna Dąbrowska	15%	Koncepcja doświadczeń, nadzór nad planowaniem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* W publikacji przedstawiono reprezentatywne wyniki jednej z dwóch analiz mikrobiomu bakteryjnego wykonanej przez Joannę Majewską. Wyniki drugiej analizy (nieprzedstawione w niniejszej publikacji) wchodziły w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Aleksandra Szymczaka na Uniwersytecie Łódzkim we współpracy z IITD PAN i obronionej w 2018 roku.

Krzysztof Masłowski

(podpis)

Ośrodek Badawczo-Rozwojowy
Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu
ul. H. Kamińskiego 73a
51-124 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Kaźmierczak Z, Lahutta K, Lecion D, Szymczak A, Miernikiewicz P, Drapała J, Harhala M, Marek-Bukowiec K, Jędruchniewicz N, Owczarek B, Górski A, Dąbrowska K. *Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered per os*. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10:2607

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	60%	<p>Przygotowywanie lizatów fagowych i oczyszczanie preparatów metodą dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej.</p> <p>Zaplanowanie, nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczeń immunizacji myszy preparatami bakteriofagów A3R i 676Z podawanymi w wodzie pitnej oraz doświadczeń dotyczących translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwi. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi (w trakcie immunizacji <i>per os</i> oraz w doświadczeniach związanych z translokacją bakteriofagów); wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów A3R i 676Z we krwi (IgG, IgM, IgA) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec fagów w osoczu myszy immunizowanych w zależności od drogi podania preparatów fagowych (ELISA) oraz blokującego wpływu próbek osocza myszy immunizowanych na aktywność fagów (łącznie z optymalizacją doświadczenia w celu doboru odpowiedniego rozcieńczenia osocza – Supplementary Figure 7).</p> <p>Udział w dootrzewnowej immunizacji myszy preparatami fagowymi oraz w immunizacjach służących uzyskaniu referencyjnych próbek osocza o wysokim poziomie przeciwciał swoistych wobec całych wirionów fagowych. Immunizacja myszy preparatem owoalbuminy w celu uzyskania surowicy referencyjnej.</p> <p>Analiza składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – izolacja DNA, amplifikacja regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowanie bibliotek i oznaczenie stężenia z wykorzystaniem qPCR, sekwencjonowanie NGS oraz analiza wyników.</p> <p>Wsparcie w procesie produkcji i oczyszczania rekombinowanych białek fagowych. Wykonanie pomiaru opłaszczenia dołków płytki 96-dołkowej preparatami białek fagowych i białka referencyjnego.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; przygotowanie tekstu manuskryptu.</p>

Zuzanna Kaźmierczak	8%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych. Dootrzewnowa immunizacja myszy preparatami fagowymi oraz immunizacja myszy preparatami fagowymi i preparatami rekombinowanych białek fagowych w celu uzyskania próbek referencyjnych.
Karolina Lahutta	3%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Dorota Lecion	3%	Wsparcie techniczne w przygotowywaniu lizatów fagowych oraz w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Ocena próbek kału pod kątem obecności bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i> metodami mikrobiologicznymi.
Aleksander Szymczak	2%	Udział w analizie składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – udział w izolacji DNA, amplifikacji regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowaniu i oznaczeniu stężenia bibliotek, sekwencjonowaniu NGS oraz analizie uzyskanych wyników.*
Paulina Miernikiewicz	2%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Jarosław Drapała	2%	Opracowanie modelu matematycznego translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwioobiegu oraz przygotowanie rycin związanych z modelem matematycznym (Supplementary Figure 3, 4 i 5).
Marek Harhala	1%	Opracowanie i optymalizacja metody oznaczania ilościowego białka związanego do powierzchni dołków płytki 96-dołkowej z wykorzystaniem CBOCA Protein Quantitation Kit.
Karolina Marek- Bukowiec	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent oraz analizy wyników.
Natalia Jędruchiewicz	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania lizatów fagowych i preparatów białek rekombinowanych w oparciu o chromatografię sitową oraz oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o chromatografię jonowymienną.
Andrzej Górski	1%	Wsparcie merytoryczne w przygotowaniu tekstu publikacji.
Krystyna Dąbrowska	15%	Koncepcja doświadczeń, nadzór nad planowaniem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* W publikacji przedstawiono reprezentatywne wyniki jednej z dwóch analiz mikrobiomu bakteryjnego wykonanej przez Joannę Majewską. Wyniki drugiej analizy (nieprzedstawione w niniejszej publikacji) wchodziły w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Aleksandra Szymczaka na Uniwersytecie Łódzkim we współpracy z IITD PAN i obronionej w 2018 roku.

R.C. kierownik
Ośrodka Badańczo-Rozwojowego
..... dr. n. med. Natalia Jędruchiewicz
(podpis)

Laboratorium Bakteriofagowe
 Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
 im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
 ul. Rudolfa Weigla 12
 53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Kaźmierczak Z, Lahutta K, Lecion D, Szymczak A, Miernikiewicz P, Drapała J, Harhala M, Marek-Bukowiec K, Jędruchiewicz N, Owczarek B, Górski A, Dąbrowska K. *Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered per os*. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10:2607

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	60%	<p>Przygotowywanie lizatów fagowych i oczyszczanie preparatów metodą dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej.</p> <p>Zaplanowanie, nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczeń immunizacji myszy preparatami bakteriofagów A3R i 676Z podawanymi w wodzie pitnej oraz doświadczeń dotyczących translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwi. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi (w trakcie immunizacji <i>per os</i> oraz w doświadczeniach związanych z translokacją bakteriofagów); wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów A3R i 676Z we krwi (IgG, IgM, IgA) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec fagów w osoczu myszy immunizowanych w zależności od drogi podania preparatów fagowych (ELISA) oraz blokującego wpływu próbek osocza myszy immunizowanych na aktywność fagów (łącznie z optymalizacją doświadczenia w celu doboru odpowiedniego rozcieńczenia osocza – Supplementary Figure 7).</p> <p>Udział w dootrzewnowej immunizacji myszy preparatami fagowymi oraz w immunizacjach służących uzyskaniu referencyjnych próbek osocza o wysokim poziomie przeciwciał swoistych wobec całych wirionów fagowych. Immunizacja myszy preparatem owoalbuminy w celu uzyskania surowicy referencyjnej.</p> <p>Analiza składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – izolacja DNA, amplifikacja regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowanie bibliotek i oznaczenie stężenia z wykorzystaniem qPCR, sekwencjonowanie NGS oraz analiza wyników.</p> <p>Wsparcie w procesie produkcji i oczyszczania rekombinowanych białek fagowych. Wykonanie pomiaru opłaszczenia dołków płytki 96-dołkowej preparatami białek fagowych i białka referencyjnego.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; przygotowanie tekstu manuskryptu.</p>

Zuzanna Kaźmierczak	8%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych. Dootrzewnowa immunizacja myszy preparatami fagowymi oraz immunizacja myszy preparatami fagowymi i preparatami rekombinowanych białek fagowych w celu uzyskania próbek referencyjnych.
Karolina Lahutta	3%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Dorota Lecion	3%	Wsparcie techniczne w przygotowywaniu lizatów fagowych oraz w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Ocena próbek kału pod kątem obecności bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i> metodami mikrobiologicznymi.
Aleksander Szymczak	2%	Udział w analizie składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – udział w izolacji DNA, amplifikacji regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowaniu i oznaczeniu stężenia bibliotek, sekwencjonowaniu NGS oraz analizie uzyskanych wyników.*
Paulina Miernikiewicz	2%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Jarosław Drapała	2%	Opracowanie modelu matematycznego translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwioobiegu oraz przygotowanie rycin związanych z modelem matematycznym (Supplementary Figure 3, 4 i 5).
Marek Harhala	1%	Opracowanie i optymalizacja metody oznaczania ilościowego białka związanego do powierzchni dołków płytki 96-dołkowej z wykorzystaniem CBQCA Protein Quantitation Kit.
Karolina Marek- Bukowiec	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent oraz analizy wyników.
Natalia Jędruchniewicz	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania lizatów fagowych i preparatów białek rekombinowanych w oparciu o chromatografię sitową oraz oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o chromatografię jonowymienną.
Andrzej Górski	1%	Wsparcie merytoryczne w przygotowaniu tekstu publikacji.
Krystyna Dąbrowska	15%	Koncepcja doświadczeń, nadzór nad planowaniem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* W publikacji przedstawiono reprezentatywne wyniki jednej z dwóch analiz mikrobiomu bakteryjnego wykonanej przez Joannę Majewską. Wyniki drugiej analizy (nieprzedstawione w niniejszej publikacji) wchodziły w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Aleksandra Szymczaka na Uniwersytecie Łódzkim we współpracy z IITD PAN i obronionej w 2018 roku.

.....
Owczarek

(podpis)

Laboratorium Bakteriofagowe
 Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
 im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
 ul. Rudolfa Weigla 12
 53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Kaźmierczak Z, Lahutta K, Lecion D, Szymczak A, Miernikiewicz P, Drapała J, Harhala M, Marek-Bukowiec K, Jędruchiewicz N, Owczarek B, Górski A, Dąbrowska K. *Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered per os*. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10:2607

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	60%	<p>Przygotowywanie lizatów fagowych i oczyszczanie preparatów metodą dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej.</p> <p>Zaplanowanie, nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczeń immunizacji myszy preparatami bakteriofagów A3R i 676Z podawanymi w wodzie pitnej oraz doświadczeń dotyczących translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwi. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi (w trakcie immunizacji <i>per os</i> oraz w doświadczeniach związanych z translokacją bakteriofagów); wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów A3R i 676Z we krwi (IgG, IgM, IgA) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec fagów w osoczu myszy immunizowanych w zależności od drogi podania preparatów fagowych (ELISA) oraz blokującego wpływu próbek osocza myszy immunizowanych na aktywność fagów (łącznie z optymalizacją doświadczenia w celu doboru odpowiedniego rozcieńczenia osocza – Supplementary Figure 7).</p> <p>Udział w dootrzewnowej immunizacji myszy preparatami fagowymi oraz w immunizacjach służących uzyskaniu referencyjnych próbek osocza o wysokim poziomie przeciwciał swoistych wobec całych wirionów fagowych. Immunizacja myszy preparatem owoalbuminy w celu uzyskania surowicy referencyjnej.</p> <p>Analiza składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – izolacja DNA, amplifikacja regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowanie bibliotek i oznaczenie stężenia z wykorzystaniem qPCR, sekwencjonowanie NGS oraz analiza wyników.</p> <p>Wsparcie w procesie produkcji i oczyszczania rekombinowanych białek fagowych. Wykonanie pomiaru opłaszczenia dołków płytki 96-dołkowej preparatami białek fagowych i białka referencyjnego.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; przygotowanie tekstu manuskryptu.</p>



Zuzanna Kaźmierczak	8%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych. Dootrzewnowa immunizacja myszy preparatami fagowymi oraz immunizacja myszy preparatami fagowymi i preparatami rekombinowanych białek fagowych w celu uzyskania próbek referencyjnych.
Karolina Lahutta	3%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Dorota Lecion	3%	Wsparcie techniczne w przygotowywaniu lizatów fagowych oraz w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Ocena próbek kału pod kątem obecności bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i> metodami mikrobiologicznymi.
Aleksander Szymczak	2%	Udział w analizie składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – udział w izolacji DNA, amplifikacji regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowaniu i oznaczeniu stężenia bibliotek, sekwencjonowaniu NGS oraz analizie uzyskanych wyników.*
Paulina Miernikiewicz	2%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Jarosław Drapała	2%	Opracowanie modelu matematycznego translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwioobiegu oraz przygotowanie rycin związanych z modelem matematycznym (Supplementary Figure 3, 4 i 5).
Marek Harhala	1%	Opracowanie i optymalizacja metody oznaczania ilościowego białka związanego do powierzchni dołków płytki 96-dołkowej z wykorzystaniem CBQCA Protein Quantitation Kit.
Karolina Marek-Bukowiec	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent oraz analizy wyników.
Natalia Jędruchiewicz	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania lizatów fagowych i preparatów białek rekombinowanych w oparciu o chromatografię sitową oraz oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o chromatografię jonowymienną.
Andrzej Górski	1%	Wsparcie merytoryczne w przygotowaniu tekstu publikacji.
Krystyna Dąbrowska	15%	Koncepcja doświadczeń, nadzór nad planowaniem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* W publikacji przedstawiono reprezentatywne wyniki jednej z dwóch analiz mikrobiomu bakteryjnego wykonanej przez Joannę Majewską. Wyniki drugiej analizy (nieprzedstawione w niniejszej publikacji) wchodziły w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Aleksandra Szymczaka na Uniwersytecie Łódzkim we współpracy z IITD PAN i obronionej w 2018 roku.

.....


(podpis)

Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Kaźmierczak Z, Lahutta K, Lecion D, Szymczak A, Miernikiewicz P, Drapała J, Harhala M, Marek-Bukowiec K, Jędruchiewicz N, Owczarek B, Górski A, Dąbrowska K. *Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered per os*. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10:2607

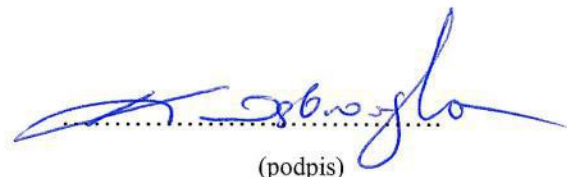
jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	60%	<p>Przygotowywanie lizatów fagowych i oczyszczanie preparatów metodą dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej.</p> <p>Zaplanowanie, nadzorowanie i przeprowadzenie doświadczeń immunizacji myszy preparatami bakteriofagów A3R i 676Z podawanymi w wodzie pitnej oraz doświadczeń dotyczących translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwi. Pobieranie i ocena próbek krwi i kału pod kątem obecności fagów metodami mikrobiologicznymi (w trakcie immunizacji <i>per os</i> oraz w doświadczeniach związanych z translokacją bakteriofagów); wyznaczenie krzywych zmian poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów A3R i 676Z we krwi (IgG, IgM, IgA) i w kale (IgA) oraz ocena immunogenności wybranych białek strukturalnych (ELISA); porównanie poziomu przeciwciał klasy IgG swoistych wobec fagów w osoczu myszy immunizowanych w zależności od drogi podania preparatów fagowych (ELISA) oraz blokującego wpływu próbek osocza myszy immunizowanych na aktywność fagów (łącznie z optymalizacją doświadczenia w celu doboru odpowiedniego rozcieńczenia osocza – Supplementary Figure 7).</p> <p>Udział w dootrzewnowej immunizacji myszy preparatami fagowymi oraz w immunizacjach służących uzyskaniu referencyjnych próbek osocza o wysokim poziomie przeciwciał swoistych wobec całych wirionów fagowych. Immunizacja myszy preparatem owoalbuminy w celu uzyskania surowicy referencyjnej.</p> <p>Analiza składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – izolacja DNA, amplifikacja regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowanie bibliotek i oznaczenie stężenia z wykorzystaniem qPCR, sekwencjonowanie NGS oraz analiza wyników.</p> <p>Wsparcie w procesie produkcji i oczyszczania rekombinowanych białek fagowych. Wykonanie pomiaru opłaszczenia dołków płytki 96-dołkowej preparatami białek fagowych i białka referencyjnego.</p> <p>Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin; przygotowanie tekstu manuskryptu.</p>



Zuzanna Kaźmierczak	8%	Produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych. Dootrzewnowa immunizacja myszy preparatami fagowymi oraz immunizacja myszy preparatami fagowymi i preparatami rekombinowanych białek fagowych w celu uzyskania próbek referencyjnych.
Karolina Lahutta	3%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Dorota Lecion	3%	Wsparcie techniczne w przygotowywaniu lizatów fagowych oraz w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt. Ocena próbek kału pod kątem obecności bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i> metodami mikrobiologicznymi.
Aleksander Szymczak	2%	Udział w analizie składu mikrobiomu bakteryjnego w próbkach kału – udział w izolacji DNA, amplifikacji regionów genu kodującego 16S rRNA, przygotowaniu i oznaczeniu stężenia bibliotek, sekwencjonowaniu NGS oraz analizie uzyskanych wyników.*
Paulina Miernikiewicz	2%	Wsparcie techniczne w procesie pobierania i procesowania próbek biologicznych w trakcie immunizacji zwierząt oraz w oznaczeniach poziomu przeciwciał swoistych wobec fagów w osoczu myszy.
Jarosław Drapała	2%	Opracowanie modelu matematycznego translokacji bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwioobiegu oraz przygotowanie rycin związanych z modelem matematycznym (Supplementary Figure 3, 4 i 5).
Marek Harhala	1%	Opracowanie i optymalizacja metody oznaczania ilościowego białka związanego do powierzchni dołków płytki 96-dołkowej z wykorzystaniem CBQCA Protein Quantitation Kit.
Karolina Marek- Bukowiec	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent oraz analizy wyników.
Natalia Jędruchniewicz	1%	Wsparcie merytoryczne w zakresie sekwencjonowania NGS w oparciu o technologię Ion Torrent.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania lizatów fagowych i preparatów białek rekombinowanych w oparciu o chromatografię sitową oraz oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o chromatografię jonowymienną.
Andrzej Górski	1%	Wsparcie merytoryczne w przygotowaniu tekstu publikacji.
Krystyna Dąbrowska	15%	Koncepcja doświadczeń, nadzór nad planowaniem eksperymentów i analizą danych, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* W publikacji przedstawiono reprezentatywne wyniki jednej z dwóch analiz mikrobiomu bakteryjnego wykonanej przez Joannę Majewską. Wyniki drugiej analizy (nieprzedstawione w niniejszej publikacji) wchodziły w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Aleksandra Szymczaka na Uniwersytecie Łódzkim we współpracy z IITD PAN i obronionej w 2018 roku.



(podpis)

Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Miernikiewicz P, Szymczak A, Kaźmierczak Z, Goszczyński TM, Owczarek B, Rybicka I, Ciekot J, Dąbrowska K. *Evolution of the T4 phage virion is driven by selection pressure from non-bacterial factors*. *Microbiology Spectrum*, 2023 (przyjęta)

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	77%	Mutagenеза ukierunkowana bakteriofagów T4 i T4ΔHoc i selekcja mutantów* w oparciu o metody mikrobiologiczne lub PCR; weryfikacja składu białkowego główki mutantów (ELISA); namnażanie bakteriofagów; porównanie przeżywalności wariantów faga T4 w wybranych warunkach (wpływ temperatury oraz temperatury i jonów Ca ²⁺ ; kwaśnego i zasadowego pH, proteolitycznych enzymów trawiennych i ekstraktu żółci). Uzyskanie i oczyszczenie konstruktów plazmidowych, produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych metodą chromatografii powinowactwa metek wiążących, powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej, wykonanie pomiarów stężenia. Ocena morfologii wirionów w oparciu o mikrografie TEM. Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin i tabel; przygotowanie tekstu manuskryptu.
Paulina Miernikiewicz	4%	Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S.
Aleksander Szymczak	2%	Wsparcie w analizie molekularnej składu preparatów zawierających mutanty fagowe.
Zuzanna Kaźmierczak	2%	Przygotowanie dziewięciu preparatów fagowych do oceny morfologii wirionów w oparciu o transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM).
Tomasz M. Goszczyński	2%	Wykonanie oceny stabilności rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S w oparciu o dichroizm kołowy.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o metodę chromatografii sitowej na złożu Sepharose 4B.
Izabela Rybicka	1%	Przygotowanie ośmiu preparatów fagowych oczyszczonych i zagęszczonych w oparciu o technologię Hollow Fiber oraz zebranie danych o stabilności preparatów podczas tego procesu (dane zebrane w Supplemental Table S3).
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białek gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Krystyna Dąbrowska	10%	Nadzór nad planowaniem eksperymentów, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* Uzyskanie jednego (T4ΔHocΔgp24byp24) z siedmiu opisanych w pracy nowych mutantów wchodziło w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Joannę Majewską w IITD PAN pod kierunkiem dr Krystyny Dąbrowskiej i obronionej w 2014 roku. Pozostałe sześć mutantów zostało uzyskanych w ramach realizacji pracy doktorskiej.

Joanna Majewska

Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Miernikiewicz P, Szymczak A, Kaźmierczak Z, Goszczyński TM, Owczarek B, Rybicka I, Ciekot J, Dąbrowska K. *Evolution of the T4 phage virion is driven by selection pressure from non-bacterial factors*. Microbiology Spectrum, 2023 (przyjęta)

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	77%	Mutageneza ukierunkowana bakteriofagów T4 i T4ΔHoc i selekcja mutantów* w oparciu o metody mikrobiologiczne lub PCR; weryfikacja składu białkowego główki mutantów (ELISA); namnażanie bakteriofagów; porównanie przeżywalności wariantów faga T4 w wybranych warunkach (wpływ temperatury oraz temperatury i jonów Ca ²⁺ ; kwaśnego i zasadowego pH, proteolitycznych enzymów trawiennych i ekstraktu żółci). Uzyskanie i oczyszczenie konstruktów plazmidowych, produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych metodą chromatografii powinowactwa metek wiążących, powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej, wykonanie pomiarów stężenia. Ocena morfologii wirionów w oparciu o mikrografie TEM. Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin i tabel; przygotowanie tekstu manuskryptu.
Paulina Miernikiewicz	4%	Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S.
Aleksander Szymczak	2%	Wsparcie w analizie molekularnej składu preparatów zawierających mutanty fagowe.
Zuzanna Kaźmierczak	2%	Przygotowanie dziewięciu preparatów fagowych do oceny morfologii wirionów w oparciu o transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM).
Tomasz M. Goszczyński	2%	Wykonanie oceny stabilności rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S w oparciu o dichroizm kołowy.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o metodę chromatografii sitowej na złożu Sepharose 4B.
Izabela Rybicka	1%	Przygotowanie ośmiu preparatów fagowych oczyszczonych i zagęszczonych w oparciu o technologię Hollow Fiber oraz zebranie danych o stabilności preparatów podczas tego procesu (dane zebrane w Supplemental Table S3).
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białek gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Krystyna Dąbrowska	10%	Nadzór nad planowaniem eksperymentów, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* Uzyskanie jednego (T4ΔHocΔgp24byp24) z siedmiu opisanych w pracy nowych mutantów wchodziło w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Joannę Majewską w IITD PAN pod kierunkiem dr Krystyny Dąbrowskiej i obronionej w 2014 roku. Pozostałe sześć mutantów zostało uzyskanych w ramach realizacji pracy doktorskiej.

Paulina Miernikiewicz

Arthritis and Clinical Immunology Research Program
Oklahoma Medical Research Foundation
Oklahoma City, United States

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Miernikiewicz P, Szymczak A, Kaźmierczak Z, Goszczyński TM, Owczarek B, Rybicka I, Ciekot J, Dąbrowska K. *Evolution of the T4 phage virion is driven by selection pressure from non-bacterial factors*. Microbiology Spectrum, 2023 (przyjęta)

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	77%	Mutageniza ukierunkowana bakteriofagów T4 i T4ΔHoc i selekcja mutantów* w oparciu o metody mikrobiologiczne lub PCR; weryfikacja składu białkowego główki mutantów (ELISA); namnażanie bakteriofagów; porównanie przeżywalności wariantów faga T4 w wybranych warunkach (wpływ temperatury oraz temperatury i jonów Ca ²⁺ ; kwaśnego i zasadowego pH, proteolitycznych enzymów trawiennych i ekstraktu żółci). Uzyskanie i oczyszczenie konstruktów plazmidowych, produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych metodą chromatografii powinowactwa metek wiążących, powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej, wykonanie pomiarów stężenia. Ocena morfologii wirionów w oparciu o mikrografie TEM. Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin i tabel; przygotowanie tekstu manuskryptu.
Paulina Miernikiewicz	4%	Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S.
Aleksander Szymczak	2%	Wsparcie w analizie molekularnej składu preparatów zawierających mutanty fagowe.
Zuzanna Kaźmierczak	2%	Przygotowanie dziewięciu preparatów fagowych do oceny morfologii wirionów w oparciu o transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM).
Tomasz M. Goszczyński	2%	Wykonanie oceny stabilności rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S w oparciu o dichroizm kołowy.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o metodę chromatografii sitowej na złożu Sepharose 4B.
Izabela Rybicka	1%	Przygotowanie ośmiu preparatów fagowych oczyszczonych i zagęszczonych w oparciu o technologię Hollow Fiber oraz zebranie danych o stabilności preparatów podczas tego procesu (dane zebrane w Supplemental Table S3).
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białek gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Krystyna Dąbrowska	10%	Nadzór nad planowaniem eksperymentów, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* Uzyskanie jednego (T4ΔHocΔgp24byp24) z siedmiu opisanych w pracy nowych mutantów wchodziło w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Joannę Majewską w IITD PAN pod kierunkiem dr Krystyny Dąbrowskiej i obronionej w 2014 roku. Pozostałe sześć mutantów zostało uzyskanych w ramach realizacji pracy doktorskiej.

Aleksander Szymczak

Ośrodek Badawczo Rozwojowy
Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu
ul. H. Kamińskiego 73a
51-124 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Miernikiewicz P, Szymczak A, Kaźmierczak Z, Goszczyński TM, Owczarek B, Rybicka I, Ciekot J, Dąbrowska K. *Evolution of the T4 phage virion is driven by selection pressure from non-bacterial factors*. *Microbiology Spectrum*, 2023 (przyjęta)

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	77%	Mutageneza ukierunkowana bakteriofagów T4 i T4ΔHoc i selekcja mutantów* w oparciu o metody mikrobiologiczne lub PCR; weryfikacja składu białkowego główki mutantów (ELISA); namnażanie bakteriofagów; porównanie przeżywalności wariantów faga T4 w wybranych warunkach (wpływ temperatury oraz temperatury i jonów Ca ²⁺ ; kwaśnego i zasadowego pH, proteolitycznych enzymów trawiennych i ekstraktu żółci). Uzyskanie i oczyszczenie konstruktów plazmidowych, produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych metodą chromatografii powinowactwa metek wiążących, powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej, wykonanie pomiarów stężenia. Ocena morfologii wirionów w oparciu o mikrografie TEM. Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin i tabel; przygotowanie tekstu manuskryptu.
Paulina Miernikiewicz	4%	Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S.
Aleksander Szymczak	2%	Wsparcie w analizie molekularnej składu preparatów zawierających mutanty fagowe.
Zuzanna Kaźmierczak	2%	Przygotowanie dziewięciu preparatów fagowych do oceny morfologii wirionów w oparciu o transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM).
Tomasz M. Goszczyński	2%	Wykonanie oceny stabilności rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S w oparciu o dichroizm kołowy.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o metodę chromatografii sitowej na złożu Sepharose 4B.
Izabela Rybicka	1%	Przygotowanie ośmiu preparatów fagowych oczyszczonych i zagęszczonych w oparciu o technologię Hollow Fiber oraz zebranie danych o stabilności preparatów podczas tego procesu (dane zebrane w Supplemental Table S3).
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białek gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Krystyna Dąbrowska	10%	Nadzór nad planowaniem eksperymentów, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* Uzyskanie jednego (T4ΔHocΔgp24byp24) z siedmiu opisanych w pracy nowych mutantów wchodziło w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Joannę Majewską w IITD PAN pod kierunkiem dr Krystyny Dąbrowskiej i obronionej w 2014 roku. Pozostałe sześć mutantów zostało uzyskanych w ramach realizacji pracy doktorskiej.

Zuzanna Kaźmierczak

Laboratorium Chemii Biomedycznej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Miernikiewicz P, Szymczak A, Kaźmierczak Z, Goszczyński TM, Owczarek B, Rybicka I, Ciekot J, Dąbrowska K. *Evolution of the T4 phage virion is driven by selection pressure from non-bacterial factors*. *Microbiology Spectrum*, 2023 (przyjęta)

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	77%	Mutagenеза ukierunkowana bakteriofagów T4 i T4ΔHoc i selekcja mutantów* w oparciu o metody mikrobiologiczne lub PCR; weryfikacja składu białkowego główki mutantów (ELISA); namnażanie bakteriofagów; porównanie przeżywalności wariantów faga T4 w wybranych warunkach (wpływ temperatury oraz temperatury i jonów Ca ²⁺ ; kwaśnego i zasadowego pH, proteolitycznych enzymów trawiennych i ekstraktu żółci). Uzyskanie i oczyszczenie konstruktów plazmidowych, produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych metodą chromatografii powinowactwa metek wiążących, powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej, wykonanie pomiarów stężenia. Ocena morfologii wirionów w oparciu o mikrografie TEM. Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin i tabel; przygotowanie tekstu manuskryptu.
Paulina Miernikiewicz	4%	Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S.
Aleksander Szymczak	2%	Wsparcie w analizie molekularnej składu preparatów zawierających mutanty fagowe.
Zuzanna Kaźmierczak	2%	Przygotowanie dziewięciu preparatów fagowych do oceny morfologii wirionów w oparciu o transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM).
Tomasz M. Goszczyński	2%	Wykonanie oceny stabilności rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S w oparciu o dichroizm kołowy.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o metodę chromatografii sitowej na złożu Sepharose 4B.
Izabela Rybicka	1%	Przygotowanie ośmiu preparatów fagowych oczyszczonych i zagęszczonych w oparciu o technologię Hollow Fiber oraz zebranie danych o stabilności preparatów podczas tego procesu (dane zebrane w Supplemental Table S3).
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białek gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Krystyna Dąbrowska	10%	Nadzór nad planowaniem eksperymentów, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* Uzyskanie jednego (T4ΔHocΔgp24byp24) z siedmiu opisanych w pracy nowych mutantów wchodziło w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Joannę Majewską w IITD PAN pod kierunkiem dr Krystyny Dąbrowskiej i obronionej w 2014 roku. Pozostałe sześć mutantów zostało uzyskanych w ramach realizacji pracy doktorskiej.



Laboratorium Bakteriofagowe
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Miernikiewicz P, Szymczak A, Kaźmierczak Z, Goszczyński TM, Owczarek B, Rybicka I, Ciekot J, Dąbrowska K. *Evolution of the T4 phage virion is driven by selection pressure from non-bacterial factors*. *Microbiology Spectrum*, 2023 (przyjęta)

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	77%	Mutagenеза ukierunkowana bakteriofagów T4 i T4ΔHoc i selekcja mutantów* w oparciu o metody mikrobiologiczne lub PCR; weryfikacja składu białkowego główki mutantów (ELISA); namnażanie bakteriofagów; porównanie przeżywalności wariantów faga T4 w wybranych warunkach (wpływ temperatury oraz temperatury i jonów Ca ²⁺ ; kwaśnego i zasadowego pH, proteolitycznych enzymów trawiennych i ekstraktu żółci). Uzyskanie i oczyszczenie konstruktów plazmidowych, produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych metodą chromatografii powinowactwa metek wiążących, powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej, wykonanie pomiarów stężenia. Ocena morfologii wirionów w oparciu o mikrografie TEM. Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin i tabel; przygotowanie tekstu manuskryptu.
Paulina Miernikiewicz	4%	Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S.
Aleksander Szymczak	2%	Wsparcie w analizie molekularnej składu preparatów zawierających mutanty fagowe.
Zuzanna Kaźmierczak	2%	Przygotowanie dziewięciu preparatów fagowych do oceny morfologii wirionów w oparciu o transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM).
Tomasz M. Goszczyński	2%	Wykonanie oceny stabilności rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S w oparciu o dichroizm kołowy.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o metodę chromatografii sitowej na złożu Sepharose 4B.
Izabela Rybicka	1%	Przygotowanie ośmiu preparatów fagowych oczyszczonych i zagęszczonych w oparciu o technologię Hollow Fiber oraz zebranie danych o stabilności preparatów podczas tego procesu (dane zebrane w Supplemental Table S3).
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białek gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Krystyna Dąbrowska	10%	Nadzór nad planowaniem eksperymentów, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* Uzyskanie jednego (T4ΔHocΔgp24byp24) z siedmiu opisanych w pracy nowych mutantów wchodziło w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Joannę Majewską w IITD PAN pod kierunkiem dr Krystyny Dąbrowskiej i obronionej w 2014 roku. Pozostałe sześć mutantów zostało uzyskanych w ramach realizacji pracy doktorskiej.

Barbara Owczarek

Izabela Rybicka

26.07.2023 r.

Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Oświadczenie


Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Miernikiewicz P, Szymczak A, Kaźmierczak Z, Goszczyński TM, Owczarek B, Rybicka I, Ciekot J, Dąbrowska K. *Evolution of the T4 phage virion is driven by selection pressure from non-bacterial factors*. *Microbiology Spectrum*, 2023 (przyjęta)

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	77%	Mutagenesa ukierunkowana bakteriofagów T4 i T4ΔHoc i selekcja mutantów* w oparciu o metody mikrobiologiczne lub PCR; weryfikacja składu białkowego główki mutantów (ELISA); namnażanie bakteriofagów; porównanie przeżywalności wariantów faga T4 w wybranych warunkach (wpływ temperatury oraz temperatury i jonów Ca ²⁺ ; kwaśnego i zasadowego pH, proteolitycznych enzymów trawiennych i ekstraktu żółci). Uzyskanie i oczyszczenie konstruktów plazmidowych, produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych metodą chromatografii powinowactwa metek wiążących, powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej, wykonanie pomiarów stężenia. Ocena morfologii wirionów w oparciu o mikrografie TEM. Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin i tabel; przygotowanie tekstu manuskryptu.
Paulina Miernikiewicz	4%	Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S.
Aleksander Szymczak	2%	Wsparcie w analizie molekularnej składu preparatów zawierających mutanty fagowe.
Zuzanna Kaźmierczak	2%	Przygotowanie dziewięciu preparatów fagowych do oceny morfologii wirionów w oparciu o transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM).
Tomasz M. Goszczyński	2%	Wykonanie oceny stabilności rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S w oparciu o dichroizm kołowy.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o metodę chromatografii sitowej na złożu Sepharose 4B.
Izabela Rybicka	1%	Przygotowanie ośmiu preparatów fagowych oczyszczonych i zagęszczonych w oparciu o technologię Hollow Fiber oraz zebranie danych o stabilności preparatów podczas tego procesu (dane zebrane w Supplemental Table S3).
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białek gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Krystyna Dąbrowska	10%	Nadzór nad planowaniem eksperymentów, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* Uzyskanie jednego (T4ΔHocΔgp24byp24) z siedmiu opisanych w pracy nowych mutantów wchodziło w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Joannę Majewską w IITD PAN pod kierunkiem dr Krystyny Dąbrowskiej i obronionej w 2014 roku. Pozostałe sześć mutantów zostało uzyskanych w ramach realizacji pracy doktorskiej.

Izabela Rybicka 

Laboratorium Chemii Biomedycznej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Oświadczenie

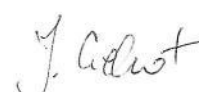
Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Miernikiewicz P, Szymczak A, Kaźmierczak Z, Goszczyński TM, Owczarek B, Rybicka I, Ciekot J, Dąbrowska K. *Evolution of the T4 phage virion is driven by selection pressure from non-bacterial factors*. *Microbiology Spectrum*, 2023 (przyjęta)

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	77%	Mutagenеза ukierunkowana bakteriofagów T4 i T4ΔHoc i selekcja mutantów* w oparciu o metody mikrobiologiczne lub PCR; weryfikacja składu białkowego główki mutantów (ELISA); namnażanie bakteriofagów; porównanie przeżywalności wariantów faga T4 w wybranych warunkach (wpływ temperatury oraz temperatury i jonów Ca ²⁺ ; kwaśnego i zasadowego pH, proteolitycznych enzymów trawiennych i ekstraktu żółci). Uzyskanie i oczyszczenie konstruktów plazmidowych, produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych metodą chromatografii powinowactwa metek wiążących, powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej, wykonanie pomiarów stężenia. Ocena morfologii wirionów w oparciu o mikrografie TEM. Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin i tabel; przygotowanie tekstu manuskryptu.
Paulina Miernikiewicz	4%	Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S.
Aleksander Szymczak	2%	Wsparcie w analizie molekularnej składu preparatów zawierających mutanty fagowe.
Zuzanna Kaźmierczak	2%	Przygotowanie dziewięciu preparatów fagowych do oceny morfologii wirionów w oparciu o transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM).
Tomasz M. Goszczyński	2%	Wykonanie oceny stabilności rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S w oparciu o dichroizm kołowy.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o metodę chromatografii sitowej na złożu Sepharose 4B.
Izabela Rybicka	1%	Przygotowanie ośmiu preparatów fagowych oczyszczonych i zagęszczonych w oparciu o technologię Hollow Fiber oraz zebranie danych o stabilności preparatów podczas tego procesu (dane zebrane w Supplemental Table S3).
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białek gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Krystyna Dąbrowska	10%	Nadzór nad planowaniem eksperymentów, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* Uzyskanie jednego (T4ΔHocΔgp24byp24) z siedmiu opisanych w pracy nowych mutantów wchodziło w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Joannę Majewską w IITD PAN pod kierunkiem dr Krystyny Dąbrowskiej i obronionej w 2014 roku. Pozostałe sześć mutantów zostało uzyskanych w ramach realizacji pracy doktorskiej.



Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Majewska J, Miernikiewicz P, Szymczak A, Kaźmierczak Z, Goszczyński TM, Owczarek B, Rybicka I, Ciekot J, Dąbrowska K. *Evolution of the T4 phage virion is driven by selection pressure from non-bacterial factors*. Microbiology Spectrum, 2023 (przyjęta)

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Joanna Majewska	77%	Mutagenеза ukierunkowana bakteriofagów T4 i T4ΔHoc i selekcja mutantów* w oparciu o metody mikrobiologiczne lub PCR; weryfikacja składu białkowego główki mutantów (ELISA); namnażanie bakteriofagów; porównanie przeżywalności wariantów faga T4 w wybranych warunkach (wpływ temperatury oraz temperatury i jonów Ca ²⁺ ; kwaśnego i zasadowego pH, proteolitycznych enzymów trawiennych i ekstraktu żółci). Uzyskanie i oczyszczenie konstruktów plazmidowych, produkcja rekombinowanych białek fagowych w systemie bakteryjnym i oczyszczenie uzyskanych produktów białkowych metodą chromatografii powinowactwa metek wiążących, powinowactwa LPS oraz dializy na membranach o porach przepuszczalnych dla obiektów o dużej masie molekularnej, wykonanie pomiarów stężenia. Ocena morfologii wirionów w oparciu o mikrografie TEM. Planowanie doświadczeń; analiza wyników i analiza statystyczna; przygotowanie rycin i tabel; przygotowanie tekstu manuskryptu.
Paulina Miernikiewicz	4%	Wsparcie merytoryczne w zakresie metodyki produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S.
Aleksander Szymczak	2%	Wsparcie w analizie molekularnej składu preparatów zawierających mutanty fagowe.
Zuzanna Kaźmierczak	2%	Przygotowanie dziewięciu preparatów fagowych do oceny morfologii wirionów w oparciu o transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM).
Tomasz M. Goszczyński	2%	Wykonanie oceny stabilności rekombinowanych białek fagowych gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S w oparciu o dichroizm kołowy.
Barbara Owczarek	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów fagowych w oparciu o metodę chromatografii sitowej na złożu Sepharose 4B.
Izabela Rybicka	1%	Przygotowanie ośmiu preparatów fagowych oczyszczonych i zagęszczonych w oparciu o technologię Hollow Fiber oraz zebranie danych o stabilności preparatów podczas tego procesu (dane zebrane w Supplemental Table S3).
Jarosław Ciekot	1%	Wykonanie etapu oczyszczania preparatów białek gp23, gp24, gp23_N381S i gp23_N384S polegającego na rozdziale chromatograficznym na złożu Superdex.
Krystyna Dąbrowska	10%	Nadzór nad planowaniem eksperymentów, wsparcie merytoryczne, udział w przygotowaniu manuskryptu.

* Uzyskanie jednego (T4ΔHocΔgp24byp24) z siedmiu opisanych w pracy nowych mutantów wchodziło w zakres pracy magisterskiej realizowanej przez Joannę Majewską w IITD PAN pod kierunkiem dr Krystyny Dąbrowskiej i obronionej w 2014 roku. Pozostałe sześć mutantów zostało uzyskanych w ramach realizacji pracy doktorskiej.

Publications

Article

Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood

Joanna Majewska, Weronika Beta, Dorota Lecion, Katarzyna Hodyra-Stefaniak, Anna Kłopot, Zuzanna Kaźmierczak, Paulina Miernikiewicz, Agnieszka Piotrowicz, Jarosław Ciekot, Barbara Owczarek, Agnieszka Kopciuch, Karolina Wojtyna, Marek Harhala, Mateusz Mąkosa and Krystyna Dąbrowska *

Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław, Poland; E-Mails: joanna.majewska@iitd.pan.wroc.pl (J.M.); weronika.beta@iitd.pan.wroc.pl (W.B.); lecion@iitd.pan.wroc.pl (D.L.); katarzyna.hodyra@iitd.pan.wroc.pl (K.H.-S.); anna.kłopot@iitd.pan.wroc.pl (A.K.); zuzanna.kazmierczak@iitd.pan.wroc.pl (Z.K.); pola@iitd.pan.wroc.pl (P.M.); agnieszka.piotrowicz@gmail.com (A.P.); jaroslaw.ciekot@iitd.pan.wroc.pl (J.C.); owczarek@iitd.pan.wroc.pl (B.O.); kopciuch@iitd.pan.wroc.pl (A.K.); karolina.wojtyna@gmail.com (K.W.); marek.harhala@gmail.com (M.H.); mateusz.makosa@iitd.pan.wroc.pl (M.M.)

* Author to whom correspondence should be addressed: E-Mail: dabrok@iitd.pan.wroc.pl; Tel.: +48-71-3371-172 (ext. 316).

Academic Editors: Abram Aertsen and Rob Lavigne

Received: 1 May 2015 / Accepted: 30 July 2015 / Published: 20 August 2015

Abstract: A specific humoral response to bacteriophages may follow phage application for medical purposes, and it may further determine the success or failure of the approach itself. We present a long-term study of antibody induction in mice by T4 phage applied *per os*: 100 days of phage treatment followed by 112 days without the phage, and subsequent second application of phage up to day 240. Serum and gut antibodies (IgM, IgG, secretory IgA) were analyzed in relation to microbiological status of the animals. T4 phage applied orally induced anti-phage antibodies when the exposure was long enough (IgG day 36, IgA day 79); the effect was related to high dosage. Termination of phage treatment resulted in a decrease of IgA again to insignificant levels. Second administration of phage induces secretory IgA sooner than that induced by the first administrations. Increased IgA level antagonized gut transit of active phage. Phage resistant *E. coli* dominated gut flora very late, on day 92.

Thus, the immunological response emerges as a major factor determining phage survival in the gut. Phage proteins Hoc and gp12 were identified as highly immunogenic. A low response to exemplary foreign antigens (from Ebola virus) presented on Hoc was observed, which suggests that phage platforms can be used in oral vaccine design.

Keywords: T4 phage; EBOV; Ebola virus; oral administration; vaccine; phage display; capsid proteins; antibodies; phage resistance

1. Introduction

Bacteriophages deliver a few important medical solutions. One of them is antibacterial therapy, which makes use of the natural ability of bacteriophages to kill bacteria. Currently, we are observing renewed interest in phage therapy as a promising alternative to antibiotics, mostly due to the problem of antibiotic resistance in bacteria. This inspires both recapitulation of previous experience and testing for an up-to-date methodology and approach [1–7]. Special regard is given to various aspects of phage interactions with organisms of treated individuals, since these interactions determine safety issues, phage pharmacokinetics, bioavailability and resulting outcomes of antibacterial treatment.

The other popular phage solution is the technological approach to phages as nanocarriers that are able to deliver biologically active elements. Nanocarriers may deliver various kinds of drugs, but they can also constitute a platform that allows for exposure of selected antigens. Such bacteriophage-based platforms are proposed as a new generation of safe (non-pathogenic) and effective vaccines. T4 phage capsid has been experimentally used to expose antigens of difficult pathogens, e.g., *Neisseria meningitidis* [8], anthrax [9,10] and HIV [11,12].

All medical applications of bacteriophages, including antibacterial therapy, vaccines and others, share a common feature: phages make direct contact with the mammalian organism and thus challenge the mammalian immunological system. One of the major consequences is a humoral response to a phage [13–15]. The humoral response, however, does not follow a simple schema of induction. It appears to depend on the route of phage administration and on individual features of a phage. It also depends on the dose and application schedule and possibly on other features, not yet specified [15–18]. As a consequence, it is not easy to draw a general conclusion about the effects that anti-phage antibodies have on the outcomes of therapeutic use of bacteriophages. Some authors found that the effect of the humoral response can be devastating [19], but others reported that anti-phage activity of serum does not exclude a favorable result of phage therapy in humans [17]. The first safety study of T4 phage application on humans revealed no antibody induction in phage-treated volunteers at all [2]. Difficulties with joint conclusions from different studies are related to the multi-factor nature of the immune system and its interactions with potential antigens.

Probably one of the most complex systems that can be considered in terms of therapeutic phage application is the gut, with its dynamic balance of symbiotic and sometimes pathogenic bacteria, natural and possibly therapeutic bacteriophages, as well as a variety of mammalian host-related factors. New technologies for sequencing and the metagenomics approach have revealed extreme microbiological diversity of the natural gut ecosystem, including bacteriophages [20,21]. This microbial balance, and

especially its impact on human health, has been recently reviewed by Dalmasso *et al.* [22]. In spite of emerging interest in the topic, little is known about the humoral response to therapeutic bacteriophages if they are applied orally, even though it is generally expected that phages present in the gut may induce specific antibodies [16,23].

Here we present a long-term study (240 days) of specific antibody induction by T4 phage applied *per os* in a murine model: 100 days of phage treatment followed by 112 days without the phage, and then repeated treatment with the same phage up to day 240. The purpose of these studies was to provide immunological data useful for medical applications of bacteriophages, both those employing phages as antibacterials and those making use of phages as nanocarriers. In this work, the assessment comprised serum and gut antibodies (IgM, IgG, IgA) in relation to microbiological status of the animals: phage survival in gut and occurrence of phage-resistant bacteria. Immune response emerged as a major factor determining phage survival in the gut. The analysis concerned the individual impact of structural proteins on induction of the humoral response. Selected proteins were those exposed on the surface of phage head (gp23*, gp24*, Hoc, Soc) and the protein responsible for phage ability to infect bacteria (gp12). This allowed for the identification of highly immunogenic structural proteins and for further testing of the immune response to foreign antigen presented on the phage as a fusion with one of these proteins. Oligopeptides from Ebola virus served as exemplary foreign antigens that elicited immune response when displayed on T4 phage and administered *per os*.

2. Results

2.1. Induction of Anti-T4 Phage Antibodies in Mice Treated with the Phage *per os*

The long-term treatment and observation of mice took 240 days. During the first part, mice were given T4 phage in drinking water 4×10^9 pfu/mL (approx. 2×10^{10} pfu per mouse daily) for 100 days, with no pH-neutralizing additives. Then the phage was removed from the diet and the experiment was continued for the next 112 days. Then the mice were again given T4 phage in drinking water with no pH-neutralizing additives 4×10^9 pfu/mL (approx. 2×10^{10} pfu per mouse daily) up to day 240. Animals' blood serum and feces were repeatedly tested for the level of specific anti-phage antibodies, during the whole 240-day period of the experiment. Serum samples were tested for IgG and IgM, and feces were tested for IgA. Animals were also monitored for the presence of active bacteriophages in feces and for possible occurrence of phage-resistant bacteria in feces; microbiological data were merged with immunological ones (presented in Figure 1).

As shown in Figure 1, the initial two weeks of continuous treatment with the phage had no significant effect on any class of investigated antibodies. From the third to fifth week (days 15–36), a constant increase of blood serum IgG antibodies was observed; IgG level increased markedly and statistically significantly ($p < 0.001$ in comparison to control mice on day 36). Contrary to expectations, no clear increase of IgM was noted before the IgG boost, and IgG level did not decrease after removal of the phage from the diet (after day 100). Secretory IgA increased considerably later, *i.e.*, approximately 7–8 weeks later than IgG (day 63–79). As a result, IgA reached its maximum after around two months of continuous treatment with the phage ($p < 0.01$ in comparison to control mice on day 79). Importantly, without continuous contact with the phage, secretion of specific IgA was gradually decreased, and on days

180–213 no significant difference was observed in comparison to control mice. The second exposure to the phage (starting from day 213) resulted in faster induction of secretory IgA: it was significantly increased in feces as soon as on day 225 ($p < 0.05$ in comparison to control mice) (Figure 1).

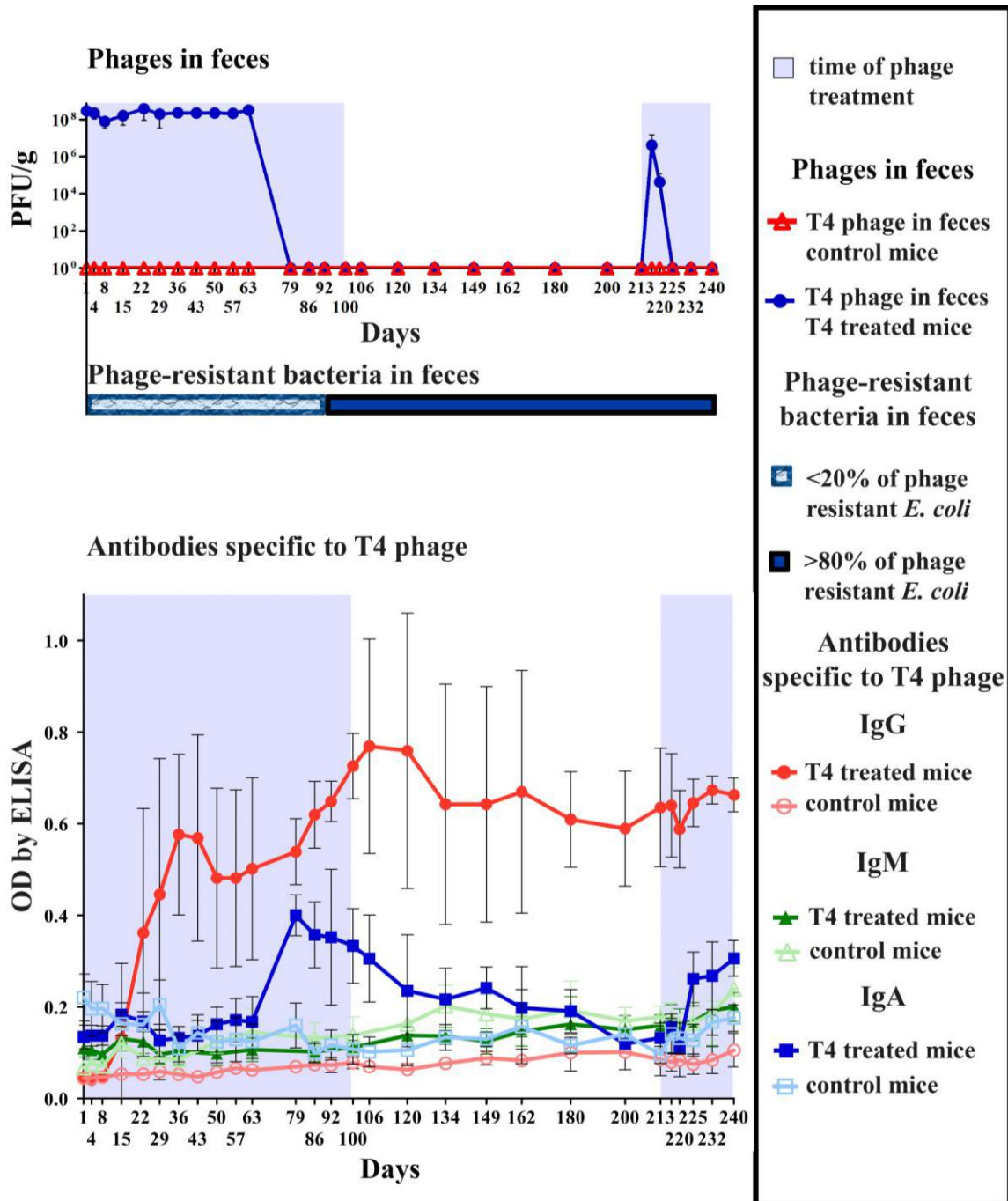


Figure 1. Bacteriophage T4 survival in the gut in correlation with increase of specific anti-phage antibodies and with emergence of phage-resistant *E. coli*. Mice ($N = 7$) were fed with T4 phage in drinking water to preclude micro-injuries that can be caused with a stomach probe and which result in false observations of phages penetrating the blood. The treatment was conducted for 100 days (days of phage treatment were marked in the figure with

light blue). Then the phage was removed from the diet and the experiment was continued for the next 112 days. Then the phage was again administered to mice for 28 days (days of phage treatment were marked in the figure with light blue). Phage dose was 4×10^9 pfu/mL with no pH-neutralizing additives (thus making approx. 2×10^{10} pfu/mouse daily as calculated from daily water uptake per animal). Control mice received no phage in the diet and they were separated from phage-treated mice. They were examined for presence of active T4 phage and no phage activity was detected during the whole experiment. IgG and IgM levels were tested in sera (blood was collected from the tail vein under anesthesia; thus the same mice were sampled for the whole experiment), and IgA levels were tested in feces. Additionally, feces were tested for the presence of active T4 phage and for T4 phage-resistant *E. coli*.

Phages were present in feces of all phage-fed mice as long as secretory IgA levels were low. Significant increase in IgA level on day 79 resulted in complete absence of active phages in feces. Interestingly, when secretory IgA decreased with time, repeated dose of the phage on day 213 resulted in recovery of active phages from feces (Figure 1). Active phages were detected until phage-specific IgA level increased again (day 225) (Figure 1).

Phage-resistant *E. coli* strains dominated the gut relatively late, *i.e.*, on day 92, shortly before the end of the phage treatment (Figure 1). From that date, they constituted 100% of bacterial colonies isolated from phage-treated mice, while in control mice only 20% of phage-resistant *E. coli* could be found in gut samples and 80% were sensitive to the phage. The prevalence of phage-resistant strains with small fluctuations was observed also during the whole time after removal of T4 from the diet and during the time of second treatment (up to day 240). No other substantial differences between phage-treated and control mice were detected in gut flora during the experiment.

In mice treated similarly with the same phage but in a lower concentration (4×10^8 pfu/mL—one order of magnitude lower), the immunological response was very weak. A significant increase of secretory IgA was not detected (data not shown), which was correlated with the fact that the phage was constantly present in feces (10^5 pfu/g); interestingly, phage-resistant *E. coli* did not dominate fecal samples even after 100 days. IgM induction was not detected in serum and the increase of serum IgG was meager and started later (day 30). Comparison of T4-specific IgG in murine sera on day 100 after phage treatment with 4×10^8 pfu/mL to those after treatment with 4×10^9 pfu/mL revealed 8.6 times higher immunization in the animals treated with the higher phage dose (Figure 2). These observations suggest that phage dose plays a major role in immunological outcomes of phage treatment. Serum IgG from mice treated with the phage *per os* for 100 days was also compared to that from mice injected with the phage *s.c.* (three doses, 5×10^9 and 5×10^9 and 2×10^9 pfu/mouse). Injection, which typically results in a very effective delivery of phages to circulation [24], resulted in 5.5 higher immunization in comparison to the higher dose applied *per os* (Figure 2).

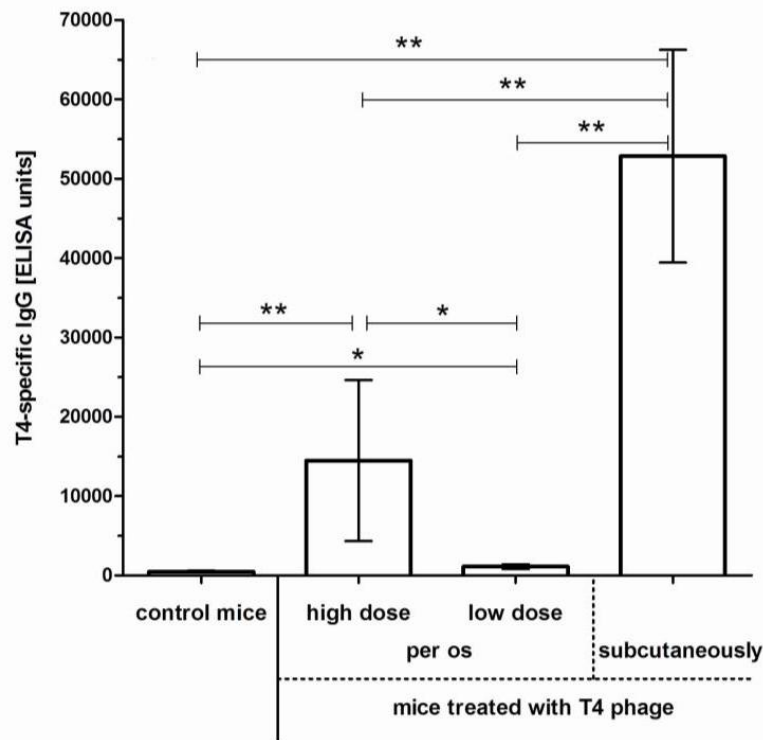


Figure 2. Intensity of anti-T4 phage IgG induction in mice treated with the phage *per os* and subcutaneously. Mice ($N = 6$ or 7) were fed with T4 phage in drinking water for 100 days, with no pH-neutralizing additives or they were injected with the phage subcutaneously. Two doses were used for the treatment *per os*: 4×10^9 pfu/mL thus making approx. 2×10^{10} pfu/mouse daily, as calculated from daily water uptake per animal (in the Figure: high dose) or 4×10^8 pfu/mL thus making approx. 2×10^9 pfu/mouse daily, as calculated from daily water uptake per animal (in the Figure: low dose). Subcutaneous treatment was done with three subsequent injections: 5×10^9 pfu/mouse on day 0, 5×10^9 pfu/mouse on day 24, 2×10^9 pfu/mouse on day 48, antibody level was tested on day 55. ELISA units were calculated for each sample according to Miura *et al.* [25,26]. Statistically significant differences between groups were marked with asterisks: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

2.2. Individual Immunogenicity of Structural Proteins gp23*, gp24*, Hoc, Soc, and gp12 in Oral Application of T4 Phage

Previous studies of T4 phage applied parenterally (i.p.) showed that phage structural proteins substantially differed in their individual immunogenicity [18]. Thus, specific response to the selected structural proteins (gp23*, gp24*, Hoc, Soc, gp12) was analyzed in samples from mice after 100 days of phage treatment *per os*. Antibodies specific to these proteins were analyzed by ELISA for the following classes: IgG in the blood and IgA in feces and results were expressed in ELISA units [25,26]. Proteins identified as significantly stimulating humoral response to the phage were graphically presented in Figure 3. A marked increase (in comparison to the control mice) was observed in anti-Hoc and anti-gp12 IgG (39- and 41-fold increase, respectively; $p < 0.001$). Similarly, anti-Hoc and anti-gp12 IgA were also significantly increased, but the increase was moderate (3.8- and 3.3-fold of increase, respectively; $p < 0.05$). Proteins Soc, gp23*, and gp24* were weakly immunogenic (Figure 3).

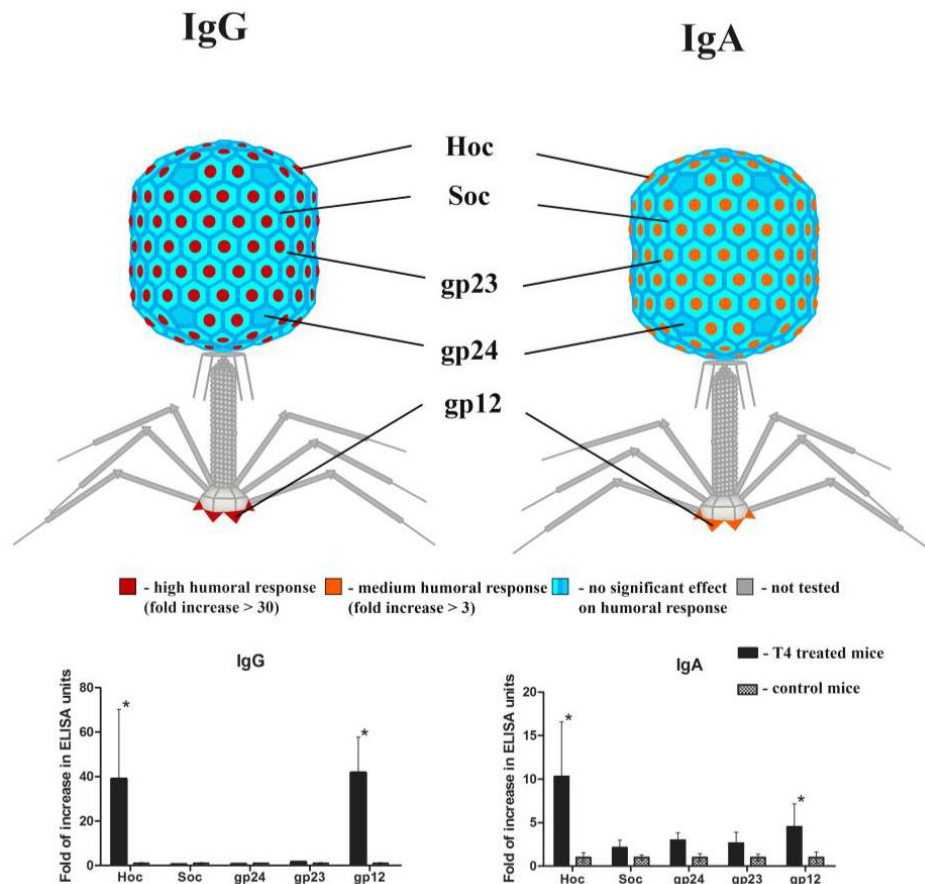


Figure 3. Individual contribution of T4 head proteins and gp12 to phage immunogenicity in mice treated with the phage *per os*. Mice ($N = 7$) were fed with T4 phage 4×10^9 pfu/mL (thus making approx. 2×10^{10} pfu/mouse daily) in drinking water for 100 days, with no pH-neutralizing additives. Separated sera and feces from these mice were examined for IgG or IgA antibodies, respectively, specific to selected T4 structural proteins: gp23*, gp24*, Hoc, Soc, and gp12. ELISA units were calculated for each protein according to Miura *et al.* [25,26], fold of increase of ELISA units in comparison to control (non-immunized) mice was expressed by colors. Statistically significant differences were marked with asterisks.

2.3. Immune Response to Foreign Antigens Presented as Fusions to Hoc Protein

T4 phage was previously demonstrated as a phage display platform applicable for presentation of foreign antigens, and those antigens were fused i.a. to the protein Hoc. Such modified phages were injected into the mice, and they elicited production of antibodies specific to presented foreign antigens [8–10,12]. Therefore, we further assessed potential ability of orally applied phages to serve as vaccine platforms. As exemplary foreign antigens, we used an oligopeptide from Ebola virus (here: antigen EB1). These oligopeptides were fused to Hoc and presented on T4 capsid by the competitive phage display [27]. Purified preparations of EB1-presenting phage were added to drinking water and mice were treated similarly as in the first part of the study. Mice were tested for specific anti-EB1 IgG and IgA; secretory IgA specific to EB1 was detected in the gut samples (Table 1).

Table 1. Induction of antibodies specific to the foreign antigen EB1 presented on T4 phage, after oral application of the phage. Mice were treated with the EB1 presenting phage in drinking water, control mice were not treated with phage or EB1 antigen, specific IgA and IgG levels were presented as mean ELISA units in groups (with SD); T4 phage specific antibodies served as a positive control of immunization. Statistically significant differences were marked with asterisks.

Class of Antibodies	Specificity of Antibodies	Type of Treatment	Immunization, ELISA Units	Statistical Significance ($p < 0.05$)
IgA	anti-EB1	T4_EB1 treatment	106,681 ($\pm 13,892$)	*
		control	30,778 ($\pm 10,853$)	
IgA	anti-T4	T4_EB1 treatment	175,507 ($\pm 61,845$)	*
		control	18,667 (± 4628)	
IgG	anti-EB1	T4_EB1 treatment	282 (± 47)	*
		control	295 (± 29)	
	anti-T4	T4_EB1 treatment	18,047 (± 4655)	
		control	557 (± 24)	

3. Discussion

A specific humoral response to bacteriophages may follow phage application for medical purposes and it may further determine the success or failure of the approach itself. Therefore, we investigated specific antibodies induced by a model phage together with microbiological characteristics. Our studies of long-term phage treatment clearly show that phages applied *per os* are able to induce a humoral response. This response may emerge *in situ*, by secretion of specific IgA to the gut lumen, but also in the blood serum as specific IgG (Figure 1). Intensity of this response and the time necessary for its induction depend on the exposure to phage antigens, which is related to phage dose (Figure 2). Specific IgA secretion turned out to be a limiting factor for phage activity in the gut. Its significant increase correlated with the lack of phages detected in feces, while an increase of serum IgG did not significantly affect gastrointestinal transit of active phages. Phages were present in murine feces as long as secretory IgA levels were low. When IgA level increased on day 79, no active phages were detected in feces. Interestingly, secretory IgA decreased with time (on day 213 it was similar to its initial levels) and this decrease allowed for the successful passage of active phages through the gut for approximately one week. Active phages were detected until phage-specific IgA level increased again on day 225 (Figure 1).

Induction of serum IgG suggests that phage can be translocated from the gut lumen to the circulation. “Gut phage” ability to induce an immunological response in humans and in animals, or even their ability to penetrate to the blood and internal organs, has never been clearly defined. One may find both examples of phages that did [28–31] and those that did not [2,32] penetrate after gastric delivery. Some studies have shown that phage translocation was rather weak [33], but it was postulated to impact systemic immune reactions [16,34]. We detected a small titer of the phage (10^3 pfu/mL) in murine blood after application of the higher phage dose (4×10^9 pfu per mL of drinking water) (data not shown). The lower phage dose (4×10^9 pfu/mL) did not allow for detectable translocation of the phage to the circulation (the detection limit was 200 pfu/mL of blood, as calculated from blood volume that was tested; this volume was limited due to ethical reasons). These observations show that even very low amounts of

phage that reach the circulation can induce a long-lasting secondary response of the immune system, when the exposure is long enough.

For phage therapy purposes, it would be useful to assess general immunogenicity of the phage applied *per os* as “high” or “low”. This requires calculation of comparable phage doses between mice and humans. Pharmacokinetic scaling of bacteriophage doses from mice to humans is not easy, since typical calculation schema have been developed for much smaller agents of generally different characteristics (e.g., small proteins) [35]. Thus, to estimate adequate phage doses in humans we used the simplification of volumes as proportional to weight across species. With such a calculation, the higher dose of T4 phage used in this study for mice, 2×10^{10} pfu per mouse daily, equals 7×10^{13} pfu per human patient daily. Such high doses are, in the least, unusual in therapeutic approaches in humans; according to Sulakvelidze *et al.* [36], during the 20th century, phages were administered to humans orally, in tablet or liquid formulations containing 10^5 to 10^{11} pfu/dose. Phage titers used for experimental therapy at the Institute of Immunology and Experimental Therapy (IIET), Phage Therapy Unit (Wrocław, Poland), in the years 2008–2010, ranged between 3×10^7 and 6×10^{10} pfu per human patient daily [4]. Human volunteers in phage T4 safety tests reported by Bruttin and Brussow [2] received a total of 9×10^7 pfu, and no specific antibodies were detected after that. In our studies, the lower, much less immunogenic dose applied to mice equals 7×10^{12} pfu per human patient daily, which is still much. Taking into account how persistent treatment was necessary to achieve a marked immunological response (two weeks of a higher dose to start the increase of IgG and more than two months to induce IgA), we conclude that T4 phage applied *per os* was weakly immunogenic.

Interestingly, these were immunological factors that turned out to limit phage viability in the gut, with no significant role of phage resistance in bacteria. Interestingly, among *E. coli* clones isolated from non-treated mice, as much as 80% were sensitive to T4 phage, which can be considered as a high fraction. Phage resistant bacterial strains dominated gut *E. coli* relatively late (day 92), and they did not determine the lack of viable phages in feces (Figure 1). This is in accordance with observations of Maura and Debarbieux [37], who reported that a phage present in the murine gut for 30 days did not give rise to domination of relevant phage-resistant bacteria. Possibly, the “arms race” between phages and bacteria is much more rapid in laboratory liquid monocultures than in the complex environment of the mammalian gut. Prolonged selection pressure necessary to select phage-resistant bacteria suggests that, at least in this model, phage propagation on commensal gut flora plays a marginal role. This is in line with the observations of Weiss *et al.* [38], who found it questionable whether T4 can effectively propagate on gut bacteria.

Structural elements of the phage capsid may differ in their individual immunogenicity [18]. Here we observed that humoral response to the phage was strongly stimulated by Hoc protein and gp12 (both IgG in the blood and IgA in the gut), while gp23*, gp24*, and Soc induced low response. High-level immunization against gp12 may strongly impact phage antibacterial activity, since gp12 plays a key role during phage infection of bacteria. A possible direction for future studies might be revealing factors promoting humoral response to gp12, which could be further applied for optimal design of phage use in humans and animals. The Hoc protein, in turn, was shown as an effective fusion protein in phage display of foreign antigens as presented by the group of V. Rao [8–10,12]. Here we proposed further study in the field; this study was comprised of a long duration of monitoring of the immune reaction and

its dependency on dose, application schedule and route of administration. Recently, bacteriophages have also been employed for DNA vaccine technologies (BigDNA's technology) that combined phages and DNA vaccines [39,40]. Thus, the high immunogenicity of Hoc may be of an advantage in developing vaccines. We found that foreign antigens displayed on the T4 phage as the Hoc-fusion can induce specific secretory IgA. We propose this result as an example of T4 phage use as an oral vaccine, and we hypothesize that further optimization of particular antigens and their arrangement on the capsid may deliver new solutions for vaccine development.

4. Materials and Methods

4.1. Bacteriophages

T4 phage was purchased from American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA). The phage was cultured on an *Escherichia coli* B host obtained from the Collection of Microorganisms at the IIET, culture medium was LB-Broth high salt (Sigma-Aldrich, Poznań, Poland). The culture was conducted 8–10 h in 37 °C. Phage lysates were purified by filtration through polysulfone membrane filters 0.22 µm (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) and added to drinking water for mice or used for further purification before they were applied as bottom antigens for ELISA. Purified phage preparations were obtained by two steps of chromatography: gel filtration on Sepharose 4B (Sigma-Aldrich, Poznań, Poland) followed by dialysis against PBS on 1000 kDa-pore membranes and LPS-affinity chromatography EndoTrap Blue according to the manufacturer's instructions (Hyglos GmbH, Bernried, Germany). LPS removal was done by three successive incubations of the preparations with the slurry followed by centrifugations. The final samples were dialyzed against PBS, filtered with 0.22 µm PVDF filters (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) and used for ELISA assay. Each purified phage preparation or phage lysate was tested for phage concentration by determination of phage titer after serial dilution with PBS (dilutions from 10⁻¹ to 10⁻⁹). Fifty microliters of each dilution was spotted on a culture plate pre-covered with susceptible bacteria, three spots for each dilution. The plate was incubated for 8–10 h at 37 °C which was enough to obtain visible plaques. The plaques were counted, mean values of three spots were calculated and the phage concentration was calculated per milliliter with regard to the dilution and spot volume.

4.2. Bacteriophages Presenting Foreign Peptides

Bacteriophages presenting exemplary foreign antigen were prepared by competitive phage display as described previously [27]. Briefly, Ebola virus antigen from Zaire EBOV strain RWGFRSGVPPKVVNY [41–43] was used for phage display; this antigen was designed "EB1". The relevant DNA sequence (CGTTGGGGCTTTCGTAGCGGCGTTCCGCCGAAAGTTGTAAATTAT) was cloned as N-terminal fusion with the gene *hoc* of T4 phage to expression vector pCDF-Duet-1 (Novagen, Merck Millipore, Darmstadt, Germany). The sequence coding for EB1 antigen was fused to the *hoc* gene using a mutagenizing primer in PCR. Expression *E. coli* B834 was transformed with the constructed plasmid, tested for effective production of EB1-Hoc fusion by SDS-PAGE and immunological detection, and used as a host for phage display cultures. Phage display cultures were conducted in LB-Broth high salt (Sigma-Aldrich, Poznań, Poland) in baffled flasks with shaking at

37 °C until OD₆₀₀ was 0.08–0.1, induced with IPTG (final concentration: 0.05 mM) and incubated with shaking at 37 °C for 1 h. T4 phage was added to a final concentration of 10⁵ pfu/mL and incubated with shaking at 37 °C for 8 h. Lysate was clarified by centrifugation at 4000 g for 3 min, filtered with sterile 0.22 µm filters and purified (as described above). Final purified phage preparations were tested for the presence of EB1 antigen on T4 capsid by ELISA assay with a standard serum specific to synthetic EB1 oligopeptide (Lipopharm, Zblewo, Poland). Phage presenting EB1 on its capsid was designed by EB1-T4 phage.

4.3. Phage Proteins

Phage proteins were used as bottom antigens in ELISA immunoassay. They were produced as optimized by Miernikiewicz *et al.* [44,45]. Briefly, proteins were expressed in *E. coli* B834(DE3) F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm met (DE3) (Novagen, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) grown in LB high salt (10 g/L of NaCl) (Sigma-Aldrich, Poznań, Poland). For expression of Soc and Hoc chaperone TF (from pTf16 vector, TaKaRa Bio Inc., Saint-Germain-en-Laye, France) and chaperones groES+groEL (from pGRO7 vector, TaKaRa Bio Inc., Saint-Germain-en-Laye, France) were used, respectively. Gp23* was co-expressed with gp31 chaperone of T4 phage. Gp12 was expressed from pCDF-Duet-1 with chaperone gp57 of T4 phage. Expression was induced with 0.2 mM IPTG (phage proteins) or 3 mM L-arabinose (TaKaRa chaperones) and conducted overnight at 25 °C. Harvested bacteria were lysed by freeze-thawing with lysozyme in phosphate buffer with PMSF (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF, pH 7.5). The soluble fraction was incubated with glutathione sorbent slurry (Glutathione Sepharose 4B, GE Healthcare Life Sciences, Warsaw, Poland), washed with phosphate buffer, and proteins were released by proteolysis with AcTev protease (5 U/mL) (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Waltham, MA, USA) at 10 °C; GST tags remained bound in the resin. In the case of gp12 Ni-NTA agarose was used without proteolysis. After intensive washing the protein was eluted with imidazole buffer. LPS removal from all protein preparations was done with EndoTrap Blue (Hyglos GmbH, Bernried, Germany). Gel filtration FPLC (fast protein liquid chromatography) on a Superdex 75 10/300 GL column (GE Healthcare Life Sciences, Warsaw, Poland) was applied and proteins were dialyzed against PBS and filtered through 0.22 µm PVDF filters (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Proteins were assessed by SDS-PAGE and concentrations were determined by the Lowry chromogenic method (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

4.4. LPS Content Determination

The endotoxin level of the purified phage preparations was assessed using EndoLISA (ELISA-based Endotoxin Detection Assay, Hyglos, Bernried, Germany), according to the manufacturer's instructions. Diluted samples or standard dilution with Binding Buffer were incubated overnight at room temperature with shaking. Subsequently, the plate was washed and Assay Reagent was added. The fluorescent signal was detected immediately by a fluorescence reader (Synergy H4 H4MLFPTAD BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). This assay was used to determine LPS content in purified phage preparations serving as bottom antigen source in ELISA test. Phage preparation was used for ELISA when its LPS content was lower than 1 activity unit per mL in order to eliminate possible reaction of animal sera with residual LPS (false-positive reactivity of serum). If the LPS content was higher than 1 activity unit per mL, additional round of purification by LPS-affinity chromatography (described above) was conducted.

4.5. Immunization of Mice

C57Bl6/J male mice (6–16 weeks old) were used. The animals were bred in the Animal Breeding Center of the IIET, in specific pathogen free (SPF) conditions. Mice from phage-treated groups were separated from control mice. Food, water, litter, boxes and other accessories for all mice were sterilized.

Mice (N = 6 to 8) received phages in drinking water to prevent micro-injuries that can be caused by a stomach probe and which result in artificial introduction of phages into the blood. Phage concentration in water was (i) the lower dose 4×10^8 pfu/mL (thus making approx. 2×10^9 pfu/mouse daily, as calculated from typical daily water uptake) or (ii) the higher dose 4×10^9 pfu/mL (thus making approx. 2×10^{10} pfu/mouse daily, as calculated from typical daily water uptake). Phage preparations were applied in drinking water without any additives for neutralization of stomach acidity, but water was mixed with PBS (1:1) in order to maintain proper ionic strength of the solution and to prevent phage aggregation and precipitation. Subcutaneous treatment was done with three subsequent injections: 5×10^9 pfu/mouse on day 0, 5×10^9 pfu/mouse on day 24, 2×10^9 pfu/mouse on day 48, antibody level was tested on day 55. Feces and blood from the tail vein (under anesthesia, to heparinized tubes) were collected repeatedly during the experiment (*i.e.*, the same mice were sampled for the whole experiment). Feces were collected directly from mice (not as fecal pellets in the cages), diluted in PBS and tested for phage-specific IgA by ELISA (see below), as well as used for microbiological testing: samples were quantitatively cultured on selective microbiological plates with media selective for Gram-positive bacteria: Mueller Hinton II Blood Agar (30.0% beef infusion, 1.75% casein hydrolysate, 0.15% starch, 1.7% agar, 5.0% sheep blood, pH neutral), Gram-negative bacteria: MacConkey Agar (1.7% peptone, 0.3% proteose peptone, 1% lactose, 0.15% bile salts, 0.5% sodium chloride, 0.003% neutral red, 0.0001% crystal violet, 1.35% agar, pH 7.0–7.1) (Graso Biotech, Starogard Gdański, Poland), and for bacteriophages: Mueller Hinton II Agar (30.0% beef infusion, 1.75% casein hydrolysate, 0.15% starch, 1.7% agar, pH neutral with *E. coli* B host layer) (Graso Biotech, Poland). Identification of *E. coli* isolated from feces was confirmed by automated mass spectrometry microbial identification system (VITEK[®]MS, Biomerieux, Durham, NC, USA). *E. coli* isolated from feces were tested for their sensitivity to T4 phage infection (60 colonies) by culturing of bacterial monolayers on culture plates with phage preparations spotted on the top; plaque formation was assessed. Serum for IgM and IgG testing was separated from the blood by double centrifugation (2250 g and 10,000 g), each time cell and platelets pellet was discarded and supernatant fraction was saved. After the second centrifugation it was used for ELISA assay. All experiments were repeated 2–4 times. One exemplary experiment of each type was presented. Each timepoint represents multiple mice, timepoints were the same for antibody testing and for microbiological testing.

4.6. Ethics Statements

All animal experiments were performed according to EU Directive 2010/63/EU for animal experimentations and were approved by the 1st Local Committee for Experiments with the Use of Laboratory Animals, Wroclaw, Poland (No. 64/2009 and 76/2011). The authors followed the ARRIVE (Animal Research: Reporting of *in vivo* Experiments) guidelines [46].

4.7. Specific Antibody Level Measurement by ELISA

A MaxiSorp flat-bottom 96-well plate (Nunc, Thermo Scientific, Poznań, Poland) was covered with purified phage preparations obtained by chromatography as described above (100 μ L per well, 5×10^9 – 10^{10} pfu/mL) or proteins (100 μ L per well, 10 μ g/mL) or oligopeptide EB1 (100 μ L per well, 80 μ g/mL) sterilely, at 4 °C, overnight. Plates were washed 5 times with PBS and blocked with 1% albumin for 1 h (100 μ L per well) at room temperature. Albumin was removed and the plate was washed 5 times with PBS with 0.05% Tween 20 (Serva, Heidelberg, Germany). Serially diluted serum was applied to the wells in 100 μ L per well. In the case of secretory IgA detection in feces, feces were homogenized in PBS in proportion 1/10, *i.e.*, each 0.1 g of feces was supplemented with PBS up to 1 mL and then serially diluted and applied to the wells in 100 μ L per well. Samples from each mice were processed separately (sera/feces were not pooled in the groups). Each sample was processed in duplicate. The plate was incubated at 37 °C for 2 h. Plates were washed 5 times with PBS with 0.05% Tween 20 (Serva, Heidelberg, Germany). Diluted detection antibody was added in the amount of 100 μ L per well: peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) or peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) or peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgA (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Detection antibody was incubated in the wells for 1 h at RT in the dark, removed, and the plate was washed 5 times with PBS with 0.05% Tween 20 (Serva, Heidelberg, Germany). TMB X-Treme substrate reagent for peroxidase was used (50 μ L) according to the manufacturer's instructions (ImmunO₄, Westminster, MD, USA). Twenty-five microliters of 2N H₂SO₄ was added to each well without substrate removal, then absorbance was measured at 450 nm (main reading) and 550 nm (background). The background values were subtracted from the main readings and the average value of each duplicate was calculated. In the case of relative increases of antibody levels in time (Figure 1), OD values were presented. To compare immunogenicity in selected conditions, to compare individual immunogenicity of phage proteins and to assess immunization by EB1 antigen (Figures 2 and 3 Table 1), highly responsive sera from animals were used to establish a reference standard serum according to Miura *et al.* [24,25]. Briefly, to calculate ELISA units (EU), 10 points of standard serum dilutions were determined on each plate, and the dilution giving an optical density at 450 nm (OD₄₅₀) of 1 was assigned as 1000 EU. A standard curve was calculated by the plate reader software (Gen5 Data Analysis Software) and fitted to a function that converted OD values to EU. Each EU value was normalized, and the average value of each duplicate (per sample) was calculated. Immunogenicity in selected conditions was assessed by fold of increase in EU (comparing immunized animals to control animals). All experiments were repeated 2–4 times; they were not summarized; exemplary experiments with their individual N values and statistical significance were presented. Statistical analysis was done by one-way analysis of variance (ANOVA, Tukey) or the Kruskal-Wallis test or the Mann-Whitney test with the Statistica 8.0 software package [47].

5. Conclusions

Phages present in the gut can induce anti-phage antibodies in blood when the exposure is long enough. The effect is also dose dependent. T4 phage (used in this study) appeared to be low immunogenic, since

only very high doses of the phage applied for a long time elicited a significant increase in specific antibody levels. However, secretion of specific IgA, even if not readily induced, had a devastating effect on phage viability. Increase of IgA seemed to play a much more important role than selection for phage-resistant *E. coli* in the gut flora; phage-resistant strains occurred relatively late. Termination of phage treatment results in a gradual decrease of secretory IgA, even to insignificant levels that again allow for transition of active phage particles through the gut. Second administration of phage also induces secretory IgA, it increases sooner than that induced by the first administration. Specific antibodies in the blood and in the gut are induced by proteins Hoc and gp12, while gp23*, gp24*, and Soc are weakly immunogenic. Foreign antigens presented on the phage can also induce antigen-specific antibodies, thus we propose T4 phage as possible platform for oral vaccines development.

Acknowledgments

We are grateful to Andrzej Górski, the head of the Bacteriophage Laboratory, IIET, for his kind help and advice during preparation of this manuscript. This work was supported by the National Science Centre in Poland, grant UMO-2012/05/E/NZ6/03314, grant NN405675940, and by the Wrocław Centre of Biotechnology programme The Leading National Research Centre (KNOW) for years 2014–2018.

Author Contributions

K.D. conceived and designed the experiments; J.M., W.B., D.L., K.H.S., A.K., Z.K., P.M., A.P., J.C., B.O., A.K., K.W., M.H., M.M. and K.D. performed the experiments; K.D., P.M. and J.M. analyzed the data; K.D. wrote the paper.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Abedon, S.T.; Kuhl, S.J.; Blasdel, B.G.; Kutter, E.M. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* **2011**, *1*, 66–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Bruttin, A.; Brüßow, H. Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: A safety test of phage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 2874–2878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kutter, E.; de Vos, D.; Gvasalia, G.; Alavidze, Z.; Gogokhia, L.; Kuhl, S.; Abedon, S.T. Phage therapy in clinical practice: Treatment of human infections. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2010**, *11*, 69–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Międzybrodzki, R.; Borysowski, J.; Weber-Dąbrowska, B.; Fortuna, W.; Letkiewicz, S.; Szufnarowski, K.; Pawełczyk, Z.; Rogóż, P.; Kłak, M.; Wojtasik, E.; *et al.* Clinical aspects of phage therapy. *Adv. Virus Res.* **2012**, *83*, 73–121. [[PubMed](#)]
5. Sarker, S.A.; McCallin, S.; Barretto, C.; Berger, B.; Pittet, A.C.; Sultana, S.; Krause, L.; Huq, S.; Bibiloni, R.; Bruttin, A.; *et al.* Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh. *Virology* **2012**, *434*, 222–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Wolska, K.; Kot, B.; Piechota, M.; Frankowska, A. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics. *Postep. Hig. Med. Dosw.* **2013**, *67*, 1300–1311. [[CrossRef](#)]
7. Przybylski, M.; Borysowski, J.; Jakubowska-Zahorska, R.; Weber-Dąbrowska, B.; Górski, A. T4 bacteriophage-mediated inhibition of adsorption and replication of human adenovirus *in vitro*. *Future Microbiol.* **2015**, *10*, 453–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Jiang, J.; Abu-Shilbayeh, L.; Rao, V.B. Display of a PorA peptide from *Neisseria meningitidis* on the bacteriophage T4 capsid surface. *Infect. Immun.* **1997**, *65*, 4770–4777. [[PubMed](#)]
9. Shivachandra, S.B.; Rao, M.; Janosi, L.; Sathaliyawala, T.; Matyas, G.R.; Alving, C.R.; Leppla, S.H.; Rao, V.B. *In vitro* binding of anthrax protective antigen on bacteriophage T4 capsid surface through Hoc-capsid interactions: A strategy for efficient display of large full-length proteins. *Virology* **2006**, *345*, 190–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Shivachandra, S.B.; Li, Q.; Peachman, K.K.; Matyas, G.R.; Leppa, S.H.; Alving, C.R.; Rao, M.; Rao, V.B. Multicomponent anthrax toxin display and delivery using bacteriophage T4. *Vaccine* **2007**, *25*, 1225–1235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Ren, Z.J.; Lewis, G.K.; Wingfield, P.T.; Locke, E.G.; Steven, A.C.; Black, L.W. Phage display of intact domains at high copy number: A system based on Soc, the small outer capsid protein of bacteriophage T4. *Protein Sci.* **1996**, *5*, 1833–1843. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Sathaliyawala, T.; Rao, M.; Maclean, D.M.; Birx, D.L.; Alving, C.R.; Rao, V.B. Assembly of human immunodeficiency virus (HIV) antigens on bacteriophage T4: A novel *in vitro* approach to construct multicomponent HIV vaccines. *J. Virol.* **2006**, *80*, 7688–7698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kamme, C. Antibodies against staphylococcal bacteriophages in human sera. I. Assay of antibodies in healthy individuals and in patients with staphylococcal infections. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B Microbiol. Immunol.* **1973**, *81*, 741–748. [[PubMed](#)]
14. Smith, H.W.; Huggins, M.B.; Shaw, K.M. Factors influencing the survival and multiplication of bacteriophages in calves and in their environment. *J. Gen. Microbiol.* **1987**, *133*, 1127–1135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Górski, A.; Międzybrodzki, R.; Borysowski, J.; Dąbrowska, K.; Wierzbicki, P.; Ohams, M.; Korczak-Kowalska, G.; Olszowska-Zaremba, N.; Łusiak-Szelachowska, M.; Kłak, M.; *et al.* Phage as a modulator of immune responses: Practical implications for phage therapy. *Adv. Virus Res.* **2012**, *83*, 41–71. [[PubMed](#)]
16. Górski, A.; Wazna, E.; Dąbrowska, B.W.; Dąbrowska, K.; Switała-Jeleń, K.; Międzybrodzki, R. Bacteriophage translocation. *FEMS Immunol Med. Microbiol.* **2006**, *46*, 313–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Łusiak-Szelachowska, M.; Zaczek, M.; Weber-Dąbrowska, B.; Międzybrodzki, R.; Kłak, M.; Fortuna, W.; Letkiewicz, S.; Rogóż, P.; Szufnarowski, K.; Jończyk-Matysiak, E.; *et al.* Phage neutralization by sera of patients receiving phage therapy. *Viral Immunol.* **2014**, *27*, 295–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Dąbrowska, K.; Miernikiewicz, P.; Piotrowicz, A.; Hodyra, K.; Owczarek, B.; Lecion, D.; Kaźmierczak, Z.; Letarov, A.; Górski, A. Immunogenicity studies of proteins forming the T4 phage head surface. *J. Virol.* **2014**, *88*, 12551–12557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

19. Huff, W.E.; Huff, G.R.; Rath, N.C.; Donoghue, A.M. Immune interference of bacteriophage efficacy when treating colibacillosis in poultry. *Poult. Sci.* **2010**, *89*, 895–900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Reyes, A.; Semenkovich, N.P.; Whiteson, K.; Rohwer, F.; Gordon, J.I. Going viral: Next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 607–617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Reyes, A.; Wu, M.; McNulty, N.P.; Rohwer, F.L.; Gordon, J.I. Gnotobiotic mouse model of phage-bacterial host dynamics in the human gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 20236–20241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Dalmasso, M.; Hill, C.; Ross, R.P. Exploiting gut bacteriophages for human health. *Trends Microbiol.* **2014**, *22*, 399–405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Duerkop, B.A.; Hooper, L.V. Resident viruses and their interactions with the immune system. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 654–659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Dabrowska, K.; Switała-Jelen, K.; Opolski, A.; Weber-Dabrowska, B.; Gorski, A. Bacteriophage penetration in vertebrates. *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *98*, 7–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Miura, K.; Orcutt, A.C.; Muratova, O.V.; Miller, L.H.; Saul, A.; Long, C.A. Development and characterization of a standardized ELISA including a reference serum on each plate to detect antibodies induced by experimental malaria vaccines. *Vaccine* **2008**, *26*, 193–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Miura, K.; Takashima, E.; Deng, B.; Tullo, G.; Diouf, A.; Moretz, S.E.; Nikolaeva, D.; Diakite, M.; Fairhurst, R.M.; Fay, M.P.; *et al.* Functional comparison of Plasmodium falciparum transmission-blocking vaccine candidates by the standard membrane-feeding assay. *Infect. Immun.* **2013**, *81*, 4377–4382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ceglarek, I.; Piotrowicz, A.; Lecion, D.; Miernikiewicz, P.; Owczarek, B.; Hodyra, K.; Harhala, M.; Górski, A.; Dąbrowska, K. A novel approach for separating bacteriophages from other bacteriophages using affinity chromatography and phage display. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 3220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Weber-Dabrowska, B.; Dabrowski, M.; Slopek, S. Studies on bacteriophage penetration in patients subjected to phage therapy. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **1987**, *35*, 563–568.
29. Keller, R.; Engley, F.B. Fate of bacteriophage particles introduced into mice by various routes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1958**, *98*, 577–579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Hoffmann, M. Animal experiments on the mucosal passage and absorption viremia of T3 phages after oral, tracheal and rectal administration. *Zentralbl. Bacteriol. Orig.* **1965**, *198*, 371–390.
31. Fogelman, I.; Davey, V.; Ochs, H.D.; Elashoff, M.; Feinberg, M.B.; Mican, J.; Siegel, J.P.; Sneller, M.; Lane, H.C. Evaluation of CD4 T cell function *in vivo* in HIV-infected patients as measured by bacteriophage phiX174 immunization. *J. Infect. Dis.* **2000**, *182*, 435–441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Merrill, C.R.; Biswas, B.; Carlton, R.M.; Jensen, N.C.; Creed, G.J.; Zullo, S.; Adhya, S. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 3188–3192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Geier, M.R.; Trigg, M.E.; Merrill, C.R. Fate of bacteriophage lambda in non-immune germ-free mice. *Nature* **1973**, *246*, 221–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Borysowski, J.; Górski, A. Is phage therapy acceptable in the immunocompromised host? *Int. J. Infect. Dis.* **2008**, *12*, 466–471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mordenti, J.; Chen, S.A.; Moore, J.A.; Ferraiolo, B.L.; Green, J.D. Interspecies scaling of clearance and volume of distribution data for five therapeutic proteins. *Pharm Res.* **1991**, *8*, 1351–1359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Sulakvelidze, A.; Alavidze, Z.; Morris, J.G., Jr. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 649–659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Maura, D.; Debarbieux, L. On the interactions between virulent bacteriophages and bacteria in the gut. *Bacteriophage* **2012**, *2*, 229–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Weiss, M.; Denou, E.; Bruttin, A.; Serra-Moreno, R.; Dillmann, M.L.; Brüßow, H. *In vivo* replication of T4 and T7 bacteriophages in germ-free mice colonized with *Escherichia coli*. *Virology* **2009**, *393*, 16–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Clark, J.R.; March, J.B. Bacteriophages and biotechnology: Vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 212–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Clark, J.R.; March, J.B. Bacteriophage mediated nucleic acid immunisation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2004**, *40*, 21–26. [[CrossRef](#)]
41. Xu, L.; Sanchez, A.; Yang, Z.; Zaki, S.R.; Nabel, E.G.; Nichol, S.T.; Nabel, G.J. Immunization for Ebola virus infection. *Nat. Med.* **1998**, *4*, 37–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Shedlock, D.J.; Aviles, J.; Talbott, K.T.; Wong, G.; Wu, S.J.; Villarreal, D.O.; Myles, D.J.; Croyle, M.A.; Yan, J.; Kobinger, G.P.; *et al.* Induction of broad cytotoxic T cells by protective DNA vaccination against Marburg and Ebola. *Mol. Ther.* **2013**, *21*, 1432–1444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Becquart, P.; Mahlaköiv, T.; Nkoghe, D.; Leroy, E.M. Identification of continuous human B-cell epitopes in the VP35, VP40, nucleoprotein and glycoprotein of Ebola virus. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e96360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Miernikiewicz, P.; Owczarek, B.; Piotrowicz, A.; Boczkowska, B.; Rzewucka, K.; Figura, G.; Letarov, A.; Kulikov, E.; Kopciuch, A.; Świtłała-Jeleń, K.; *et al.* Recombinant expression and purification of T4 phage Hoc, Soc, gp23, gp24 proteins in native conformations with stability studies. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e38902. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Miernikiewicz, P.; Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wrocław, Poland. Personal Communication, 2013.
46. Kilkenny, C.; Browne, W.J.; Cuthill, I.C.; Emerson, M.; Altman, D.G. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* **2010**, *8*, e1000412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. StatSoft, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. Available online: <http://www.statsoft.com> (accessed on 20 April 2015).

Supplementary Materials

Ebola virus antigen from Zaire EBOV strain RWGFRSGVPPKVVNY (EB1) was used as an exemplary foreign antigen and it was presented on T4 capsid by competitive phage display [27] (in the Figure: EB1-T4). The phage was purified and tested for the presence of EB1 antigens by ELISA, in comparison to a control phage modified with 6-histidine sequences instead of EB1. Additionally, solving buffer from purified phage preparation was separated on 100-kDa membranes and tested for the presence of EB1 antigens by ELISA (in the Figure: background); this was done to exclude potential remains of EB1 unincorporated to the phage capsid.

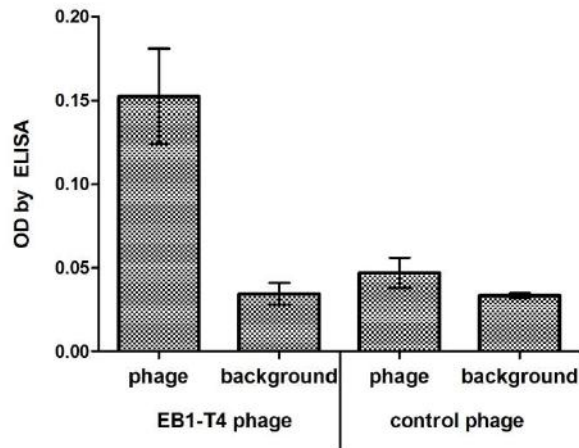


Figure S1. Purified preparation of T4 phage modified with oligopeptides EB1 derived from Ebola virus: immunological identification of EB1 oligopeptides on the phage capsid and in the solvent.



Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered *per os*

Joanna Majewska¹, Zuzanna Kaźmierczak¹, Karolina Lahutta¹, Dorota Lecion¹, Aleksander Szymczak¹, Paulina Miernikiewicz¹, Jarosław Drapała², Marek Harhala¹, Karolina Marek-Bukowiec³, Natalia Jędruchniewicz³, Barbara Owczarek¹, Andrzej Górski¹ and Krystyna Dąbrowska^{1,3*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Joseph Alex Duncan,
University of North Carolina at Chapel
Hill, United States

Reviewed by:

Marisa Mariel Fernandez,
Institute of Studies on Humoral
Immunity (IDEHU), Argentina
Carolina Maldonado-Galdeano,
Centro de Referencia para
Lactobacilos (CERELA),
CONICET, Argentina
Wenyu Han,
Jilin University, China

*Correspondence:

Krystyna Dąbrowska
dabrowska@hirsfeld.pl

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 25 April 2019

Accepted: 21 October 2019

Published: 14 November 2019

Citation:

Majewska J, Kaźmierczak Z,
Lahutta K, Lecion D, Szymczak A,
Miernikiewicz P, Drapała J, Harhala M,
Marek-Bukowiec K,
Jędruchniewicz N, Owczarek B,
Górski A and Dąbrowska K (2019)
Induction of Phage-Specific
Antibodies by Two Therapeutic
Staphylococcal Bacteriophages
Administered *per os*.
Front. Immunol. 10:2607.
doi: 10.3389/fimmu.2019.02607

¹ Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wrocław, Poland, ² Faculty of Computer Science and Management, Wrocław University of Science and Technology, Wrocław, Poland, ³ Research and Development Center, Regional Specialist Hospital in Wrocław, Wrocław, Poland

In therapeutic phage applications oral administration is a common and well-accepted delivery route. Phages applied *per os* may elicit a specific humoral response, which may in turn affect phage activity. We present specific anti-phage antibody induction in mice receiving therapeutic staphylococcal bacteriophage A3R or 676Z in drinking water. The schedule comprised: (1) primary exposure to phages for 100 days, followed by (2) diet without phage for 120 days, and (3) secondary exposure to the same phage for 44 days. Both phages induced specific antibodies in blood (IgM, IgG, IgA), even though poor to ineffective translocation of the phages to blood was observed. IgM reached a maximum on day 22, IgG increased from day 22 until the end of the experiment. Specific IgA in the blood and in the gut were induced simultaneously within about 2 months; the IgA level gradually decreased when phage was removed from the diet. Importantly, phage-specific IgA was the limiting factor for phage activity in the gastrointestinal tract. Multicopy proteins (major capsid protein and tail morphogenetic protein H) contributed significantly to phage immunogenicity (IgG), while the baseplate protein gpORF096 did not induce a significant response. Microbiome composition assessment by next-generation sequencing (NGS) revealed that no important changes correlated with phage treatment.

Keywords: *Staphylococcus* phage, antibodies, immune response, oral administration, gastrointestinal tract, A3R phage, 676Z phage, translocation

INTRODUCTION

With antibiotic resistance spreading at an alarming rate and only a few novel classes of antibiotics discovered in the last decades (1–3), the need for alternative therapeutics to control bacterial infections is critical. Among difficult bacterial infections, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the major threats (4–6). Although MRSA strains are not usually characterized by higher virulence than methicillin-sensitive strains (MSSA), they often carry concomitant resistance to many commonly used as well as new antibiotics and last-resort drugs

(7–10), which greatly limits therapeutic options, and is associated with increased mortality risk and higher costs of treatment. Molecular characterization, evolution, and epidemiology of MRSA were recently thoroughly reviewed elsewhere (11).

Phage therapy is gaining renewed interest as alternative treatment in antibiotic-resistant bacterial infections (12–14). This includes phage therapeutics active against *Staphylococcus aureus*. Efficacy of staphylococcal phage therapy has been reported in cases of, among others, purulent disease of lungs and pleura (15), gastrointestinal infections, ulcerated varicose, pericarditis, and furunculosis (16, 17). Case studies have also demonstrated successful topical use of anti-staphylococcal phages in recurrent corneal abscess and interstitial keratitis caused by vancomycin-intermediate sensitivity *S. aureus* (VISA) (18), and orally as a three-phage cocktail (including phage A3R) in decolonization from MRSA in a healthcare worker of an intestinal carrier status (19). Staphylococcal phage ISP was proposed as a component of phage cocktail dedicated to treatment of infected burn wounds (20), but the preliminary, small-scale results were not satisfactory. In the Phage Therapy Unit of the Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy (HIET) phages specific to staphylococci have been applied most frequently (21–23). Both poly- and monoinfections with *S. aureus* were treated, including MRSA, and applied bacteriophages included A3R phage and 676Z phage (24). They have also been used as components of the therapeutic anti-staphylococcal phage cocktail MS-1 (25). Reports from the therapeutic use of these bacteriophages support good applicability of their oral use (21–23), which is also a convenient, relatively safe route of delivery, well-accepted by patients.

The role of phages in medicine is not restricted to their inherent ability to specifically infect and kill bacterial cells. Phages have recently been recognized as important components of the natural microbiome of humans and animals (26, 27), with a special focus on the gastrointestinal (GI) tract, where they constitute a major fraction of the virome (28, 29). Both natural bacteriophages and those introduced to humans or animals for therapeutic purposes enter interactions with mammalian immune systems. Although it is generally clear that bacteriophages are able to elicit specific antibody production which may in turn affect phage activity (30–39), the mechanisms and consequences of this process are vague. Factors that determine phage immunogenicity, and how specific responses affect phage pharmacokinetics, are not well-recognized either in exogenous (e.g., therapeutic) phages or those constituting a part of the natural virome (e.g., in the gut). In the first oral phage safety trial in humans (40) no anti-phage IgG, IgM, or IgA antibodies were detected in the blood of human volunteers receiving T4 phage for two consecutive days. Animal models, however, demonstrated that antibody induction by orally administered phages was possible by continuous exposure of animals to relatively high doses of phage (41). It has been documented that therapeutic phages induced phage-specific IgG, IgM, and IgA antibodies with development of phage-neutralizing activity in human blood (neutralization assessed *in vitro*); however, no correlation was observed between the induction of these phage-neutralizing antibodies and the outcome of phage therapy

(25, 42). In early studies by Bradley et al. (43) actinophage MSP8 (*Siphoviridae*) was administered in drinking water to mice. Phage-neutralizing antibodies were detected in the blood, with the initial response involving 19s globulin (IgM), later accompanied by 7s globulin (IgG). Similar observations were reported for coliphage T4, which induced specific IgG after oral administration in mice (41). Notably, in these murine models phage doses were very high in comparison to those applied in humans. Interestingly, effective intragastric immunization does not require phage particles to be infective, as demonstrated by immunization with UV-inactivated filamentous phage (44); thus effective delivery of phage antigens can be sufficient for induction of the specific response.

The long-term kinetics of phage-specific antibody induction by orally applied model phage T4 so far have been demonstrated only in our previous studies (41). Continuous exposure of mice to relatively high phage titers in drinking water resulted in the induction of secretory anti-phage IgA in the gastrointestinal tract and anti-phage IgG antibodies in the blood. Phage-specific secretory IgA in the gut appeared to be the major factor limiting phage activity in the gut. Notably, secretory IgA decreased over time once the phage was removed from the diet. A significant increase of anti-phage IgM antibodies was not detected, and phage-specific IgA antibodies in the blood were not investigated. Differences in immunogenicity of capsid proteins were demonstrated in the model phage, where either high- or low-immunogenic proteins were identified. No other bacteriophages, including therapeutic ones, have been evaluated so far. Comparison of humoral response kinetics to phages representing different groups (e.g., naturally occurring vs. therapeutic ones) may allow to identify possible general trends in antibody induction by phages.

Here we present an immunological study of two related therapeutic bacteriophages active against *Staphylococcus aureus*: A3R and 676Z (23, 45) in a mouse model. A very long-term experiment (~9 months) allowed for studies of specific antibodies' complete kinetics: (1) in the prolonged primary exposure to phages, (2) during the time of phage removal from the diet, and (3) in the second exposure to the same phage. The study included both induction of specific secretory IgA and specific IgG, IgM, and IgA in blood, and further, it included bioavailability of active phage in relation to the kinetics of antibody production. Major phage structural proteins that contributed to specific antibody induction by phages A3R and 676Z were identified, and overall safety assessment was conducted with testing for microbiome composition in animal feces.

MATERIALS AND METHODS

Bacteriophages and Bacterial Strains

A3R and 676Z phages were obtained from the Therapeutic Phage Collection of the Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy (HIET) PAS and propagated on *Staphylococcus aureus* strains R19930 and Z11778, respectively, both obtained from the Polish Collection of Microorganisms

(HIIET PAS, Poland) and isolated from patients of the Phage Therapy Unit at the HIIET PAS.

Crude phage lysates were prepared as follows: flasks containing enriched nutrient broth were inoculated with bacterial host suspension and incubated at 37°C for 3 h with vigorous shaking. Then, phages were added to the flasks, and the cultures were kept at room temperature for 30 min to allow for phage adsorption and incubated at 37°C with vigorous shaking for 10 h. After that time the flasks were transferred to 4°C and left for 2 days to clarify. Phage lysates were then centrifuged at 8,000 rpm, and the supernatants were filtered through 0.22 µm Millipore membrane filters (Merck Millipore) and purified using size exclusion chromatography on Sepharose 4B (Sigma-Aldrich). Such preparations were either used to prepare phage-enriched drinking water for animal experiments, or subjected to dialysis through 1,000 kDa membranes (Spectrum Laboratories, USA) against PBS. For ELISA tests involving fecal samples, an additional purification step involving CIMmultus QA-1 Advanced Composite Column, pore size 2 µm (BIA Separations), was completed prior to dialysis. Phage titers in lysates and purified preparations were determined using serial dilutions and the double-layer agar plate technique according to Adams (46).

Phage Proteins

Phage proteins were used as bottom antigens in ELISA immunoassay and to obtain protein-specific sera. Three proteins were used: Mcp—major capsid protein (product of gene AFN38122.1 or AFN38316.1 for A3R and 676Z, respectively); TmpH—tail morphogenetic protein H (product of gene AFN38181.1 or AFN38375.1 for A3R and 676Z, respectively); gpORF096 (product of gene AFN38152.1 or AFN38346.1 for A3R and 676Z, respectively). Genes were cloned in the Gateway technology into the expression vector (Thermo Fisher) pDEST15 (Mcp) or pDEST24 (TmpH and gpORF096) and expressed in *E. coli* B834(DE3) F⁻ *ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm met* (DE3) (Novagen) grown in Luria-Bertani Broth (LB) high salt (10 g/L of NaCl) culture medium (Sigma-Aldrich) supplemented with ampicillin, chloramphenicol and 3 mM L-arabinose (Sigma-Aldrich) at 37°C until OD₆₀₀ reached 0.8. To facilitate proper folding of proteins, chaperones groES+groEL (from pGRO7 vector, TaKaRa Bio Inc.) were used. Expression of phage proteins was induced with 0.2 mM isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) (Thermo Scientific) and conducted overnight at 25°C. Cultures were then centrifuged for 5 min at 8,000 rpm and the supernatant was removed. Harvested bacteria were suspended in phosphate buffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0), treated with PMSF (1 mM) and incubated on ice for 15 min. The lysis was done by incubation with lysozyme (0.5 mg/ml) for 6–7 h on ice and by the freeze-thaw method (−80°C). The preparation was then supplemented with Mg²⁺ (up to 0.25 mM), DNase (10 µg/ml) and RNase (20 µg/ml), and incubated on ice for 3 h. Fractions were separated by two centrifugations (12 000 rpm, 45 min, 15°C). The soluble fraction was filtered through 0.45 µm PVDF filters and incubated with glutathione sorbent slurry (Glutathione Sepharose 4B, GE Healthcare Life Sciences), washed with phosphate buffer, and

proteins were released by proteolysis with rTev protease (5 U/mL) (Pure Biologics, Poland) at 10°C; GST tags remained bound in the resin. LPS removal from all protein preparations was done with EndoTrap HD (Hyglos GmbH, Germany). Gel filtration FPLC (fast protein liquid chromatography) on a Superdex 75 10/300 GL column (GE Healthcare Life Sciences, Poland) was applied for final separation and proteins were dialyzed against PBS and filtered through 0.22 µm PVDF filters (Merck Millipore, Germany). Proteins were assessed by SDS-PAGE and concentrations were determined by the Lowry chromogenic method (Thermo Scientific, USA). Alternatively, protein concentrations were calculated based on SDS-PAGE protein band density with reference to a standard band of known protein concentration using dedicated software (GeneSnap, Syngene).

Immunization of Mice

C57BL/6J normal male mice ($N = 6$ or 7) were obtained from the Medical University of Białystok and bred in the Animal Breeding Centre of the Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy (HIIET) in an isolated area in SPF conditions. All animal experiments were performed according to EU directive 2010/63/EU for animal experiments and were approved by the 1st Local Committee for Experiments with the Use of Laboratory Animals, Wrocław, Poland (project no. 76/2011). The authors followed the ARRIVE (Animal Research: Reporting of *in vivo* Experiments) guidelines.

Microbiological assessment confirmed that no phages active against the two host *S. aureus* strains were initially present in fecal and blood samples collected from the mice used for these experiments. Size-exclusion chromatography-purified preparations of phage A3R or 676Z in 0.068 M phosphate buffer (pH 7.2) were diluted in PBS and mixed with drinking water (1:1 ratio) to a final concentration of 4×10^9 pfu/ml. Water mixed with PBS was used to maintain higher ionic strength since decreased ionic strength was shown to trigger phage aggregation (47). Mice were given such preparations continuously for 100 days as a sole water source. Phages were then removed from the diet and the experiment was continued for 120 days. After that, drinking water was once again replaced with phage preparations continuously for the next 44 days. Whenever phage-treated groups were given phage preparations, the control group was given drinking water mixed with PBS and phosphate buffer in the same ratio as phage-treated groups. Mice from phage-treated groups were separated from control mice.

Blood from the tail vein and fecal samples were collected throughout the experiments to determine the number of viable phage particles in feces and assess phage translocation to the circulation system. Active phages were detected in any samples when fresh only. Plasma was separated from blood samples by double centrifugation (2,250 g and 10,000 g) and stored at −20°C along with fecal samples for the subsequent evaluation of specific anti-phage antibody levels or microbiome assessment by 16S RNA analysis in next-generation sequencing (NGS).

Intraperitoneal Immunization of Mice and Phage-Specific Reference Plasma Samples

C57BL/6J normal male mice ($N = 5$ or 6) (Medical University of Białystok) were administered intraperitoneally (IP) three doses of highly purified phage preparations, 10^{10} pfu/mouse each on days 0, 20, and 50. Blood samples were collected from the tail vein on day 100 and plasma was separated as described above.

To obtain phage-specific reference plasma samples for the standard curve in calculation of ELISA units (41, 48, 49), C57BL/6J normal male mice (Medical University of Białystok) were administered subcutaneously (s.c.) three doses of highly purified phage preparations, 5×10^{10} pfu/mouse each on days 0 (+ adjuvant), 20 (+ adjuvant), and 40. Blood was collected from the orbital vein on day 48.

Protein-Specific Sera

Ovalbumin (OVA) was purchased from Abnova. Phage structural proteins Mcp, TmpH, and gpORF096 were obtained as described above. To obtain OVA-specific IgG, C57BL/6J male mice (Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw) were administered subcutaneously (s.c.) three doses of OVA, 150 μ g/mouse each on days 0 (+ adjuvant), 14, and 28. Blood was collected from the orbital vein to microtubes containing serum gel with clotting activator (Sarstedt, Germany) 8 days after the last dose. Serum was separated from blood by centrifugation (10 min, 2,000 g) and stored at -20°C for further use. To obtain phage protein-specific sera, C57BL/6J male mice were administered s.c. three doses of highly purified proteins Mcp, TmpH, or gpORF096, 200 μ g/mouse each on days 0 (+ adjuvant), 21 (+ adjuvant), and 45. Blood was collected from the orbital vein 1 week after the last dose and serum was separated and stored as described above.

Specific Anti-phage Antibody Level Measurement by ELISA

MaxiSorp flat-bottom 96-well plates (Nunc, Thermo Scientific) were coated with highly purified phage preparations 5×10^8 pfu/well in 100 μ l (or 7.5×10^8 pfu/well in the case of fecal IgA assessment) overnight at 4°C . Subsequently, wells were washed 5 times with PBS or PBS with 0.05% Tween 20 (BD Biosciences) (in fecal samples) and blocked with 1% albumin (Sigma) in PBS at room temperature for 45 min. Blocking solution was then removed and plates were washed 5 times with PBS with 0.05% Tween 20. Plasma or fecal samples diluted in PBS were then added to wells at 100 μ l per well and incubated at 37°C for 2 h. Samples were diluted as follows: 1:100, 1:200, and 1:400 for plasma IgM, IgG and IgA testing, respectively; 1:2,000 dilution was used for fecal IgA. Each sample was investigated in duplicate. Subsequently, plates were washed 5 (for plasma samples) or 7 (for fecal samples) times with PBS with 0.05% Tween 20 and 100 μ l per well of diluted detection antibody: horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories), IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories), or IgA (BIO-RAD) was applied

to the plates and incubated for 1 h at room temperature in the dark. The antibody solution was removed and the plates were washed 5 or 7 times with PBS with 0.05% Tween 20. TMB (50 μ l/well) was used as a substrate reagent for peroxidase according to the manufacturer's instructions (R&D Systems) and incubated for 30 min. Finally, 25 μ l of 2N H_2SO_4 was added to stop the reaction and the absorbance was measured at 450 nm (main reading) and normalized by subtracting the background absorbance at 570 nm.

To compare phage-specific IgG levels in plasma after different administration routes, a standard curve with phage-specific reference plasma samples was used as described previously (41, 48, 49). Each curve consisted of 10 points of 2-fold reference plasma dilutions, from 1:100 to 1:51,200 (each dilution was processed in duplicate) and two uncoated wells to which PBS was added instead of serum samples that served as blanks. Further steps of the assay were performed as described above. Gen5 was used to normalize and calculate ELISA units, with the standard curve as a reference (41, 48, 49). Plasma samples were diluted as follows: for 676Z phage 1:500 and 1:100 dilutions were used for phage-treated groups and control group, respectively, while for A3R 1:800 and 1:200 dilutions were used for phage-treated groups and control group, respectively. These dilutions were optimized to fit within standard curves in our previous immunological studies of phage-specific antibody production (data not shown). The dilution factor was taken into account when calculating final ELISA units.

Assessment of Immunogenicity of Individual Proteins by ELISA

MaxiSorp flat-bottom 96-well plates (Nunc, Thermo Scientific) were coated with highly purified protein preparations. Each protein's individual ability to adhere to the plastic surface of the plate was assessed and normalized by the low-concentration CBQCA Protein Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific) (see below) and wells were covered overnight at 4°C with OVA (1.2 μ g/well), Mcp (0.8 μ g/well), TmpH (1.5 μ g/well), and gpORF096 (0.2 μ g/well). Subsequently, wells were washed 5 times with PBS and blocked with 5-fold diluted SuperBlock Blocking Buffer (Thermo Scientific) at room temperature for 45 min. Blocking solution was then removed and plates were washed 5 times with PBS with 0.05% Tween 20. Plasma samples diluted in PBS were then added to wells at 100 μ l per well. Two standard curves were prepared for each plate: one with Mcp-, TmpH-, or gpORF096-coated wells and their respective reference sera, and one with OVA-coated wells and reference OVA-specific murine serum for normalization of results between plates. Each curve consisted of 10 points of 2-fold reference serum dilutions, from 1:100 to 1:51,200 (each dilution was processed in duplicate) and two uncoated wells to which PBS was added instead of serum samples that served as blanks. Further steps of the assay were performed as described above. Gen5 was used to normalize and calculate ELISA units, with the OVA standard curve as a reference (41, 48, 49).

Blocking of Phage Activity by Murine Plasma Samples

Plasma samples collected from mice immunized with A3R or 676Z phages either *per os* or IP and from control mice were diluted 2,000-fold in PBS and incubated with equal volumes of purified phage preparations of phages A3R or 676Z (2×10^6 or 1×10^7 pfu/ml) for 30 min at 37°C. Then, samples were serially diluted and phage titers were determined using the spot plating technique. The plasma dilution factor used in this experiment was determined experimentally, as for dilutions smaller than 1:2,000 the difference between groups was either undetectable or unclear (for exemplary results see **Supplementary Figure 7**).

Phage Translocation From GI Tract to Circulation

C57BL/6J normal male mice ($N = 5, 6, \text{ or } 7$) (Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw) were used. Size-exclusion chromatography-purified preparations of phage A3R or 676Z in 0.068 M phosphate buffer (pH 7.2) were diluted in PBS and mixed with drinking water to a final concentration of 4×10^9 pfu/ml (“low”) or 8×10^{10} pfu/ml (“high”). Mice received these preparations as a sole water source for 30 h and food was removed for the initial 5 h. To assess the effect of gastric juice neutralization on phage translocation to blood, one of two groups receiving a high phage titer was given 200 mM sodium bicarbonate in drinking water for 16 h prior to the experiment. Blood samples were collected from the tail vein after 5 and 27 h of phage administration in drinking water. Phage titers in blood were determined using double-layer agar plates technique according to Adams (46).

Measurement of Protein Content in Wells

The CBQCA Protein Quantitation Kit (Thermo Fisher) was adapted to measure protein content in wells of MaxiSorp flat-bottom 96-well plates and determine optimal protein concentrations for plate coating. Plates were coated with OVA and phage proteins at various concentrations overnight at 4°C. PBS was added to wells serving as blanks (6 wells) and designated for the standard curve. Plates were washed 5 times with PBS. Eighty microliters of assay buffer (0.1 M sodium borate buffer, 0.1% Triton X-100, pH 9.3) supplemented with 0.83 mM KCl were added to protein-coated and blank wells. A six-point standard curve of 160, 80, 40, 20, 10, and 5 ng per well of bovine serum albumin (BSA) in the assay buffer supplemented with 0.83 mM KCl was prepared in designated wells. Subsequently, 20 μ l of 1 mM ATTO-TAG CBQCA reagent solution in the assay buffer were added to each well. The plate was shielded from light and incubated for 2 h at room temperature with shaking (400 rpm). Fluorescence was read using the excitation/emission wavelength of $\sim 465/550$ nm. The mean blank value was calculated and subtracted from the results. Protein content in OVA- and phage protein-coated wells was calculated with reference to the standard curve obtained for BSA.

Microbiome Assessment of Mice

DNA isolation from murine feces was performed with the QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) preceded by physical

homogenization with 0.1 mm zirconia beads (OPS Diagnostics) in 1 ml of InhibitEX buffer: samples were vortexed for 1 min, incubated in 95°C for 5 min, vortexed vigorously for 3 min and finally centrifuged for 1 min at 14,500 rpm. Further steps were performed according to the manufacturer’s instructions followed by an additional cleaning procedure using Genomic DNA Clean & Concentrator-10 (Zymo Research). DNA was eluted with 200 μ l of ATE buffer and samples were stored at -20°C for further use.

Further steps were performed as described previously (50). Briefly, preliminary measurement of DNA concentration in the samples was performed with the Qubit 2.0 fluorometer using the Qubit dsDNA HS assay kit. Three samples of the highest quality from each group were selected for further processing. The Ion 16S Metagenomics Kit (Thermo Fisher) was used to amplify DNA coding for 16S rRNA V2, V3, V4, V5, V6–7, V8, V9 hypervariable regions’ coding sequences, according to the manufacturer’s instructions, using 5 ng of DNA for each sample. Barcoded libraries were created by the Ion Xpress Plus Fragment Library Kit with Ion Xpress Barcodes. The final library concentration was quantified by RT-qPCR with the Ion Library TaqMan Quantitation Kit according to the manufacturer’s protocol. Emulsion PCR and the bead enrichment step were performed on the Ion OneTouch 2 System with the Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit. Enriched template beads were mixed with the reagents from the Hi-Q View 400 Sequencing kit and loaded onto Ion Torrent 314 V2 chips. Sequencing parameters standard for 16S rRNA Targeted Sequencing were used based on the manufacturer’s protocol.

Unaligned binary data files [Binary Alignment Map (BAM)] generated by the Ion Torrent PGM were uploaded to IonReporter version 5.6. Analysis was performed with the base pair cut-off number set at 150, minimum alignment coverage at 90%, and minimum abundance at 10 copies. Curated MicroSEQ 16S Reference Library v2013.1 was used as a reference database to identify obtained reads. Results obtained by the described workflow were visualized by KRONA software integrated in IonReporter 5.6.

RESULTS

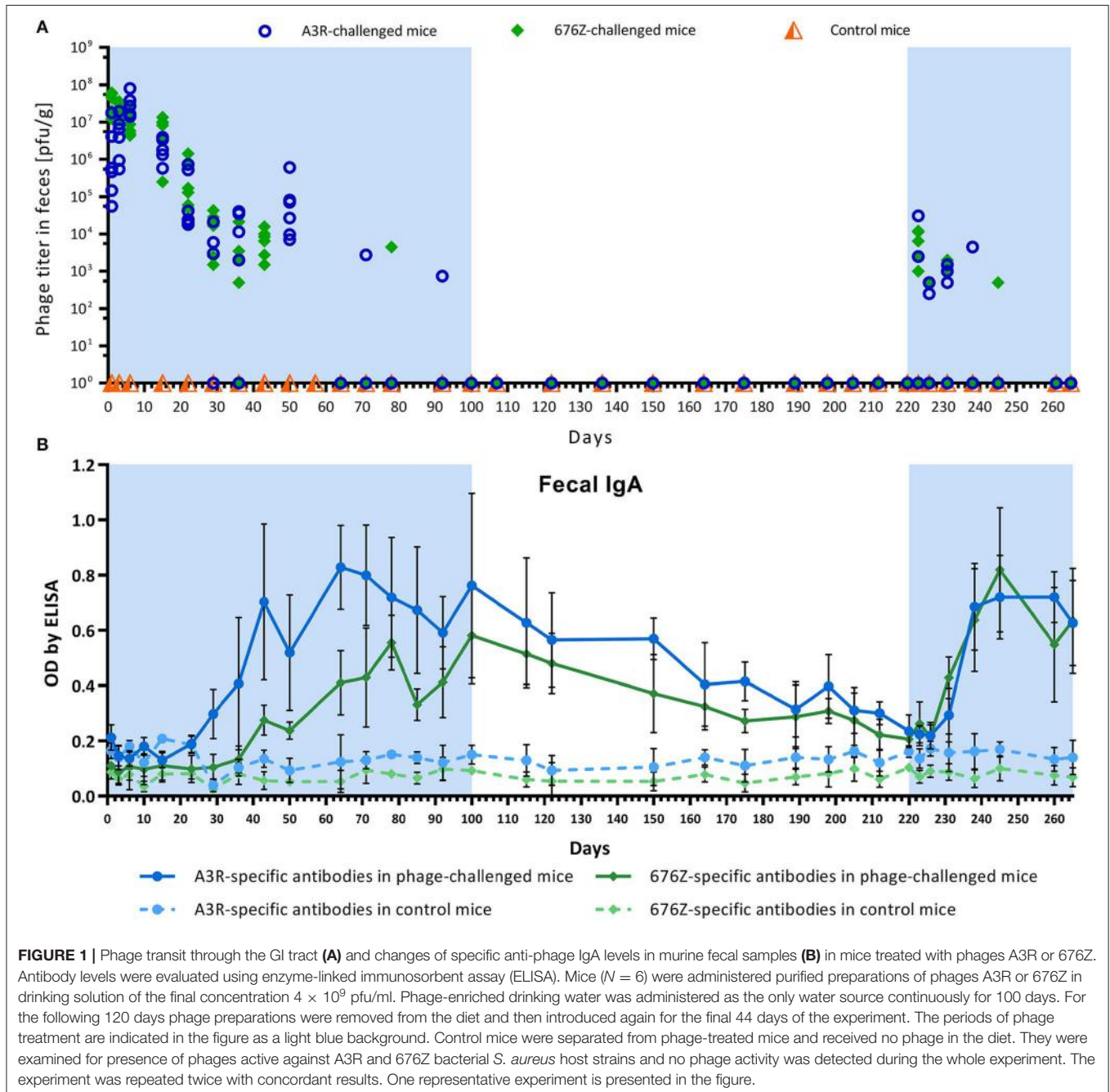
Phage Passage Through the Gastrointestinal Tract and Induction of Phage-Specific IgA in Murine Gut

Before the experiment, microbiological assessment of bacterial colonies isolated from murine feces indicated lack of *S. aureus*, confirming that phages A3R and 676Z had no natural host within the GI tract of mice used in this experiment (data not shown). By the use of the animals with a natural microbiome (including virome) but without phage hosts, this study allowed for assessment of the phage-specific immune response and its impact on phage viability in the normal GI tract, without interfering effects of phage propagation on a sensitive host. The experiment was 264 days long and it comprised three stages: (I) on days 0–100 mice were continuously given purified A3R or 676Z phage preparations as a drinking solution at a final concentration of

4×10^9 pfu/ml (which corresponds to $\sim 2 \times 10^{10}$ pfu per mouse daily as calculated from the average daily water intake); (II) on days 101–220 phages were removed from the diet, and then (III) phage was given again on days 221–264 the same way as at stage I.

Passage of active phages through the GI tract was assessed by the phage recovery from feces; their kinetics are presented in **Figure 1A**. Primary exposure (stage I) to phages resulted in very effective gut transit. Phage titers recovered from murine feces within the first 24 h reached 3.84×10^6 and 3.53×10^7 for A3R and 676Z, respectively. Within the next 2

weeks of phage treatment, phage titers recovered from feces varied in the range 1.9×10^6 to 2.5×10^7 pfu/g and 7.5×10^6 to 3.5×10^7 pfu/g for A3R and 676Z, respectively. This correlated with very low secretory IgA levels (**Figure 1B**; the same timescale was used as for phage recovery in **Figure 1A**). Later, IgA was gradually increasing, and that correlated with gradually decreasing phage titers in feces. Phages were still detectable until day 50, ranging between $\sim 5 \times 10^3$ and 5×10^5 pfu/g, which is 2–4 orders of magnitude less than at the beginning of the experiment. From day 64, phages were undetectable or single plaques in single individuals were



observed. This correlated with markedly increased levels of phage-specific secretory IgA that were observed approximately from 2 months of primary phage treatment until its end (day 100) (Figure 1).

During the second stage of the experiment (days 101–220), when phage was removed from the diet, phages were not detected in feces (as expected, also with regard to the lack of a sensitive bacterial host). Importantly, when animals were not exposed to the phages, phage-specific IgA in feces gradually decreased to insignificant levels within the next 120 days (on day 220) (Figure 1). During the third stage of the experiment, when phage preparations were again added to drinking water, phage-specific secretory IgA increased sooner, i.e., within the next 2 weeks, but before they did, active phages were able to pass the GI tract again. Nevertheless, mean titers were markedly lower, in the range 1.3×10^2 to 6×10^3 and 8.3×10^1 to 5.6×10^3 pfu/g for A3R and 676Z, respectively, and they decreased to undetectable levels within only 25–30 days. Again, significantly elevated secretion of phage-specific IgA correlated with the lack of active phage shedding.

Induction of Anti-phage Antibodies in the Blood of Mice Treated With Phage Preparations *per os*

Administration of the phages in drinking water to mice allows for detection of active phage in blood, but detection is irregular (not in all individuals) and in low concentrations. Surprisingly, even administration of phages at the concentration of 8×10^{10} pfu/ml often did not result in detectable levels, and the maximum blood titer achieved in some individuals did not exceed 2×10^3 pfu/ml (Supplementary Figures 1, 2). Importantly, any phages were detectable in blood only within the 1st week of the treatment (Supplementary Figure 2), which may be related to gradually increasing specific antibody levels in blood.

During the whole experiment, animals were repeatedly tested for A3R and 676Z phage-specific antibodies in blood (plasma). Kinetics of IgM, IgG, and IgA production are shown in Figure 2. In general, a clear increase of phage-specific antibody levels in all classes was observed. No significant differences between the two investigated phages were observed. The pattern of antibody increase was typical for many proteinaceous antigens capable of induction of a T-dependent antibody response. First, phage-specific IgM increased from ~day 10, reaching a maximum concentration in plasma on day 22. After that, phage-specific IgM gradually decreased to insignificant levels. In parallel to the increase of IgM, phage-specific IgG also began its increase; it reached a significantly elevated concentration on day 22 and continued its intensive increase for approximately a month (until day 50), when it achieved a roughly stable, markedly high level. This high concentration did not decrease significantly until the end of the experiment, even at stage II when phage preparations were not administered to the animals (Figure 2). Concordantly, second administration of the phages on day 220 (stage III of the study) did not result in detection of active phage particles in

blood (data not shown). At the same time, phage passage through the gut was effective again (Figure 1A).

Phage-specific IgA levels in blood (Figure 2) were consistent with those observed as secretory antibodies in feces (Figure 1B): phage-specific IgA levels were not detectable in blood at the beginning of the experiment, then gradually increased, reaching their highest levels after ~2 months of treatment. After phage removal from the diet, IgA levels gradually decreased, reaching a markedly lower concentration on day 220 (day 120 of the pause in phage treatment). Notably, in contrast to IgA, IgG level was not affected by removing phage from the diet. The second administration of phage preparations induced anti-phage IgA production much sooner than primary administration: it reached significantly increased levels within the next 2 weeks (Figure 2), which was concordant with secretory IgA induction (Figure 1B).

Individual Immunogenicity of Selected Structural Proteins: Major Capsid Protein (Mcp), Tail Morphogenetic Protein H (Tmph), and Baseplate Protein gpORF096

Structural phage proteins may differ significantly in their ability to induce a specific humoral response, as demonstrated previously in T4 phage (37, 41). Therefore, immunogenicity of two structural proteins abundantly present on the A3R and 676Z phage virions was investigated: Mcp—major capsid protein (product of gene AFN38122.1 or AFN38316.1 for A3R and 676Z, respectively); and TmpH—tail morphogenetic protein H (product of gene AFN38181.1 or AFN38375.1 for A3R and 676Z, respectively) (45). In addition, gpORF096 (product of gene AFN38152.1 or AFN38346.1 for A3R and 676Z, respectively) was investigated as a recently identified element of phage baseplate necessary for effective infection of host bacteria (51). All three proteins share 100% amino acid sequence identity between A3R and 676Z phages.

IgG antibodies specific to the structural proteins Mcp, TmpH and gpORF096 were analyzed on day 100, when the specific response to phages was fully developed. They were analyzed by ELISA, and to allow for comparisons, results were normalized as ELISA units (48, 49). A marked increase of both Mcp- and TmpH-specific antibodies was observed, both in A3R and in 676Z phage-treated mice (in comparison to control non-treated mice) (Figure 3), which demonstrates that major capsid protein and tail proteins importantly contribute to the overall immunogenic effect of these phages. This is in line with the high copy number of these two proteins on bacteriophage virions. By contrast, no increase in protein-specific antibodies was observed for the less abundantly present baseplate protein gpORF096 (Figure 3).

Comparison of Phage-Specific IgG Induction in Phage Treatment by Different Administration Routes

Effect of administration route on A3R and 676Z phage ability to induce a specific response was assessed. Anti-phage IgG levels in mice treated with A3R or 676Z phage *per os* (4×10^9 pfu/ml, which corresponds to $\sim 2 \times 10^{10}$ pfu/mouse daily, continuously

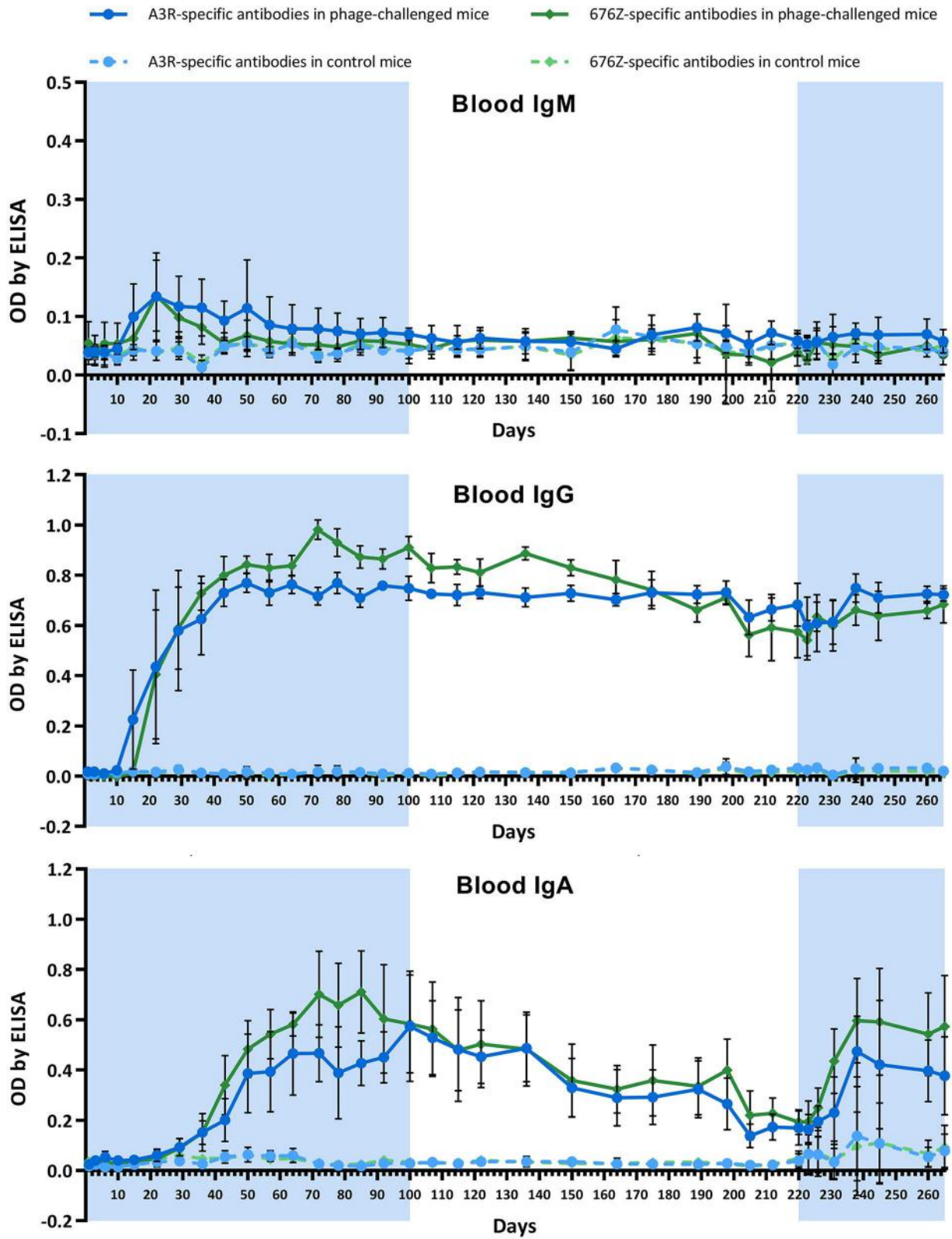


FIGURE 2 | Kinetics of phage-specific antibody production in blood of mice treated with phages A3R or 676Z. IgM, IgG, and IgA levels were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Mice ($N = 6$) were administered purified preparations of phages A3R or 676Z in drinking solution of the final
(Continued)

FIGURE 2 | concentration 4×10^9 pfu/ml. Phage-enriched drinking water was administered as a sole water source continuously for 100 days. For the following 120 days phage preparations were removed from the diet and then applied again for the final 44 days of the experiment. The periods of phage treatment are indicated in the figure as a light blue background. Control mice were separated from phage-treated mice and received no phage in the diet. They were examined for presence of phages active against A3R and 676Z bacterial *S. aureus* host strains and no phage activity was detected during the whole experiment. Blood was collected from the tail vein; thus the same mice were sampled for the whole experiment. The experiment was repeated twice with concordant results. One representative experiment is presented in the figure.

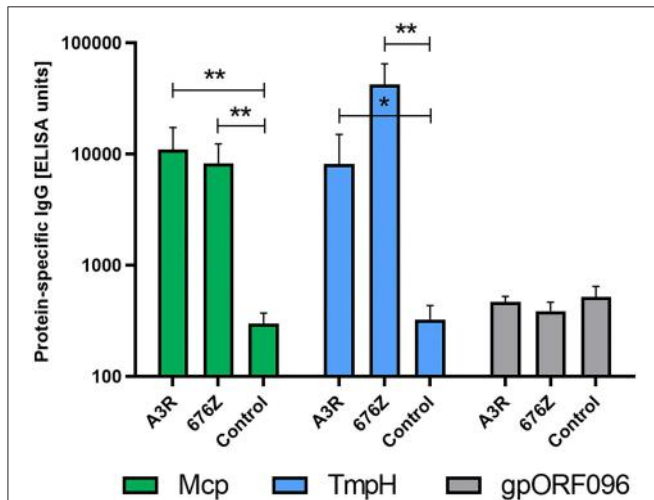


FIGURE 3 | Individual immunogenicity of three selected structural proteins of phages A3R and 676Z in mice treated with the phage *per os* assessed by IgG ELISA units. Mice ($N = 6$) were administered purified preparations of phages A3R or 676Z in drinking water mixed with PBS to a final concentration of 4×10^9 pfu/ml. Phage-enriched drinking water was administered as a sole water source continuously for 100 days. Separated plasma samples from these mice were examined for IgG antibodies specific to selected structural proteins: Mcp, TmpH, and gpORF096. Results were normalized and ELISA units were calculated with regard to a standard curve obtained for OVA-coated wells and OVA-specific murine serum (41, 48, 49). Statistically significant differences between groups are marked with asterisks: * $p < 0.008$, ** $p < 0.005$ (one-tailed Mann-Whitney U -test).

for 100 days) were compared to those of mice injected with the phage intraperitoneally (three doses, 1×10^{10} pfu/mouse each). Injection resulted in 1.9 and 2.2 times higher immunization than the oral route for A3R and 676Z phage, respectively (**Figure 4A**). This correlated with differences in phage-neutralizing activity of plasma, as determined by efficiency of plating (EOP): EOP for A3R and 676Z phages incubated with IP-developed specific plasma samples was only 15 and 10% (respectively), while it was 67 and 75% after incubation with samples from orally immunized mice (**Figure 4B**). Thus, neutralization was significantly stronger when animals were treated with phage IP than in those treated orally, even though the total dose of phage was almost two orders of magnitude higher in the latter ones.

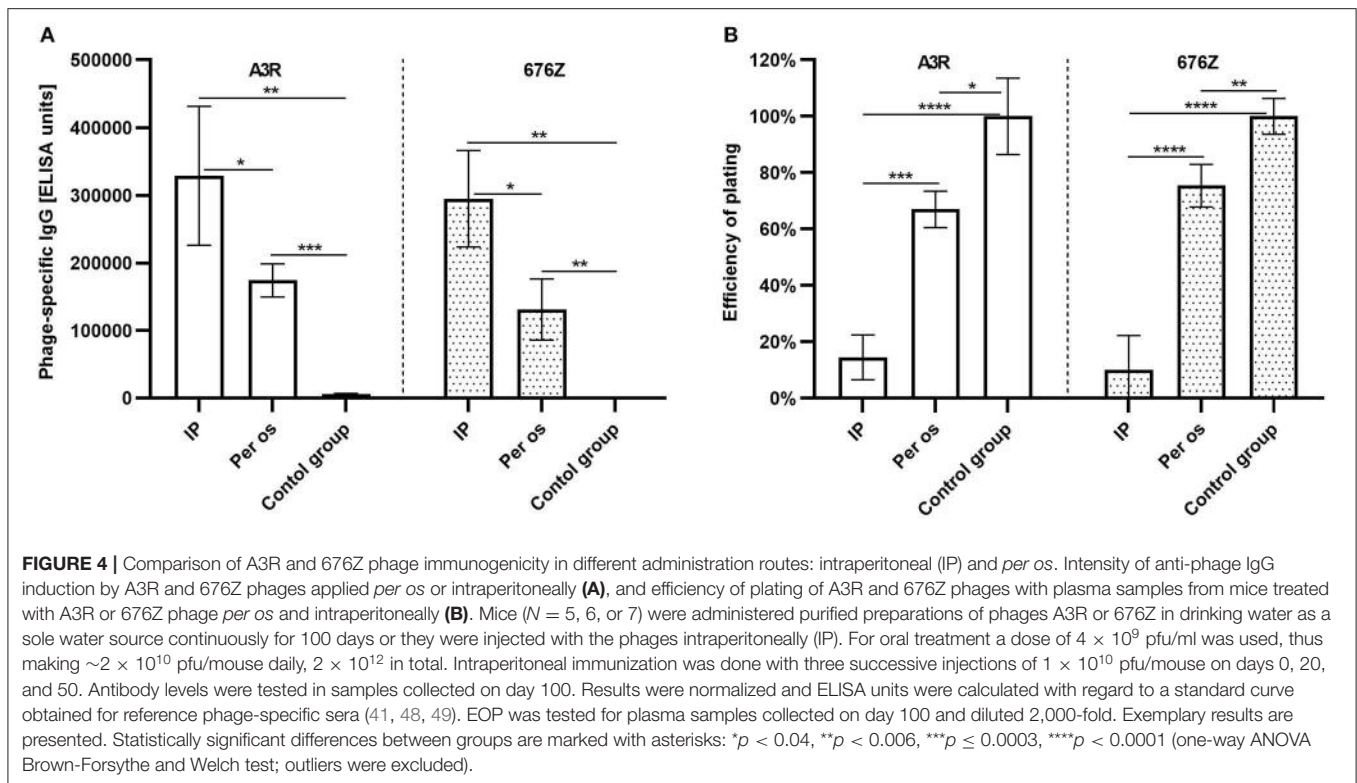
DISCUSSION

In this study we investigated two similar staphylococcal bacteriophages, A3R and 676Z, with high therapeutic applicability (23, 24, 45). We compared how these phages induce

a specific immune response (antibodies) when administered orally, and how in turn the specific immune response affects phage bioavailability in the GI tract. We observed that both bacteriophages induced specific antibody production in the gut (secretory IgA) and in the blood (IgG, IgM, IgA) (**Figures 1, 2**, respectively). Induction of secretory IgA antibodies was rather slow, and it took more than a month of intensive exposure to phage (4×10^9 pfu/ml in drinking water, continuously) to achieve a notable increase in fecal phage-specific IgA. A substantial increase was observed after 2 months of exposure to the phages. This suggests that phages, although immunogenic, were not very effective in the local (mucosal) induction of a specific immune response when given orally. However, once A3R- and 676Z-specific IgA antibodies were efficiently produced, gut passage of active bacteriophages was inhibited (**Figure 1**). Importantly, when bacteriophages were removed from the diet, secretory IgA levels in the gut gradually decreased to insignificant levels, which again allowed for the passage of active phages through the gut. This second introduction of phage to the diet induced specific IgA sooner, but still it took ~ 2 weeks. For that duration, active phages were again detected in fecal samples (**Figure 1**). Thus, specific IgA secreted in the gastrointestinal tract was the limiting factor for phage viability there, and for effective gut passage. Gut passage was independent of phage-specific IgG production in blood, which was also observed. IgG was significantly increased from about day 22, and it remained at a high level until the very end of the experiment (**Figure 2**).

We demonstrated that phage-specific IgG rich plasma samples from mice immunized orally had phage neutralizing activity *in vitro*. The presence of specific antibodies in the circulation has been shown to affect phage pharmacokinetics and result in neutralization of phage particles by specific sera as well as in decrease of the efficacy of phages against bacterial pathogens in animal models (39, 52–54). Here we also observed that once the level of phage-specific secretory IgA in the gut increased significantly, bioavailability of orally administered phages in the GI tract decreased dramatically as no active phage particles were detected in feces (**Figure 1**). Thus, our animal model demonstrates that specific immune response is capable of decreasing bactericidal activity of bacteriophages *in vivo*.

These observations are concordant with previous observations of specific antibody induction (in the same model) by a model phage: coliphage T4 (41). T4, when applied in the same dose, induced specific IgA in the gut in a very similar time (more than a month). When the phage was removed from the diet, T4-specific IgA decreased to insignificant levels within about 100 days, which allowed for efficient gut passage of active phages through the gut. Further, second exposure to the phage induced phage-specific IgA much sooner than during



the first exposure to phage (within about 2 weeks) and later active T4 phage was no longer detected in fecal samples. Gut passage of active T4 was also independent of phage-specific IgG in blood; IgG was significantly increased from day 36, and it remained at a high level until the very end of the experiment (41). Coliphage T4 was used in the previous study as a model phage. However, although T4-like phages are considered as therapeutic candidates, T4 itself has never been adapted for phage therapy, partially because of the high prevalence of T4-specific antibodies in the human population (37). Since observations for the coliphage T4 and for taxonomically irrelevant phages A3R and 676Z are so similar, the observed schema of immune responses to these phages seems to be (at least to some extent) universal and can also apply to other phages. At least phages of overall similar structure and chemistry (DNA, tiled) may share similar overall immunogenicity and resulting kinetics of immune response and phage bioavailability. Of note, other administration schedules may result in different kinetics and we are going to investigate this issue in future studies.

In the case of phage-specific IgM, its increase was noted in this study (Figure 2), while in previous studies on T4 it was not detected (41). Phages A3R and 676Z induced specific IgM in blood at ~ 2 weeks of the treatment, the maximum being observed on day 22. The achieved peak was not very high (Figure 2), but observed phage-specific IgM and IgG levels represented the classical pattern of specific antibody induction by T-dependent antigens, where T cells provide essential costimulatory signals for B cell differentiation. In that pattern, B cells primarily generate specific IgM, but as the

response progresses B cells undergo Ig class switching together with affinity maturation. They become long-living plasma and memory cells, and antibody production switches to high-affinity IgG and achieves a relatively high and stable level (55–58). The T-dependent immune response is typically expected for proteinaceous antigens; since proteins are major components of phage virions, phages comply with characteristics of T-dependent antigens. We suppose that also in previous experiment with T4 (41), even if not detected, T4-phage specific IgM were likely produced at a low level. One should expect IgM production also in response to other bacteriophage strains.

Exposure of a system to antigens delivered to the GI tract may result in the development of oral tolerance. This may be especially relevant in case of phages, as they are naturally present in the gut as a dominant fraction of the virome and hence may be subjected to mucosally induced tolerance. However, in our model of oral immunization we observed typical induction of phage-specific IgG antibodies on a systemic level within 2 weeks, followed by systemic and secretory phage-specific IgA later on. Therefore, we hypothesize that high dose of phages administered in the presented model was sufficient to prevent the development of tolerance to these phages. This observation is supported by the results of previous studies involving a model coliphage T4, as the induction of humoral response was shown to be dose-dependent: no secretory IgA in the gut and only slight increase in phage-specific IgG in the blood was detected when a 10-fold lower dose of phage was administered (41). Further, Flanagan et al. (59) highlighted differences between digested (fragmented) antigens that tend to remain tolerogenic, in the contrary to intact

antigens that become immunogenic. Phages investigated herein were relatively resistant to digestion since they traveled through the GI tract remaining active, thus they are not fragmented. This may suggest that capability of phages to escape degradation in the GI tract predisposes them, on the other hand, to be immunogenic and to induce specific IgG and IgA (59).

At the structural protein level, major capsid protein and tail sheath protein importantly contributed to the overall immunogenic effect of both investigated bacteriophages. This is in line with the high copy number and strong exposure of these two proteins on bacteriophage virions. However, this observation is different to that in T4 phage, where the multicopy major capsid protein gp23 had much less effect on the humoral response in oral administration (41), although gp23 had been shown to effectively induce specific antibodies in IP treatment (37). An increase in the level of antibodies specific to the less abundant structural component baseplate protein gpORF096 was not observed, which suggests that this protein does not contribute to the overall phage immunogenicity in this model. This observation is important from the practical point of view, since anti-gpORF096 antibodies were shown to neutralize phage ability to infect sensitive bacteria, while Mcp- and TmpH-specific antibodies did not affect phage infectivity (51). It is possible that gpORF096 is involved in host recognition and phage binding to host receptors (51); therefore its low immunogenicity seems beneficial for the phage as it would aid in retaining the ability to infect its bacterial host and propagate.

Duration of exposure to phages is among major factors relevant for the therapeutic use of phages. The length of oral phage therapy varies, as both short and prolonged administration of phages has been described, up to months (23). For this reason, we aimed to develop a model that would comprise the assessment of prolonged oral treatment and resulting kinetics of phage-specific antibody production. Aiming to identify possible general trends in antibody induction by phages, the schedule used in this work was almost identical to that applied in our previous work with coliphage T4 (41) to allow for a comparison between phages representing different groups.

Possibly absorption of phage proteins is sufficient to induce phage-specific antibodies in blood. We find it unclear whether active phage translocation from gut to blood is necessary for development of a specific antibody response in the blood. Here we observed very poor and highly irregular translocation of active bacteriophages in both investigated phage strains (**Supplementary Figures 1, 2**). Based on *in vitro* cell culture assay, Nguyen (60) hypothesized that phage transcytosis is a common phenomenon and as many as 31 billion phage transcytotic events occur daily within the human body. This was calculated from the *in vitro* rate of phage transcytosis 0.325×10^{-12} ml/($\mu\text{m}^2 \times \text{h}$), which in mice with a much smaller gut surface (61) and with average phage concentration in the intestine achieving 10^7 - 10^8 pfu/ml (as observed herein) may translate to more than one million transcytotic events daily (10^6 pfu/day). Unexpectedly, only poor and irregular detection of active phages in blood occurred (**Supplementary Figures 1, 2**). Most individuals' blood samples contained no active phage; the highest phage titers in rare animals reached 10^2 - 10^3

pfu/ml (median in all experiments: 0, mean: 5×10^1 pfu/ml) (**Supplementary Figures 1, 2**). We developed a model that accommodated rate of phage transcytosis as proposed by Nguyen et al. (60) together with experimentally identified kinetics of phage clearance from blood as reported by Kim et al. (62). This model was used to estimate expected phage concentrations in murine blood (for details see **Supporting Material: Mathematical model and A3R and 676Z phage translocation from GI tract to circulation**). Simulated (expected) phage amounts were approximately one order of magnitude higher than the experimentally observed ones (**Supplementary Figure 5**). This discrepancy can be partially explained by the fact that *in vitro* cell cultures provide very different conditions to gut in a living animal or human and transcytosis observed *in vitro* may differ from that *in vivo*. Furthermore, the digestive tract content being an absorbing matrix, and immune-related factors (including non-specific ones, such as phagocytes) may strongly decrease the amount of phages that are able to translocate to the circulation effectively. Probably, translocated bacteriophages are filtered by intestinal lymph nodes (63), which are able to prevent the spread of translocating virions throughout the whole body. As a result, active phage concentrations in blood achieved by oral application are much lower than expected. Importantly, in spite of poor translocation of active phage, phages effectively induced specific IgM, IgG, and IgA antibodies in blood. This suggests that systemic circulation of antigen-presenting cells and other immunological cells engaged in development of a specific immune response allows for full development of the antibody repertoire in the circulation.

The normal immune response and lack of visible side effects in phage-treated mice are evidence supporting the safety of the phage preparations used in this study. Normal animals with natural bacterial flora in the gut were microbiologically assessed and confirmed as lacking A3R- or 676Z-sensitive bacteria in the GI tract. Such a model allows for a direct assessment of immune responses to phage in normal animals, since they are colonized with a natural microbiome, which is known to be a key factor for proper development of immune responses. Furthermore, this model allowed for observation of the potential impact that the specific immune response exerted on phage viability in the GI tract, without interfering effects of phage propagation on sensitive hosts. For this reason, selection for phage-resistant bacteria in the gut microbiome was not possible and was not a subject of investigation. However, the general composition of fecal microbiome was assessed by 16S rRNA targeted sequencing and compared between day 1 and 100; it revealed no important changes correlated with phage treatment in the microbiome composition (**Supplementary Table 1, Supplementary Figure 6**). This further supports the safety of oral phage applications.

This study revealed that oral administration of bacteriophages induced only a weak response to the phage. In the case of secretory IgA, which was revealed as the limiting factor for phage activity in the gut, termination of exposure to phage results in a decrease of specific IgA. This restores the possibility for phage to pass actively through the gut. Together with the positive assessment of safety, this is encouraging for the perspective of

therapeutic use of phages, especially in treatment of infections in the alimentary tract.

CONCLUSIONS

The investigated bacteriophages A3R and 676Z when applied orally are capable but not very effective in induction of a specific immune response.

Specific anti-phage IgA in the gut is a major factor limiting the passage of active A3R and 676Z phages through the mammalian GI tract. Importantly, IgA levels may decrease to insignificant levels when exposure to phage is terminated. These effects seem to be universal, since the same effects were demonstrated previously for T4 phage. At least phages of overall similar structure and chemistry (DNA, tiled) may share similar overall immunogenicity and resulting phage kinetics.

Although phage translocation from gut to blood was poor and highly irregular, phage-specific IgM, IgG, and IgA were induced in blood.

Major capsid protein and tail morphogenetic protein H strongly contributed to the immunogenic effect of phages A3R and 676Z, while less abundantly represented baseplate protein gpORF096 was not immunogenic in this model.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

REFERENCES

- Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP, et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*. (2015) 517:455–9. doi: 10.1038/nature14098
- Pantel L, Florin T, Dobosz-Bartoszek M, Racine E, Sarciaux M, Serri M, et al. Odilorhabdins, antibacterial agents that cause miscoding by binding at a new ribosomal site. *Mol Cell*. (2018) 70:83–94 e87. doi: 10.1016/j.molcel.2018.03.001
- Smith PA, Koehler MFT, Girgis HS, Yan D, Chen Y, Chen Y, et al. Optimized arylomycins are a new class of Gram-negative antibiotics. *Nature*. (2018) 561:189–94. doi: 10.1038/s41586-018-0483-6
- Arias CA, Murray BE. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century — A clinical super-challenge. *N Engl J Med*. (2009) 360:439–43. doi: 10.1056/NEJMp0804651
- CDC. *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013*. Centers for Disease Control and Prevention (2013).
- WHO. *Prioritization of Pathogens to Guide Discovery, Research and Development of New Antibiotics for Drug Resistant Bacterial Infections, Including Tuberculosis*. Geneva: World Health Organization (2017).
- de Dios Caballero J, Pastor MD, Vindel A, Máiz L, Yagüe G, Salvador C, et al. Emergence of cfr-mediated linezolid resistance in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic clone isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*. (2015) 60:1878–82. doi: 10.1128/AAC.02067-15
- Kaur D, Chate S. Study of antibiotic resistance pattern in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with special reference to newer antibiotic. *J Glob Infect Dis*. (2015) 7:78. doi: 10.4103/0974-777X.157245

ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of EU directive 2010/63/EU. The protocol was approved by the 1st Local Committee for Experiments with the Use of Laboratory Animals, Wrocław, Poland.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

KD and JM conceived and designed the experiments. ZK cloned phage genes and optimized expression and purification of phage protein preparations. JM, KD, KL, DL, AS, PM, MH, KM-B, NJ, and BO performed the experiments. KD and JM analyzed the data. JD provided the mathematical model. The manuscript was written by KD and JM. AG reviewed the manuscript and gave scientific comments.

FUNDING

This work was supported by the National Science Centre in Poland, grants UMO-2012/05/E/NZ6/03314 and UMO-2018/29/B/NZ6/01659.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02607/full#supplementary-material>

- Roch M, Gagetti P, Davis J, Ceriana P, Errecalde L, Corso A, et al. Daptomycin resistance in clinical MRSA strains is associated with a high biological fitness cost. *Front Microbiol*. (2017) 8:2303. doi: 10.3389/fmicb.2017.02303
- Ghahremani M, Jazani NH, Sharifi Y. Emergence of vancomycin-intermediate and -resistant *Staphylococcus aureus* among methicillin-resistant *S. aureus* isolated from clinical specimens in the northwest of Iran. *J Glob Antimicrob Resist*. (2018) 14:4–9. doi: 10.1016/j.jgar.2018.01.017
- Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin Microbiol Rev*. (2018) 31:e00020–18. doi: 10.1128/CMR.00020-18
- Górski A, Miedzybrodzki R, Łobocka M, Głowacka-Rutkowska A, Bednarek A, Borysowski J, et al. Phage therapy: what have we learned? *Viruses*. (2018) 10:288. doi: 10.3390/v10060288
- Hill C, Mills S, Ross RP. Phages & antibiotic resistance: are the most abundant entities on earth ready for a comeback? *Future Microbiol*. (2018) 13:711–26. doi: 10.2217/fmb-2017-0261
- Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clin Microbiol Rev*. (2019) 32:e00066–18. doi: 10.1128/CMR.00066-18
- Meladze GD, Mebuke MG, Chkhetia N, Kiknadze N, Koguashvili GG. [Efficacy of staphylococcal bacteriophage in the treatment of purulent lung and pleural diseases]. *Grudn Khir*. (1982) 53–6.
- Slopek S, Durlakowa I, Weber-Dabrowska B, Kucharewicz-Krukowska A, Dabrowski M, Bisikiewicz R. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. I. General evaluation of the results. *Arch Immunol Ther Exp*. (1983) 31:267–91.
- Slopek S, Weber-Dabrowska B, Dabrowski M, Kucharewicz-Krukowska A. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981–1986. *Arch Immunol Ther Exp*. (1987) 35:569–83.

18. Fadlallah A, Chelala E, Legeais J-M. Corneal infection therapy with topical bacteriophage administration. *Open Ophthalmol J.* (2015) 9:167–8. doi: 10.2174/1874364101509010167
19. Leszczynski P, Weber-Dabrowska B, Kohutnicka M, Łuczak M, Górecki A, Górski A. Successful eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) intestinal carrier status in a healthcare worker — Case report. *Folia Microbiol.* (2006) 51:236–8. doi: 10.1007/BF02932128
20. Rose T, Verbeke G, Vos DD, Merabishvili M, Vanechoutte M, Lavigne R, et al. Experimental phage therapy of burn wound infection: difficult first steps. *Int J Burns Trauma.* (2014) 4:66–73.
21. Weber-Dabrowska B, Mulczyk M, Gorski A. Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. *Arch Immunol Ther Exp.* (2000) 48:547–51.
22. Weber-Dabrowska B, Mulczyk M, Górski A. Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. *Transplant Proc.* (2003) 35:1385–6. doi: 10.1016/S0041-1345(03)00525-6
23. Miedzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Fortuna W, Letkiewicz S, Szufnarowski K, et al. Clinical aspects of phage therapy. In: Łobocka M, Szybalski W, editors. *Advances in Virus Research.* Vol. 83. London: Elsevier (2012).
24. Międzybrodzki R, et al. Current updates from the long-standing phage research centers in Georgia, Poland, and Russia. In: Harper D, Abedon S, Burrows B, McConville M, editors. *Bacteriophages.* Cham: Springer (2018). p. 1–31.
25. Zaczek M, Łusiak-Szelachowska M, Jonczyk-Matysiak E, Weber-Dabrowska B, Miedzybrodzki R, Owczarek B, et al. Antibody production in response to staphylococcal ms-1 phage cocktail in patients undergoing phage therapy. *Front Microbiol.* (2016) 7:1681. doi: 10.3389/fmicb.2016.01681
26. Handley SA. The virome: a missing component of biological interaction networks in health and disease. *Genome Med.* (2016) 8:32. doi: 10.1186/s13073-016-0287-y
27. Manrique P, Dills M, Young M. The human gut phage community and its implications for health and disease. *Viruses.* (2017) 9:141. doi: 10.3390/v9060141
28. 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) 10:607–17. doi: 10.1038/nrmicro2853
29. Reyes A, Wu M, McNulty NP, Rohwer FL, Gordon JI. Gnotobiotic mouse model of phage-bacterial host dynamics in the human gut. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2013) 110:20236–41. doi: 10.1073/pnas.1319470110
30. Uhr JW. Antibody formation: III. the primary and secondary antibody response to bacteriophage ox 174 in guinea pigs. *J Exp Med.* (1962) 115:655–70. doi: 10.1084/jem.115.3.655
31. Uhr JW. Antibody formation: IV. formation of rapidly and slowly sedimenting antibodies and immunological memory to bacteriophage phiX 174. *J Exp Med.* (1963) 117:457–77. doi: 10.1084/jem.117.3.457
32. Hájek P, Mandel L. Antibody response of young animals to bacteriophages of different immunological behaviour: Φ X 174 and T2. *Folia Microbiol.* (1966) 11:282–9. doi: 10.1007/BF02878898
33. Hájek P. Neutralization of bacterial viruses by antibodies of young animals. 3. The development of the avidity of 19S and 7S neutralizing antibodies in the course of primary and secondary response in young rabbits immunized with PhiX 174 bacteriophage. *Folia Microbiol.* (1970) 15:9–16. doi: 10.1007/BF02867042
34. Stashak PW, Baker PJ, Roberson BS. The serum antibody response to bacteriophage phi chi 174 in germ-free and conventionally reared mice. I. Assay of neutralizing antibody by a 50 per cent neutralization method. *Immunology.* (1970) 18:295–305.
35. Pyun KH, Ochs HD, Wedgwood RJ, Xiqiang Y, Heller SR, Reimer CB. Human antibody responses to bacteriophage Φ X 174: sequential induction of IgM and IgG subclass antibody. *Clin Immunol Immunopathol.* (1989) 51:252–63. doi: 10.1016/0090-1229(89)90024-X
36. Rubinstein A, Mizrahi Y, Bernstein L, Shliozberg J, Golodner M, Liu G-Q, et al. Progressive specific immune attrition after primary, secondary and tertiary immunizations with bacteriophage Φ X174 in asymptomatic HIV-1 infected patients. *AIDS.* (2000) 14:F55–62. doi: 10.1097/00002030-200003100-00004
37. Dabrowska K, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Hodyra K, Owczarek B, Lecion D, et al. Immunogenicity studies of proteins forming the T4 phage head surface. *J Virol.* (2014) 88:12551–7. doi: 10.1128/JVI.02043-14
38. Smith LL, Buckley R, Lugar P. Diagnostic immunization with bacteriophage Φ X 174 in patients with common variable immunodeficiency/hypogammaglobulinemia. *Front Immunol.* (2014) 5:410. doi: 10.3389/fimmu.2014.00410
39. Hodyra-Stefaniak K, Miernikiewicz P, Drapala J, Drab M, Jonczyk-Matysiak E, Lecion D, et al. Mammalian host-versus-phage immune response determines phage fate *in vivo*. *Sci Rep.* (2015) 5:14802. doi: 10.1038/srep14802
40. Bruttin A, Brussow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* (2005) 49:2874–8. doi: 10.1128/AAC.49.7.2874-2878.2005
41. Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, et al. Oral application of T4 phage induces weak antibody production in the gut and in the blood. *Viruses.* (2015) 7:4783–99. doi: 10.3390/v7082845
42. Łusiak-Szelachowska M, Zaczek M, Weber-Dabrowska B, Miedzybrodzki R, Kłak M, Fortuna W, et al. Phage neutralization by sera of patients receiving phage therapy. *Viral Immunol.* (2014) 27:295–304. doi: 10.1089/vim.2013.0128
43. Bradley SG, Kim YB, Watson DW. Immune response by the mouse to orally administered actinophage. *Exp Biol Med.* (1963) 113:686–8. doi: 10.3181/00379727-113-28462
44. Delmastro P. Immunogenicity of filamentous phage displaying peptide mimotopes after oral administration. *Vaccine.* (1997) 15:1276–85. doi: 10.1016/S0264-410X(97)00072-8
45. Łobocka M, Hejnowicz MS, Dabrowski K, Gozdek A, Kosakowski J, Witkowska M, et al. Genomics of staphylococcal twort-like phages - potential therapeutics of the post-antibiotic era. In: Łobocka M, Szybalski W, editors. *Advances in Virus Research.* Vol. 83. London: Elsevier (2012). p. 143–216.
46. Adams MH. *Bacteriophages.* New York, NY: Interscience Publishers, Inc (1959).
47. Szermer-Olearnik B, Drab M, Makosa M, Zembala M, Barbasz J, Dabrowska K, et al. Aggregation/dispersion transitions of T4 phage triggered by environmental ion availability. *J Nanobiotechnol.* (2017) 15:32. doi: 10.1186/s12951-017-0266-5
48. Miura K, Orcutt AC, Muratova OV, Miller LH, Saul A, Long CA. Development and characterization of a standardized ELISA including a reference serum on each plate to detect antibodies induced by experimental malaria vaccines. *Vaccine.* (2008) 26:193–200. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.10.064
49. Miura K, Takashima E, Deng B, Tullio G, Diouf A, Moretz SE, et al. Functional comparison of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine candidates by the standard membrane-feeding assay. *Infect Immun.* (2013) 81:4377–82. doi: 10.1128/IAI.01056-13
50. Harhala M, Nelson D, Miernikiewicz P, Heselpoth R, Brzezicka B, Majewska J, et al. Safety studies of pneumococcal endolysins Cpl-1 and Pal. *Viruses.* (2018) 10:638. doi: 10.3390/v10110638
51. Kaźmierczak Z. *Identification of adhesive structural proteins of phages T4, A3/R, 676/Z and their effect on mammalian cells* (PhD thesis). Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy of the Polish Academy of Sciences (2018).
52. Smith HW, Huggins MB. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J Gen Microbiol.* (1982) 128:307–18. doi: 10.1099/00221287-128-2-307
53. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Donoghue AM. Immune interference of bacteriophage efficacy when treating colibacillosis in poultry. *Poult Sci.* (2010) 89:895–900. doi: 10.3382/ps.2009-00528
54. Kłopot A, Zakrzewska A, Lecion D, Majewska JM, Harhala MA, Lahutta K, et al. Real-time qPCR as a method for detection of antibody-neutralized phage particles. *Front Microbiol.* (2017) 8:2170. doi: 10.3389/fmicb.2017.02170
55. Berek C, Berger A, Apel M. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell.* (1991) 67:1121–9. doi: 10.1016/0092-8674(91)90289-B
56. Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U. Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature.* (1991) 354:389–92. doi: 10.1038/354389a0

57. Stavnezer J, Guikema JEJ, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol.* (2008) 26:261–92. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090248
58. Basu S, Ray A, Dittel BN. Cannabinoid receptor 2 (CB2) plays a role in the generation of germinal center and memory B cells, but not in the production of antigen-specific IgG and IgM, in response to T-dependent antigens. *PLoS ONE.* (2013) 8:e67587. doi: 10.1371/journal.pone.0067587
59. Flanagan M, Jain S, Michael JG. Breaking of oral tolerance by an encapsulated antigen. *Ann N Y Acad Sci.* (1996) 778:373–5. doi: 10.1111/j.1749-6632.1996.tb21147.x
60. Nguyen S, Baker K, Padman BS, Patwa R, Dunstan RA, Weston TA, et al. Bacteriophage transcytosis provides a mechanism to cross epithelial cell layers. *MBio.* (2017) 8:e01874-17. doi: 10.1128/mBio.01874-17
61. Casteleyn C, Rebecki A, Van der Aa A, Simoens B, Van den Broeck W. Surface area assessment of the murine intestinal tract as a prerequisite for oral dose translation from mouse to man. *Lab Anim.* (2010) 44:176–83. doi: 10.1258/la.2009.009112
62. Kim KP, Cha JD, Jang EH, Klumpp J, Hagens S, Hardt WD, et al. PEGylation of bacteriophages increases blood circulation time and reduces T-helper type 1 immune response. *Microb Biotechnol.* (2008) 1:247–57. doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00028.x
63. Smith HW, Huggins MB, Shaw KM. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. *J Gen Microbiol.* (1987) 133:1111–26. doi: 10.1099/00221287-133-5-1111

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

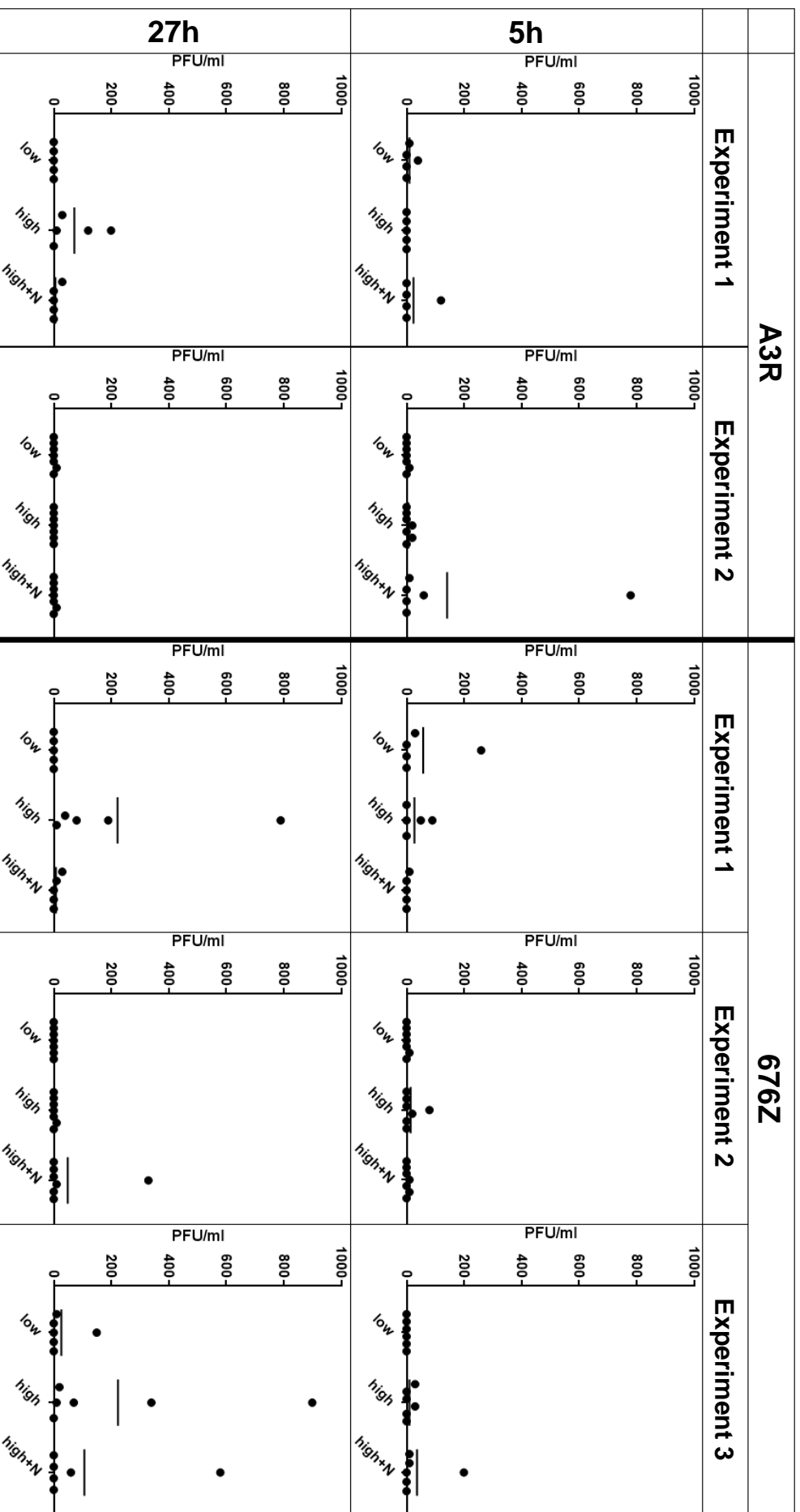
Copyright © 2019 Majewska, Kaźmierczak, Lahutta, Lecion, Szymczak, Miernikiewicz, Drapała, Harhala, Marek-Bukowiec, Jędruchiewicz, Owczarek, Górski and Dąbrowska. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Materials

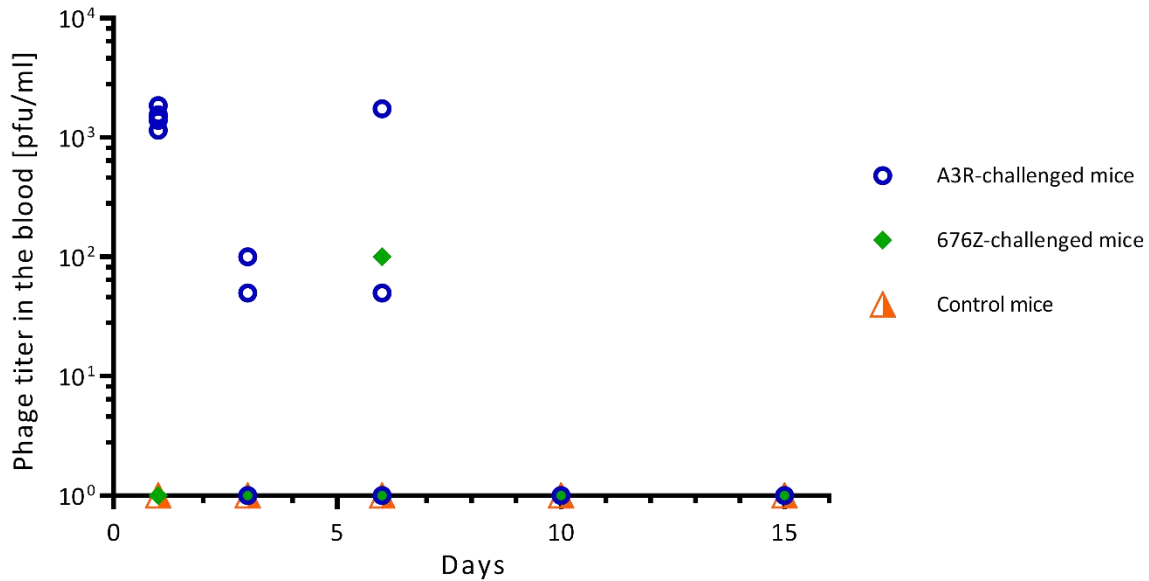
1 A3R and 676Z phage translocation from GI tract to circulation

It is unclear whether development of the phage-specific humoral response in the blood after oral administration requires translocation of active phage particles to the circulation. Nevertheless, in the context of oral application of phages as therapeutic agents in systemic infections, the ability of phages to penetrate through the gastrointestinal lining is particularly interesting. Therefore, we tested translocation of A3R and 676Z phage to blood. Detected translocation after 5 h and 27 h of treatment was poor and highly irregular (**Supplementary Figure 1**). Notably, even a phage dose 20 times higher than that used for oral immunization did not result in clearly demonstrated transfer of active phage to blood; it was highly irregular, including animals with almost 10^3 pfu/ml of blood and those without detectable phage. The detection limit in this experiment, due to the amount of blood that was possible to collect from one mouse, was 10^1 pfu/ml. Interestingly, a pH neutralizing agent applied prior to phage administration in drinking water did not result in improved phage penetration to blood (**Supplementary Figure 1**).

Irregular penetration of active phages to blood was also observed in the major experiment with prolonged administration of A3R and 676Z phage in drinking water (**Figure 1**). Phages were detectable in the blood, but their emergence was highly irregularly and in small titers, from zero up to 10^3 pfu/ml in some individuals (**Supplementary Figure 2**).



Supplementary Figure 1. A3R and 676Z phage titers detected in the blood of mice receiving phage preparations in drinking water for 5 h and for 27 h. Two different concentrations of phage particles were used: “low”, i.e. 4×10^9 pfu/ml, and “high”, i.e. 8×10^{10} pfu/ml; they were administered to mice (N=5-7) in drinking water. To determine whether neutralization of stomach acid affected phage translocation in these mice, mice receiving “high” phage titers (“high+N”) were in addition given sodium bicarbonate in drinking water for 16 h before drinking water with phages. Due to highly irregular penetration all experiments (exp. 1-3) are presented.



Supplementary Figure 2. A3R and 676Z phage titers detected in the blood of mice treated with phages A3R or 676Z. Mice (N = 7) were administered purified preparations of phages A3R or 676Z in drinking solution of the final concentration 4×10^9 pfu/ml. Phage-enriched drinking water was administered as a sole water source continuously for 100 days. For the following 120 days phage preparations were removed from the diet and then applied again for the final 44 days of the experiment. Only the first 15 days of the experiment are shown. No phages were detected in the blood for the rest of the experiment. Control mice were separated from phage-treated mice and received no phage in the diet. They were examined for presence of phages active against A3R and 676Z bacterial *S. aureus* host strains and no phage activity was detected during the whole experiment. Blood was collected from the tail vein; thus the same mice were sampled for the whole experiment. The experiment was repeated twice with concordant results. One representative experiment is presented in the figure.

2 Mathematical model

The raw dataset was composed of pairs $\{(t_i, x_i)\}_{i=0}^N$, where N stood for the total number of measurements, t_i was time of the i -th sample acquisition, and x_i stood for the amount of phage in blood. This was fitted to model pharmacokinetics of a *Myoviridae* phage in murine blood as previously identified by Kim et al. (Kim et al., 2008).

The first step of data preprocessing was normalization:

$$w_i \leftarrow \frac{x_i}{x_0} \quad (1)$$

and then logarithmic scaling was performed:

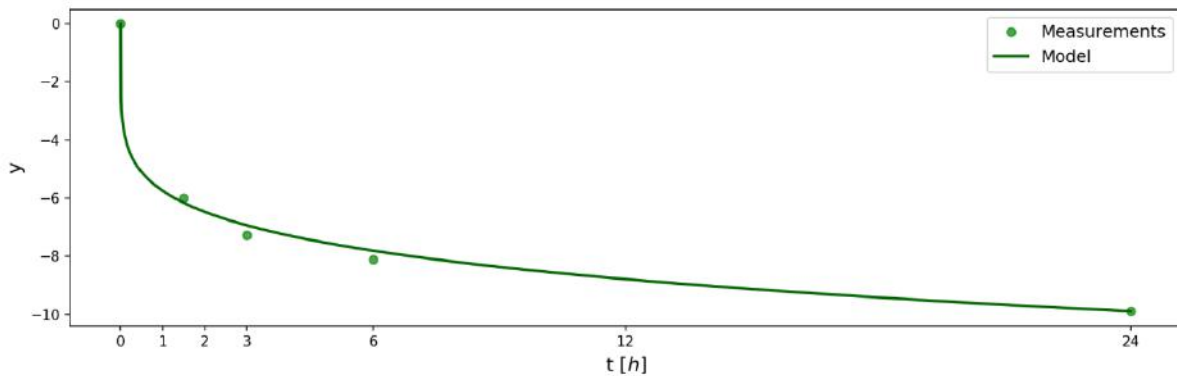
$$y_i = \ln w_i \quad (2)$$

leading to the dataset $\{(t_i, y_i)\}_{i=0}^N$.

The whole process of mathematical modeling was performed using the logarithmic scale defined above. Visual inspection of the dataset revealed that the rate of decay of the variable y decreases with time. The function below accounted for this phenomenon:

$$y(t) = at^b, \quad (3)$$

where t is time, a and b are free-to-choose parameters. We determined the best values of the parameters using the least squares fit (Nocedal, 2006), see **Supplementary Figure 3**.



Supplementary Figure 3. Illustration of the model with parameters $a = -5.87$, $b = 0.17$.

For the purpose of prediction of the system state in response to phage injections, a description of dynamic properties of the process was needed. Calculation was done on the assumption that the underlying process was not distributed in space, thus the effect was immediate along the whole compartment represented by the variable x . Further assumption was that phage permeated continuously to the compartment, due to the constant exposure and activity of cells in healthy animals. Therefore, the differential equation was designed, that has a solution (3). This was an inverse problem to solving differential equation, where for a given differential equation the function satisfying it should be found; here, the differential equation behind it was designed. Among many differential equations having solution (3) we choose the one that allows for a good fit to the dataset. The equation had to accommodate possible phage injections. Thus, the resulting differential equation describing the whole process was:

$$x'(t) = a \frac{b}{t} t^b x(t) + u(t), \quad (4)$$

where $u(t)$ was the system input, which describes the way, the phage permeated the system. Note, that the state variable in differential equation (4) was x , but y as the model response was used. For the reason mentioned previously, simulations in this work assigned constant values for this function, resulting from transcytosis rate calculated according to Nguyen et al (Nguyen et al., 2017):

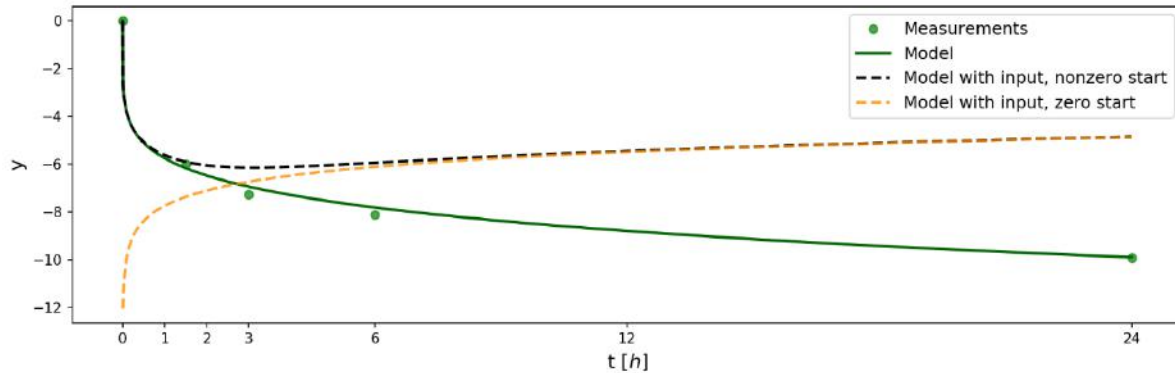
$$\Phi_{tr}^{day} = r_{tr} S_{li} \frac{\Phi_{li}}{V_{li}} 24h \quad (5)$$

$$\Phi_{tr,m}^{day} = mf \times \Phi_{tr}^{day} \quad (6)$$

where mf is the mucus factor equal to 4.4 as proposed by Nguyen et al. (Nguyen et al., 2017), and intestine surface (S_{li}) area was recalculated according to data given by Casteleyn et al. (Casteleyn et al., 2010). Initial phage concentration (Φ_{li}/V_{li} by Nguen et al. (Nguyen et al., 2017)) was calculated from experimental data on mean phage concentration in feces as observed within this work in an exemplary experiment (Experiment 1 in **Supplementary Figure 1**: A3R: 3.2×10^7 pfu/ml, 676Z: 1.1×10^8 pfu/ml). These allowed for calculation of

total phage amount expected to be transcytosed daily in investigated mice: **2.75×10^6 pfu per 24h for A3R phage and 9.3×10^6 pfu per 24h for 676 phage.**

The equation (4) allowed to simulate scenarios for given initial state of the process and different scenarios of phage dose available for transcytosis. Typical ones are illustrated in **Supplementary Figure 4** (of note, in logarithmic scale zero is represented by minus infinity and one corresponds to zero). Comparing two curves: the black one represents the process that started with a given amount of phage (normalized to 1) supplied continuously from outside (the input u is constant), the orange one represents the same process, but initiated with no phage (zero). In the latter case, phages enter the system only due to supply from outside the system.

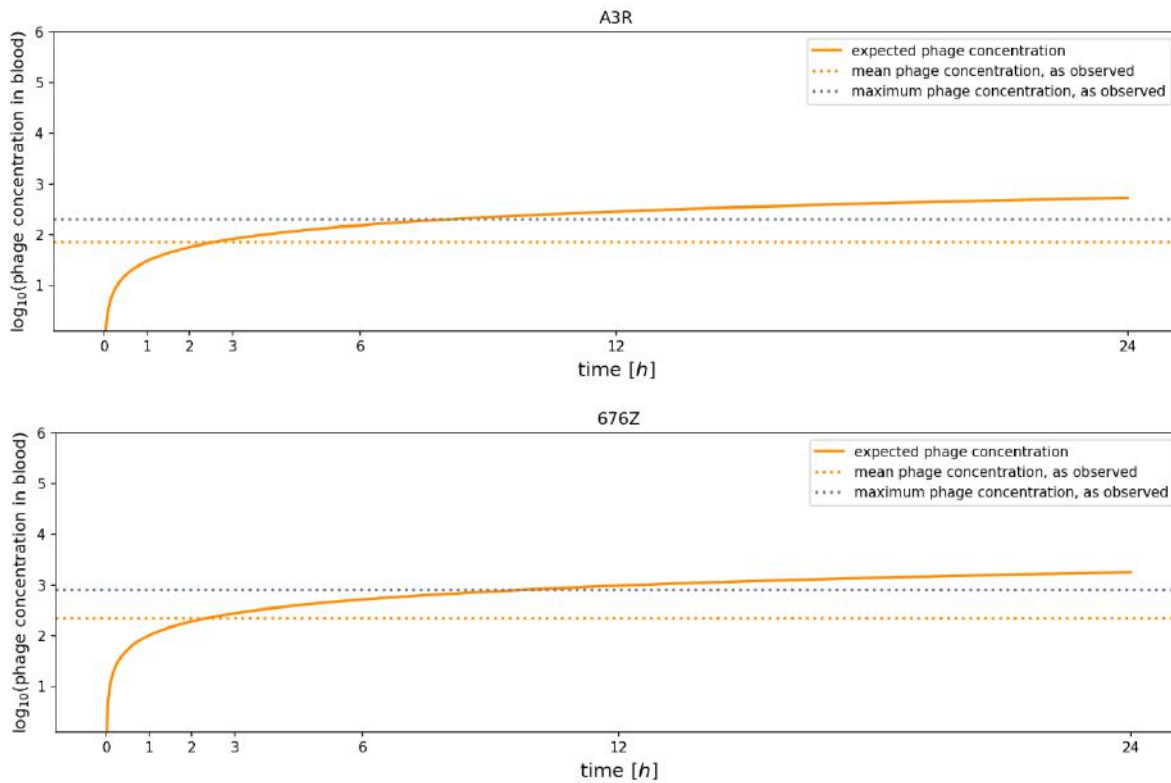


Supplementary Figure 4. Representative examples of simulations with- and without-administration and with zero- and nonzero- initial conditions (validation of the model).

The software was written in Python 3.7 with the *scipy* library to perform the least square fit of the function (2) and to simulate the process described by the differential equation (3).

Simulations allowed for calculation of expected phage concentration in blood, when assumed: (i) transcytosis rate according to Nguyen et al. (Nguyen et al., 2017), (ii) phage was distributed (diluted) in the whole body volume (not only in blood) which was an average 20 ml in these animals' groups, and (iii) phage concentration in the intestine was as identified in Experiment 1 (A3R: 3.2×10^7 pfu/ml, 676Z: 1.1×10^8 pfu/ml). As demonstrated by Denou et al. (Denou et al., 2009), effective transit of orally applied phage to lower sections of intestine can be completed within 4 hours, thus 27th hour of Experiment 1 is represented by 23rd hour in the simulation. Calculation of expected phage concentration

(over time) is presented in **Supplementary Figure 5** panel A3R and 676Z (orange line, normal). When compared to mean phage concentration in blood as observed in the Experiment 1 (orange line, dotted), expected phage concentration is approximately 1 order of magnitude higher than the observed one. Even maximum phage concentration observed in any individual mouse (grey line, dotted) was lower than the expected phage concentration. For discussion of this unexpected discrepancy please see Discussion section.



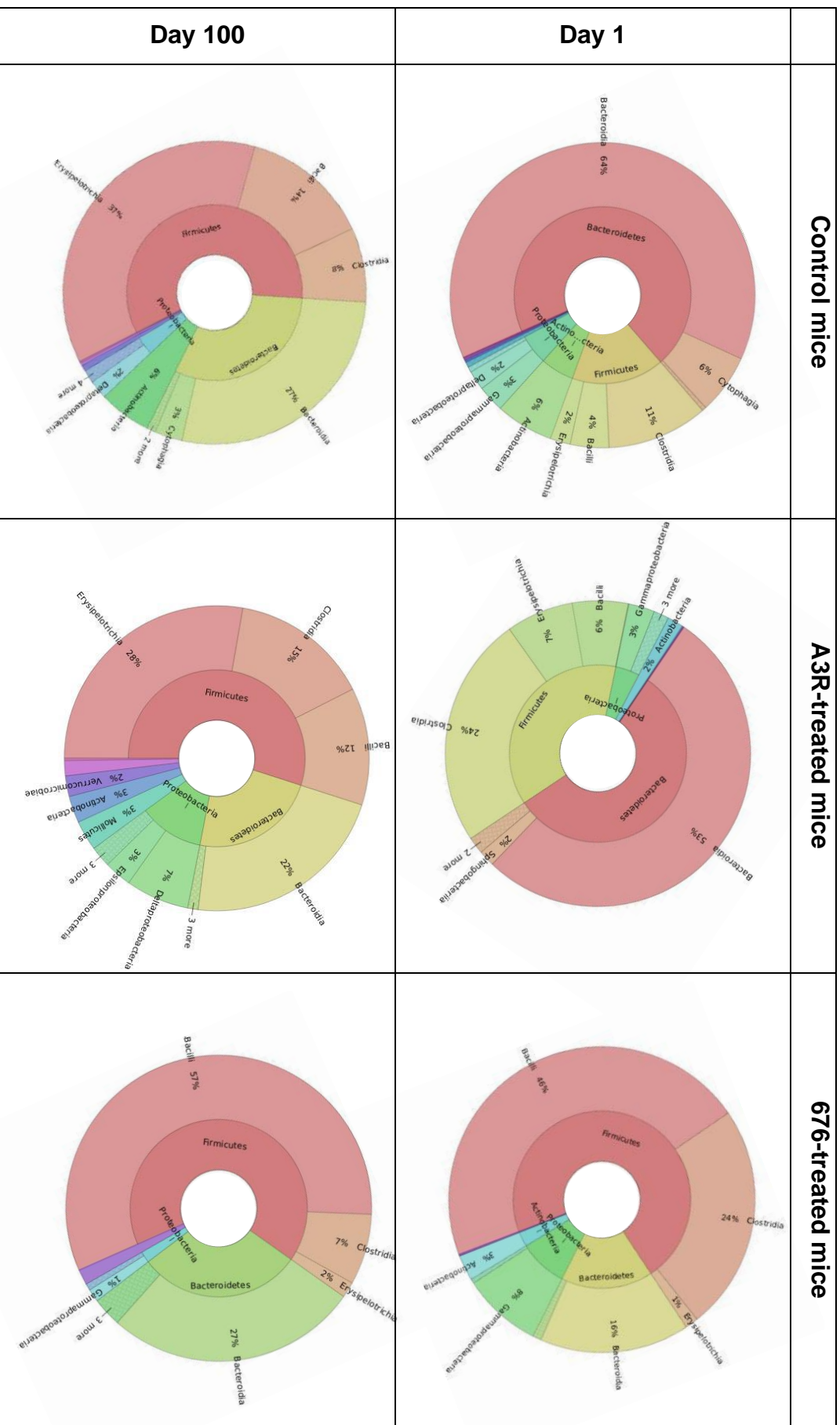
Supplementary Figure 5. Comparison of expected (simulated) and observed (experimental) phage concentrations in blood of mice fed with bacteriophages A3R and 676Z.

3 Microbiome assessment

Although much more specific than antibiotics, being antibacterial agents exogenous bacteriophages may still affect one's microbiome, especially when applied orally, as they come in contact with the highly complex commensal microflora of the GI tract. Studies have shown that shifts in the microbial composition (dysbiosis) in the gut may be linked to various diseases (6, 7). Therefore, the fecal bacterial microbiome composition was assessed by 16S rRNA targeted sequencing on day 1 and day 100, marking the end of the initial contact of experimental groups with bacteriophages A3R and 676Z. Analysis of the microbiome at the beginning of the experiment and at the end of the initial continuous phage treatment revealed no significant changes in alpha diversity with regard to either the Shannon-Wiener or the Simpson index (**Supplementary Table 1**). In the experimental groups a tendency to increase of Firmicutes class abundance was identified after 100 days (**Supplementary Figure 6**). This seems to be similar to the tendency identified in humans, where the Firmicutes/Bacteroides ratio increased with increasing age (8). Since the experiments presented herein were very long, considering the murine life span, we suppose that the increase in Firmicutes probably represents normal changes in gut flora related to aging.

Supplementary Table 1. Average values of alpha diversity of the microbiome on day 1 and after 100 days of continuous phage treatment *per os* in drinking water.

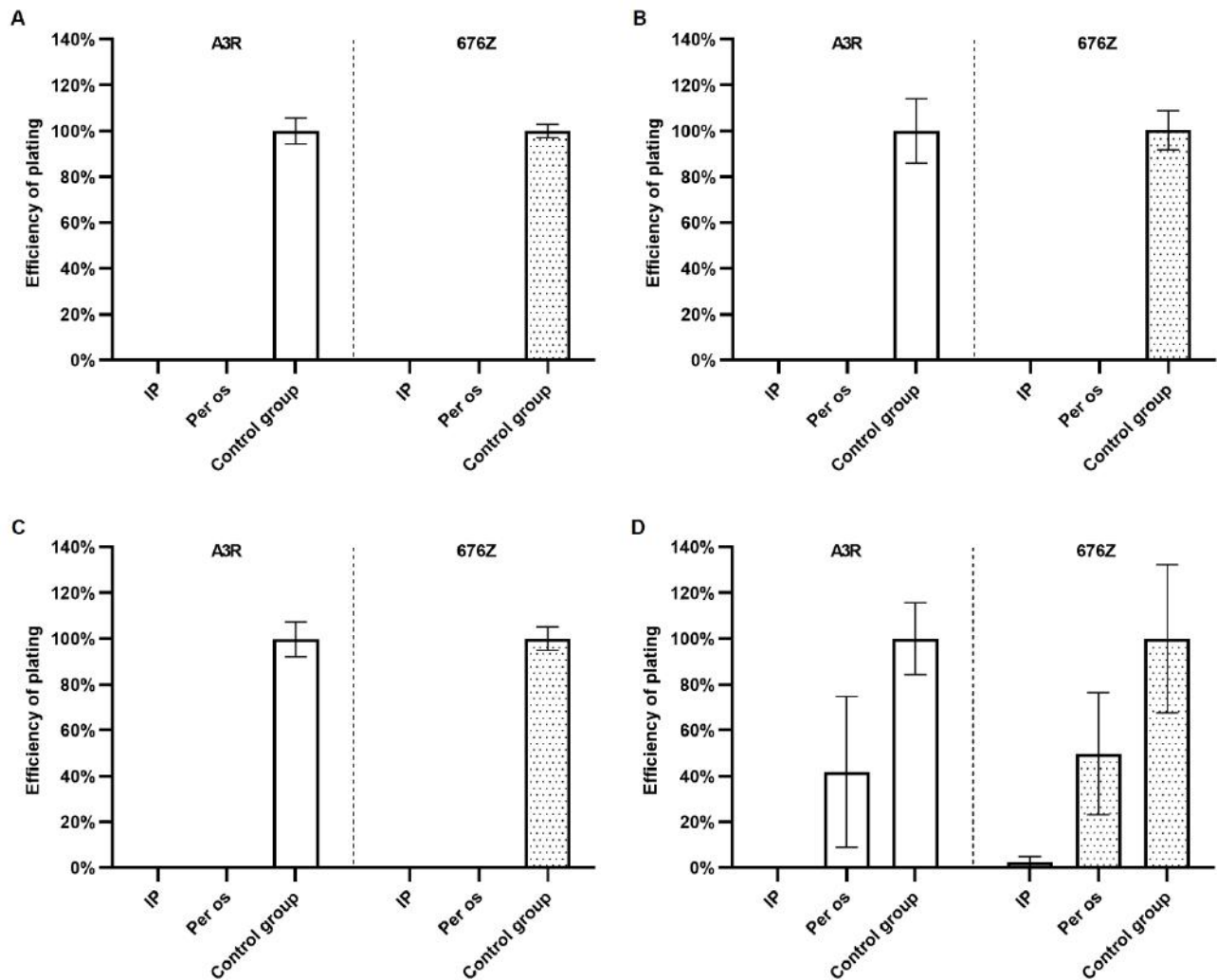
	Shannon-Wiener		Simpson	
	Day 1	Day 100	Day 1	Day 100
A3R-treated group	2.82	2.12	0.735	0.6164
676Z-treated group	2.56	2.07	0.7332	0.6088
Control group	2.53	2.78	0.6984	0.7718



Supplementary Figure 6. Composition of bacterial microbiome component in mice on day 1 and after 100 days of continuous administration of A3R or 676Z phage preparations in drinking water.

4 Optimization of plasma dilution for blocking of phage activity by murine plasma samples

The plasma dilution factor used in the assay was determined experimentally. Following dilutions were tested: non-diluted samples, 1:10, 1:100, 1:1,000 and 1:2,000. For the final experiment 1:2,000 dilution was chosen as optimal (Fig. 4 in the main text of the manuscript), as for dilutions smaller than 1:1,000 after incubation with plasma samples from the experimental groups phage titers were reduced to undetectable levels, and for 1:1,000 dilution the differences between groups were unclear. Exemplary results are shown in **Supplementary Figure 7**.



Supplementary Figure 7. Optimization of plasma dilution for comparison of blocking of phage activity by murine plasma samples: undiluted (A), 10-fold diluted (B), 100-fold diluted (C) and 1,000-fold diluted (D) plasma samples. Efficiency of plating of A3R and 676Z phages after incubation with plasma samples from mice treated with A3R or 676Z phage *per os* and intraperitoneally (IP). Mice (N = 5 or 6) were administered purified preparations of phages A3R or 676Z in drinking water as a sole

water source continuously for 100 days or they were injected with the phages intraperitoneally. For oral treatment a dose of 4×10^9 pfu/ml was used, thus making approx. 2×10^{10} pfu/mouse daily, 2×10^{12} in total. Intraperitoneal immunization was done with three successive injections of 1×10^{10} pfu/mouse on days 0, 20 and 50. EOP was tested for plasma samples collected on day 100. Exemplary results are presented.

5 References

- Casteleyn, C., Rekecki, A., Van der Aa, A., Simoens, P., and Van den Broeck, W. (2010). Surface area assessment of the murine intestinal tract as a prerequisite for oral dose translation from mouse to man. *Lab Anim* 44(3), 176-183. doi: 10.1258/la.2009.009112.
- Denou, E., Bruttin, A., Barretto, C., Ngom-Bru, C., Brussow, H., and Zuber, S. (2009). T4 phages against Escherichia coli diarrhea: potential and problems. *Virology* 388(1), 21-30. doi: 10.1016/j.virol.2009.03.009.
- Kim, K.P., Cha, J.D., Jang, E.H., Klumpp, J., Hagens, S., Hardt, W.D., et al. (2008). PEGylation of bacteriophages increases blood circulation time and reduces T-helper type 1 immune response. *Microb Biotechnol* 1(3), 247-257. doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00028.x.
- Nguyen, S., Baker, K., Padman, B.S., Patwa, R., Dunstan, R.A., Weston, T.A., et al. (2017). Bacteriophage Transcytosis Provides a Mechanism To Cross Epithelial Cell Layers. *MBio* 8(6). doi: 10.1128/mBio.01874-17.
- Nocedal, J., Wright, S. (2006). *Numerical optimization*. NY, USA: Springer Nature.

Final Decision made for Spectrum00115-23R2

Od : spectrumjournal@msubmit.net

wt., 2023, lip-25 21:41

Temat : Final Decision made for Spectrum00115-23R2**Do :** joanna majewska <joanna.majewska@hirszfeld.pl>**Odpowiedz :** spectrum@asmusa.org

Dear Dr. Majewska:

Here is a copy of the decision letter for manuscript "Evolution of the T4 phage virion is driven by selection pressure from non-bacterial factors" by Joanna Majewska, Paulina Miernikiewicz, Aleksander Szymczak, Zuzanna Kaźmierczak, Tomasz Goszczyński, Barbara Owczarek, Izabela Rybicka, Jarosław Ciekot, and Krystyna Dąbrowska [Paper #Spectrum00115-23R2], for which you were a Contributing Author.

Sincerely,

Stefano Pagliara
Editor
Microbiology Spectrum

Subject: Spectrum00115-23R2 Decision Letter

July 25, 2023

Prof. Krystyna Dąbrowska
Ludwik Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy
Bacteriophage Laboratory
Wroclaw
Poland

Re: Spectrum00115-23R2 (Evolution of the T4 phage virion is driven by selection pressure from non-bacterial factors)

Dear Prof. Krystyna Dąbrowska:

Your manuscript has been accepted, and I am forwarding it to the ASM Journals Department for publication. You will be notified when your proofs are ready to be viewed.

The ASM Journals program strives for constant improvement in our submission and publication process. Please tell us how we can improve

your experience by taking this quick [Author Survey](#).

Publication Fees: We have partnered with Copyright Clearance Center to collect author charges. You will soon receive a message from no-reply@copyright.com with further instructions. For questions related to paying charges through RightsLink, please contact Copyright Clearance Center by email at ASM_Support@copyright.com or toll free at +1.877.622.5543. Hours of operation: 24 hours per day, 7 days per week. Copyright Clearance Center makes every attempt to respond to all emails within 24 hours. For a complete list of **Publication Fees**, including supplemental material costs, please visit our <https://journals.asm.org/publication-fees> website.

ASM policy requires that data be available to the public upon online posting of the article, so please verify all links to sequence records, if present, and make sure that each number retrieves the full record of the data. If a new accession number is not linked or a link is broken, provide production staff with the correct URL for the record. If the accession numbers for new data are not publicly accessible before the expected online posting of the article, publication of your article may be delayed; please contact the ASM production staff immediately with the expected release date.

Corresponding authors may [join or renew ASM membership](#) to obtain discounts on publication fees. Need to upgrade your membership level? Please contact Customer Service at Service@asmusa.org.

Thank you for submitting your paper to Spectrum.

Sincerely,

Stefano Pagliara
Editor, Microbiology Spectrum

Journals Department
American Society for Microbiology
1752 N St., NW
Washington, DC 20036
E-mail: spectrum@asmusa.org

Microbiology Spectrum (in press)

Evolution of the T4 phage virion is driven by selection pressure from non-bacterial factors

Joanna Majewska^{a#}, Paulina Miernikiewicz^a, Aleksander Szymczak^a, Zuzanna Kaźmierczak^{a,b}, Tomasz M. Goszczyński^a, Barbara Owczarek^a, Izabela Rybicka^a, Jarosław Ciekot^a, Krystyna Dąbrowska^{a,b#}

^a Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, R. Weigla 12, 53-114 Wrocław, Poland

^b Research and Development Center, Regional Specialist Hospital in Wrocław, H. M. Kamińskiego 73a, 51-124 Wrocław, Poland

Correspondence:

Joanna Majewska

joanna.majewska@hirsfeld.pl

Krystyna Dąbrowska

dabrowska@hirsfeld.pl

Abstract

Bacteriophages colonize animal and human bodies, propagating on sensitive bacteria that are symbionts, commensals, or pathogens of animals and humans. T4-like phages are dependent on abundant symbionts such as *Escherichia coli*, commonly present in animal and human gastrointestinal (GI) tracts. Bacteriophage T4 is one of the most complex viruses and its intricate structure, particularly the capsid head, protecting phage genome, likely contributes substantially to the overall phage fitness in diverse environments. We investigated how individual head proteins – gp24, Hoc and Soc – affect T4 phage survival under pressure from non-bacterial factors.

We constructed a panel of T4 phage variants defective in these structural proteins: T4 Δ Soc, T4 Δ 24byp24, T4 Δ Hoc Δ Soc, T4 Δ Hoc Δ 24byp24, T4 Δ Soc Δ 24byp24 and T4 Δ Hoc Δ Soc Δ 24byp24 (byp=bypass). These variants were investigated for their sensitivity to selected environmental conditions relevant to the microenvironment of the GI tract, including pH, temperature, and digestive enzymes.

The simple and ‘primitive’ structure of the phage capsid (Δ 24byp24) was significantly less stable at low pH, and more sensitive to inactivation by digestive enzymes and simultaneous lack of gp24 and Soc resulted in a notable decrease in phage activity at 37°C. Gp24 was also found to be highly resistant to thermal and chemical denaturation.

Thus, gp24, which was acquired relatively late in evolution, seems to play the key role in T4 withstanding environmental conditions, including those related to the animal/human GI tract, and Soc is a molecular glue that enhances this protective effect.

Importance

Bacteriophages are important components of animal and human microbiota, particularly in the gastrointestinal tract, where they dominate the viral community and contribute to shaping microbial balance. However, interactions with bacterial hosts are not the only element of the equation in phage survival – phages inhabiting the GI tract are constantly exposed to increased temperature, pH fluctuations or digestive enzymes, which raises the question of whether and how the complex structure of phage capsids contributes to their persistence in the specific microenvironment of human/animal bodies. Here we address this phage-centric perspective, identifying the role of individual head proteins in T4 phage survival in the GI tract conditions. The selection pressure driving the evolution of T4-like phages could have come from the external environment that affects phage virions by increased temperature and variable pH; it is possible that in the local microenvironment along the GI tract the phage benefits from stability-protecting proteins.

Keywords: T4 phage, head proteins, head vertex protein, gp24, gastrointestinal tract, bacteriophage evolution

Introduction

Bacteriophages (phages) colonize human and animal bodies and make up an important part of their microbiota. They are known to populate the gastrointestinal tract, and have been identified as the main component (about 90%) of the gut virome (1). Phage presence is determined by the presence of sensitive bacteria, mostly symbionts such as *Escherichia coli*. T4-like phages are an abundant group of coliphages. Discovered a long time ago and extensively studied over the decades, T4 is also one of the most common model phages in microbiology and biotechnology, being one of the most important representatives of human and animal microbiota.

T4 phage is a complex virus, its virion being formed by more than 40 types of proteins (2). The virion head is a prolate icosahedron 120 nm long and 86 nm wide, made up of four structural proteins: gp23, gp24, Hoc and Soc (3) (Figure 1). Gp23 (major capsid protein) forms hexamers that constitute the surface lattice, while gp24 (head vertex protein) forms pentamers on eleven non-portal vertices of the head. Gp23 and gp24 are essential for capsid assembly and maturation, and their deletions in wild-type T4 are lethal for the phage. However, lethality caused by gp24 deletions can be bypassed by certain mutations in gene 23, which allow its protein product gp23 to form both hexamers and pentamers and to replace gp24 at the vertices of the head (4, 5). Interestingly, gp23 and gp24 share a significant homology (6) and gp24 is thought to be a relatively recent evolutionary addition to the phage virion, given the fact that it can be easily bypassed (7).

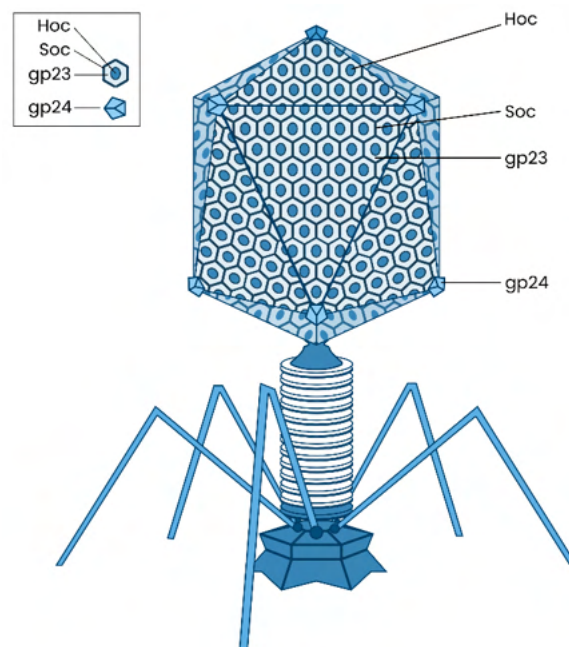


Figure 1. Schematic representation of bacteriophage T4 virion. Four protein components of the head – gp23, gp24, Hoc and Soc – and their positions within the head structure are indicated.

Soc and Hoc, in turn, are nonessential and they decorate the outer surface of the capsid (8). Hoc protein is located in the center of each gp23 hexamer, while Soc trimers are distributed between gp23

hexamers, serving as a molecular clamp (9, 10). It is believed that nonessential proteins are involved in improving phage fitness. Indeed, Soc is involved in stabilizing the capsid against the pressure of highly condensed genomic DNA and also in unfavorable environments (11). Experiments with the T4 mutants T4 Δ Soc, T4 Δ Hoc and the double mutant T4 Δ Hoc Δ Soc performed in alkaline pH demonstrated that Soc stabilized the capsid in those conditions. Starting from pH 10, Soc-deficient mutants (but not Hoc-deficient mutant) were more sensitive to high pH, in comparison to wild-type T4 (11). Potential effects of Hoc on capsid stability seemed marginal (if any) and its role was postulated to involve moderating phage interactions with the mammalian immune system or mucosal surfaces (12, 13) rather than resisting physical factors.

Bacteriophage T4 infects *E. coli* cells, attaching to its surface with the long tail fibers (LTFs) and using the outer membrane protein C (OmpC) and lipopolysaccharide (LPS) as coreceptors (14). Interestingly, recent studies (15) demonstrated that the dynamics of phage-bacteria interactions in spatially structured environments – more typical in natural settings – differ significantly from those observed in well-mixed laboratory cultures. In the presence of spatial refuges, lower level of genetic resistance to phages is observed and phenotypic resistance strategies are more relevant for bacterial survival, with heterogenous expression of the phage receptor (in the case of bacteriophage T4, namely OmpC) being one of the mechanisms. In recent years, novel approaches such as transposon insertion sequencing (16) and genome-wide loss-of-function and gain-of-function technologies (17) have been proposed for high-throughput identification of phage receptors and host factors important during phage infection. Both these studies confirmed known receptors of T4 phage and pointed to various factors potentially involved in the complex phage-host interactions. In a mature T4 virion, LTFs can adopt two conformations: retracted or extended, and individual fibers remain in a dynamic equilibrium between these two states (18). Importantly, in the retracted state LTFs are folded against the tail sheath, interacting with Wac protein and with the capsid. Given the symmetry mismatch between the baseplate – to which the LTFs are anchored – and the icosahedral capsid, individual LTFs interact with the capsid differently, with one of the fibers interacting with the capsid edge. Therefore, it cannot be excluded that mutations and changes in the protein composition of T4 phage capsid could also affect the conformation of LTFs and, indirectly, the process of phage attachment to the host.

Specific physical factors are linked to the local microenvironment along the alimentary tract that provides optimal conditions for digestion, especially with regard to the activity of digestive enzymes requiring a very specific pH range. Thus, T4-like phages within mammalian or avian microbiota are under the pressure of acidic (stomach) or alkaline (intestine) pH. Also, body temperature in warm-blooded animals is typically higher than that of the environment. Further, phages in the gut are exposed to digestive enzymes, such as trypsin, chymotrypsins, or pepsin. This raises questions of whether the complex structure of phage capsids contributes in any way to their survival inside the GI tract of animals and humans, and – if so – what is the role of individual proteins. Interestingly, recent studies of phage

interactions with human and animal systems revealed that ways in which phages affect higher organisms go far beyond regulation of the bacterial part of microbiomes (19–21). However, the reverse perspective, in which phages and – to some extent – possibly also phage evolution may be affected by non-bacterial (physico-chemical) factors, including the specific natural niche of human and animal bodies (particularly the GI tract), remains underexplored.

The simplest and probably the most primitive version of the T4 phage capsid, made of gp23 only (bypass variant), is viable but not common. If so, other than gp23, potentially “dispensable” proteins may provide an evolutionary advantage to the phage in the external environment, but also when circulating inside animal or human bodies as components of their natural microbiota. In this study we constructed and compared physical stability of all types of T4 mutants, deficient in gp24 (bypass), Soc, and Hoc, including double and triple deletions. We investigated high and low pH, elevated temperature, and digestive enzymes as physical and chemical factors that affect the T4 phage when populating gut microbiota, seeking to understand the distinct roles of individual head proteins in its survival, with the main focus on the specific conditions inside human and animal bodies. Taking into account that T4-like phages have been considered for phage therapy (22–24) and T4 itself could be a promising nanovector (25, 26), such data not only would expand our understanding of phage biology, but also impact the field of phage application as biotechnological and medical tools, where susceptibility of phage particles and phage-based vectors to certain conditions could be either a disadvantage or a desired characteristic.

Results

T4 phage mutants deficient in head proteins

Site-directed mutagenesis was performed on T4 phage and its previously described mutant T4 Δ Hoc (27) to introduce nonsense mutations into genes *24* and/or *soc* and, as a result, the following panel of T4 phage variants was obtained: T4 Δ Soc, T4 Δ 24byp24_1, T4 Δ 24byp24_2, T4 Δ Hoc Δ Soc, T4 Δ Hoc Δ 24byp24, T4 Δ Soc Δ 24byp24 and T4 Δ Hoc Δ Soc Δ 24byp24. Δ Soc variants were first selected by PCR (Supplemental Figure S1) and successful introduction of nonsense mutations in the isolates was confirmed with direct sequencing. Since gp24 is essential for T4 phage capsid assembly and maturation, stable Δ 24 mutations require the cooccurrence of spontaneous bypass-24 mutations in gene *23*, which compensate for the lack of gp24 (4, 5). Hence, each of the gp24-deficient mutants also harbors such bypass-24 mutations. All mutations identified in gene *23* are summarized in Table 1. Of the four identified amino acid substitutions, N381S (5) and a novel mutation N384S are the most relevant, as they confer the bypass-24 phenotype. The role of the identified mutations is discussed more extensively in the *Discussion* section. Briefly, bypass mutations in gp23 allow the phage to survive without gp24, which in a wild-type phage is an essential protein. Nonsense mutations in Hoc- and Soc-coding genes, in turn, simply result in the lack of these proteins in the capsid, since these two are nonessential

(‘decorative’) proteins. Presence or absence of gp23, gp24, Hoc and Soc in the capsids of wild-type T4 phage and its mutants was verified using ELISA with protein-specific reference plasma samples, which confirmed that nonsense mutations in genes *24* and/or *soc* resulted in the lack of gp24 and/or Soc and therefore in deficient composition of the head (Supplemental Figure S3).

Table 1. T4 phage mutants investigated in this study: protein composition of capsids and mutations identified in gene *23* in gp24-deficient mutants ^a

	gp23	gp24	Hoc	Soc	Mutations altering gp23 ^b
T4	+	+	+	+	-
T4ΔHoc	+	+	-	+	-
T4ΔSoc	+	+	+	-	-
T4Δ24byp24_1	+ *	-	+	+	A295V (C884T) N381S (A1142G)
T4Δ24byp24_2	+ *	-	+	+	A295V (C884T) N384S (A1151G)
T4ΔHocΔSoc	+	+	-	-	-
T4ΔHocΔ24byp24	+ *	-	-	+	V99I (G295A) N381S (A1142G)
T4ΔSocΔ24byp24	+ *	-	+	-	A295V (C884T) N381S (A1142G)
T4ΔHocΔSocΔ24byp24	+ *	-	-	-	V99I (G295A) N381S (A1142G)

^a “+” or “-” indicate presence or absence of the protein, respectively; asterisks (*) indicate bypass variant of the major capsid protein (gp23).

^b boldfacing indicates mutations in gp23 with bypass effect previously confirmed by Johnson et al. (5).

Head vertex protein (gp24) and small outer capsid protein (Soc) improve phage resistance to body temperature of warm-blooded animals

T4 phage and its head protein-deficient mutants were investigated for their susceptibility to 37°C as the approximated body temperature in warm-blooded animals. Incubation of the investigated phages at 37°C for 2 h resulted in a statistically significant decrease in phage titers in three mutants – T4Δ24byp24_1 (26% titer drop), T4ΔSocΔ24byp24 (72% titer drop), and T4ΔHocΔSocΔ24byp24 (72% titer drop). However, when exposure to 37°C was prolonged to up to 24 h (data not shown), the difference between the wild-type T4 phage and T4Δ24byp24_1 was no longer detectable, while the negative effect of temperature on the double and triple mutant deficient in head vertex (gp24) protein and Soc was still

apparent. This strongly suggests that the specialized vertex protein gp24 and Soc are both involved in protecting the capsid from heat-related damage, possibly through different mechanisms. Importantly, while lack of only one of these proteins appears to have a smaller effect or no effect at all on phage survival at body temperature, simultaneously lacking both is highly detrimental.

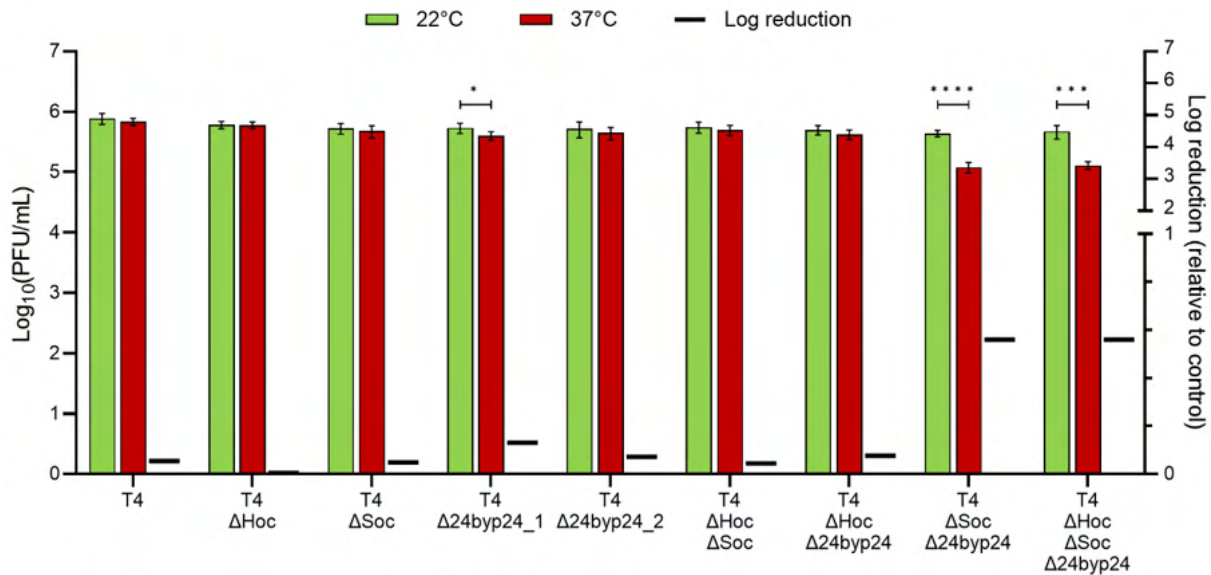


Figure 2. Stability of T4 phage and its mutants deficient in head proteins at 37°C. Purified phage preparations (N=6) were diluted in PS to 10⁶ pfu/ml and incubated at 22°C or 37°C for 2 h. Phage titers were determined using spot plating. Log reductions were calculated relative to the control group (22°C). The experiment was repeated twice with concordant results. One representative experiment is presented. * p 0.0243; *** p 0.008; **** p < 0.0001 (Welch's t test).

Head vertex protein (gp24) demonstrates remarkable thermostability

Some bypass mutants of T4 phage were identified as sensitive to increased temperatures. These mutants lack protein gp24 in their capsids, but at the same time they bear characteristic bypass mutations in protein gp23, necessary for protein gp23 to form head vertices replacing gp24 (otherwise the lack of gp24 is lethal for the phage). Heads of these mutants are formed with mutated gp23 that builds both surfaces and vertices of icosahedrons, so better thermostability of the complete T4 phage (compared to its 'primitive' version without gp24) can be mediated either by gp24 or by the non-bypass version of gp23. To identify the molecular basis, thermostability of gp24 and gp23 was assessed by circular dichroism (CD) (folding/unfolding was assessed at 222 nm with increasing temperature). All gp23 variants showed similar denaturation curves and similar T_m values, with no apparent differences between the wild-type gp23 and its bypass mutants (Figure 3, Supplemental Table S1). In contrast, the denaturation curve of gp24 revealed unexpected, outstanding resistance of this protein to high temperatures (Figure 3); this resistance was so strong that T_m could not be determined (Supplemental Table S1). These results strongly support the conclusion that the head vertex protein gp24 likely plays a major role in maintaining the thermostability of the T4 phage capsid.

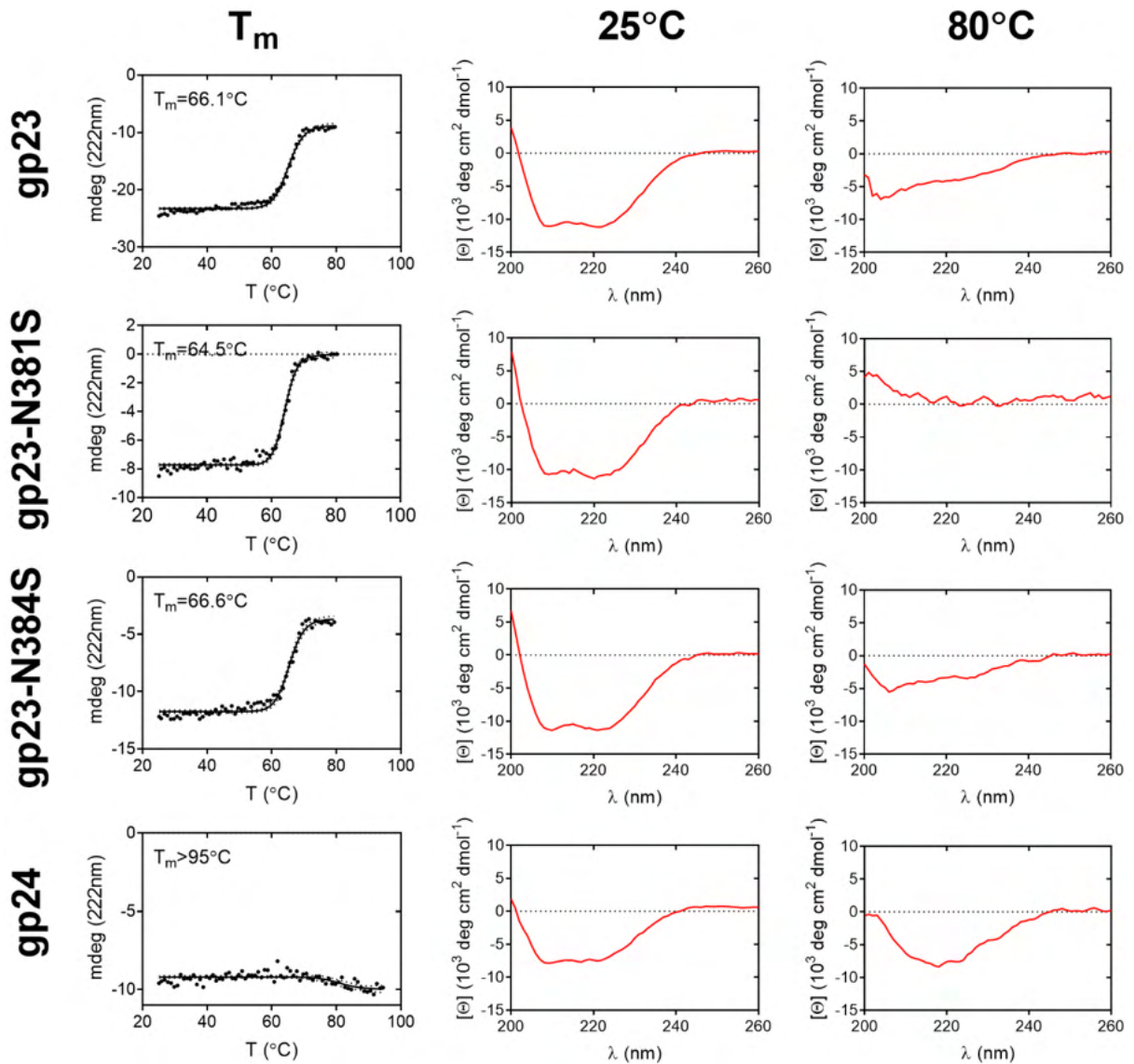


Figure 3. Thermal denaturation curves and circular dichroism (CD) spectra of recombinant T4 head proteins: major capsid protein gp23 and its two mutants with a single amino acid substitution N381S or N384S, and head vertex protein gp24. Protein solutions in PBS were heated in the range of 25°C-80°C (gp23 and its mutants) or 25°C-95°C (gp24); wavelength: 222 nm. CD spectra were acquired in the range of 200-260 nm at 25°C and 80°C.

Head vertex protein (gp24) and small outer capsid protein (Soc) are crucial for the stability of T4 phage virions in response to pH

We investigated how modifications of phage head protein composition affected T4 phage activity in acidic and alkaline pH. All variants were less stable at pH 3, but the T4 Δ 24byp24 mutants were significantly more sensitive than T4 or T4 deficient in Hoc and/or Soc, as shown in Figure 4. The titers of T4 Δ 24byp24 mutants after 30 min incubation were three to five orders of magnitude lower than those of T4 and other gp24-positive phages, the latter ones being only moderately affected (Figure 4, top panel). In alkaline pH, however, it was the lack of Soc that negatively affected phage viability.

Sensitivity of Soc-deficient mutants to alkaline pH was further increased when the phages were also lacking gp24 (as bypass mutants) (Figure 4, bottom panel), again demonstrating that gp24 and Soc together are crucial for the stability of T4 phage virions. Lack of gp24 or Hoc alone did not have a negative effect on phage viability at pH 10.6, yet some decrease in phage titer was observed for T4 Δ Hoc Δ 24byp24.

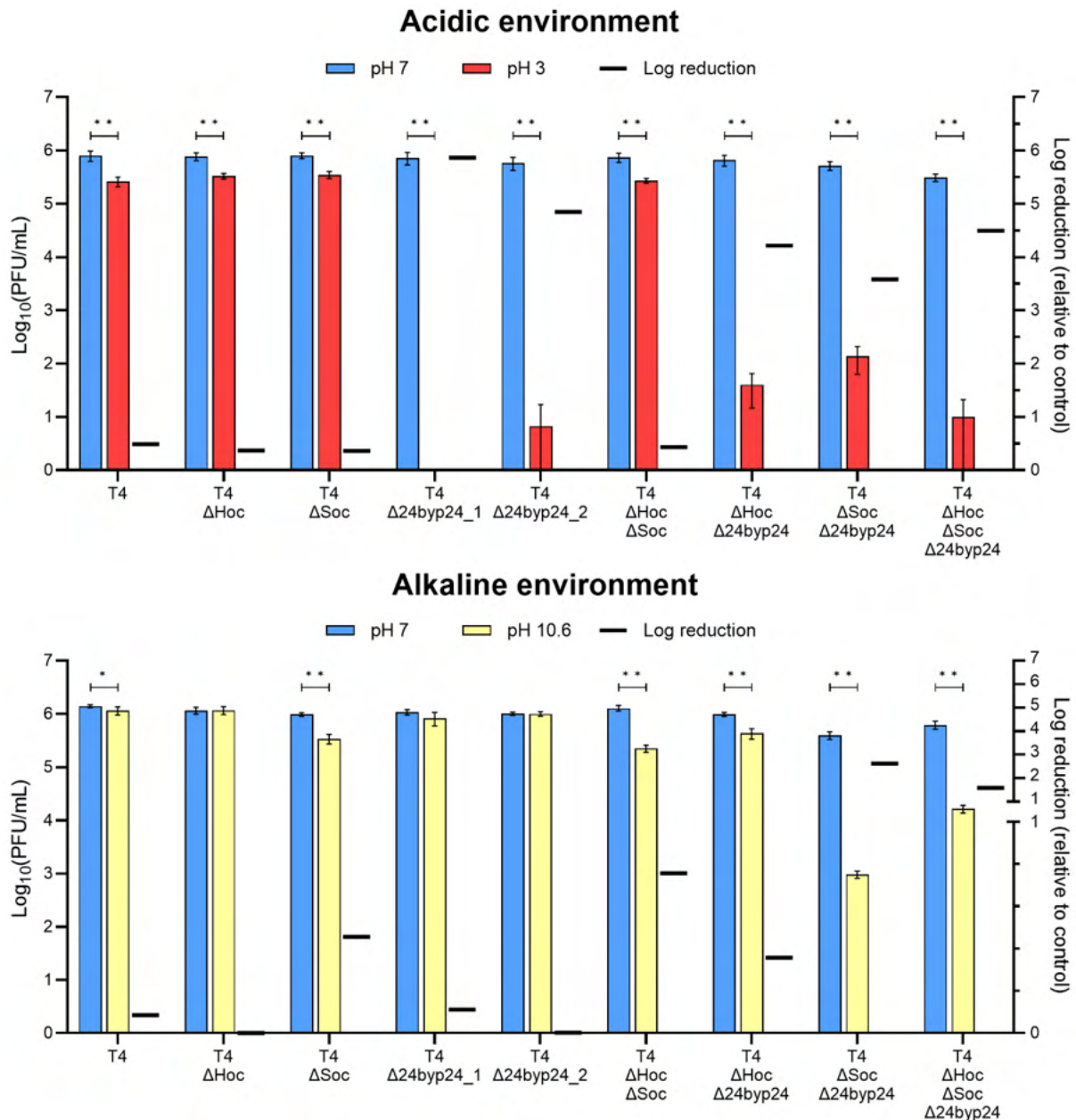


Figure 4. Effect of acidic, pH 3.0, and alkaline, pH 10.6, environment on the viability of T4 phage and its mutants defective in head proteins. Purified phage preparations (N=6) were diluted to 10^6 pfu/ml in PS, pH 7 and PS, pH 3 or 10.6 and incubated at 37°C for 30 min (pH 3.0) or 1 h (pH 10.6). Phage titers were determined using spot plating. Log reductions were calculated relative to the control group (pH 7). Each experiment was repeated at least twice with concordant results. One representative experiment is presented. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$ (Mann-Whitney test).

Sensitivity to proteolytic digestive enzymes and bile

Phage capsids are composed of proteins and therefore on their journey along the GI tract they could potentially be prone to proteolytic activity of digestive enzymes, e.g. pepsin, trypsin and chymotrypsins. We investigated whether protein composition of the T4 head affected phage susceptibility to those enzymes. Wild-type T4 and its mutants were incubated with pepsin (1 mg/ml, pH 4), trypsin (2 mg/ml, pH 8, 20 mM Ca²⁺ as a cofactor), or α -chymotrypsin (3 mg/ml, pH 8, 20 mM Ca²⁺ as a cofactor), at 37°C (the optimum for these enzymes' activity).

In the case of pepsin, an acidic environment must be provided to maintain enzyme activity. Thus, optimal conditions for pepsin treatment include those previously identified as affecting T4 Δ 24byp24 mutants. To moderate the effect of acidic pH, but at the same time to provide sufficient conditions for the enzyme, the experiment was carried out at pH 4 (the upper pH limit for optimal activity of pepsin) at 37°C, with two non-pepsin-treated controls incubated at pH 4 and either 37°C or 22°C. As expected, 37°C and acidic pH affected T4 Δ 24byp24 mutants (65% to 98% titer decrease in comparison to the control incubated at pH 4 at 22°C). Nevertheless, a larger decrease of the phage titer for all gp24-deficient mutants resulted from pepsin treatment (78% to 99% titer decrease in comparison to the control incubated at pH 4 at 22°C and 38% to 65% in comparison to the non-pepsin-treated group incubated at 37°C). Again, bypass mutants deficient also in Soc protein were the most efficiently inactivated by pepsin digestion (\geq 99% titer decrease in comparison to the control incubated at pH 4 at 22°C and 57% to 65% in comparison to non-pepsin-treated group incubated at 37°C) (Figure 5, Supplemental Table S2). Pepsin had no negative effect on mutants lacking Hoc or Soc, nor on the T4 Δ Hoc Δ Soc double mutant.

Neither T4 nor any of the investigated T4 mutants appeared to be prone to proteolytic activity of trypsin, but all phages, including wild-type T4, were found to be sensitive to α -chymotrypsin (Figure 5), with gp24-deficient phages again being significantly more affected.

No decrease in phage titers was observed after incubation with either 0.7% or 2% bile extract for any of the mutants. Bile concentration of 0.7% corresponds to that found in human GI tract (28). While some mild effects of bile components may have been undetectable *in vitro* at a physiological concentration, using a nearly 3-fold higher bile content likely would have made any such effects more apparent. Therefore, this strongly suggests that bile components do not have a negative effect on bacteriophage T4 regardless of the protein composition of the capsid (Figure 5).

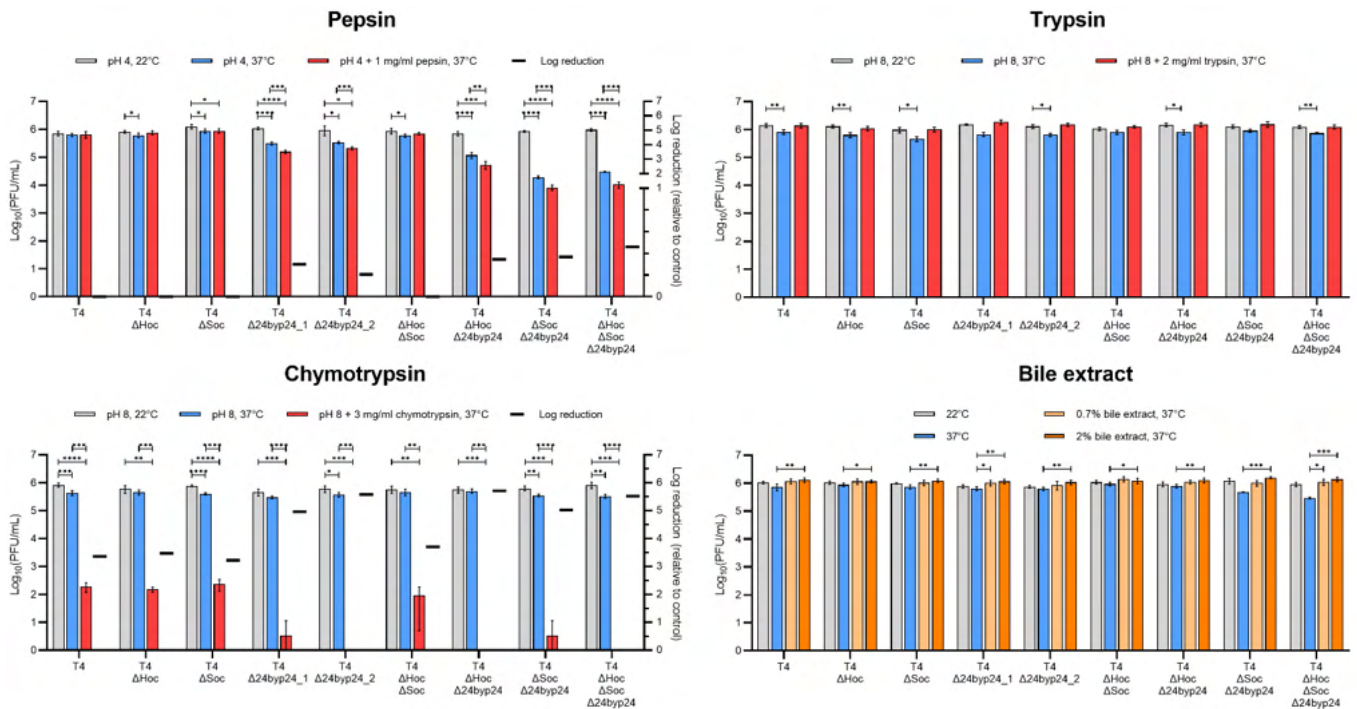


Figure 5. Effects of the proteolytic digestive enzymes pepsin, trypsin and α -chymotrypsin, and bile extract on the viability of T4 phage and its mutants defective in head proteins. Purified phage preparations (N=6) (10^6 pfu/ml) were incubated in PS pH 4 or PS pH 4 with pepsin (1 mg/ml) at 37°C or in PS pH 4 at 22°C for 2 h; in PS+20 mM CaCl_2 pH 8 or PS+20 mM CaCl_2 pH 8 with of trypsin (2 mg/ml) at 37°C or in PS+20 mM CaCl_2 pH 8 at 22°C for 2 h; in PS+20 mM CaCl_2 pH 8 or PS+20 mM CaCl_2 pH 8 with of α -chymotrypsin (3 mg/ml) at 37°C or in PS+20 mM CaCl_2 pH 8 at 22°C for 6 h; in PS or 0.7% and 2% porcine bile extract in PS at 37°C or in PS at 22°C for 2 h. Phage titers were determined using spot plating. Log reductions were calculated relative to the relevant control group incubated at 37°C in the absence of the investigated factor (represented with blue bars). Each experiment was repeated at least twice with concordant results. One representative experiment is presented. * $p \leq 0.0332$; ** $p \leq 0.0021$; *** $p \leq 0.0002$; **** $p < 0.0001$ (Brown-Forsythe and Welch ANOVA, Dunnett's T3 multiple comparisons test).

Discussion

Out of four proteins comprising the head shell of a mature T4 phage, only gp23 and gp24 are essential components. While gp23 hexamers form the surface lattice, gp24 builds eleven pentameric vertices of the bacteriophage T4 capsid. These two proteins share ~21% amino acid sequence identity (6) and 31% sequence similarity (29) and gp24 is postulated to be a gp23 derivative, originating from a gene duplication and subsequent sequence divergence and optimization (30). Moreover, specialized vertex protein likely is a relatively recent evolutionary addition, given the fact that spontaneously occurring specific mutations in gp23 quite easily allow for a functional substitution of gp24 (7), bypassing the otherwise lethal effect of gp24 deficiencies. Johnson et al. (5) identified N381S substitution in gp23 as

a bypass-24 mutation sufficient to confer a bypass phenotype. Although a similar N384S substitution has not been described to date, given the consistent nature of the substitutions, where asparagine is substituted with serine, and the close proximity of this novel mutation to the originally described position, we propose to include N384S substitution identified in this study in the list of bypass-24 mutations. Considering the fact that another verified bypass-24 mutation, A387T (5), although involving an amino acid substitution of different nature, is located in close proximity, this region of gp23 appears to be important for gp23 structural function. This was in fact recently confirmed by Fang et al. (31), who demonstrated that N381S and A387T are located within a short α -helix of the A domain of gp23, at the interface of adjacent protein subunits within the same capsomer and are involved in modulating intersubunit interactions.

All gp24-deficient mutants selected in this study carry either N381S or N384S substitution. However, these mutations are accompanied by A295V or V99I substitutions (Table 1). Johnson et al. (5) described a different mutation at position 295, where alanine was replaced with threonine, and concluded that it does not confer a bypass-24 phenotype and neither does another closely located mutation, T296A. This strongly suggests that the A295V substitutions observed in mutants investigated herein do not confer the bypass phenotype. V99I, on the other hand, was involved in conferring the bypass-24 phenotype when accompanied by A126T mutation, yet neither of these two substitutions was sufficient when introduced alone. In our study, V99I mutation was accompanied by N381S, which is a sufficient bypass-24 mutation itself; therefore the exact role of V99I is not clear, but most likely it has no important role in the definition of the phenotype here.

We have found bypass-24 mutants of T4 simultaneously deficient in Soc protein significantly more sensitive to increased temperature than wild-type phage or other types of mutants. Surprisingly, we observed sensitivity to relatively mild conditions: these phages were negatively affected by a temperature of 37°C. Importantly, all variants were stable at 22°C. T4 phage life cycles are dependent on *E. coli* bacteria, which are common symbionts of mammals or birds. Since T4-like phages belong to mammalian or avian GI tract microbiota, they are constantly exposed to temperatures exceeding ambient levels. The observation that the 'primitive' version of the phage capsid is sensitive to a temperature of 37°C highlights the role of gp24 and Soc in phage survival when inside animal and human bodies. Importantly, selection for this adaptation may of course have come from many other sources, including temperature and pH variations that may occur in the external environment. Of note, while lack of either gp24 or Soc alone does not result in a substantial sensitivity to mildly higher temperature, simultaneously lacking both proteins is highly detrimental. This points to the evolutionary advantage of the acquisition of a specialized vertex protein and supports the role of Soc as a molecular glue stabilizing the phage capsid in response to thermal denaturation (32).

Since the lack of gp24 itself is lethal for the phage and it needs to be compensated with bypass mutations in gp23 to keep the phage viable, differences in phage sensitivity to temperature and other factors may

result directly from the absence/presence of gp24, but alternatively they may also result from the altered amino acid sequence of gp23. The bypass ('primitive') version of gp23 might have overall lower stability, hence leading to impaired resistance to environmental stress of the whole phage head. Therefore, we compared the thermostability of isolated recombinant proteins gp24 and gp23, and two bypass mutants of gp23 (Figure 3). We observed that bypass mutations N381S or N384S in gp23 did not affect its thermostability. At the same time we observed that gp24 exhibited spectacular resistance to high temperature: denaturation was not observed even at 95°C and T_m could not be determined (Figure 3, Supplemental Table S1). Thus we conclude that differences in thermosensitivity between T4 phage and its gp24-deficient mutants can be attributed to the absence/presence of gp24 rather than to amino acid substitutions in gp23, rendering the gp24-deficient phages more prone to environmental stress, including the conditions inside the bodies of warm-blooded animals where phages exist within normal intestinal microbiota.

In addition, we noted that the detrimental effect of temperature was counteracted by the introduction of Ca^{2+} ions to the phage's microenvironment. This protective effect of Ca^{2+} was however also applicable to wild-type T4 (Supplemental Figure S4); thus a specific effect of Ca^{2+} on the bypass mutants was not observed, and the effect is rather general for T4-like phages. Also, luminal concentrations of Ca^{2+} ions in the GI tract are strongly dependent on the dietary calcium intake and potentially highly variable. Therefore, the potential protective role of Ca^{2+} in GI tracts of animals and humans is not certain, especially considering the fact that many phages rely on the presence of divalent cations for stability and propagation. In nature, calcium is considered an easily available element as it is among the most abundant cations in water and soil. Nevertheless, concentrations of Ca^{2+} ions vary depending on the environment, typically reaching ~10 mM in open ocean water (33) and ranging between 0.01 and ~1.9 mM in freshwater, with the average at approx. 0.1-0.35 mM and much higher concentrations observed in the vicinity of carbonate rocks (34). Calcium concentrations in the soil solutions were reported to reach up to 20 mM (35) and strongly depend on the type of soil.

The environment of the GI tract is also characterized by fluctuations of pH, typically from strongly acidic contents of the stomach to more alkaline conditions in further sections (detailed conditions differ between species), and by the presence of digestive enzymes. Proteolytic enzymes such as pepsin, trypsin and chymotrypsins may potentially affect the phage, considering the proteinaceous nature of phage capsids. All these factors constitute a specific and diverse environmental niche that may negatively affect phage particles. Although ΔSoc mutants of bacteriophage T4 have previously been reported as more susceptible to extreme pH conditions (11), those stability tests have only been performed in alkaline pH, and more importantly they did not include gp24 bypass mutants. In this study we confirmed that lack of Soc negatively affected phage viability in alkaline pH, and observed that sensitivity to an alkaline environment was further increased when Soc-deficient mutants were also lacking gp24 (Figure 4). On the other hand, exposure of phages to acidic pH caused massive neutralization of T4 $\Delta 24$ byp24

mutants regardless of the presence or absence of Hoc and/or Soc. These results show that the molecular bases for T4 phage resistance to acidic and alkaline pH are likely fundamentally different. The role of Soc protein as a molecular glue stabilizing the capsid in the extreme environmental conditions may in fact be manifested in alkaline conditions, while in an acidic environment it is gp24 rather than Soc that is vitally important for T4 phage viability. Of note, we have previously found that the chemical stability of gp24 was also markedly higher than that of gp23 (36). Thus, the molecular switch from gp23-only capsids to capsids built with both gp23 and gp24 could have been promoted by both increased temperatures and acidic conditions – primarily in the external environment or perhaps also in the GI tracts.

Bacteriophages, even those relatively closely related, differ in their susceptibility to proteolytic degradation by digestive enzymes. To list a few examples, studies on other *E. coli* myoviruses – T2 (a close relative of T4) and P1 (37) – and an *E. coli* podovirus CA933P (38) revealed that T2 phage was inactivated by high concentrations of chymotrypsins, but not trypsin, while P1 was rapidly inactivated by trypsin and more slowly by chymotrypsins, with Δ -chymotrypsin-mediated inactivation being more potent than that of other three chymotrypsins. Free, non-encapsulated CA933P was relatively quickly inactivated by pepsin, but was not affected by bovine intestinal proteases – trypsin and α -chymotrypsin – despite a long incubation period of 24 h. However, it is unclear whether microenvironmental conditions were optimal for the proteolytic activity of intestinal proteases (normal saline solution, pH 7.2, no indication of the presence and concentration of calcium ions). Additionally, as many phages are highly sensitive to acidic pH, evaluation of pepsin-mediated inactivation is often challenging. Even though the data regarding phages and digestive enzymes are somewhat limited, inactivation by proteolytic enzymes is likely phage-specific and, therefore, in terms of phage resistance to proteolysis there is no universal pattern that could be applied to bacteriophages, even those of a similar morphotype or specificity. When it comes to T4 phage in particular, Ishii and Yanagida (11) tested T4 Δ Soc, T4 Δ Hoc or T4 Δ Soc Δ Hoc mutants and reported no differences in their susceptibility to digestion by trypsin in comparison to wild-type T4. We observed herein that while neither T4 nor any of its mutants were inactivated by trypsin, all of them were sensitive to proteolytic activity of α -chymotrypsin, with a more severe titer decrease again being observed for gp24-deficient phages (Figure 5). Also, in the case of pepsin, lack of gp24 rendered the phages prone to proteolytic digestion, while those with intact gp24 remained unaffected. Bypass mutants deficient also in Soc protein were inactivated more efficiently, which again indicates that both gp24 and Soc are involved in improving and maintaining stability of the T4 phage capsid.

The key to understanding the observed differences in susceptibility to proteolytic digestion likely lies in spatial architecture of phage capsids and/or the substrate specificity of these enzymes. Trypsin, α -chymotrypsin and pepsin all display distinct substrate specificity – trypsin is highly specific and favors basic residues like lysin and arginine, while α -chymotrypsin selectively catalyzes the hydrolysis of

peptide bonds after aromatic amino acids (tyrosine, phenylalanine and tryptophan) and leucine, with secondary hydrolysis also occurring after methionine, isoleucine, serine, threonine, valine, histidine, glycine, and alanine (39, 40). Pepsin is reported to be much less specific than trypsin and other proteases (40), but it was reported to favor bulky hydrophobic amino acid residues – in general, it preferentially cleaves after phenylalanine and leucine, yet for many other amino acids the cleavage probability depends greatly on the adjacent residues (41). When interactions between individual protein elements building the phage capsid are added to the equation, some amino acids may remain ‘hidden’, while at the same time other residues are exposed and available for cleavage by proteolytic enzymes. It is clear that *bypass* mutations in gp23 greatly affect how monomers of this protein interact with one another to form oligomers – hexamers and also pentamers, not observed in the case of regular gp23. Therefore, it is likely that some amino acid residues that would have been protected from the proteolytic enzymes in regular gp23 hexamers, are rendered more exposed to the environment in these pentameric structures and perhaps also in the mutated hexamers, as slight shifts in conformation could occur compared to wild-type gp23. This could be even more relevant in Δ Soc Δ 24byp24 variants, when the molecular net of Soc trimers normally located between the gp23 hexamers is also absent. However, these speculations would require experimental confirmation. On the other hand, introduction of additional serine residue in a place of asparagine in the investigated bypass mutants (N381S or N384S) could theoretically provide an additional cleavage site for the digestive enzymes. However, this explanation seems less plausible as this region of gp23 is generally not well exposed (31).

In addition to mammalian physiology-related conditions and their impact on T4 phage variants, we observed that some of the investigated variants were sensitive to technological processing, specifically to purification and concentration with the Hollow Fiber system. This system includes the use of forced flow and pressure, thus potentially affecting phage particles as a physical factor. Surprisingly, the most sensitive and unstable were mutants bearing two deletions at the same time: Δ 24byp24 and Δ Hoc (Supplemental Table S3). This further supports the key role of gp24 in resisting physical conditions by the phage, here, however, supported by Hoc protein. We hypothesize that this may result from stabilizing effects that Hoc potentially exerts on gp23 hexamers, particularly under external pressure. These observations may shed new light on the possible role of Hoc – previously considered only marginally involved in providing stability – again highlighting how different elements in the complex structure of T4 capsid contribute to its overall fitness: while Soc trimers form a molecular cage that may reinforce the phage head against the internal pressure of tightly packed genetic material (10, 30), resisting external pressure appears to require a different mechanism. External pressure and flow conditions may to some extent resemble gut conditions in the area of intensive peristaltic movements, but this problem requires further studies. We propose this observation as evidence of how capsid proteins directly determine phage stability under common laboratory procedures like purification and concentration, which may have a practical impact for development of phage processing methods as well as in the context of application of modified phage capsids – and particularly T4 capsid – as biotechnological (42) and medical tools, e.g.,

as vaccine platforms and artificial viral vectors (25, 26, 43). Hoc protein, however, has already been proposed as potentially mediating phage interactions with mammalian immune system (12) and with mucosal surfaces (44), which strongly suggests Hoc contribution to improved phage survival inside the gut.

Factors such as temperature or low/high pH are not exclusively specific to the conditions inside animal bodies, but rather remain general characteristics of any given environmental location. Also bacterial hosts of T4-like phages are not restricted to the gut. Although *E. coli* was long believed to be unable to replicate in the extraintestinal environment (45), some specific naturalized strains have recently been reported to survive and potentially reproduce in soil, sediments or in association with macrophytic algae and periphyton in aquatic ecosystems (46). However, their long-term survival is strongly affected by environmental conditions and their genotypes are distinct from those of animal-origin *E. coli*. Comeau and Krisch (29) analyzed the T4 phage superfamily regarding the prevalence of head proteins. Homologs of all four proteins were only identified in phages very closely related to T4, while the most distant group comprising phages infecting cyanobacteria and thermophilic eubacteria (typically environmental hosts) had isometric capsids and no homologs of gp24, Hoc or Soc. Nevertheless, the evolution of T4 phage capsid could have been influenced mostly by environmental niches very distinct from those of animal bodies. Alternatively, T4 phage capsid evolution could have been – at least partially – directed or co-directed by the microenvironment of the GI tracts of warm-blooded animals, where its host *E. coli* is abundantly present and thriving. This alternative scenario is demonstrated in Figure 6, highlighting the GI tract-related factors and their hypothetical influence.

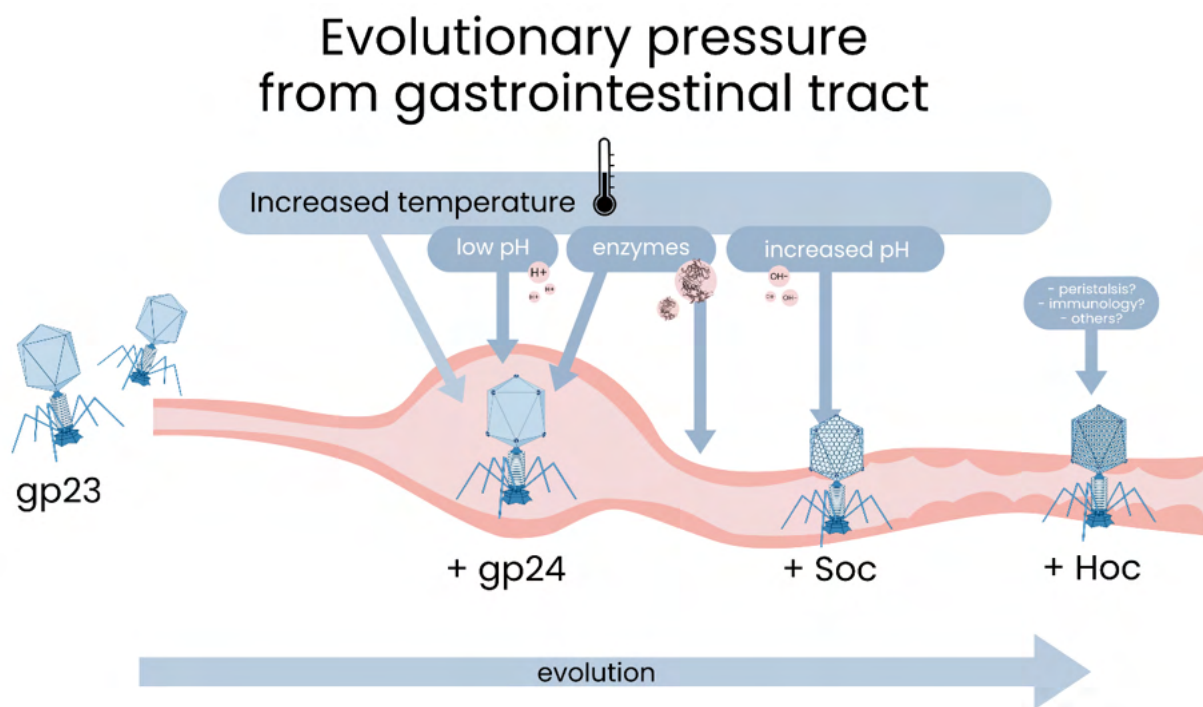


Figure 6. Schematic representation of the proposed gastrointestinal tract-related factors that may have contributed to the selection pressure on T4 phage.

Regardless of the exact source of selection pressure, our observations demonstrate the key role of T4 phage capsid composition in phage resistance to a variety of conditions, all of which are also highly relevant in the context of phage presence in the GI tracts of animals and humans. Since it is believed that the specialized vertex protein gp24 evolved as a result of gene 23 duplication and subsequent optimization, what we now consider as bypass mutations in gp23 could very well reflect a less specialized, initial variant of gp23. In this scenario, a phage lacking the specialized vertex protein would in fact represent a more ancestral and ‘primitive’ variant. We demonstrated that such simple and ‘primitive’ structure of the phage capsid, without gp24 that was acquired relatively late in evolution, is significantly less stable at the low pH and more sensitive to inactivation by digestive enzymes. Moreover, the nonessential protein Soc – the least prevalent capsid structural protein among the T4 phage superfamily (29) – and gp24 both play major role in T4 phage stability at warmer temperatures, again pointing to the improved fitness of the T4 phage compared to its ancestral variant, most likely lacking nonessential head proteins. Thus, we postulate that the key role of gp24 in phage structure is to provide the capsid with better resistance to harsh environmental conditions, including those that affect T4 phage along the GI tract. Considering that T4-like phages propagate on bacterial symbionts in the gut (*E. coli*) and are common and abundant elements of the gut microbiota, we also hypothesize that the specific conditions inside animal/human bodies could partially contribute to the evolutionary pressure on T4-like phages, together with the external environment, shaping the structure of phage virion and promoting stabilization of the most optimal phenotypes.

Materials and methods

Bacteriophages

Bacteriophage T4 was purchased from American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, Maryland, USA). Its mutant HAP1 (T4 Δ Hoc) was previously selected and described at the Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences (HIIET PAS) (27) and is a part of the Polish Collection of Microorganisms (HIIET PAS, Poland). HAP1 mutant bears the C496T transition in the *hoc* gene (Table 2), which results in an ochre stop codon at 44% of the protein length and therefore the mature HAP1 bacteriophage lacks functional Hoc protein on its capsid. Phages T4 and T4 Δ Hoc served for the construction of other mutants with altered head composition, as described below.

Bacterial strains

All phages were propagated on an *Escherichia coli* B host from the Polish Collection of Microorganisms (HIIET PAS, Poland). *E. coli* DH5 α , genotype: F⁻ Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ* (Invitrogen) and *E. coli* DP50 (later referred to

as supF), genotype: F⁻ *fhuA53 dapD8 lacY1* or $\Delta(\text{cod-lacI})6 \text{ glnX44(AS)} \Delta(\text{gal-uvrB})47 \lambda^- \text{ tyrT58(AS)} \text{ gyrA29(NalR)} \Delta\text{thyA57 hsdS}$, kindly supplied by prof. Andrey Letarov (Russian Academy of Sciences, Moscow) were used for *in vivo* recombination cultures and *E. coli* supF also for selection of Δgp24 -deficient phages. The supF strain is a nonsense suppressor strain that carries a *tyrT* mutation in the anticodon region of tRNA^{tyr} (GUA → CUA), which allows for the incorporation of tyrosine at the amber termination codon, therefore preventing premature termination of the protein production at the site of nonsense mutation.

Site-directed mutagenesis and selection of mutants from the overall phage progeny

Nonsense mutations were introduced to phage genomes using site-directed mutagenesis and *in vivo* recombination cultures.

— Gp24-deficient phages

A fragment of the T4 phage *24* gene was amplified in a PCR reaction with the mutagenizing forward primer 5'-TATCAAATACCTTAACCCAGACAACGAATTTACATTTAAAACCTGGTGCTACTTACGCTGGCGAAGCTGGATATGTAGACCGAGAACAAATCACAGAATTAACAGAAGAGTCTAAATTA ACTCTCAATAAATAGGATTTATTCAAATAGAATAATATCG-3' and the reverse primer 5'-AACCAGCCTGATGCAGCAAGAAT-3' to implement two nonsense codons into the PCR product (Table 2), subsequently cloned into pGEM-T Easy vector (Promega).

Gp24-deficient mutants must contain a bypass mutation in *gp23* to compensate for this deficiency (otherwise lethal); bypass mutations are known to occur spontaneously. To construct these mutants, a two-step procedure was used. First, nonsense mutations were introduced into gene *24*, and then the phage was subjected to selection to promote bypass mutations in gene *23*. Briefly, the nonsense mutation suppressor strain *E. coli* supF was transformed with a pGEM-T Easy plasmid construct with a fragment of T4 phage gene *24* with nonsense codons (Table 2). The recombination culture was then performed, where *E. coli* supF transformed with the construct was infected with the phage to allow for homologous recombination between the plasmid and the phage genome. The resulting phage lysate was filtered through a 0.22 μm syringe filter and plated on double-layer agar with *E. coli* supF as a host; from this step on, non-transformed *E. coli* supF strain was used. Single plaques were then transferred to corresponding sections of double-layer agar plates with either *E. coli* B or *E. coli* supF. Plates were incubated overnight and analyzed to identify sections where lysis was observed on the nonsense suppressor strain *E. coli* supF, but not on *E. coli* B. Phage isolates collected from such sections were propagated on *E. coli* supF (37°C, 8 h, vigorous shaking), lysates were filtered through 0.22 μm syringe filters and nonsense mutations in gene *24* were confirmed with direct sequencing (Genomed S.A., Poland). Confirmed gp24-deficient isolates were plated on double-layer agar plates with *E. coli* B as a host to provide selection for spontaneous bypass mutations in gene *23*. Single plaques were isolated and

propagated on *E. coli* B (37°C, 8 h, vigorous shaking) and the lysates were filtered through 0.22 µm syringe filters. Reverse mutations of gene 24 were ruled out by direct sequencing of gene 24, and gene 23 was sequenced (Genomed S.A., Poland) to identify bypass mutations.

Table 2. Fragments of nucleotide sequences of wild-type (wt) T4 phage genes 24, *hoc* and *soc* and their mutated variants with nonsense (*) mutations, either spontaneous (Δ Hoc) or introduced into phage genomes by site-directed mutagenesis (Δ gp24 and Δ Soc), and corresponding changes in the amino acid sequence of the protein products.

gp24											
T4 strain	Nucleotide and amino acid position	Sequence ^a									
wt	289	AAA	GGC	GAT	TTA	TTC	AAA	TAT	AAT	AAT	
	97	K	G	D	L	F	K	Y	N	N	
Δ gp24	289	AAA	<u>TAG</u>	GAT	TTA	TTC	AAA	<u>TAG</u>	AAT	AAT	
	97	K	*	D	L	F	K	*			
Hoc											
T4 strain	Nucleotide and amino acid position	Sequence ^a									
wt	481	ATT	AAA	TGC	GTA	GCC	CAA	GTA	ACC	GCG	
	161	I	K	C	V	A	Q	V	T	A	
Δ Hoc	481	ATT	AAA	TGC	GTA	GCC	<u>TAA</u>	GTA	ACC	GCG	
	161	I	K	C	V	A	*				
Soc											
T4 strain	Nucleotide and amino acid position	Sequence ^a									
wt	1	ATG	GCT	AGT	ACT	CGC	GGT				
	1	M	A	S	T	R	G				
Δ Soc	1	ATG	GCT	<u>TAG</u>	ATA	<u>GAG</u>	<u>TAG</u>				
	1	M	A	*	I	E	*				

^a boldfacing indicates changes in the nucleotide sequence, the resulting STOP codons are underlined.

— Soc-deficient phages

pMA plasmid construct bearing a fragment of the T4 phage *soc* gene with nonsense codons at the beginning of the gene (Table 2) was synthesized *de novo* in GeneArt (Thermo Fisher Scientific) and

used for the transformation of *E. coli* DH5 α chemocompetent cells. The recombination culture was then performed, where *E. coli* DH5 α transformed with the construct was infected with the phage to allow for homologous recombination between the plasmid and the phage genome. The resulting phage lysate was filtered through a 0.22 μ m syringe filter and plated on double-layer agar with *E. coli* B as a host. Single plaques were isolated and suspended in sterile PBS. Unlike gp24, Soc is a nonessential protein; therefore a selection method based on a nonsense suppressor and a wild-type host strain described above could not be applied to identify the mutants. A PCR-based approach was used instead – for each isolate two reactions were run in parallel: one with a primer complementary to wild-type *soc* (5'-GAAAACCTGTATTTTCAGGGCAGCAGCAGCATGGCTAGTACTCGCGG-3'), and the other to *soc* with the mutations (5'-AATTACATGGCTTAGATAGAGTAG-3') and a common reverse primer (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAACCAGTTACTTTCCAC-3'). An example result is presented in Supplemental Figure S1 (Supplemental Materials). The results were confirmed with direct sequencing (Genomed S.A., Poland). Mutants were propagated on *E. coli* B (37°C, 8 h, vigorous shaking) and the lysates were filtered through 0.22 μ m syringe filters.

Bacteriophage preparations

All phages were propagated on *E. coli* B. To prepare crude phage lysates, nutrient broth was inoculated with a 3-hour bacterial host culture and phages. Flasks were incubated at 37°C with vigorous shaking for 8-10 h, and then transferred to 4°C for 2 days to clarify. Phage lysates were then centrifuged at 8000 rpm; the supernatants were filtered through 0.22 μ m Millipore membrane filters (Merck Millipore) and purified using size exclusion chromatography on Sepharose 4B (Sigma-Aldrich) as described previously (47). Phage titers in lysates and purified preparations were determined using serial dilutions and spot plating.

Phage protein composition verification in ELISA

MaxiSorp flat-bottom 96-well plates (Nunc, Thermo Scientific) were coated with purified phage preparations, 5×10^9 pfu/ml, overnight. For the detection of Soc, phage preparations were incubated at 80°C for 30 minutes prior to the coating to disrupt the structure of the capsid and make Soc available for interactions with Soc-specific antibodies. For all the other proteins, intact, non-temperature-treated phage preparations were used. Plates were then washed 5 times with PBS and blocked with 5-fold diluted SuperBlock Blocking Buffer (Thermo Scientific) at room temperature (RT) for 45 minutes. Blocking solution was then removed and plates were washed 5 times with PBS with 0.05% Tween 20. Protein-specific mice plasma (anti-gp23, anti-gp24, anti-Hoc, anti-Soc, and anti-albumin as a negative control) diluted (200-fold, except for anti-Soc, which was diluted 100-fold) in PBS were then added to wells at 100 μ l per well and the plates were incubated at 37°C for 2 h. Each phage/plasma combination was investigated in duplicate. Subsequently, plates were again washed 5 times with PBS with 0.05% Tween 20 and 100 μ l of horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson

ImmunoResearch Laboratories) was added to wells and incubated for 1 h at RT in the dark. The antibody solution was then removed and the plates were washed 5 times with PBS with 0.05% Tween 20. TMB (50 μ l/well) was used as a peroxidase substrate according to the manufacturer's instructions (R&D Systems) and incubated for 30 min. Finally, 25 μ l of 2N H₂SO₄ was added to stop the reaction and the absorbance was measured at 450 nm (main reading) and normalized by subtracting the background absorbance at 570 nm.

Electron microscopy

High titer phage suspensions for visualization of phage particles were obtained by ammonium acetate precipitation (48). Then, 50 μ l of phage preparations was deposited on nickel formvar/carbon coated transmission electron microscopy (TEM) grids (400-mesh) and incubated for 1 min. After the excess liquid was removed, the samples were stained with 0.5% uranyl acetate and observed with a Zeiss EM900 transmission electron microscope. General morphology of phage virions was examined and no significant differences were found (Supplemental Figure S2).

Temperature sensitivity

Purified phage preparations (10⁶ pfu/ml) were incubated in 0.9% NaCl (physiological saline, PS) at 22°C or 37°C for 2 h. To investigate the effect of Ca²⁺, purified phage preparations (10⁶ pfu/ml) were incubated in PS at 22°C or 37°C (control) or in PS supplemented with 5 mM or 20 mM CaCl₂ at 37°C for 24 h. Samples were then serially diluted and phage titers were determined using spot plating technique. Molar concentration of sodium ions in the PS used as a primary microenvironment for phage stability testing is ~150 mM, which had been previously indicated by Szermer-Olearnik et al. (49) as a high-ionic strength environment, preventing clustering of phage particles into aggregates.

Susceptibility to acidic and alkaline pH

Purified phage preparations (10⁶ pfu/ml) were incubated in physiological saline (PS) at neutral (pH 7) and either acidic (pH 3, 30 min) or alkaline pH (pH= 10.6, 1 h) at 37°C. Samples were then serially diluted and phage titers were determined using spot plating technique.

Susceptibility to bile

Purified phage preparations (10⁶ pfu/ml) were incubated in PS or 0.7% and 2% porcine bile extract (Sigma-Aldrich) in PS at 37°C or in PS at 22°C for 2 h. Samples were then serially diluted and phage titers were determined using spot plating technique.

Susceptibility to proteolytic activity of digestive enzymes

Purified phage preparations (10^6 pfu/ml) were incubated in PS pH 4 or PS pH 4 with 1 mg/ml of pepsin (from porcine gastric mucosa, Sigma Aldrich) at 37°C or in PS pH 4 at 22°C for 2 h.

Purified phage preparations (10^6 pfu/ml) were incubated in PS+20 mM CaCl₂ pH 8 or PS+20 mM CaCl₂ pH 8 supplemented with 2 mg/ml of trypsin (Sigma Aldrich) at 37°C or in PS+20 mM CaCl₂ pH 8 at 22°C for 2 h.

Purified phage preparations (10^6 pfu/ml) were incubated in PS+20 mM CaCl₂ pH 8 or PS+20 mM CaCl₂ pH 8 supplemented with 3 mg/ml of α -chymotrypsin (Sigma Aldrich) at 37°C or in PS+20 mM CaCl₂ pH 8 at 22°C for 6 h.

Samples were then serially diluted and phage titers were determined using spot plating technique.

Stability of phages under flow and pressure conditions

Phage lysates were processed with Sartorius Hollow Fiber (HF) 115 cm² cut-off 750 kDa cartridge with pressure lower than 0.68 Ba at RT. Buffer exchange from growth medium to PBS was done by processing material with 5 diavolumes of the buffer. Next, phage preparations were concentrated using the same HF system with the same pressure force reducing buffer volume from 300 ml to 40 ml. Three sets of samples were collected and titered on the same day: (i) lysates that was used as loading material for HF, (ii) phage preparations after buffer exchange, (iii) phage preparations after concentration. Each sample was titered in technical replicates, the experiment was repeated twice.

Phage proteins

Bacteriophage T4 head proteins gp23 and gp24 were produced in the *Escherichia coli* expression system and purified as described by Miernikiewicz et al. (36) with modifications.

Amino acid sequences of both proteins were identical to those in the mature T4 phage head – the proteins lacked 65 (gp23) or 10 (gp24) N-terminal amino acids that are cleaved by gp21 protease during capsid assembly. Genes coding for the proteins were cloned using Gateway technology into pDEST15 vector, allowing for expression of recombinant products with the N-terminal glutathione S-transferase (GST) affinity tag, and expressed in *E. coli* B834(DE3) F⁻ *ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm met* (DE3) (Novagen). Bacteria were grown in Luria-Bertani Broth (LB) high salt (10 g/L of NaCl) culture medium (Sigma-Aldrich) supplemented with appropriate antibiotics (ampicillin and chloramphenicol or ampicillin alone in the case of gp23 or gp24, respectively) at 37°C until OD₆₀₀ reached 0.8–1.0. To facilitate proper folding of gp23, the protein was coexpressed with T4 phage gp31 chaperone, which is a specific phage cochaperonin functionally replacing GroES in the groES/groEL chaperonin complex. The chaperone was expressed from pG31t vector, kindly supplied by prof. Andrey Letarov, Russian Academy of Sciences, Moscow. Expression of gp24 did not require additional chaperones. Expression

of the recombinant phage proteins was induced with 0.2 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Thermo Scientific) and conducted overnight at 25°C. Cultures were then centrifuged for 5 min at 8000 rpm and the supernatant was removed. Harvested bacteria were suspended in PBS, treated with PMSF (1 mM), and lysis was performed by incubation with lysozyme (0.5 or 1.5 mg/ml for gp24 or gp23, respectively) for 6–7 h on ice and by the freeze-thaw method (-80°C). The suspension was then supplemented with Mg²⁺ (up to 1 mM), DNase (20 μ g/ml) and RNase (40 μ g/ml), and incubated on ice for 3 h. Fractions were separated by two centrifugations (12 000 rpm, 45 min, 4°C). The soluble fraction was filtered through 0.45 μ m PVDF filters and incubated with glutathione sorbent slurry (Glutathione Sepharose 4B, GE Healthcare Life Sciences), washed with PBS, and proteins were released by proteolysis with MobiTev Protease1 (10 U/mL) (MoBiTec GmbH, Germany) at 10°C; GST tags remained bound in the resin. LPS removal from all protein preparations was done with EndoTrap HD (Hyglos GmbH, Germany). Gel filtration FPLC (fast protein liquid chromatography) on a Superdex 75 10/300 GL column (GE Healthcare Life Sciences, Poland) was applied for final separation and proteins were dialyzed against PBS and filtered through 0.22 μ m PVDF filters (Merck Millipore, Germany). Proteins were assessed by SDS-PAGE and concentrations were determined using the Bradford Assay (Thermo Scientific, USA). Proteins were also run on native PAGE to confirm oligomers formation.

To obtain gp23 variants with single amino acid substitutions corresponding to bypass-24 mutations in the investigated T4 phage mutants (N381S or N384S), mutations were introduced to the pDEST15 plasmid construct bearing wild-type gp23 coding sequence (36) in a PCR reaction with mutagenizing forward primers 5'-CTTCCCGTAGCGTAGTTAACGTT-3' (gp23-N381S) or 5'-CTTCCCGTAACGTTAGCGTTCTGGCTT-3' (gp23-N384S) and the 5'-phosphorylated reverse primer 5'-CGATAATGAAGTTACCTTCACCACGA-3'. The reaction was carried out as follows: initial denaturation at 98°C – 30 s, 35 cycles of 98°C – 10 s, 64°C – 20 s, 72°C – 4 min, followed by final elongation at 72°C – 10 min; and products were then subjected to ligation with Liga5 ligase (A&A Biotechnology) at RT for 30 min. Resulting ligated plasmids were purified using a Clean-up kit (A&A Biotechnology) and used for the transformation of chemocompetent *E. coli* DH5 α cells. Once the correct nucleotide sequence of the plasmids was confirmed by direct sequencing (Genomed S.A., Poland), the plasmids were used along with the pG31t vector construct bearing the gp31 chaperone for the cotransformation of *E. coli* B834 and protein production and purification was carried out as described above for the wild-type gp23.

Immunological purity grade protein preparations used to obtain highly responsive protein-specific plasma were produced as optimized by Miernikiewicz et al. (36, 50). Immunization of mice was performed as described by Dąbrowska et al. (51).

Circular dichroism (CD)

Stability of gp24, gp23 and two gp23 bypass variants – gp23-N381S and gp23-N384S – was studied by circular dichroism. CD spectra were recorded on a J-1500 spectropolarimeter (Jasco, Japan) equipped with a thermostated cell holder and PM-539 detector. The results were expressed as mean residue ellipticity (θ) in $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ assuming a mean residue weight of 106.8 Da or 109.9 Da per amino acid residue for gp23 and gp23 mutants or gp24, respectively. Spectra were accumulated three to six times. All values were corrected for solvent contributions (PBS). Data pitch, bandwidth, and digital integration time were 1 nm, 2 nm, and 1 s, respectively, at 100 nm min^{-1} . For thermal scans, the protein samples were heated from 25 to 80°C (or 25 to 95°C for gp24) with a heating rate 1°C min^{-1} controlled by a Jasco programmable Peltier element. CD spectra were recorded at 25 and 80°C and the dichroic activity at 222 nm was continuously monitored every 1°C . The stability of the proteins was expressed in terms of T_m , the temperature at which the concentration of the protein in its folded state equals that in the unfolded state.

Data availability

The datasets supporting the conclusions of this article are available in the Open Science Framework (OSF) at https://osf.io/u7sj5/?view_only=ac226393badb48c7978e021b94896fd2.

Acknowledgments

This work was supported by the National Science Centre in Poland, grants 2017/25/N/NZ6/02372 and 2019/35/B/NZ7/01824.

References

1. Cao Z, Sugimura N, Burgermeister E, Ebert MP, Zuo T, Lan P. 2022. The gut virome: A new microbiome component in health and disease. *EBioMedicine* 81:104113.
2. Leiman PG, Kanamaru S, Mesyanzhinov VV, Arisaka F, Rossmann MG. 2003. Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cell Mol Life Sci* 60:2356–2370.
3. Fokine A, Chipman PR, Leiman PG, Mesyanzhinov V V., Rao VB, Rossmann MG. 2004. Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6003–6008.
4. McNicol L, Simon LD, Black LW. 1977. A mutation which bypasses the requirement for p24 in bacteriophage T4 capsid morphogenesis. *J Mol Biol* 116:261–283.
5. Johnson K, Condie B, Mooney DT, Doermann AH. 1992. Mutations that eliminate the requirement for the vertex protein in bacteriophage T4 capsid assembly. *J Mol Biol* 224:601–611.
6. Fokine A, Battisti AJ, Kostyuchenko VA, Black LW, Rossmann MG. 2006. Cryo-EM structure of a bacteriophage T4 gp24 bypass mutant: the evolution of pentameric vertex proteins in icosahedral viruses. *J Struct Biol* 154:255–259.
7. Rao VB, Black LW. 2010. Structure and assembly of bacteriophage T4 head. *Virology* 407:356.
8. Ishii T, Yanagida M. 1975. Molecular organization of the shell of the T-even bacteriophage head. *J Mol Biol* 97:655–660.
9. Iwasaki K, Trus BL, Wingfield PT, Cheng N, Campusano G, Rao VB, Steven AC. 2000. Molecular architecture of bacteriophage T4 capsid: vertex structure and bimodal binding of the stabilizing accessory protein. *Soc. Virology* 271:321–333.

10. Qin L, Fokine A, O'Donnell E, Rao VB, Rossmann MG. 2010. Structure of the Small Outer Capsid Protein, Soc: A Clamp for Stabilizing Capsids of T4-like Phages. *J Mol Biol* 395:728–741.
11. Ishii T, Yanagida M. 1977. The two dispensable structural proteins (soc and hoc) of the T4 phage capsid; their purification and properties, isolation and characterization of the defective mutants, and their binding with the defective heads *in vitro*. *J Mol Biol* 109:487–514.
12. Dąbrowska K, Świtłała-Jeleń K, Opolski A, Górski A. 2006. Possible association between phages, Hoc protein, and the immune system. *Arch Virol* 151:209–215.
13. Barr JJ, Auro R, Furlan M, Whiteson KL, Erb ML, Pogliano J, Stotland A, Wolkowicz R, Cutting AS, Doran KS, Salamon P, Youle M, Rohwer F. 2013. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:10771–10776.
14. Trojet SN, Caumont-Sarcos A, Perrody E, Comeau AM, Krisch HM. 2011. The gp38 Adhesins of the T4 Superfamily: A Complex Modular Determinant of the Phage's Host Specificity. *Genome Biol Evol* 3:674–686.
15. Attrill EL, Claydon R, Łapińska U, Recker M, Meaden S, Brown AT, Westra ER, Harding S V., Pagliara S. 2021. Individual bacteria in structured environments rely on phenotypic resistance to phage. *PLoS Biol* 19:e3001406.
16. Kortright KE, Chan BK, Turner PE. 2020. High-throughput discovery of phage receptors using transposon insertion sequencing of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117:18670–18679.
17. Mutalik VK, Adler BA, Rishi HS, Piya D, Zhong C, Koskella B, Kutter EM, Calendar R, Novichkov PS, Price MN, Deutschbauer AM, Arkin AP. 2020. High-throughput mapping of the phage resistance landscape in *E. coli*. *PLoS Biol* 18:e3000877.
18. Hu B, Margolin W, Molineux IJ, Liu J. 2015. Structural remodeling of bacteriophage T4 and host membranes during infection initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.
19. Gogokhia L, Buhrke K, Bell R, Hoffman B, Brown DG, Hanke-Gogokhia C, Ajami NJ, Wong MC, Ghazaryan A, Valentine JF, Porter N, Martens E, O'Connell R, Jacob V, Scherl E, Crawford C, Stephens WZ, Casjens SR, Longman RS, Round JL. 2019. Expansion of Bacteriophages Is Linked to Aggravated Intestinal Inflammation and Colitis. *Cell Host Microbe* 25:285-299.e8.
20. Sweere JM, Van Belleghem JD, Ishak H, Bach MS, Popescu M, Sunkari V, Kaber G, Manasherob R, Suh GA, Cao X, de Vries CR, Lam DN, Marshall PL, Birukova M, Katznelson E, Lazzareschi D V., Balaji S, Keswani SG, Hawn TR, Secor PR, Bollyky PL. 2019. Bacteriophage trigger antiviral immunity and prevent clearance of bacterial infection. *Science* 363:eaat9691.
21. Hodyra-Stefaniak K, Miernikiewicz P, Drapała J, Drab M, Jonczyk-Matysiak E, Lecion D, Kazmierczak Z, Beta W, Majewska J, Harhala M, Bubak B, Kłopot A, Górski A, Dabrowska K. 2015. Mammalian Host-Versus-Phage immune response determines phage fate *in vivo*. *Sci Rep* 5:14802.
22. Nishikawa H, Yasuda M, Uchiyama J, Rashel M, Maeda Y, Takemura I, Sugihara S, Ujihara T, Shimizu Y, Shuin T, Matsuzaki S. 2008. T-even-related bacteriophages as candidates for treatment of *Escherichia coli* urinary tract infections. *Arch Virol* 153:507–515.
23. Bourdin G, Schmitt B, Marvin Guy L, Germond J-E, Zuber S, Michot L, Reuteler G, Brüssow H. 2014. Amplification and Purification of T4-Like *Escherichia coli* Phages for Phage Therapy: from Laboratory to Pilot Scale. *Appl Environ Microbiol* 80:1469–1476.
24. Sarker SA, Berger B, Deng Y, Kieser S, Foata F, Moine D, Descombes P, Sultana S, Huq S, Bardhan PK, Vuillet V, Praplan F, Brüssow H. 2017. Oral application of *Escherichia coli* bacteriophage: safety tests in healthy and diarrheal children from Bangladesh. *Environ Microbiol* 19:237–250.
25. Zhu J, Batra H, Ananthaswamy N, Mahalingam M, Tao P, Wu X, Guo W, Fokine A, Rao VB. 2023. Design of bacteriophage T4-based artificial viral vectors for human genome remodeling. *Nat Commun* 14:2928.
26. Zhu J, Tao P, Mahalingam M, Sha J, Kilgore P, Chopra AK, Rao V. 2019. A prokaryotic-eukaryotic hybrid viral vector for delivery of large cargos of genes and proteins into human cells. *Sci Adv* 5.
27. Dabrowska K, Zembala M, Boratynski J, Switłała-Jelen K, Wietrzyk J, Opolski A, Szczauńska K, Kujawa M, Godlewska J, Gorski A. 2007. Hoc protein regulates the biological effects of T4 phage in mammals. *Arch Microbiol* 187:489–498.
28. Khanorkar S. 2012. *Insights in Physiology*. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.
29. Comeau AM, Krisch HM. 2008. The capsid of the T4 phage superfamily: the evolution, diversity, and structure of some of the most prevalent proteins in the biosphere. *Mol Biol Evol* 25:1321–1332.
30. Rao VB, Fokine A, Fang Q, Shao Q. 2023. Bacteriophage T4 Head: Structure, Assembly, and Genome Packaging. *Viruses* 15:527.

31. Fang Q, Tang W-C, Fokine A, Mahalingam M, Shao Q, Rossmann MG, Rao VB. 2022. Structures of a large prolate virus capsid in unexpanded and expanded states generate insights into the icosahedral virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119:e2203272119.
32. Steven AC, Greenstone HL, Booy FP, Black LW, Ross PD. 1992. Conformational changes of a viral capsid protein. *J Mol Biol* 228:870–884.
33. He H, Li Y, Wang S, Ma Q, Pan Y. 2020. A High Precision Method for Calcium Determination in Seawater Using Ion Chromatography. *Front Mar Sci* 7.
34. Weyhenmeyer GA, Hartmann J, Hessen DO, Kopáček J, Hejzlar J, Jacquet S, Hamilton SK, Verburg P, Leach TH, Schmid M, Flaim G, Nöges T, Nöges P, Wentzky VC, Rogora M, Rusak JA, Kosten S, Paterson AM, Teubner K, Higgins SN, Lawrence G, Kangur K, Kokorite I, Cerasino L, Funk C, Harvey R, Moatar F, de Wit HA, Zechmeister T. 2019. Widespread diminishing anthropogenic effects on calcium in freshwaters. *Sci Rep* 9:10450.
35. González-Fontes A, Navarro-Gochicoa MT, Ceacero CJ, Herrera-Rodríguez MB, Camacho-Cristóbal JJ, Rexach J. 2017. Understanding calcium transport and signaling, and its use efficiency in vascular plants, p. 165–180. *In Plant Macronutrient Use Efficiency*. Elsevier.
36. Miernikiewicz P, Owczarek B, Piotrowicz A, Boczkowska B, Rzewucka K, Figura G, Letarov A, Kulikov E, Kopciuch A, Świtła-Jeleń K, Oślizło A, Hodyra K, Gubernator J, Dabrowska K. 2012. Recombinant expression and purification of T4 phage Hoc, soc, gp23, gp24 proteins in native conformations with stability studies. *PLoS One* 7:e38902.
37. Northrop JH. 1964. The effect of proteolytic enzymes on *E. coli* phages and on native proteins. *J Gen Physiol* 48:73–78.
38. Dini C, Islan GA, de Urza PJ, Castro GR. 2012. Novel Biopolymer Matrices for Microencapsulation of Phages: Enhanced Protection Against Acidity and Protease Activity. *Macromol Biosci* 12:1200–1208.
39. Vajda T, Szabó T. 1976. Specificity of trypsin and alpha-chymotrypsin towards neutral substrates. *Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung* 11:287–94.
40. Sweeney PJ, Walker JM. 1993. Proteolytic Enzymes for Peptide Production, p. 277–303. *In Burrell MM (ed.), Methods in Molecular Biology, Vol 16: Enzymes of Molecular Biology*. Humana Press, New Jersey.
41. Hamuro Y, Coales SJ, Molnar KS, Tuske SJ, Morrow JA. 2008. Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22:1041–1046.
42. Zhang L, Wang P, Wang C, Wu Y, Feng X, Huang H, Ren L, Liu B-F, Gao S, Liu X. 2019. Bacteriophage T4 capsid as a nanocarrier for Peptide-N-Glycosidase F immobilization through self-assembly. *Sci Rep* 9:4865.
43. Tao P, Mahalingam M, Marasa BS, Zhang Z, Chopra AK, Rao VB. 2013. *In vitro* and *in vivo* delivery of genes and proteins using the bacteriophage T4 DNA packaging machine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:5846–5851.
44. Barr JJ, Auro R, Sam-Soon N, Kassegne S, Peters G, Bonilla N, Hatay M, Mourtada S, Bailey B, Youle M, Felts B, Baljon A, Nulton J, Salamon P, Rohwer F. 2015. Subdiffusive motion of bacteriophage in mucosal surfaces increases the frequency of bacterial encounters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:13675–13680.
45. Winfield MD, Groisman EA. 2003. Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of Salmonella and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 69:3687–3694.
46. Jang J, Hur H-G, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. 2017. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *J Appl Microbiol* 123:570–581.
47. Boratyński J, Syper D, Weber-Dąbrowska B, Łusiak-Szelachowska M, Poźniak G, Górski A. 2004. Preparation of endotoxin-free bacteriophages. *Cell Mol Biol Lett* 9:253–259.
48. Ackermann HW. 2009. Phage classification and characterization. *Methods Mol Biol* 501:127–140.
49. Szermer-Olearnik B, Drab M, Mąkosa M, Zembala M, Barbasz J, Dąbrowska K, Boratyński J. 2017. Aggregation/dispersion transitions of T4 phage triggered by environmental ion availability. *J Nanobiotechnology* 15:32.
50. Miernikiewicz P, Dabrowska K, Piotrowicz A, Owczarek B, Wojas-Turek J, Kicielińska J, Rossowska J, Pajtasz-Piasecka E, Hodyra K, Macegoniuk K, Rzewucka K, Kopciuch A, Majka T, Letarov A, Kulikov E, Maciejewski H, Górski A. 2013. T4 phage and its head surface proteins do not stimulate inflammatory mediator production. *PLoS One* 8:e71036.
51. Dąbrowska K, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Hodyra K, Owczarek B, Lecion D, Kaźmierczak Z, Letarov A, Gorski A. 2014. Immunogenicity Studies of Proteins Forming the T4 Phage Head Surface. *J Virol* 88:12551–12557.

Supplemental Materials for

Evolution of the T4 phage virion is driven by selection pressure from non-bacterial factors

Joanna Majewska[#], Paulina Miernikiewicz, Aleksander Szymczak, Zuzanna Kaźmierczak, Tomasz M. Goszczyński, Barbara Owczarek, Izabela Rybicka, Jarosław Ciekot, Krystyna Dąbrowska[#]

[#] Corresponding authors: Joanna Majewska, joanna.majewska@hirszfeld.pl
Krystyna Dąbrowska, dabrowska@hirszfeld.pl

Supplemental Materials

Table S1. Melting temperatures and changes in enthalpy and entropy of recombinant T4 head proteins: major capsid protein gp23 and its two mutants with a single amino acid substitution N381S or N384S, and head vertex protein gp24 assessed by circular dichroism (CD).

Protein	T _m (°C)	ΔH (J mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
gp23	66.1	539520	1590.5
gp23-N381S	64.5	665255	1970
gp23-N384S	66.6	535559	1576
gp24	>95	---	---

Table S2. The effect of pepsin on bacteriophage T4 and its mutants. Purified phage preparations (N=6), 10⁶ pfu/ml, were incubated in PS (physiological saline) pH 4 or PS pH 4 with pepsin (1 mg/ml) at 37°C or in PS pH 4 at 22°C for 2 h. Phage titers were determined using spot plating. Titer decrease was calculated for the pepsin-treated group with respect to the two non-treated groups.

Bacteriophage	Phage titer			Titer decrease [%]	
	A pH 4, 22 °C	B pH 4, 37 °C	C pH 4, pepsin (1mg/ml), 37 °C	(C/A)	(C/B)
T4	7.17E + 05 (± 1.37E + 05)	6.30E + 05 (± 8.83E + 04)	6.53E + 05 (± 1.69E + 05)	9%	-4%
T4ΔHoc	8.20E + 05 (± 8.67E + 04)	6.13E + 05 (± 1.20E + 05)	7.53E + 05 (± 1.28E + 05)	8%	-23%
T4ΔSoc	1.26E + 06 (± 2.42E + 05)	8.70E + 05 (± 1.40E + 05)	8.80E + 05 (± 1.54E + 05)	30%	-1%
T4Δ24byp24_1	1.09E + 06 (± 1.12E + 05)	3.12E + 05 (± 4.24E + 04)	1.57E + 05 (± 2.11E + 04)	86%	50%
T4Δ24byp24_2	9.50E + 05 (± 3.73E + 05)	3.36E + 05 (± 3.40E + 04)	2.09E + 05 (± 2.50E + 04)	78%	38%
T4ΔHocΔSoc	8.70E + 05 (± 1.92E + 05)	5.97E + 05 (± 8.14E + 04)	7.00E + 05 (± 8.29E + 04)	20%	-17%
T4ΔHocΔ24byp24	7.10E + 05 (± 1.20E + 05)	1.18E + 05 (± 2.92E + 04)	5.33E + 04 (± 1.65E + 04)	92%	55%
T4ΔSocΔ24byp24	8.37E + 05 (± 6.74E + 04)	1.93E + 04 (± 2.24E + 03)	8.27E + 03 (± 1.76E + 03)	99%	57%
T4ΔHocΔSocΔ24byp24	9.57E + 05 (± 1.1E + 05)	3.00E + 04 (± 1.35E + 03)	1.04E + 04 (± 2.60E + 03)	99%	65%

Table S3. Stability of bacteriophage T4 and its mutants under flow and pressure conditions in the process of purification and concentration of phage preparations using the Hollow Fiber system. Phage lysates were subjected to buffer exchange to PBS and subsequent reduction of buffer volume. Samples were collected throughout the process and phage recovery was calculated. The results of two independent experiments are presented.

Bacteriophage		Total number of phage particles		Total phage recovery [%]
		Lysate	Purified phage preparation	
T4	1	5.85E + 13	4.30E + 13	73.5%
	2	5.25E + 13	4.20E + 13	80.0%
	Average			76.8%
T4ΔHoc	1	6.93E + 13	4.10E + 13	59.2%
	2	5.04E + 13	4.00E + 13	79.4%
	Average			69.3%
T4ΔSoc	1	5.55E + 13	2.90E + 13	52.3%
	2	3.57E + 13	2.10E + 13	58.8%
	Average			55.5%
T4Δ24byps24_1	1	4.11E + 13	3.00E + 13	73.0%
	2	3.69E + 13	2.20E + 13	59.6%
	Average			66.3%
T4ΔHocΔSoc	1	6.75E + 13	5.30E + 13	78.5%
	2	4.08E + 13	3.30E + 13	80.9%
	Average			79.7%
T4ΔHocΔ24byp24	1	2.13E + 13	7.60E + 11	3.6%
	2	4.02E + 13	4.30E + 12	10.7%
	Average			7.1%
T4ΔSocΔ24byp24	1	3.18E + 13	2.40E + 13	75.5%
	2	1.41E + 13	1.35E + 13	95.7%
	Average			85.6%
T4ΔHocΔSocΔ24byp24	1	1.08E + 13	5.25E + 11	4.9%
	2	1.11E + 13	7.20E + 11	6.5%
	Average			5.7%

PCR-based method for the detection of nonsense mutations introduced to *soc* gene and identification of mutants in the overall phage progeny

With Soc being a nonessential protein, identification of mutants bearing nonsense mutations within the *soc* gene in the overall phage progeny following the recombination culture could not be based on differential propagation on nonsense suppressor and wild-type host strains. Therefore, a PCR-based method was applied to differentiate between wild-type and mutated *soc*. Single plaques were isolated and each isolate was used as a template for parallel PCR reactions with a set of primers specific for either the wild-type or modified *soc* region. Exemplary results of such screening are shown in Figure S1.

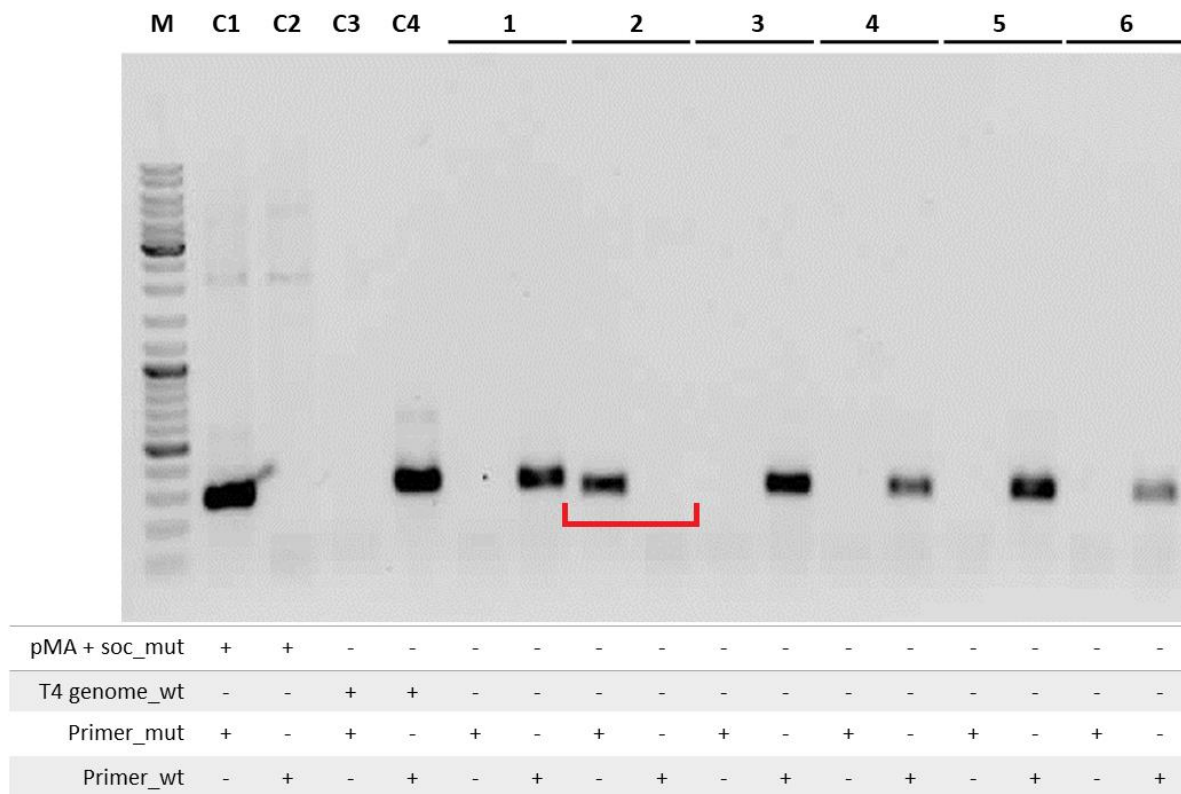


Figure S1. Identification of *soc*-deficient mutants by PCR with two sets of primers specific to wild-type or modified *soc* visualized by electrophoresis. M – DNA mass marker; C1-C4 – controls; 1-6 – isolates. Band profile identifies isolate 2 as a Soc-deficient phage (red). Approximately 800 clones were tested in total; exemplary agarose gel including one positive sample is presented.

Morphology assessment using transmission electron microscopy (TEM)

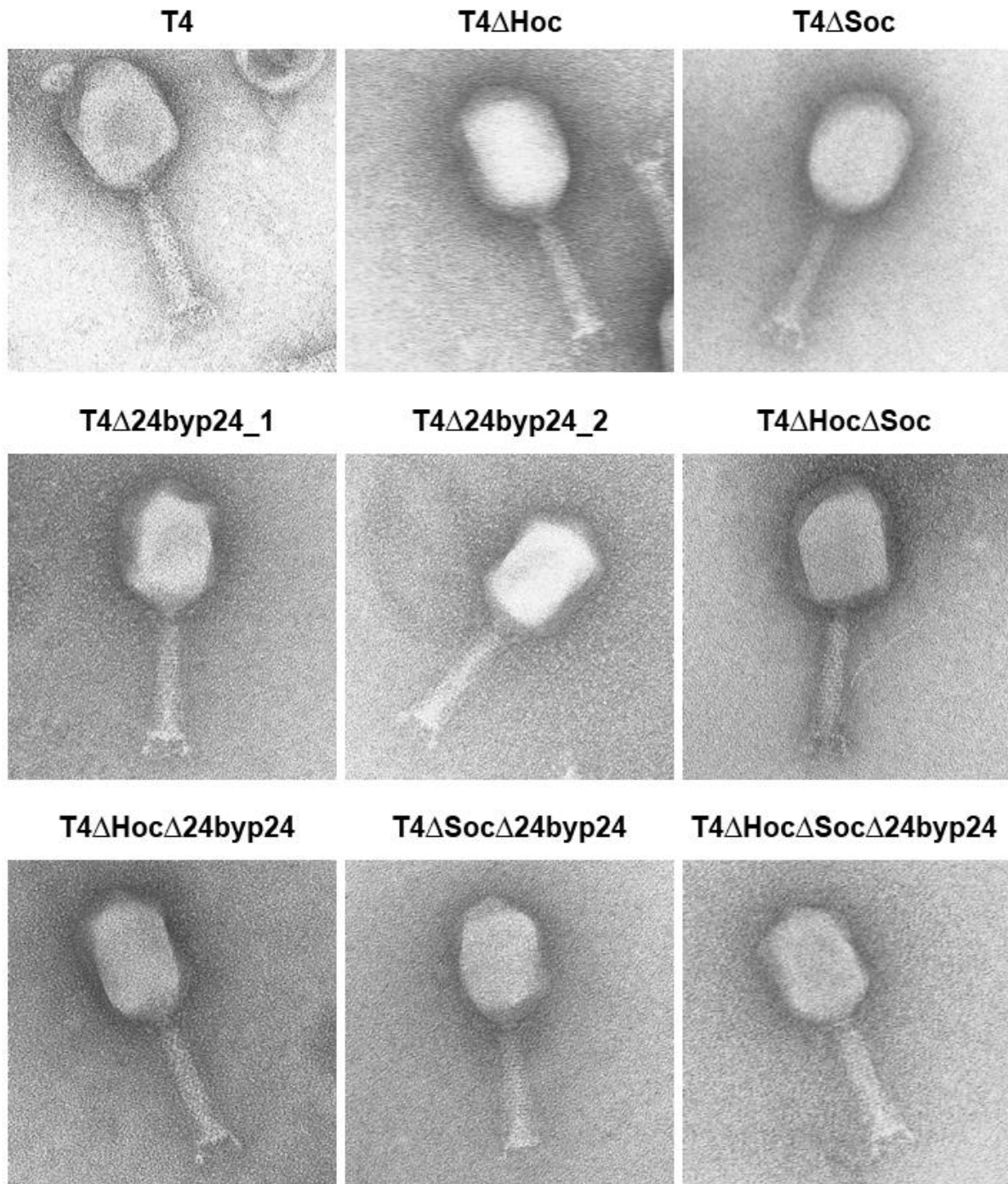


Figure S2. Bacteriophage T4 and its mutants visualized under a transmission electron microscope. Phage morphology is consistent with previous reports; Fokine et al. (1) observed in cryo-electron microscopy that electron micrographs of a gp24byp mutant phage contained only particles with a normal head length.

Protein composition of the head verified in ELISA

Anti-gp23, anti-gp24, anti-Hoc and anti-Soc protein-specific reference plasma samples collected from mice immunized with these proteins were used in ELISA to verify the capsid composition of the mutants and confirm that the mutations introduced to phage genomes indeed conferred the desired phenotypes. Albumin-specific plasma served as a negative control.

ELISA results (Figure S3) confirmed that the head protein composition of each phage was correct: wild-type bacteriophage T4 was shown to have all four head proteins, i.e. gp23, gp24, Hoc and Soc, while the mutants lacked one, two or three of them. All phages tested positive for the presence of major capsid protein gp23, which cannot be eliminated from the capsid. Presence of gene 23 gp24-bypass mutations and accompanying mutations confirmed in the genome of gp24-deficient mutants did not interfere with gp23 recognition by the gp23-specific polyclonal antibodies in the reference plasma.

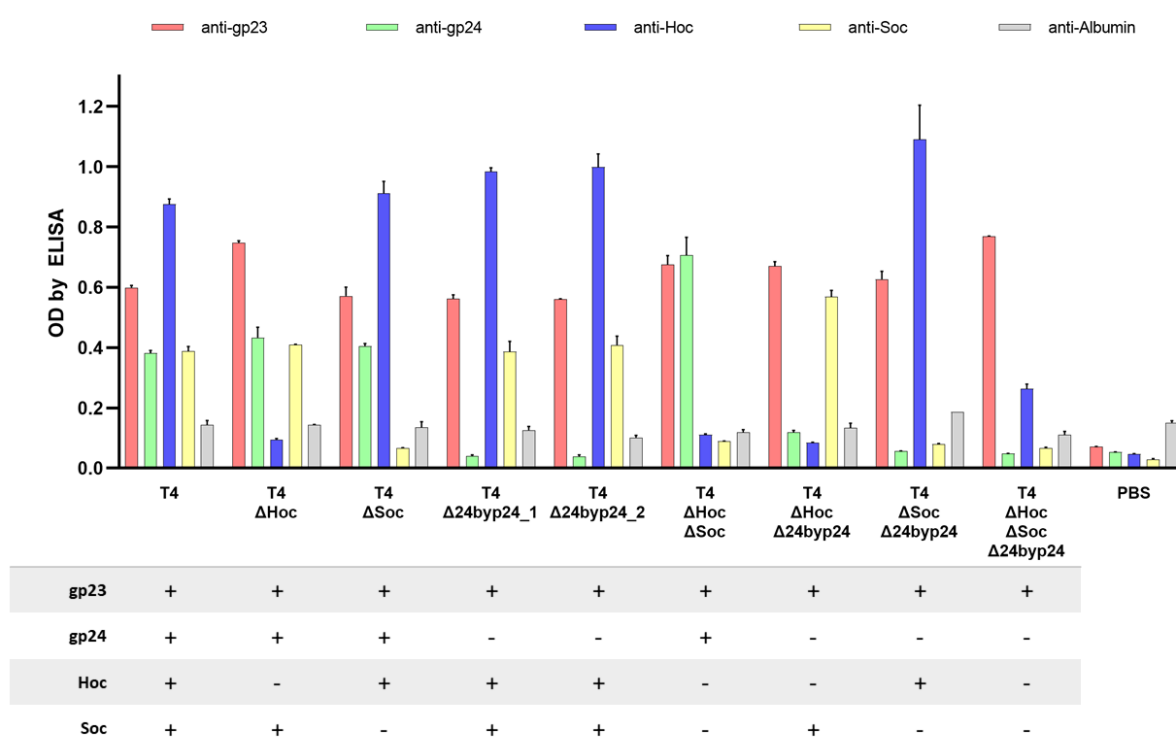


Figure S3. Protein composition of the capsid head of T4 phage and its mutants verified in ELISA with protein-specific plasma samples. Plates were coated with bacteriophage preparations, 5×10^9 pfu/ml (in the case of Soc protein, phage preparations were incubated at 80°C for 30 min prior to coating), and the presence of gp23, gp24, Hoc and Soc in the virions was detected with protein-specific plasma samples obtained from mice immunized with these proteins. Anti-albumin plasma and PBS-coated wells served as negative controls to exclude non-specific interactions.

Presence of calcium ions improves phage stability when incubated at 37°C

Detrimental effect of incubation at the temperature of 37°C on gp24- and Soc-deficient phages (Fig. 2) can be counteracted by the introduction of 20 mM Ca²⁺ ions to the phage’s microenvironment (Fig. S4). This protective effect of Ca²⁺ ions is however also applicable to the wild-type T4; thus it remains unclear whether Ca²⁺ has any specific effect on the mutants or protection is rather a general feature of T4 phage. The effect was most noticeable after at least 24 hours of phage exposure (Fig. S4). Physiological saline (0.9% NaCl solution), which was used as the primary environment in this experiment, has a molar concentration of ~150 mM. Such concentration of sodium ions – well above the ionic strength threshold of 20 mM – had been previously indicated by Szermer-Olearnik et al. (2) as a high-ionic strength environment, preventing clustering of phage particles into aggregates. Moreover, aggregates formed under lower-ionic strength were demonstrated to rapidly destabilize and disperse into single phage virions once ionic strength was increased to 150 mM NaCl. Therefore, the differences in phage titers presented in Fig. S4 are unlikely to result from the further increase of ionic strength caused by the addition of calcium ions to the solution.

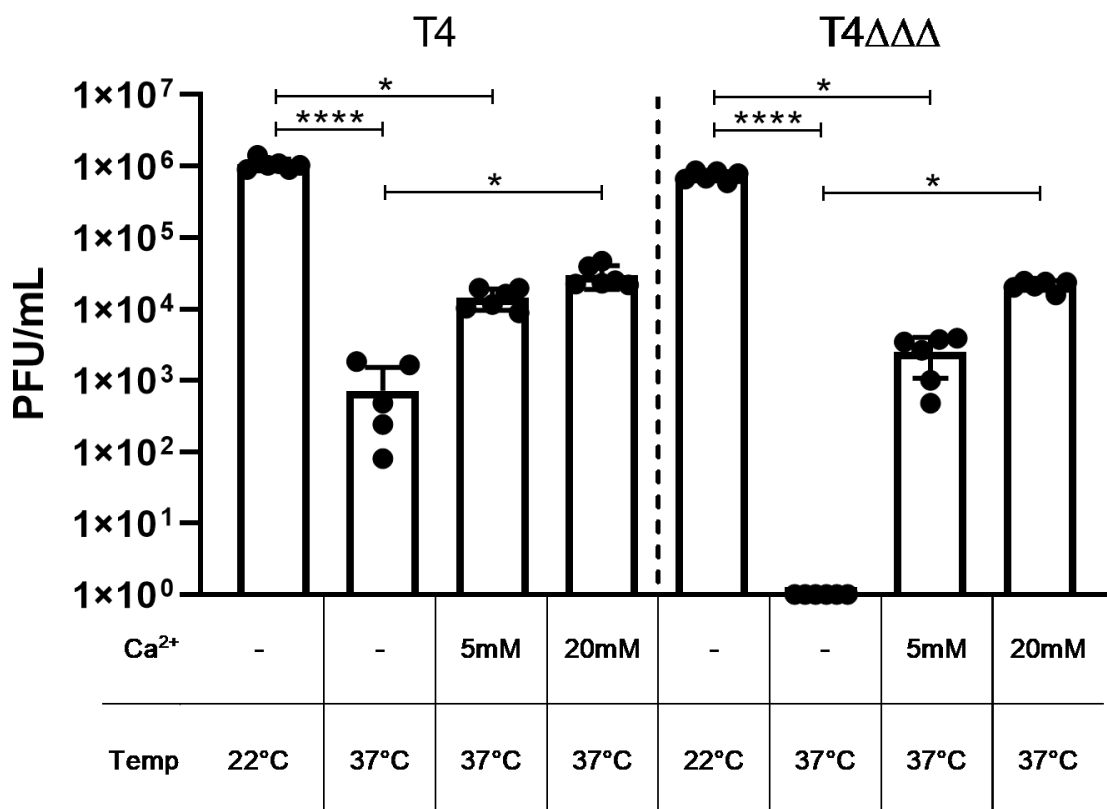


Figure S4. The effect of Ca²⁺ ions on the temperature sensitivity of T4 phage and its mutant T4ΔHocΔSocΔ24byp24 (T4ΔΔΔ). Phages (N=6), 10⁶ pfu/ml, were incubated in PS at 22°C (control) or 37°C or in PS supplemented with CaCl₂ (5 mM or 20 mM) at 37°C for 24 h. Phage titers were determined using spot plating. * p < 0.02; **** p < 0.0001 (Kruskal-Wallis’s t test, Dunn’s multiple comparisons test).

References

1. Fokine A, Battisti AJ, Kostyuchenko VA, Black LW, Rossmann MG. 2006. Cryo-EM structure of a bacteriophage T4 gp24 bypass mutant: the evolution of pentameric vertex proteins in icosahedral viruses. *J Struct Biol* 154:255–259.
2. Szermer-Olearnik B, Drab M, Mąkosa M, Zembala M, Barbasz J, Dąbrowska K, Boratyński J. 2017. Aggregation/dispersion transitions of T4 phage triggered by environmental ion availability. *J Nanobiotechnology* 15:32.

Conclusions

- Bacteriophages administered orally over a long period of time can induce an anti-phage humoral response, as demonstrated by the production of phage-specific IgM, IgG, and IgA antibodies in the blood and phage-specific secretory IgA antibodies in the gut. However, given the relatively large dose of phage preparations necessary to elicit the response, it appears that—in the model of oral administration—phage particles have limited immunogenicity.
- The onset of phage-specific IgG antibody production is observed sooner than the secretion of phage-specific IgA antibodies. Moreover, after the termination of the phage treatment, the phage-specific IgG level remains high, while the level of phage-specific IgA decreases gradually to insignificant values. The second administration of phage preparations results in a more rapid increase in phage-specific IgA.
- Importantly, the secretion of phage-specific IgA antibodies in the gut is the major factor limiting the passage of active phage particles through the gastrointestinal (GI) tract. The selection of phage-resistant bacteria in the gut microbiota is much less important.
- These observations seem to be universal, at least when it comes to phages of an overall similar morphology (myovirus morphotype).
- Phage structural proteins differ significantly in their contribution to the overall phage immunogenicity in the oral immunization model, and no general pattern was observed.
- The complex protein composition of the T4 phage capsid contributes to the overall phage fitness in diverse environmental conditions, including those related to the animal GI tract – the more ‘primitive’ capsid structure ($\Delta 24\text{byp}24$) lacking the specialized head vertex protein gp24 is significantly less stable at low pH and more sensitive to inactivation by proteolytic digestive enzymes.
- In general, gp24 seems to play the key role in the T4 phage withstanding environmental conditions, and Soc trimers act as molecular glue, enhancing the protective effect.
- It is likely that the specific microenvironment of the gastrointestinal tract may have, at least to some extent, shaped the evolution of the protein composition and structure of the T4 phage capsid.