

**„Konstrukcja nowego systemu prezentowania białek/peptydów na powierzchni termofilnego bakteriofaga TP-84”  
mgr Weronika Jaroszewicz**

Systemy prezentowania białek/peptydów lub innych cząsteczek na powierzchni bakteriofaga bazują na fuzji sekwencji obcych polipeptydów z N- lub C-terminalnym końcem białka strukturalnego bakteriofaga, dzięki czemu docelowe peptydy/białka eksponowane są na zewnątrz wirionu. Technologia ta została opracowana ponad 30 lat temu, a jej twórcy otrzymali Nagrodę Nobla za „prezentację peptydów oraz przeciwciał na powierzchni faga”. W ostatnich latach zaobserwować można intensywny rozwój technik związanych z fagowym prezentowaniem białek/peptydów, jednak wszystkie dotychczas skonstruowane systemy bazują na bakteriofagach infekujących bakterie mezofilne, o optymalnych warunkach wzrostu od 30°C do 39°C. Niesie to za sobą pewne ograniczenia, takie jak problemy z produkcją i prezentacją hydrofobowych peptydów na powierzchni fagów lub tworzenie się agregatów rekombinowanych białek. Termostabilny system prezentowania peptydów/białek, oparty na bakteriofagu termofilnym, mógłby być rozwiązaniem tych problemów.

Głównym celem niniejszej pracy było skonstruowanie systemu prezentowania białek/peptydów na powierzchni bakteriofaga TP-84, infekującego Gram-pozytywną bakterię *Geobacillus stearothermophilus*. Pierwszym etapem badań prowadzących do otrzymania funkcjonalnego systemu było utworzenie trzech zestawów bibliotek genowych faga TP-84. Wybrano sześć genów, które potencjalnie mogły zostać użyte w nowym systemie prezentacji białek/peptydów, z czego trzy geny kodujące białka kapsydowe, jeden gen kodujący białko dystalne ogonka oraz dwa geny kodujące inne białka strukturalne TP-84. Następnie geny te wstawiano do plazmidu pUC19 w formie natywnej lub w formie fuzyjnej, z dołączoną sekwencją kodującą znaczniki molekularne 6xHis lub 3xFLAG, wraz z 9-nukleotydowym linkerem. Początkowo uzyskano trzy wersje bibliotek dla pięciu genów TP-84. Gen 8 bakteriofaga TP-84, kodujący dodatkowe białko kapsydu, udało się wstawić do wektora plazmidowego dopiero po opracowaniu tandemowej metody klonowania.

Drugim etapem badań było klonowanie całego genomu bakteriofaga TP-84 do wektora plazmidowego pBAC-lacZ z indukowalnym systemem kontroli liczby kopii. Zastosowano dwie różne techniki do wstawienia genomu faga TP-84 podzielonego na osiem części o wielkości między 4200 a 6700 par zasad, klonowanie metodą Gibsona oraz Golden Gate. W wyniku zastosowania techniki klonowania Gibsona, otrzymano klon pBAC-lacZ z wstawionym genomem bakteriofaga TP-84 o wielkości 6600 par zasad z 15-nukleotydową insercją w obrębie genomu TP-84. Nie udało się natomiast otrzymać klona z całym genomem TP-84 używając zarówno techniki klonowania Gibsona, jak i Golden Gate. Może to wskazywać na toksyczność produktów niektórych genów faga TP-84 na komórki *E. coli*.

Podczas ostatniego etapu badań skupiono się na opracowaniu metody umożliwiającej umieszczenie zrekombinowanego genomu TP-84 w komórce gospodarza. Za pomocą transfekcji z użyciem PEG8000 skutecznie transfekowano protoplasty gospodarza *G. stearothermophilus* 10 materiałem genetycznym bakteriofaga TP-84, zarówno w formie natywnej, jak i rekombinowanej. Technika immunodetekcji potwierdziła otrzymanie aktywnych cząstek fagowych zawierających fuzyjny gen 12 kodujący główne białko kapsydu połączony ze znacznikiem molekularnym eksponowanym na zewnątrz cząstki wirusa.

Podsumowując, w niniejszej pracy opracowano funkcjonalny system prezentacji białek/peptydów na powierzchni termofilnego faga TP-84. Niemniej jednak, system ten należy w dalszym ciągu optymalizować, przy czym niezbędne mogą okazać się bardziej szczegółowe badania struktury i biologii bakteriofaga TP-84 oraz jego gospodarza.