

9.1 Wprowadzenie do biologii faga M13

Slide nr. and content:

- 1) Aby zrozumieć sens metody „phage display” należy przybliżyć biologię faga M13, który jest jednym z najczęściej wykorzystywanych w tej technice fagiem.
- 2) M13 jest fagiem filamentarnym, zależnym od fimbrii (pilusów) typu F, a jego gospodarzem jest *E. coli*.
 - 2.1 Fagi zależne od fimbrii typu F infekują swojego gospodarza wykorzystując właśnie ten receptor. Fimbria typu F jest długą, kurczliwą strukturą, wykorzystywaną przez bakterie w procesie koniugacji. Pilusy typu F występują wyłącznie na tych komórkach *E. coli*, które posiadają plazmid koniugacyjny (zwany również plazmidem F).
 - 2.2 Fag filamentarny M13 rozpoznaje pilusy typu F na komórce gospodarza i wykorzystuje je w celu wprowadzenia materiału genetycznego. Na widocznej rycinie zaprezentowano faga M13 połączonego z fimbrią typu F.
 - 2.3 Rycina wyjaśnia również, dlaczego M13 należy do fagów filamentarnych – jego kapsyd przyjmuje bowiem kształt długiego, elastycznego włókna.
- 3) Kapsyd faga M13 ma 7 nm średnicy i osiąga 900 nm długości. Wirion tego faga składa się z cząsteczki DNA otoczonej białkowym płaszczem (złożonym z 5 różnych białek).
 - 3.1 Kapsyd faga M13 składa się w głównej mierze z białka będącego produktem genu 8. Filament zawiera około 2800 cząsteczek tego białka, które tworzy swego rodzaju tubę, chroniącą DNA przed wpływem środowiska. Każdy z końców filamentu zaopatrzone jest w inny zestaw białek.
 - 3.2 Koniec dystalny filamentu zawiera białka, będące produktami genów 7 i 9. Proteiny te są niezbędne w trakcie składania wirionów potomnych w trakcie infekcji. Białka 7 i 9 odpowiadają za rozpoznanie cząsteczek wirusowego DNA i inicjację jego pakowania do wnętrza kapsydu.
 - 3.3 Na proksymalnym końcu kapsydu występują białka, będące produktami genów 6 i 3. Funkcją białka 6 jest stabilizowanie struktury wirionu, z kolei białko 3 jest wyeksponowane w kierunku środowiska, a jego głównym zadaniem jest interakcja z fimbriami typu F na powierzchni bakterii. Białko 3 pomaga również w uwalnianiu wirionów potomnych z komórki gospodarza.
 - 3.4 Genom faga M13 składa się z jednoniciowego DNA i zawiera jedynie około 6400 par zasad. Materiał genetyczny tego wirusa zawiera wyłącznie geny niezbędne do prawidłowego przebiegu infekcji.
 - 3.5 Poza białkami strukturalnymi omówionymi powyżej, genom faga M13 koduje również proteiny odpowiedzialne za replikację DNA oraz składanie wirionów potomnych. Ponadto w genomie tego wirusa istnieje region nie kodujący żadnego białka, ale zawierający dwa miejsca inicjacji replikacji (ori) – po jednym na każdy z możliwych kierunków replikacji. Miejsca te są niezbędne do rozpoczęcia replikacji genomu. Poza tym, w genomie M13 znajduje się również sekwencja sygnałowa, rozpoznawana przez kompleks białek 7 i 9, umożliwiająca zapakowanie cząsteczki DNA do wnętrza pustego kapsydu.

Po krótkim wstępie na temat budowy wirionu faga M13, można zagłębić się w mechanizmy powstawania cząsteczek tego wirusa.

4) Nowe wiriony powstają w skutek infekcji *E. coli* fagiem M13. Schemat tej infekcji został zaprezentowany poniżej.

4.1 Jak wspomniano wcześniej, fag filamentarny M13 może zainfekować tylko te komórki *E. coli*, które posiadają pilusy typu F. Fimbrie typu F są bowiem niezbędne, aby materiał genetyczny wirusa mógł wnikać do wnętrza komórki gospodarza. W fazie początkowej fag M13 rozpoznaje i adheruje do fimbrii przy pomocy wystającego z kapsydu białka 3. W momencie, gdy pilus ulega skurczeniu, DNA faga zostaje wciągnięte do wnętrza komórki, przy czym jego białkowy płaszcz ulega rozłożeniu.

4.2 Zaraz po wnikięciu wirusowego materiału genetycznego (ssDNA) do wnętrza komórki, enzymy gospodarza przekształcają go w formę dwuniciową (dsDNA), a następnie rozpoczyna się replikacja genomu. Powstałe w ten sposób kopie służą zarówno do ekspresji genów odpowiedzialnych za namnażanie wirusa, jak i stanowią matrycę dla kolejnych kopii genomu.

4.3 Gdy w cytoplazmie gospodarza pojawiają się gotowe białka i cząsteczki DNA wirusowego, rozpoczyna się składanie wirionów potomnych. Nowo utworzone kopie DNA są chronione przed enzymami gospodarza przy pomocy białka 5, aż do momentu rozpoznania sekwencji sygnałowej przez kompleks białek 7 i 9. W momencie wychwycenia cząsteczki DNA przez ten kompleks, rozpoczyna się pakowanie materiału genetycznego do gotowego kapsydu.

4.4 Wiriony potomne uwalniane są do środowiska przez błonę komórkową, a konkretnie przez kanał tworzony przez białko 4. Proces ten nie prowadzi do lizy komórki gospodarza, a infekcję tego typu nazywamy chroniczną. W ten sposób bakteriofag M13 namnaża się do wysokiego miana i może atakować kolejne wrażliwe komórki *E. coli*.

Niewielki genom, nieskomplikowany system infekcji oraz łatwość amplifikacji faga M13 czyni go idealnym modelem do stworzenia systemu „phage display”. System ten zostanie dokładnie omówiony w części 2