

# Bakteriofág

.

# Bakteriofágy (fágy, bakteriální viry) rozlišujeme na

- **Virulentní:** způsobují lyzi buněk
- **Mírné (temperované):** způsobují buď lyzi
- nebo se jejich DNA začlení do chromosomu buňky, což má za následek,
- že buňka nelyzuje a infekci přežije

# Podle typu genomu patří většina bakteriofágů do těchto skupin

- ds DNA viry  
(T4, P22 s permutovanými geny, T7 s nepermutovanými geny, lambda, P2, phi80 s kohezními konci, )
- ss DNA viry  
(M13, f1,  $\Phi$  X174)
- ds RNA viry
- + ss RNA viry  
(f2, MS2, Q $\beta$ )

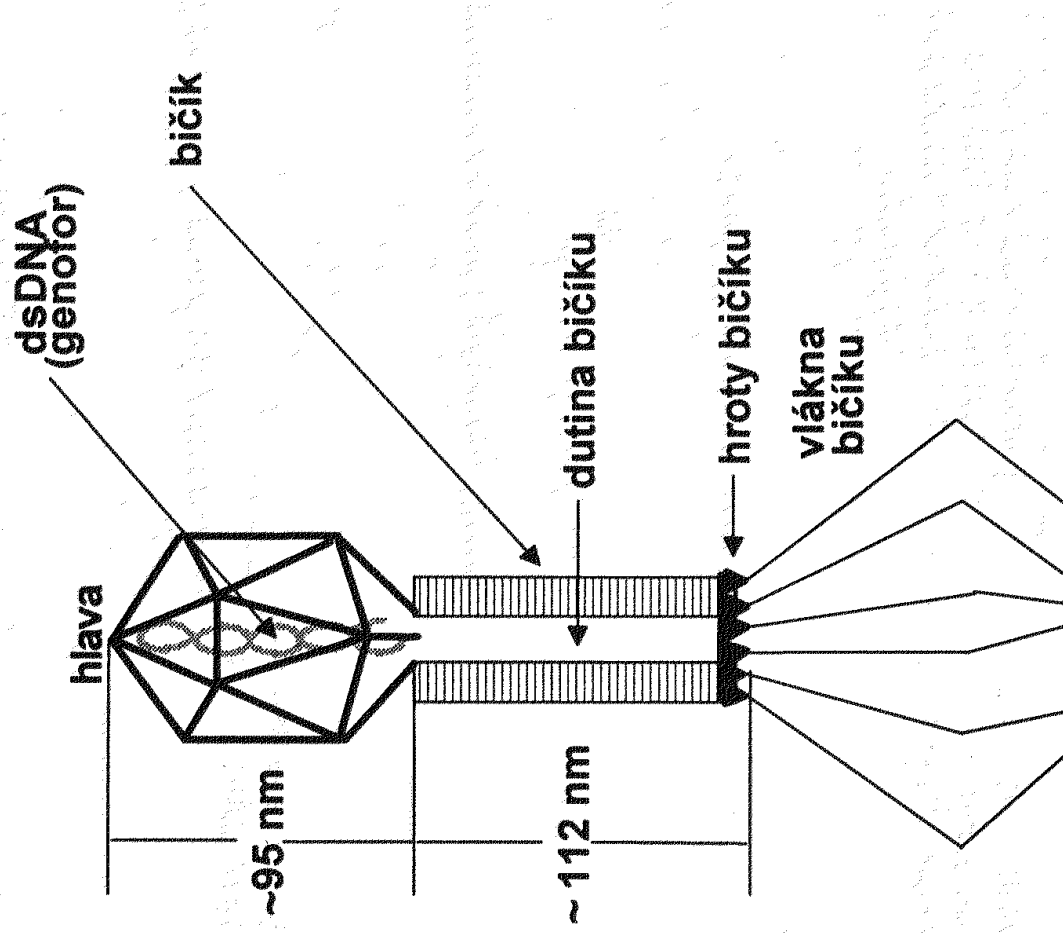
# Bakteriofágy se klasifikují

- Také do morfologických skupin

# Bakteriofág T4 (*E.coli*)

- Je virulentní
- Genom je tvořen lineární ds DNA o délce 160 kb
- Místo C obsahuje hydroxymetylcytosin
- Na DNA je lokalizováno 300 genů, 30 z nich zajišťuje poměrně rychlou replikaci fágové DNA v hostitelské buňce
- Genetická mapa fága je kruhová (má cyklicky permutované geny tzn., že viriony mají různé pořadí genů)
- Některé geny fága T4 obsahují introny

# Schéma virionu T4 (Rosypal 2003)



Obr. 384  
Schéma virionu fága T4

# Infekce buňky

- Viriony se naadsorbují na povrch buňky
- Pomocí proteinu v bičíkových hrotech se spojí se specifickým buněčným receptorem
- Kontrakcí bičíku je umožněna injekce DNA do buňky

# Ihned po infekci

- zastavuje fág syntézu hostitelské DNA, RNA a proteinů
- Díky exprese genomu fága T4

.



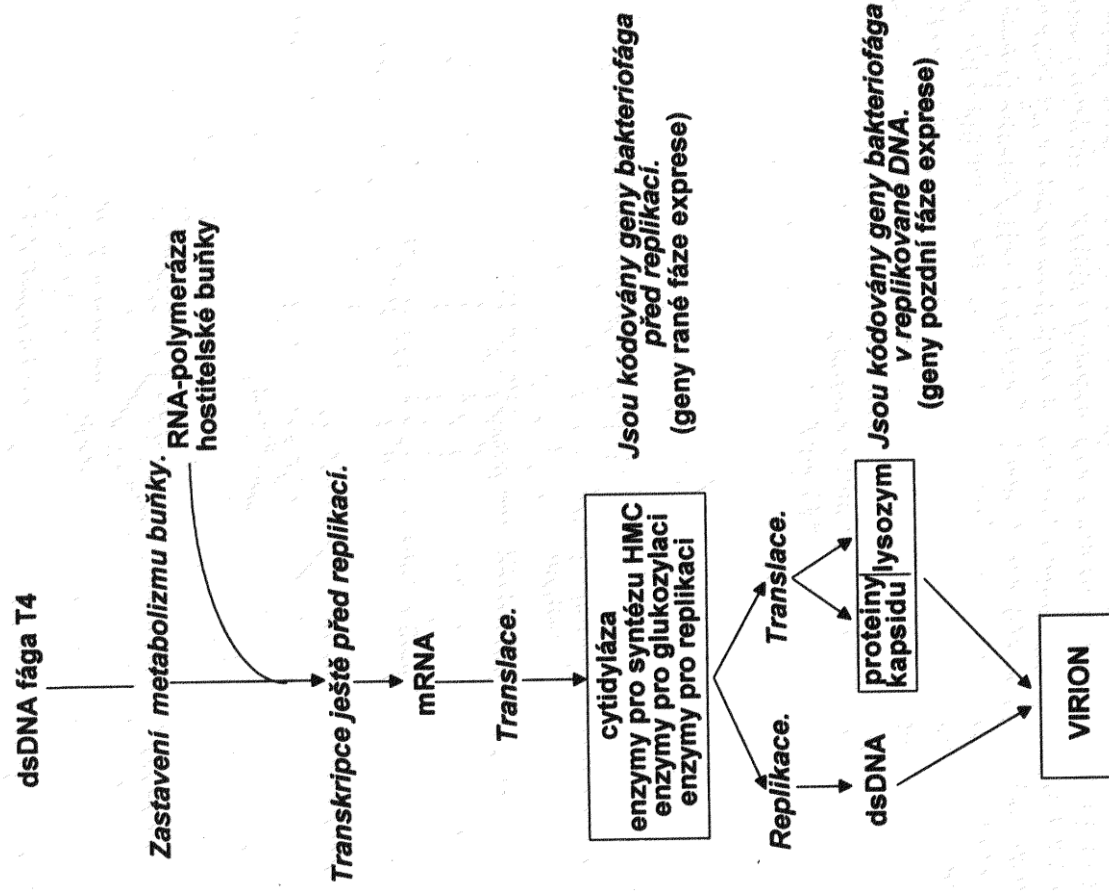
# Exprese genomu fága T4

- Působením RNA-polymerázy hostitelské buňky dochází k transkripci **genů rané fáze exprese** (před replikací fágové DNA) – genů kódujících
- enzymy pro rozklad DNA hostitelské buňky,
- cytidylázu hydrolyzující volný dCTP,
- enzymy pro syntézu HMC
- a pro glukozylaci (glukosylací je DNA fága chráněna proti účinku restričních nukleáz v hostitelské buňce)
- enzymy pro replikaci fágové DNA

# Po syntéze enzymů kódovaných geny rané fáze exprese

- začne probíhat replikace DNA
- V replikovaných molekulách jsou přepisovány **geny pozdní fáze exprese** za tvorby mRNA,
- která je překládána do proteinů, jimiž jsou obalovány zreplikované molekuly fágové DNA
- za tvorby virionů
- Vlivem lysozymu dochází k lyzi hostitelských buněk a uvolnění virionů

# Expresse genomu bakteriofága T4 (Rosypal 2003)



Obr. 385

Expresse genomu bakteriofága T4

# Bakteriofág T7 (*E. coli*)

- Fág virulentní
- Strategie exprese genomu je založena na logickém sledu 3 skupin genů, které se přepisují podle určitého pořadí. Jsou to

# Geny první skupiny

- **(geny brzké rané fáze exprese)** – jsou přepisovány RNA polymerázou hostitelské buňky na nereplikované fágové DNA.
- Jedním z těchto genů je i gen, který kóduje vlastní fágovou RNA polymerázu,
- kterou jsou přepisovány geny druhé a třetí skupiny.

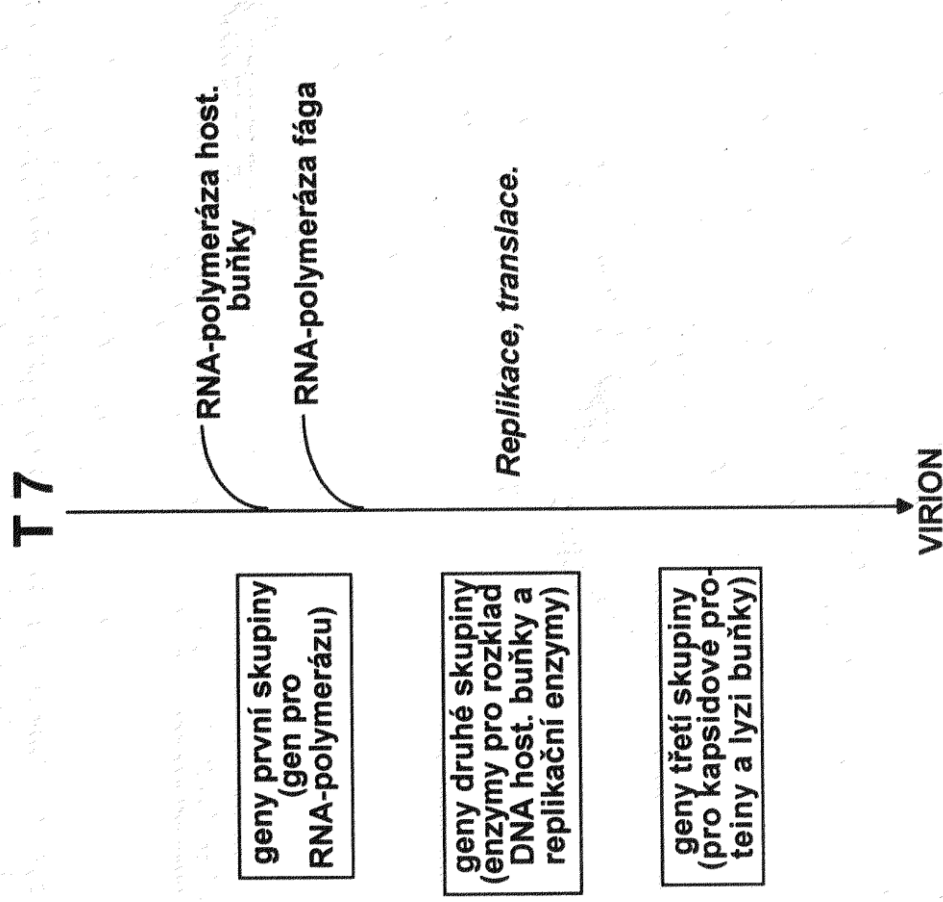
# Geny druhé skupiny

- **(geny pozdější rané fáze exprese)** – zahrnují geny kódující enzymy pro rozklad DNA hostitelské buňky a pro replikaci fágové DNA.

# Geny třetí skupiny

- (**geny pozdní fáze exprese**) – geny kódující proteiny kapsidů a lyzi buňky

# Exprese genomu fága T7 (Rosypal 2003)



Obr. 386

Základní strategie exprese genomu fága T7



# Specificita RNA polymerázy fága T7 vůči vlastním promotorům

- byla využita při konstrukci klonovacích expresních vektorů.

# Fágy s jednořetězcovou (ss) DNA

- Malé fágy *E. coli*
- Fág  $\Phi$  X174 má sférickou kapsidu
- Fág M13, fág f1 jsou vláknité
- Jsou tzv. **male specifické**, protože se adsorbují na pilusy kódované konjugativními plasmidy
- Celý vláknitý fág je pohlcen buňkou a proteinový obal je oddělen od DNA během průchodu vnitřní cytoplasmatickou membránou
- Po replikaci je DNA opět obalena proteinem během průchodu cytoplasmatickou membránou
- Po vstupu ss DNA do buňky (+ řetězec) začíná syntéza komplementárního řetězce DNA (-řetězec), čímž vzniká ds DNA nazývaná replikativní forma (RF).

# Vláknitý fág M13

- A další fágy s ss DNA
- Nemají fixní délku
- Částice bývá tak dlouhá, jak dlouhá je její DNA
- Cizí molekuly různé délky mohou být ve fágové DNA klonovány, aniž by došlo k porušení funkcí fága
- Proto jsou tyto fágy používány jako klonovací vektory

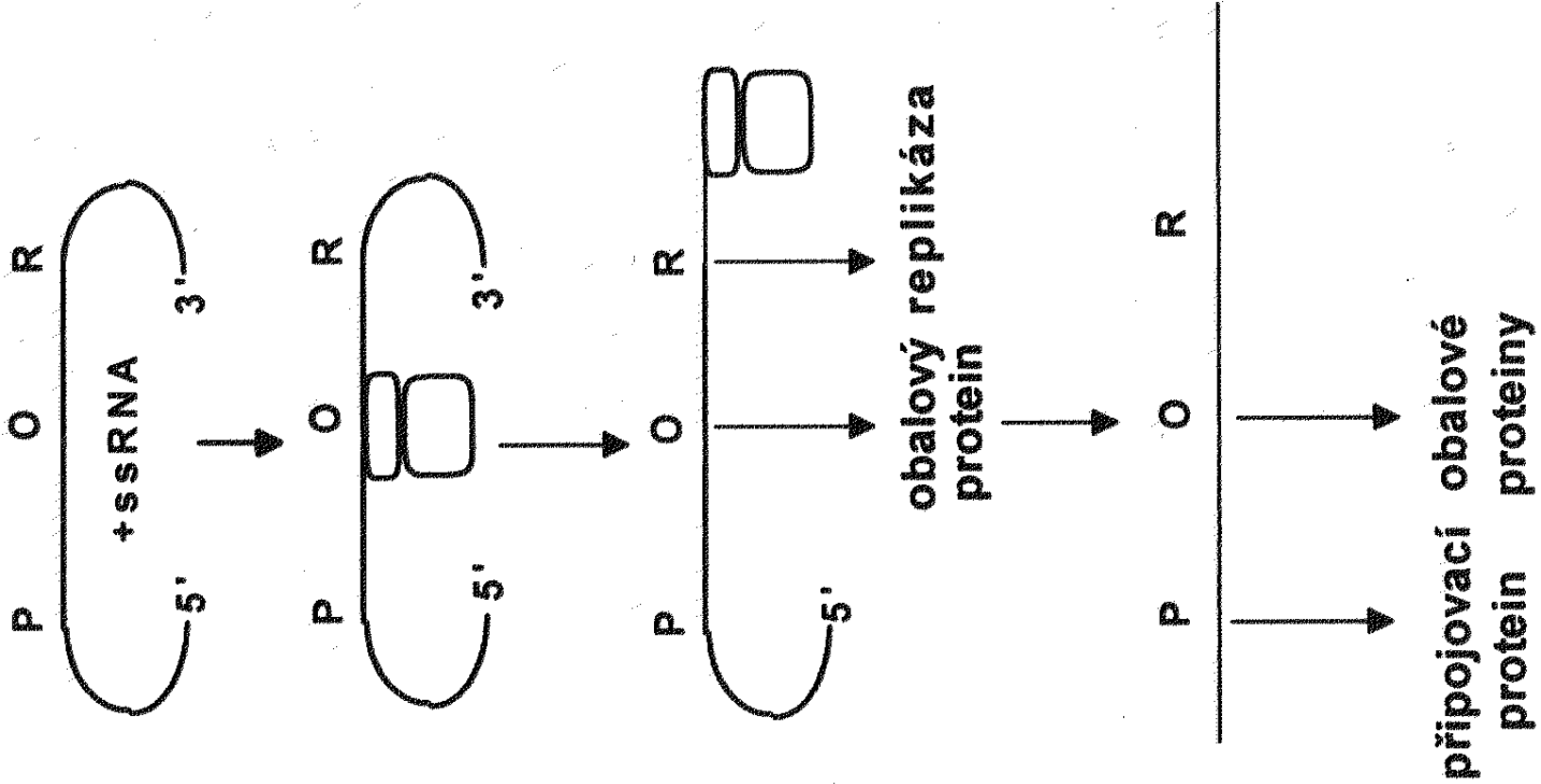
# Bakteriální viry s pozitivní RNA (+ssRNA)

- Např. viry MS2 a Q $\beta$ .
- Genom obsahuje gen O pro obalový protein, gen R pro RNA-replikázu a gen P pro připojovací protein.
- Po vstupu do buňky *E. coli* se genom nereplikuje
- Protože je tvořen + RNA, působí jako mRNA, takže se na něj může připojit ribozom a to na místo, kde je lokalizován gen O pro obalový protein
- Translací tohoto genu se uvolňuje vlásenka blokující původně překlad na genu R
- Po uvolnění vlásenky je umožněn vstup ribosomu na gen R, takže se může tvořit RNA replikáza
- Pak začne syntéza připojovacího proteinu na genu P

# RNA-replikáza

- Katalyzuje replikaci pozitivní RNA na negativní a negativní na pozitivní
- Na část molekul pozitivní RNA se nejprve připojí jedna molekula připojovacího proteinu a pak proteiny obalové za tvorby kompletních virionů
- Syntéza RNA-replikázy je regulována koncentrací molekul obalových proteinů, při jejich kritické koncentraci se syntéza zastaví
- RNA replikáza Q $\beta$  se využívá při amplifikacích *in vitro*

# Strategie replikace a exprese genomu RNA bakteriofágů (Rosvopal 2003)



# Bakteriofágy

- **Mírné (temperované):** způsobují buď lyzi
- nebo se jejich DNA začlení do chromosomu buňky, což má za následek,
- že buňka nelyzuje a infekci přežije

# Bakteriální buňka obsahující profága se označuje jako

- **Lyzogenní**
- **Lyzogenie** je stav bakteriální buňky, v němž obsahuje profága
- **Lyzogenizace** je souhrn pochodů, které se rozvíjejí po infekci bakteriálních buněk mírným fágem a směřují k jejich přeměně na buňky lyzogenní



# Je-li buňka infikována mírným fágem

- Fágový genom se v ní **replikuje** a proto buňka zlyzuje, jako kdyby byla infikována virulentním fágem nebo
- Fágový genom přejde do stavu **profága** a buňka infekci fágem přežije.
- Profágem se rozumí provirus ve formě fágového genomu.

# Lyzogenní buňky se liší od nelyzogenních

- ve vlastnostech, které jsou podmíněny přítomností profága:
- 1. Schopnost **syntetizovat viriony** stejného typu jako ten, kterým byly lyzogenizovány
- Profág se může z chromozomu bakterie uvolnit a začít se replikovat
- Uvolnění profága z chromosomu bakterií lze indukovat fyzikálními nebo chemickými faktory (UV-záření, mitomycin C)
- Při nízkých frekvencích probíhá náhodně spontánní lyze (bez pozorovatelného vlivu vnějších faktorů)

# Lyzogenní buňky se liší od nelyzogenních

- 2. **Imunitou** vůči infekci fágem, jehož genom je homologický s profágem.
- Podstata této imunity spočívá v tom,
- že profág kóduje syntézu **imunitního represoru**,
- který specificky zastavuje syntézu proteinů potřebných k syntéze virionů fága, jež je s ním homologický nebo blízce příbuzný

# Příkladem mírného fága je fág

- $\lambda$  (E. coli)