

Bakteriofág lambda (Rosypal 2003)

.

Bakteriofág λ (*E.coli*)

- Modelový virus
- Je fág mírný
- Jeho hostitelskými buňkami jsou buňky kmene *E. coli* K12 (lambda-)
- Lyzogenní kmen nesoucí profága se označuje jako *E. coli* K12 (lambda+)
- Znalost regulačních mechanismů jeho genové exprese je poučná pro studium regulací jiných virů a organismů
- Jeho studium ukazuje, jakým způsobem se může virový genom včlenit do chromosomu hostitelské buňky
- Vyznačuje se transkripcí přes terminátory transkripčních jednotek (anti-terminace)
- Používá se jako klonovací vektor

Genom fága lambda

- Je tvořen molekulou ds DNA,
- Která má kohezní konce
- tj. vzájemně komplementární jednořetězcové 5 konce vyčnívající z ds molekuly DNA, které se mohou párovat
- DNA má lineární tvar jen uvnitř virionů
- V hostitelské buňce se přeměňuje ve tvar kružnicová dsDNA
- V tomto stavu se v hostitelské b. replikuje
- Jestliže se replikace zastaví, může se včlenit do chromosomu hostitelské b.

Replikace genomu fága lambda

- Začíná po infekci hostitelské buňky (adsorbce virionu na receptor, injekce DNA do buňky)
- Tvorba kružnice (kohezní konce dlouhé 12 nukleotidů)
- Replikace otáčivou kružnicí za tvorby konkatemerů
- Jestli replikace pokračuje, navozují se procesy, které vedou k lyzi buněk
- Jestli se replikace zastaví, DNA fága lambda se integruje ve formě profága do genomu hostitelské buňky

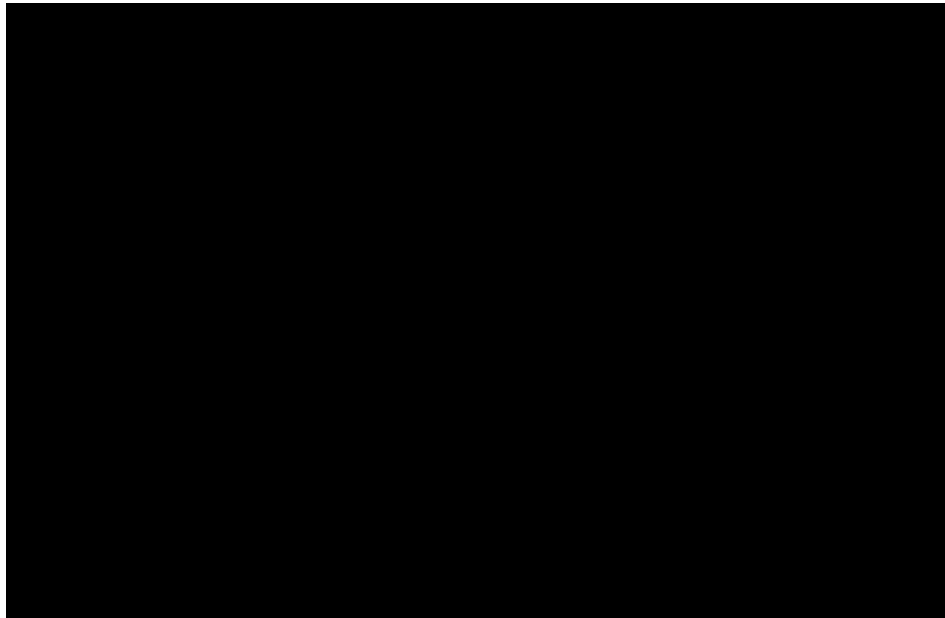
Konkatermer

- Vzniká replikací otáčivou kružnicí
- Štěpí se na molekuly DNA, které svou délkou odpovídají genomu fága
- Štěpení se uskutečňuje v procesu tvorby virionů, kdy koncový protein bičíku virionu má funkci endonukleázy, která se označuje jako **termináza**
- Rozpoznává na fágové DNA specifickou sekvenci **cos**, kterou štěpí za vzniku kohezních konců

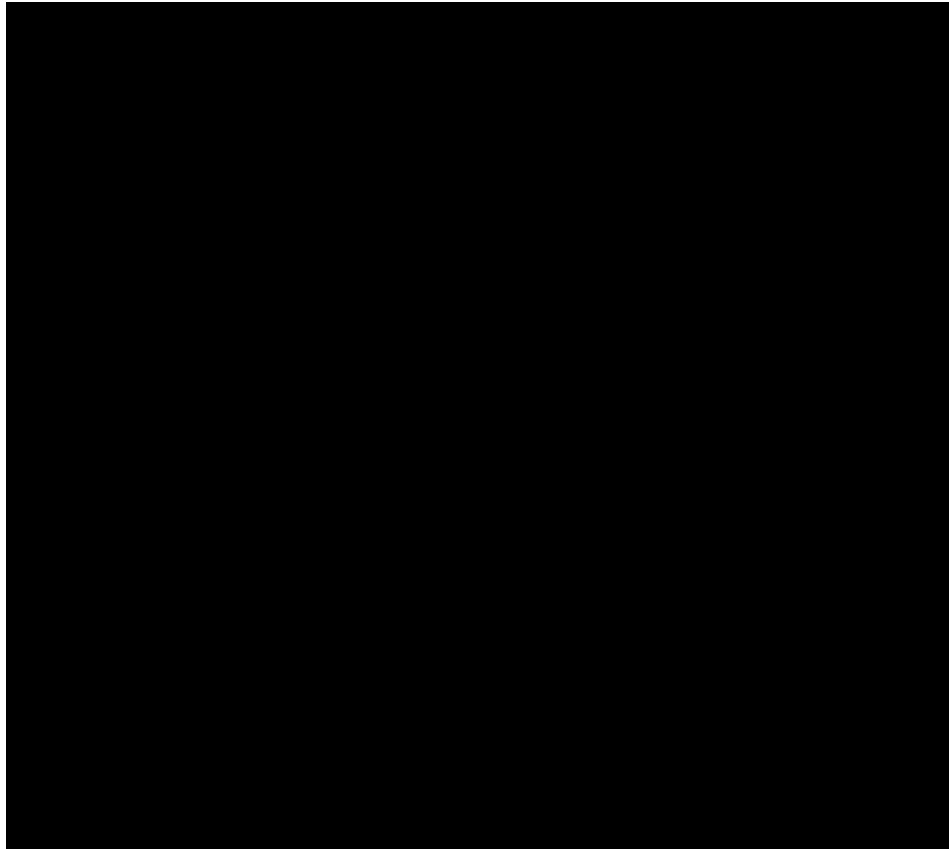
DNA fága lambda

- Po infekci buňka a její replikace

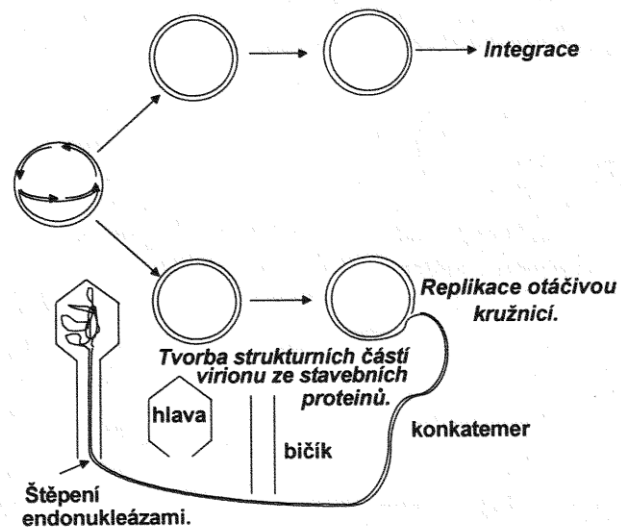
DNA fága lambda bezprostředně po infekci buňky



Konverze lineární DNA fága lambda v kružnicovou



Replikace DNA fága lambda vedoucí k tvorbě virionu a lyzi buňky



Nutnou podmínkou pro navození lyzogenního stavu je zastavení replikace fágové DNA.

Obr. 389

Replikace DNA fága lambda vedoucí k tvorbě virionů a lyzi buňky

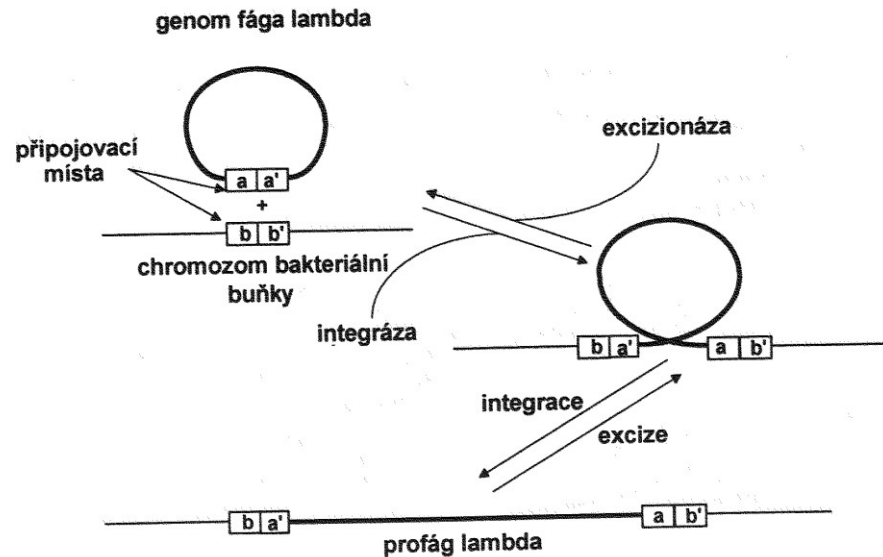
Sekvence cos

- Tvoří konce molekul fágové DNA ve fágové hlavičce
- Ve fágové hlavičce je DNA v lineární formě

Integrace a excise DNA fága lambda do chromosomu buňky

- Děje se jednoduchým c-o pomocí připojovacích míst **att.aa** na DNA fága a **att.bb** na chromosomu bakteriální buňky. Jedná se o místně specifickou rekombinaci (krátké úseky homologie).
- Integrace je katalyzována **integrázou**, která přesně spojí konec **a s b** a konec **a s b**.
- Excise probíhá opačným pochodem a je katalyzována **excizionázou**.

Integrace a excize genomu fága lambda

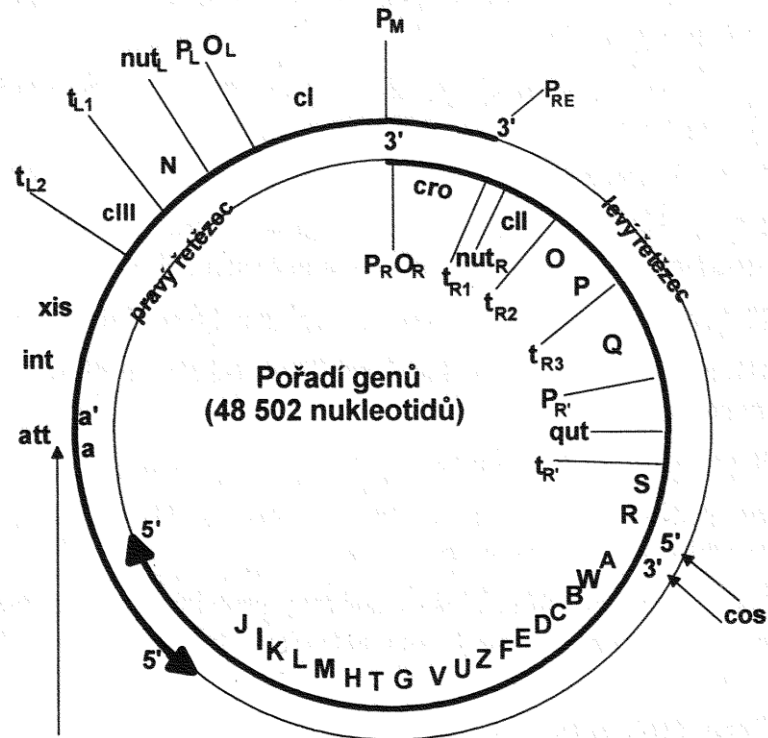


Obr. 390
Integrace a excize genomu fága lambda

Genetická mapa fága lambda

- Bývá znázorňována jako kruhová
- Jsou na ní lokalizovány
- Geny kódující regulační proteiny, které řídí životní cyklus fága (lyzi a lyzogenizaci)
- Geny kódující proteiny, který katalyzují rekombinaci genomu fága lambda (xis, int)
- Geny O,P, které kódují proteiny katalyzující replikaci DNA
- Geny S,R, které kódují proteiny uplatňující se při lyzi buňky
- Geny kódující stavební proteiny hlavy fága a bičíku fága

Geny řídící životní cyklus fága – geny kódující regulační proteiny



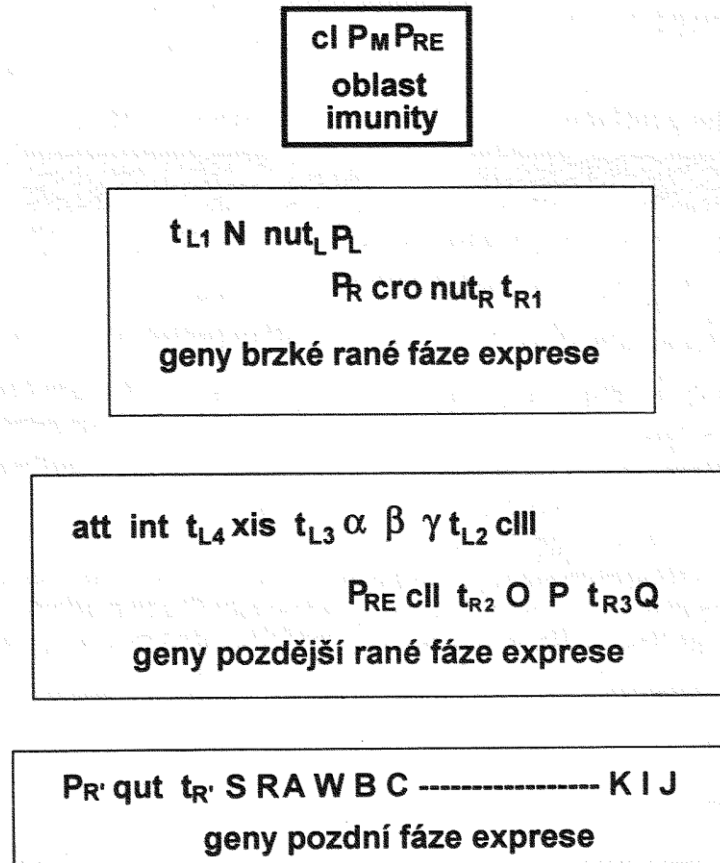
V tomto místě rekombinuje s bakteriálním chromozomem.

DNA-řetězce jsou označeny jako levý a pravý ve shodě se směrem transkripce.

Tučnými šipkami je vyjádřen směr transkripce. V kružnicové formě se DNA fága nachází během replikace. V této formě dochází též k její transkripci. V lineární formě se nachází jen ve stavu profága. V tomto případě je pak zakončena na jednom konci sekvencí att_a a na druhém att_a'

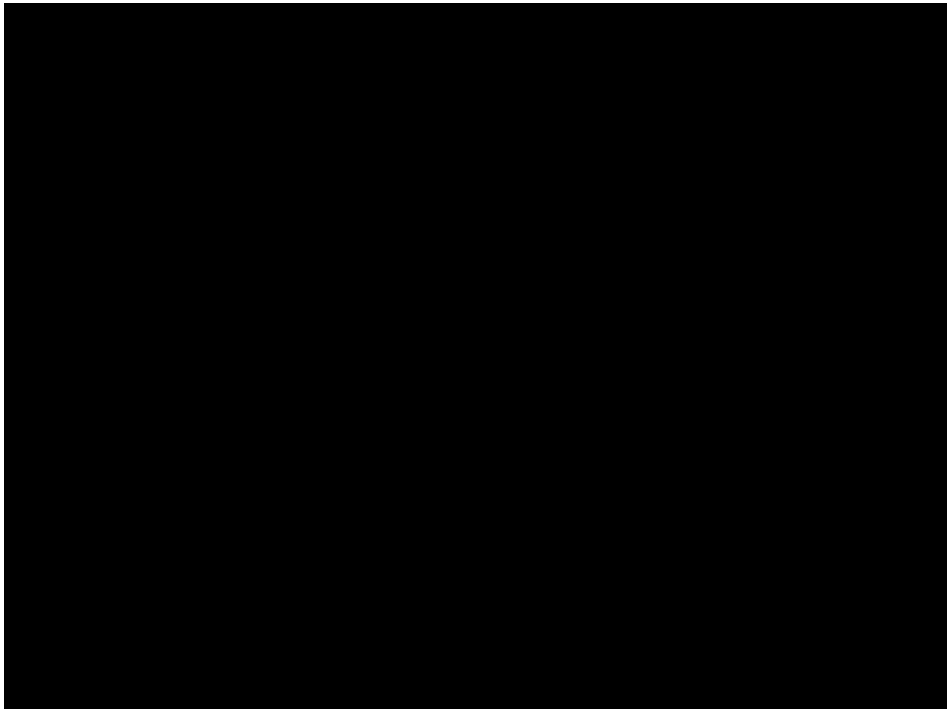
Obr. 391
Genetická mapa bakteriofága lambda

Pořadí exprese genů fága lambda v hostitelské buňce

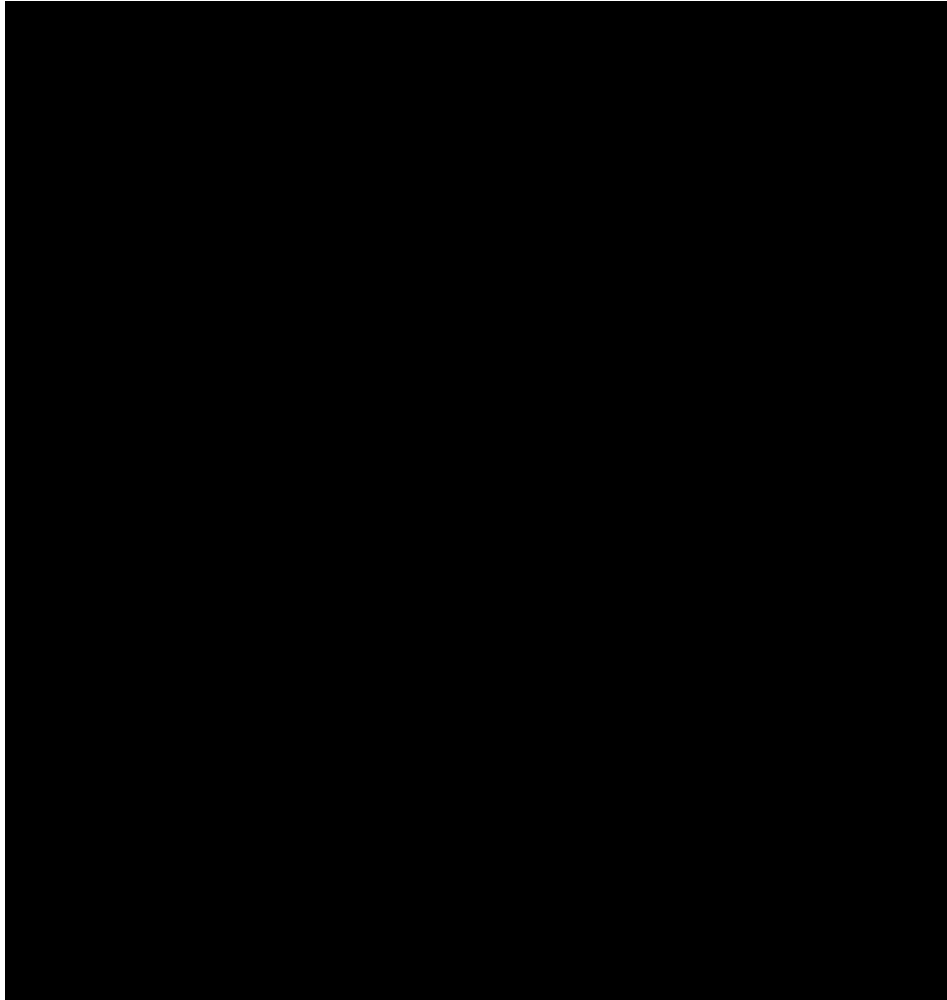


Obr. 392
Schéma rozložení genů fága lambda podle jednotlivých fází jejich exprese

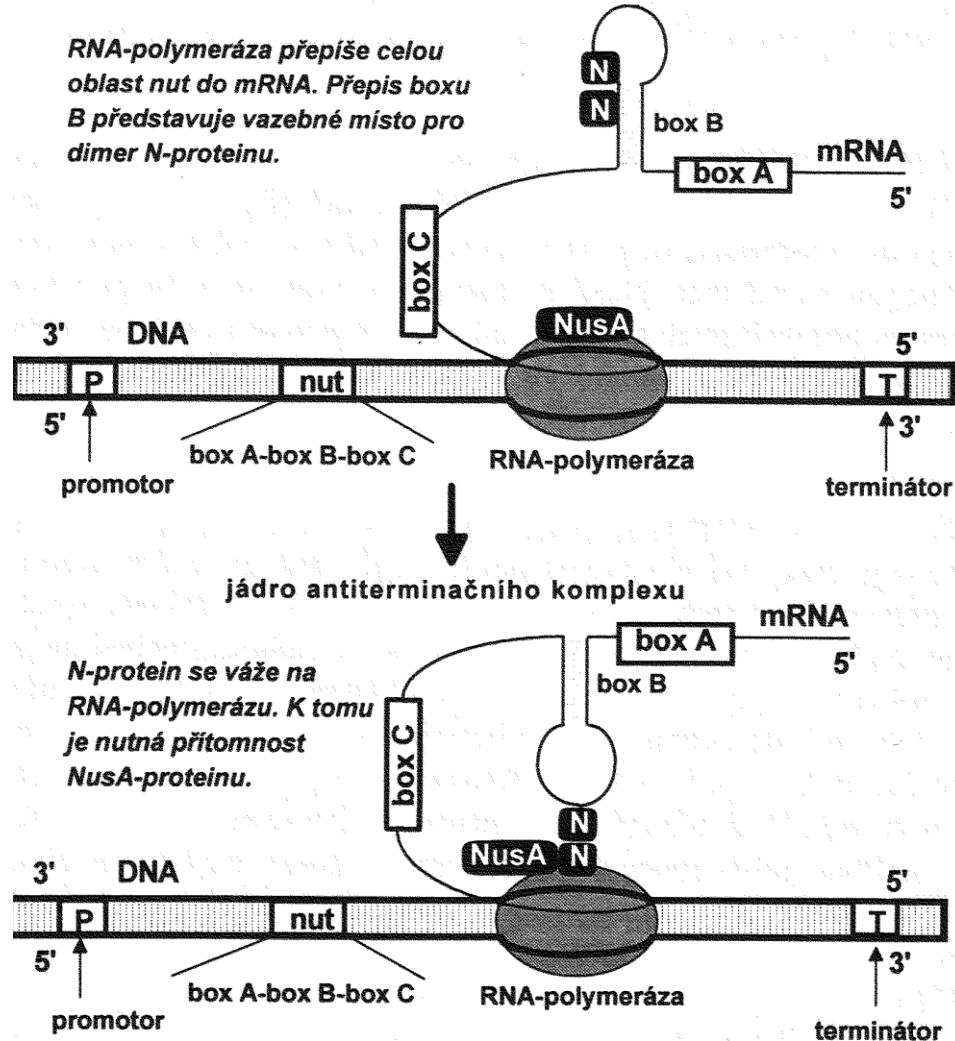
Terminace



Antiterminace



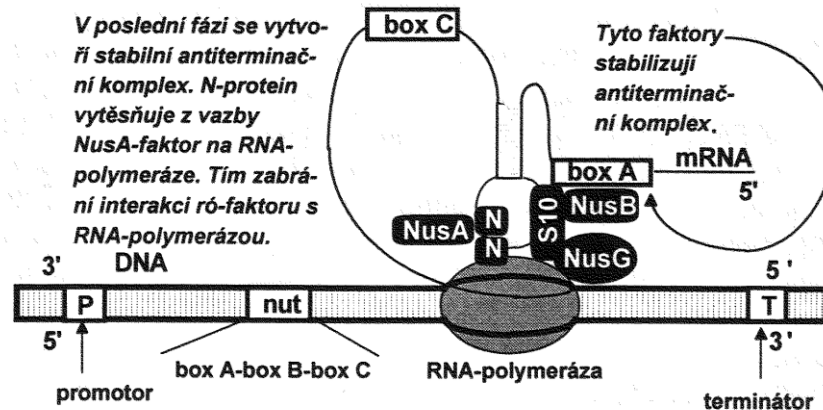
Vytvoření jádra antiterminačního



Obr. 394

Vytvoření jádra antiterminačního komplexu

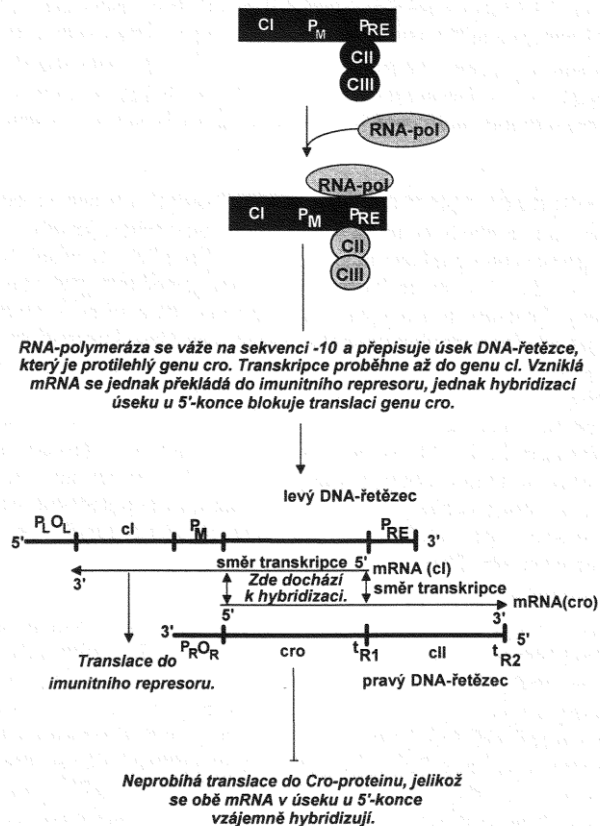
Stabilní antiterminační komplex



Obr. 395
Stabilní antiterminační komplex

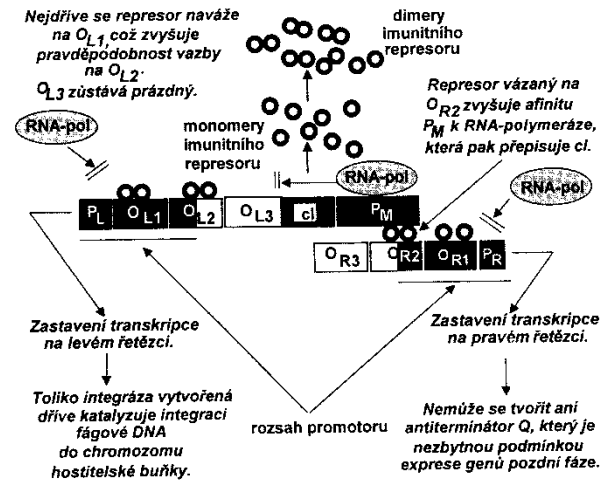
Navození lyzogenního stavu v buňce

Na promotor P_{RE} se váže CII-protein (na sekvenci -35). Snadno se však rozkládá působením proteinu HflA hostitelské buňky. Tomuto rozkladu brání přítomnost proteinu CIII vázajícího se na CII. Promotor P_{RE} může být rozeznán RNA-polymerázou, jen když se na něj nejdříve naváže CII.

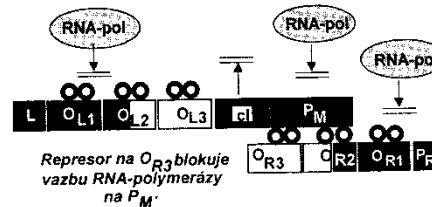


Vazba imunitního represoru na operátory – stabilizace lyzogenního stavu buňky

Produktem genu *ci* je protein, který se dimerizuje. Teprve tento protein představuje aktivní imunitní represor, který se váže na operátory překrývající se s promotory P_L , P_M , P_R . Každý operátor má tři vazebná místa pro represor. Na každé z nich se váže dimer.



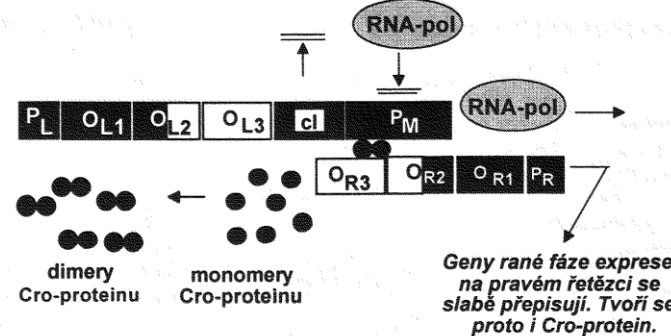
Při vysoké koncentraci imunitního represoru nastane tato situace:



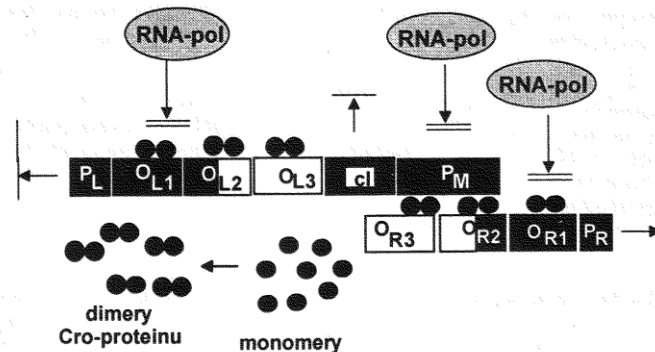
Jestliže se sníží koncentrace represoru, nastane opět situace uvedená v horní části tohoto schématu.

Navození lyze hostitelské buňky

Cro-protein má podobnou strukturu jako imunitní represor. Váže se silně na O_{R3} , slaběji na O_{R2} a O_{R1} . Vazbou na O_{R3} blokuje navázání RNA-polymerázy na P_M .

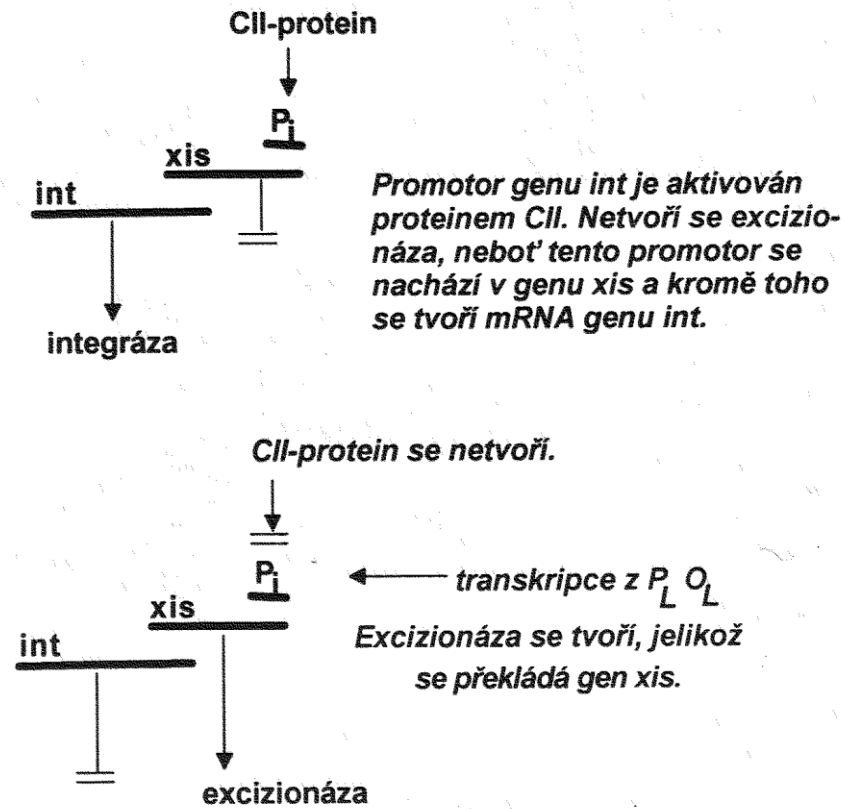


Při vyšší koncentraci Cro-proteinu jsou tímto proteinem obsazena všechna operátorová vazebná místa. Proto se zastaví transkripce všech genů rané fáze exprese na levém i pravém řetězci. Toliko Q-protein může z P_R uskutečnit antiterminaci a umožnit transkripci z tohoto promotoru všech genů pozdní fáze exprese.



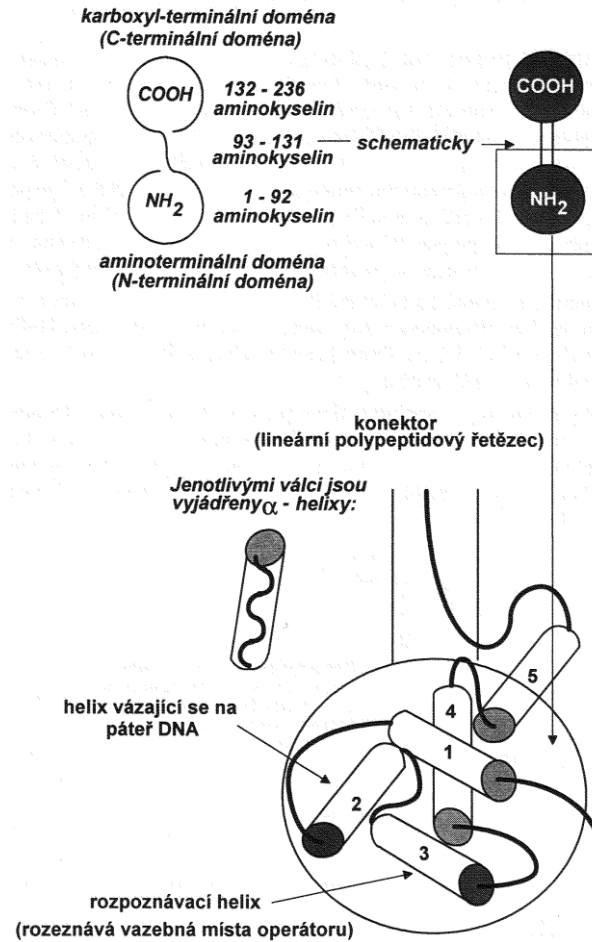
Obr. 398
Vazba Cro-proteinu na operátory O_L a O_R

Úloha genů *xis* a *int*



Obr. 399
Syntéza integrázy a excizionázy

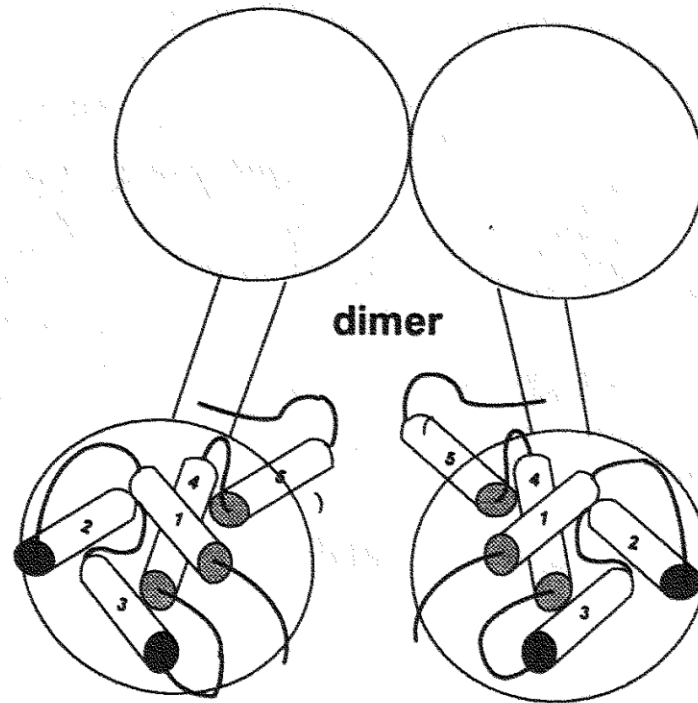
Imunitní represor - protomer



Obr. 400

Protomer (podjednotka) imunitního represoru

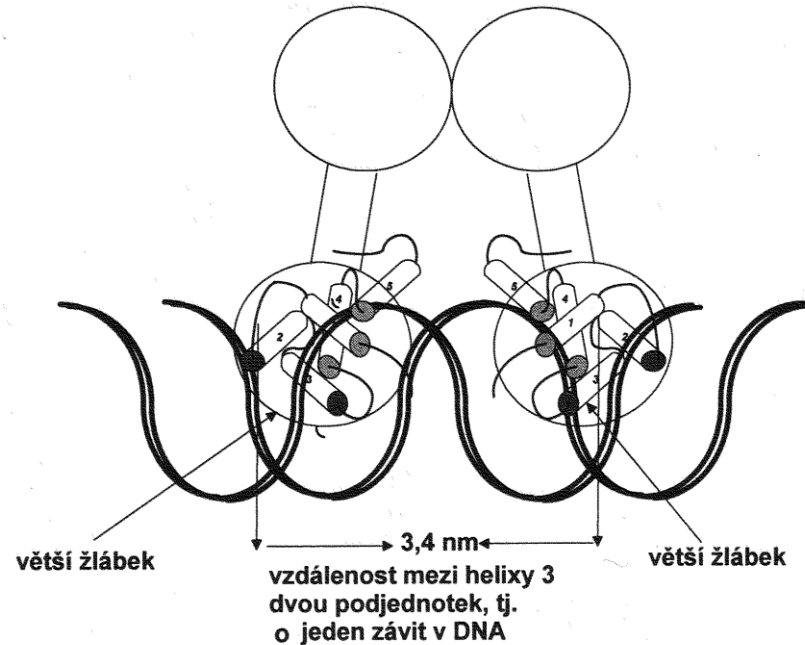
Molekula imunitního represoru



Obr. 401

Molekula imunitního represoru

Rozpoznávání operátoru munitním represorem

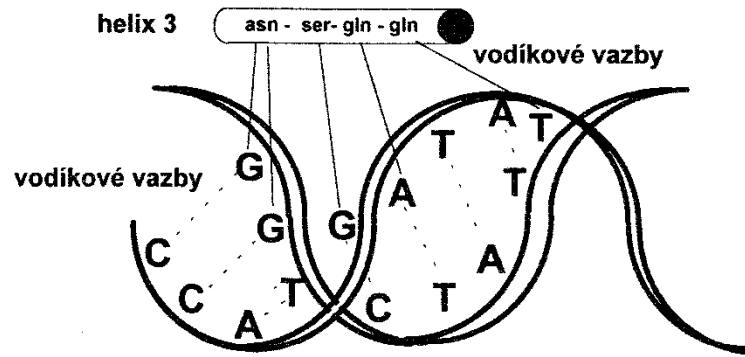


Helix 3 rozpozná specifická vazebná místa operátorů a váže se na ně určitou sekvencí aminokyselin.

Obr. 402

Rozpoznávání operátoru O_L a O_R imunitním represorem

Rozpoznávání sekvencí operátoru



Obr. 403

Rozpoznávání sekvencí operátoru helixem 3 imunitního represoru
(zjednodušené schéma)