

Ostatní viry prokaryot

Bacteriophages. Maniloff, J.

Encyclopedia of life Sciences 2001

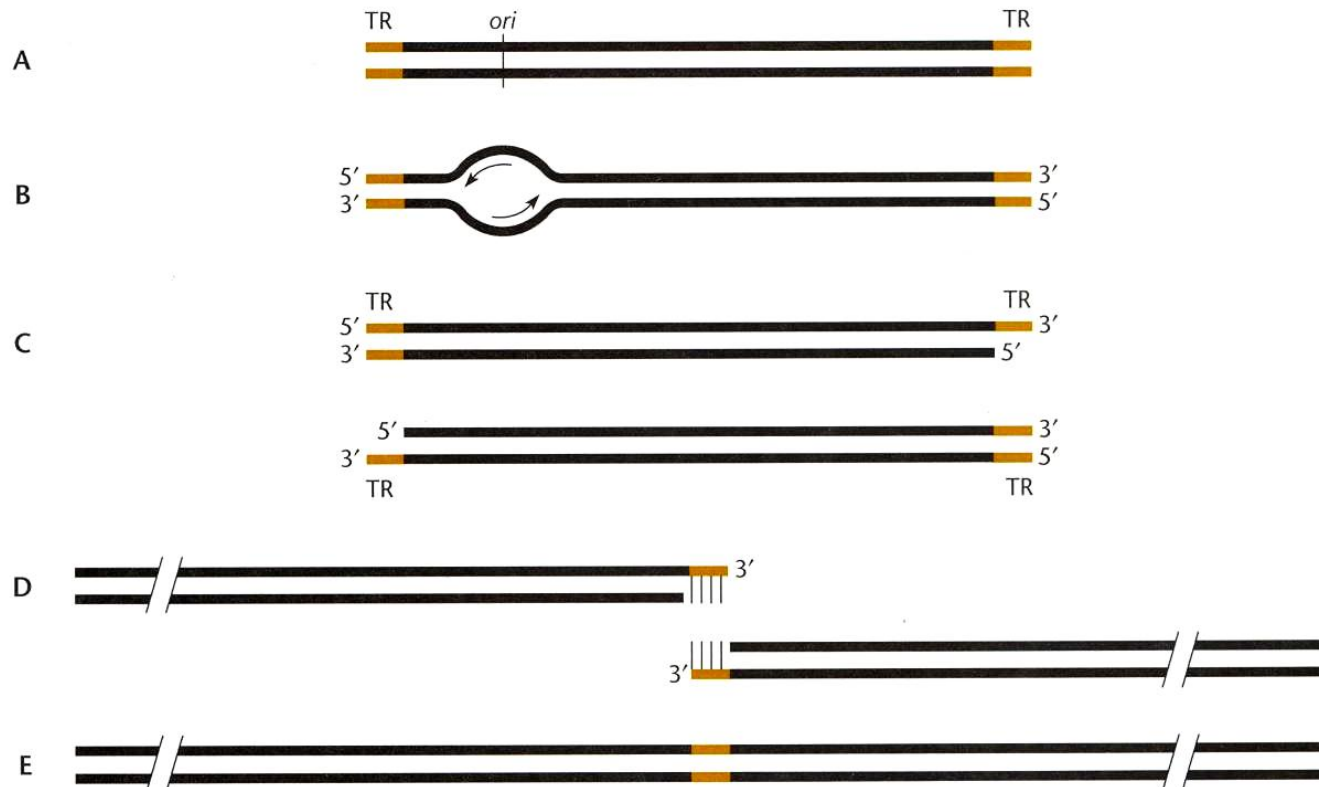
Viruses of the Archaea. Basta, T. et al. ,

Encyclopedia of life Sciences 2008

Bakteriofág T7

- Jednoduchá regulace po infekci –
 - Pouze časný a pozdní geny
 - Exprese probíhá zleva do prava – vlevo časný geny, vpravo pozdní geny
 - Regulace pozdních genů vlastní RNA polymerásou (T7 RNA polymerasa)
 - Pozdní geny odlišné promotory
 - Využití v rekombinantních technikách
- Lineární DNA bez kohézních konců – odlišná replikace
 - Vytváření konkatamer z jednotlivých DNA úseků vázaných tzv. „end to end“
 - Neztrácí se genetická informace
 - Replikace z ori místa na obě strany obou řetězců – 3' zůstává ssDNA – není možnost vytvoření primeru
 - T7 má stejnou sekvenci na obou stranách fága – oba konce jsou komplementární a mohou se párovat
- Kodovány geny replikační mašinerie –
 - nezávislost na hostitelském organismu
 - DNA polymerasa, DNA ligasa, DNA helicasa, primasa, T7 RNA polymerasa
 - DNA endonukleasy a exonukleasy
- Příbuzné fágy – T3, (*E. coli*), Φ 29 (*Bacillus subtilis*)

Model replikace bakteriofága T7

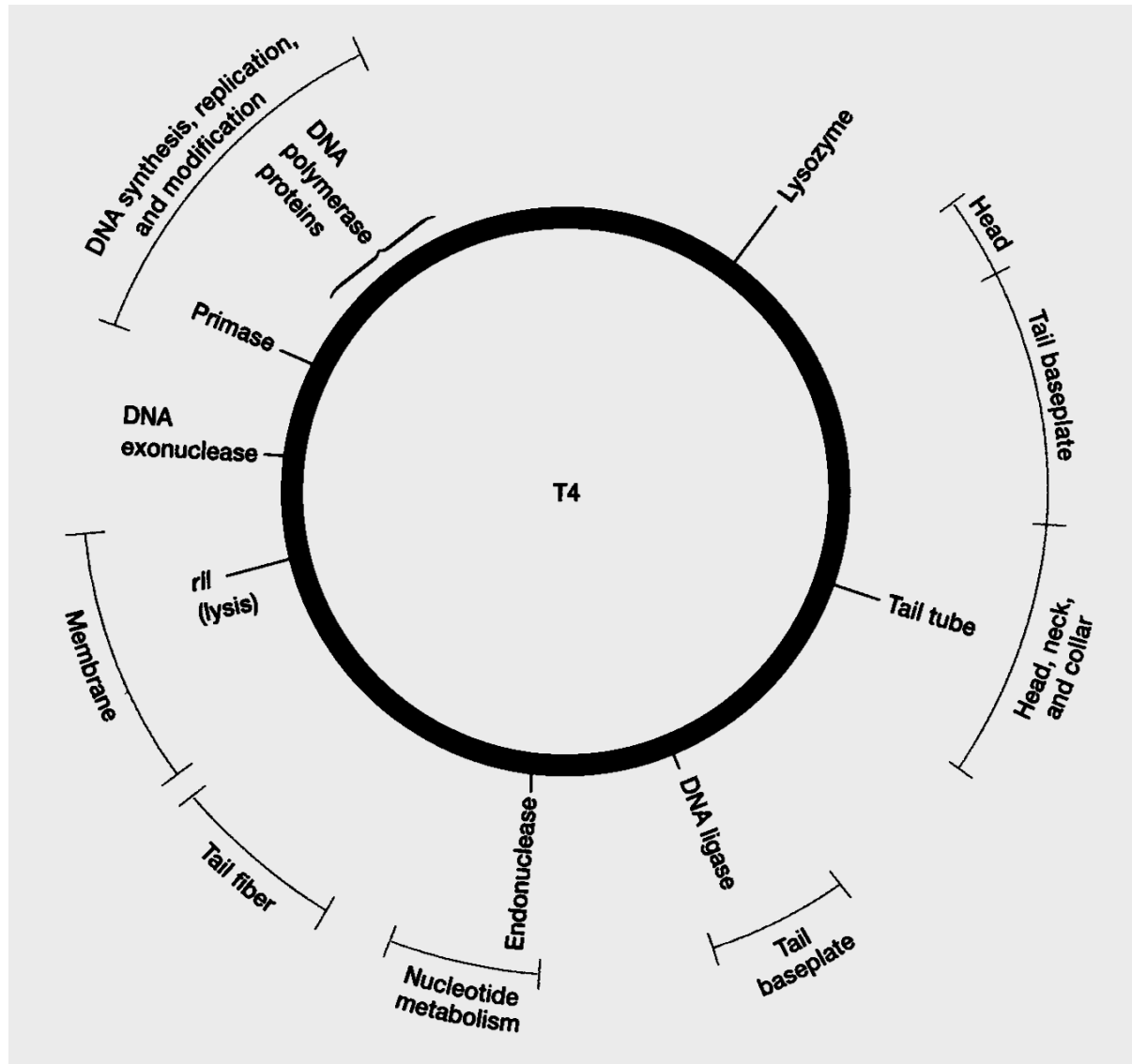


Bakteriofág T4

- Jeden z největších známých
- Používán při molekulárně genetických studiích
- 200 genů, komplexní regulace –
 - při studiu použity amber mutace
- Časné geny
 - z promotorů podobné sigma 70
 - pozdržené časné geny (antiterminační mechanismus),
- Střední a pozdní geny – promotory odlišná struktura –
 - Pro střední geny vyžadují MotA protein – vazba na σ^{70} transkripce T4 středních genů
 - AsiA – negativní regulace σ^{70} promotorů hostitele
 - Pro pozdní geny alternativní sigma faktor (gen 55) vázající se na RNA polymerázu
- Pozdní geny zpražené s replikací – transkripce probíhá pouze na replikující se DNA

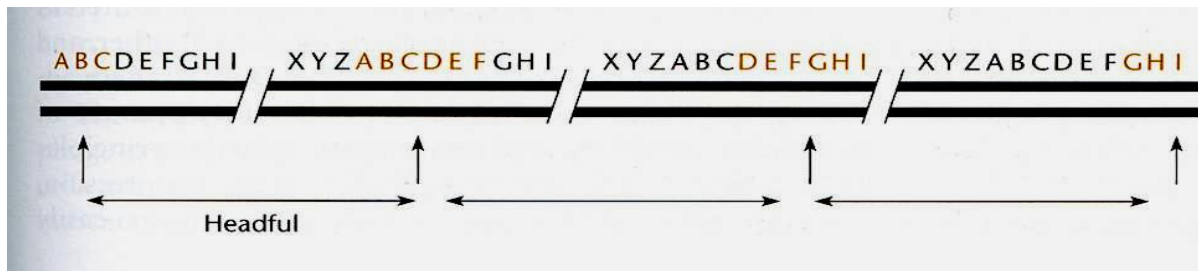
Sigma 70 promotor	TTGACA	-	17bp	-	TATAAT
T4 střední promotor	TTTGCTTA	-	13bp	-	TATAAT
T4 pozdní promotor	<hr/>				TATAAATA -

Genetická mapa T4 fága



Bakteriofág T4

- Lineární DNA bez kohezních konců –
 - Vytváření konkatamer z jednotlivých úseků DNA genomu
 - 30 genů participuje na replikaci – většina fágová – analogické bakteriálním i eukaryotním (strukturně podobnější) DNA polymerasa, beta protein (sliding clamp), primase...)
- dvě fáze replikace
 - Replikace je iniciována na několika definovaných *ori*, analogické bakteriální a vede k akumulaci DNA v délce genomu s ssDNA 3' koncem,
 - Konce jsou identické – terminálně redundantní – nedochází ke ztrátě gen. informace
 - Po nějakém čase dojde k jinému mechanismu replikace.
 - ss opakování na koncích DNA mohou porušit stejnou sekvenci na konci sesterského vlákna DNA a vytvořit tak tzv. D-loops
 - tyto struktury mohou sloužit jako primer pro syntézu dlouhých konkatemer
 - rekombinantně dependentní replikace (recombination-dependent replication)
 - Vznik dlouhých větvených konkatamer
 - Pakovány mechanismem plné hlavy (ne unikátní *pac* místa)
 - Fágy pocházející z jedné infekce nemají stejné konce genomu, jsou cyklicky permutovány.

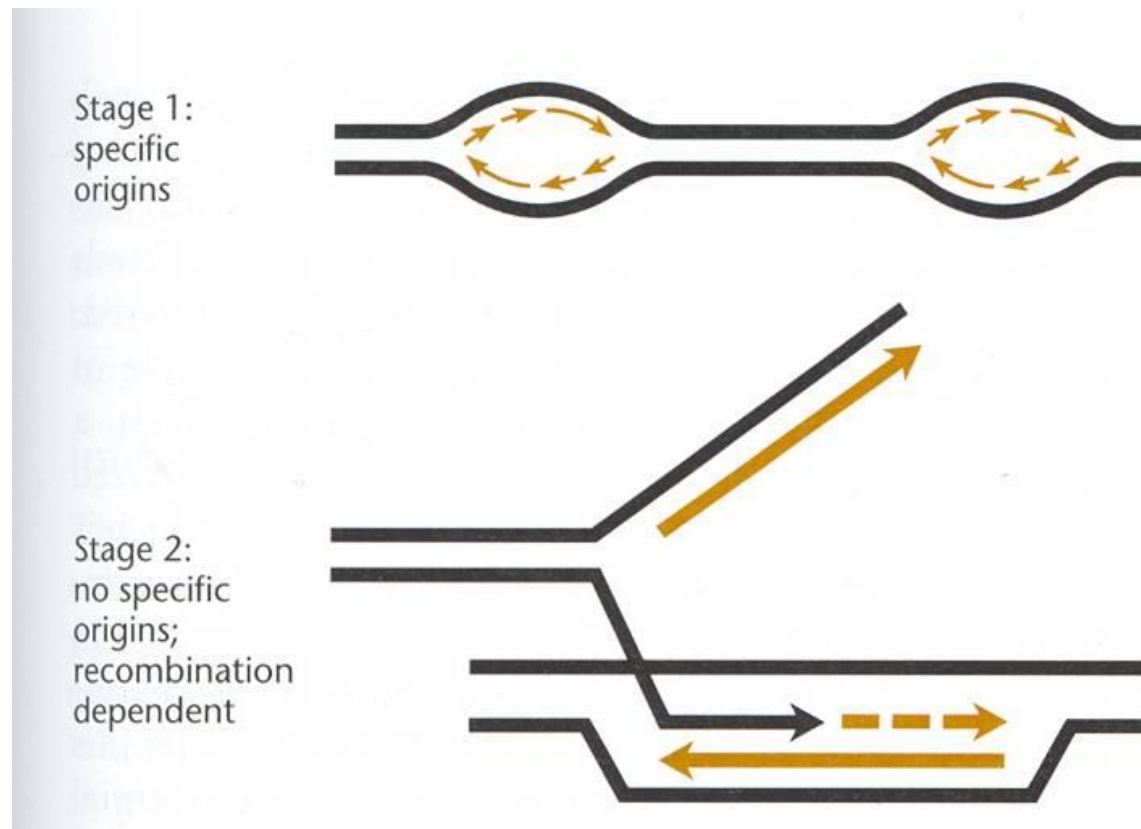


Rekombinantně dependntní replikace

Stadium 1: replikace je iniciována ze specifických začátků

Stadium 2: rekombinanční intermediáty slouží jako primery k replikaci

- PriA, PriB, PriC a DnaT mohou zahájit replikaci na 3' OH konci DNA



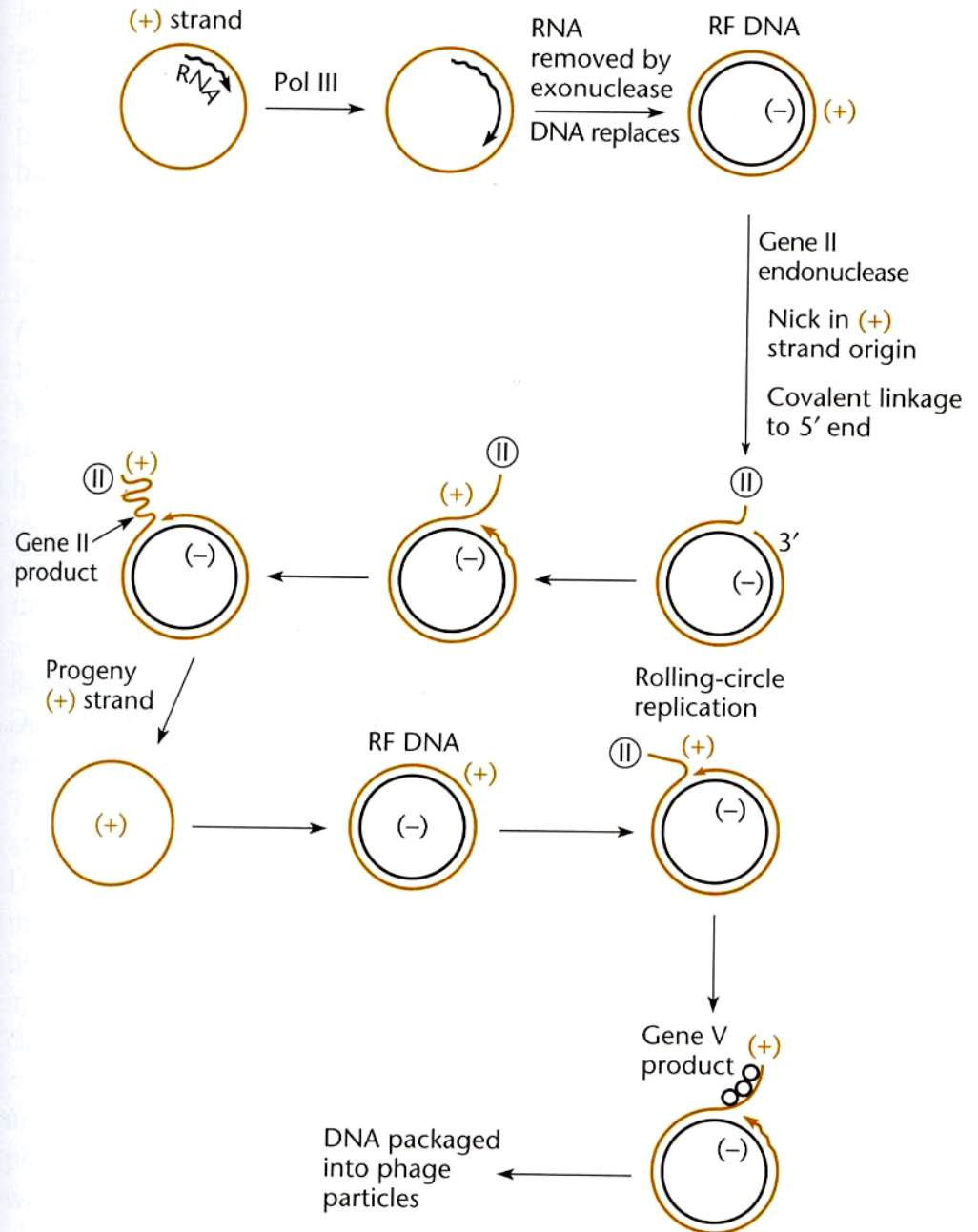
ssDNA bakteriofágy

□ Bakteriofág ΦX174

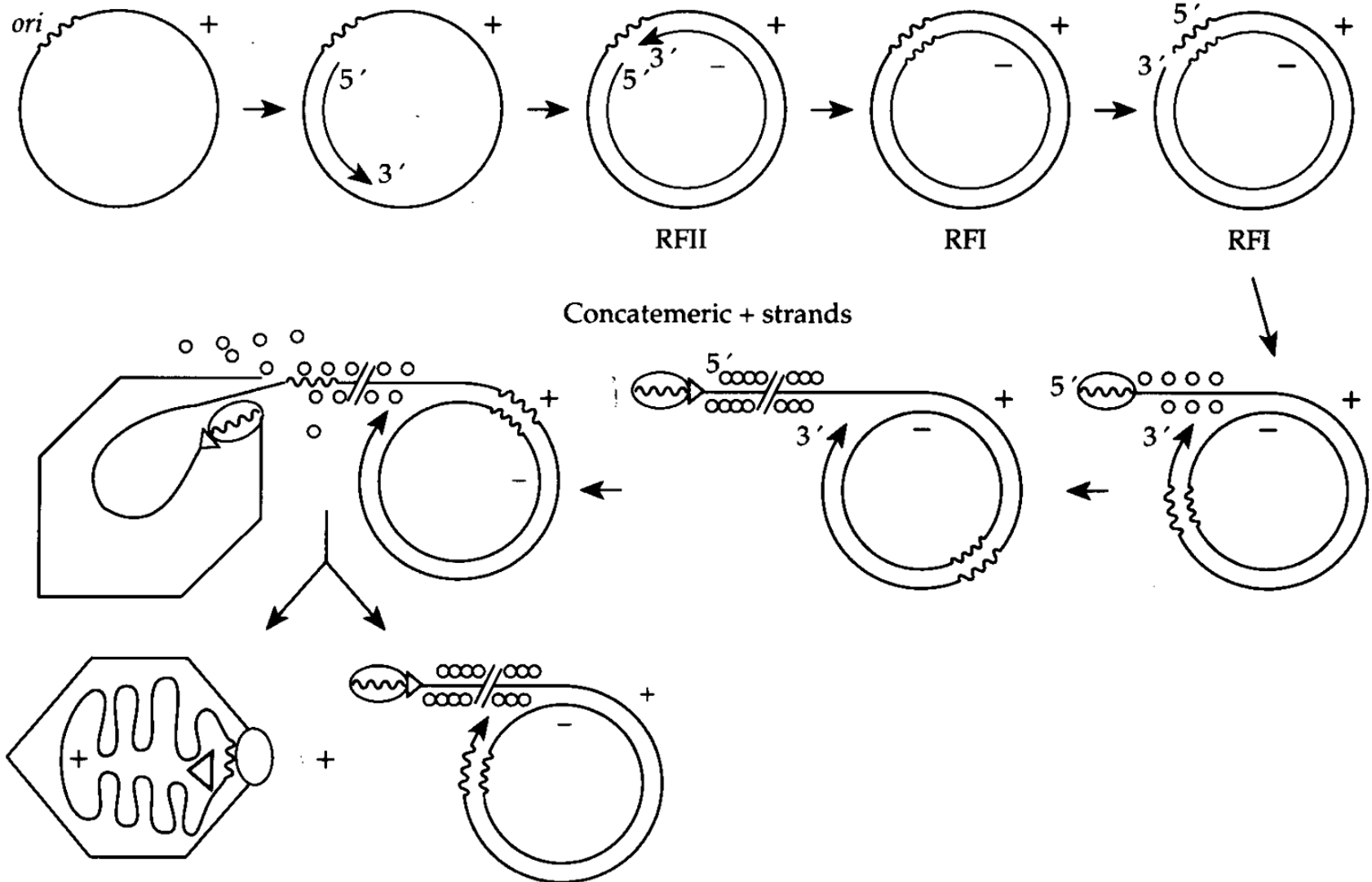
- první třída - ikosahedrální kapsida, 5,4 kbp ssDNA, cirkulární
- lytický fág, *E. coli*
- první osekvenovaný organismus (1977)
- nemá ekvivalentní množství adeninu (24%) a thyminu (33 %) ani guaninu (18 %) a cytosinu (24 %) - mnoho neobvyklých basí
- neobvyklý způsob replikace
 - ss (+) DNA není kodující
 - po infekci syntéza druhého kodujícího vlákna - replicative form (RF)
 - Vytvoření primosomu v unikátním místě ssDNA (DnaB, DnaC, DnaG a PriA, PriB)
 - dsDNA se replikuje několika cykly mechanismem valivé kružnice
 - probíhá syntéza virových partikulí
 - mechanismem valivé kružnice se vytváří ss (+) nekodující vlákno
 - pakování do hlavy
- první organismus v kterém bylo prokázáno překrývání začátku genů - jsou transkribovány v jiných ORF

Replikace ssDNA bakteriofágů

- ss (+) DNA není kodující
- po infekci syntéza druhého kodujícího vlákna - replicative form (RF) – RNA primer - vazbou hostitelské RNA polymerasy na *ori* tvořené 60 nukleotidy a vytvářející vlásenku
- dsDNA se replikuje několika cykly mechanismem valivé kružnice
- probíhá syntéza virových partikulí
- mechanismem valivé kružnice se vytváří ss (+) nekodující vlákno
- pakování do hlavy



Bakteriofág Φ X174 – replikační cyklus

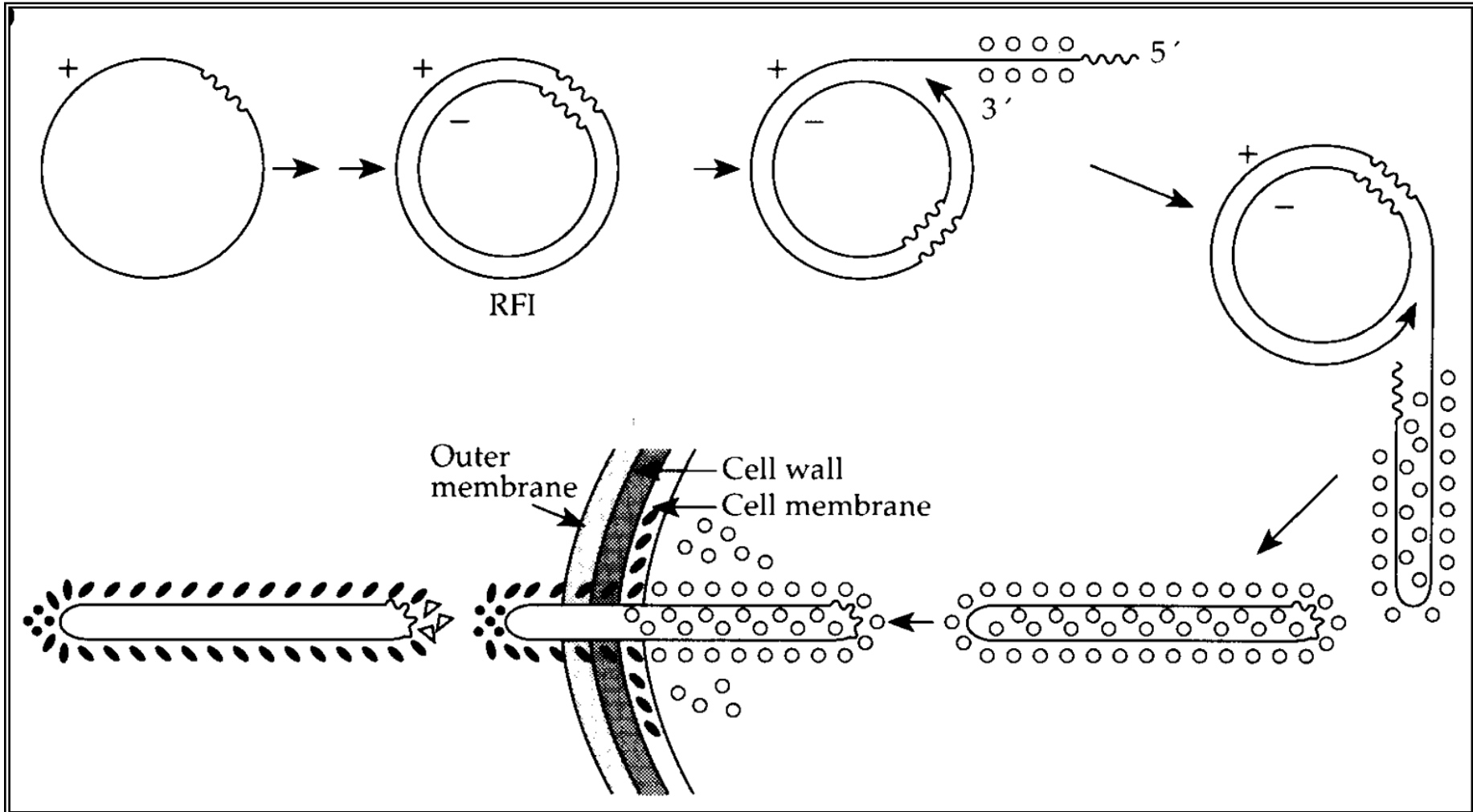


ssDNA bakteriofágy

□ **Bakteriofág M13**

- druhá třída - filamentní fágy
 - kapsida a cylindr, který tvoří filament, je tvořen z 2700 kopií produktu genu 8
 - jeden konec fága je tvořen proteiny z genu 7 a 9,
 - druhý konec je tvořen produkty genu 6 a 3.
 - cirkulární genom, 6,4 kbp, nemá překrývající se geny
- infekce *E. coli* prostřednictvím pilusů (male specific phages)
- do buňky vstupuje celý fág a kapsida je degradována hostitelem, degradační proteiny jsou využity zpětně k tvorbě nových virionů
- životní cyklus
 - po kompletaci fága nedochází k lysi buňky, ale viriony jsou extrudovány přes membránu
 - proces je kontinuální a během jednoho cyklu je vytvořeno asi 1000 virových částic
 - v infikovaných buňkách se udržuje vždy 100 kopií RF DNA a je děděna při dělení buněk
 - v nové buňce se chová jako multikopiový plazmid a replikuje se do dovršení výchozího množství kopií (100)

Bakteriofág M13



Mechanismus infekce ssDNA fágy

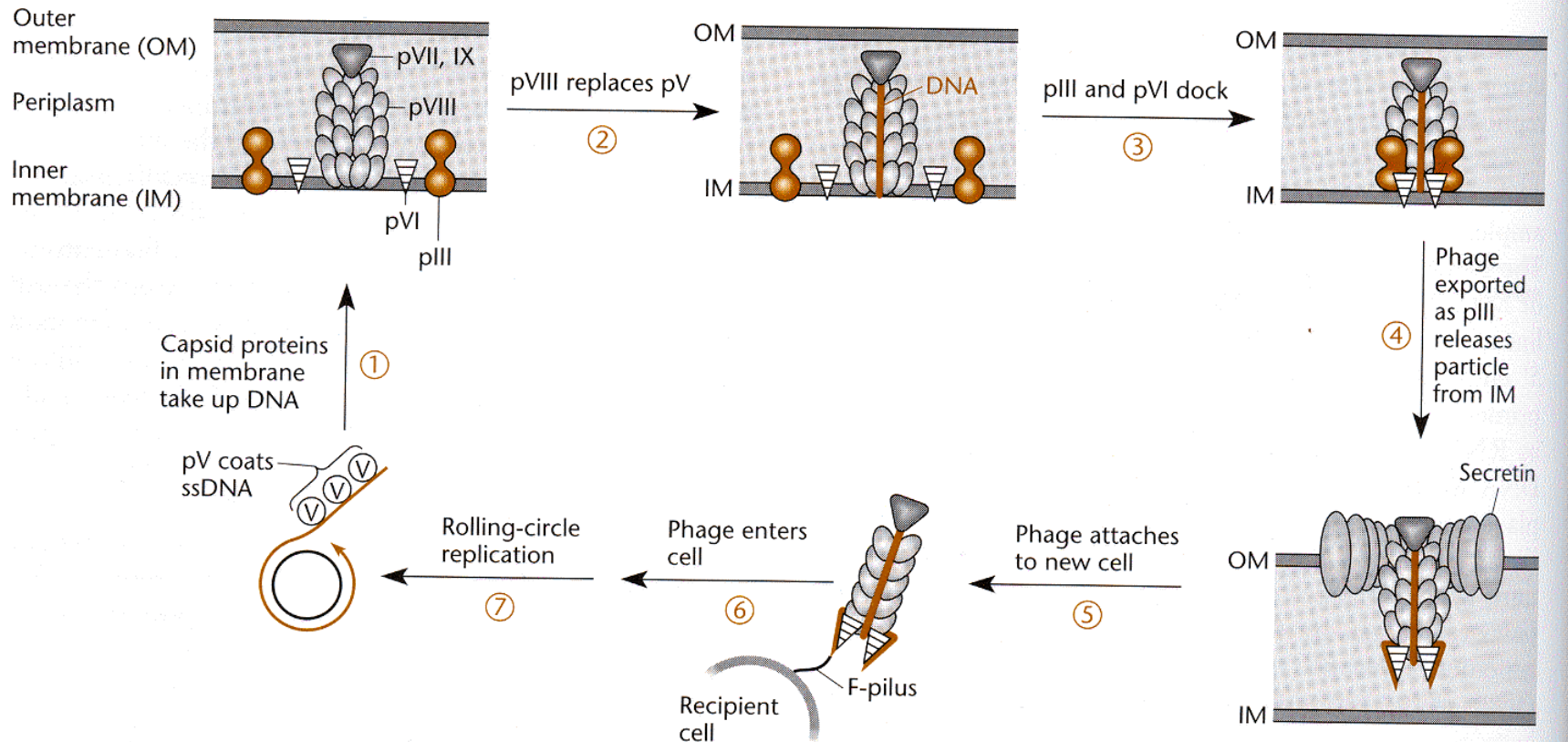


Figure 7.10 Infection cycle of the single-stranded DNA phage f1. Steps 1 through 7 show the encapsidation of phage DNA as it is secreted through the membrane pore formed by the pIV secretin to release the phage and infect a new cell. Details are given in the text. ssDNA, single-stranded DNA.

Fágy jako vektory – M13

□ Klonovací vektory – ssDNA

- Filamentózní fág, nemá fixní délku DNA, možnost klonovat cizí DNA
- Možnost transfekce RF formy (replicative form) – transformace fágové DNA
- Orientace fragmentu udává, které vlákno bude ve fágovi

■ Klonování

■ Vytváření ssDNA templátu na proby

■ Phage display – peptidy – studium protilátek

■ Site-specific mutageneze

- První aplikace místně specifické mutageneze
- Mutovaný gen se klonuje do M13 vektoru (M13mp18)
- Vytvoří se oligonukleotid komplementární s mutovanou částí a obsahující příslušnou mutaci a hybridizuje se s plazmidem
- Pomocí DNA polymerasy a oligonukleotidu jako primeru se dotvoří druhé vlákno DNA a liguje se do kruhu
- Transfekce do buněk – polovina plaků bude obsahovat mutovanou DNA
- Potvrzení hybridizací, sekvenací

Fágy jako vektory – T7

□ **Expresní vektory založené na T7 fágu:**

- pET (plasmid expression T7) – exprese genů v *E. coli*
 - T7 RNA polymerasa
 - T7 promoter 10 genu – protein hlavy - nejsilnější ze známých promotorů
 - Translační fúze s afinitními tagy – usnadnění izolace – His tag
 - Indukovatelnost T7 RNA polymerasy – pod lac promotorem

□ **Substráty pro RNA sondy a procesní pochody:**

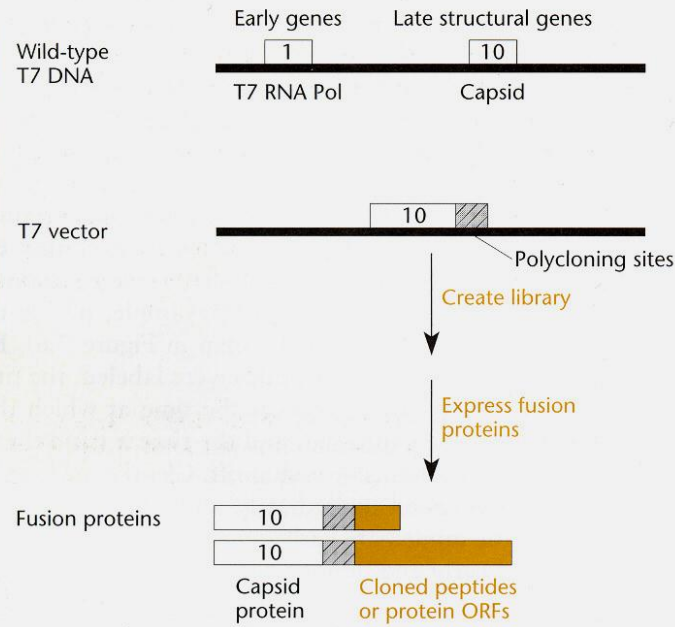
- Příprava RNA templátu pro přípravu RNA hybridizačních prob
- Substráty pro procesní pochody jako RNA splicing
 - Provádí se in vitro s přidanou RNA polymerasou na linearisovaném plazmidu
 - Vytvoří se komplementární vlákno mRNA ke klonovanému genu

□ **Phage display:**

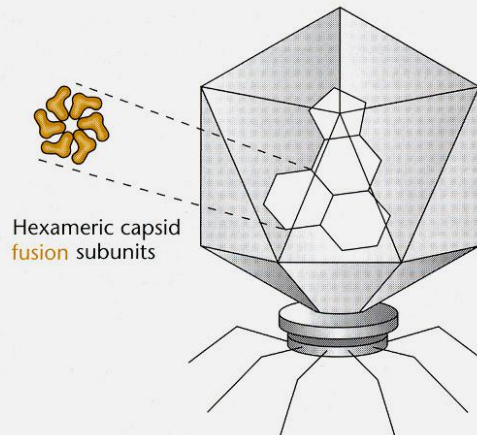
- Studium interakcí proteinu s další cílovou molekulou
 - Fuse klonovaných proteinových ORFs s proteinem hlavy fága
 - Fusované proteiny se stanou součástí povrchu fága
 - Nechájí se interagovat s cílovou molekulou – protein, DNA, RNA
 - Neinteragující se odmyjí interagující se nechají namnožit a znova se nechají interagovat s cílovou molekulou.
 - Výsledný jeden klon fága se sekvenuje
 - Může být použit jakýkoliv fág – T7 – nejlépe prozkoumaný

Phage display

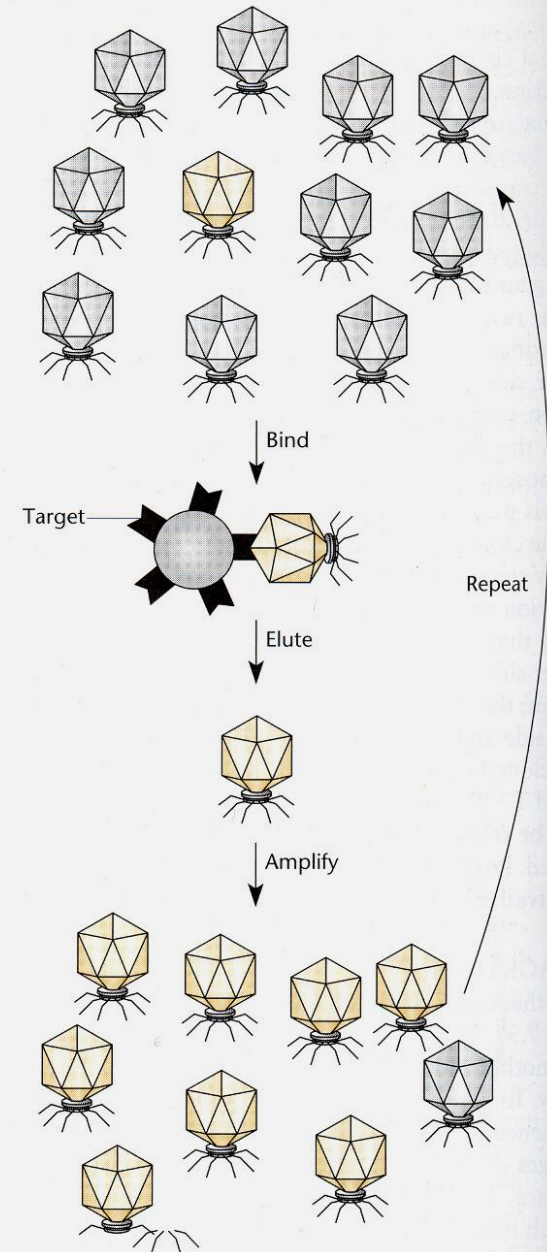
A Cloning proteins to be "displayed"



B T7 "display" phage particle



C "Panning"



Fágy jako vektory – λ

□ Klonovací vektory

- Vytvoření mnoha kopií – vysoký výtěžek DNA nebo proteinů
- Možnost exprese toxických proteinů
- Snadné uchovávání knihoven

□ Cosmidy

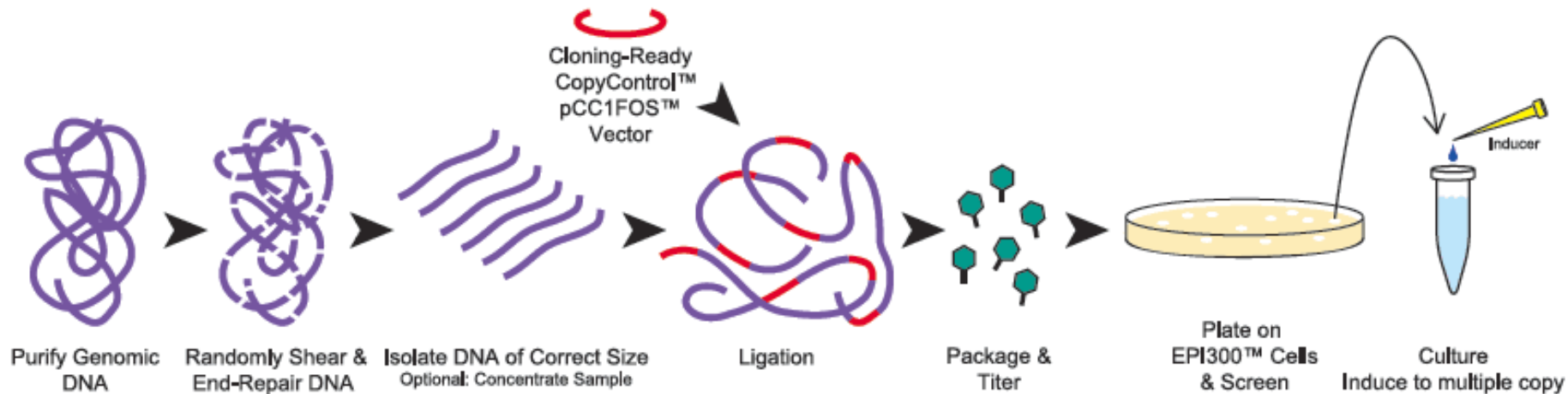
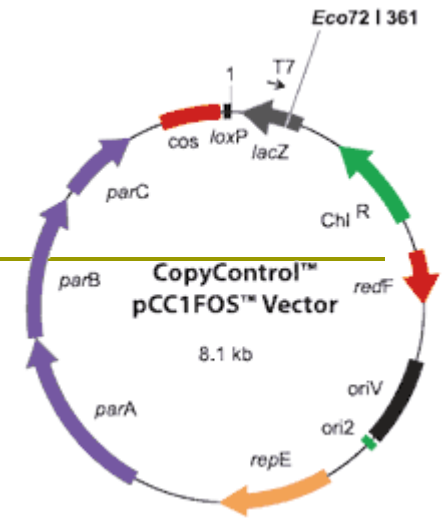
- Plazmidy obsahující *cos* místa
- Využití *cos* sekvencí k *in vitro* „pakování“ virů
- Smíchání cosmidové DNA s buňkami infikovanými λ fágem
 - Zabalení cosmidové DNA do fágových partikulí
 - Reinfekce recipienta
 - Efektivnější než transformace nebo transfekce
- Vytvoření knihoven se stejně dlouhými úseky DNA
- Vytváření specifických mutant

□ Lysogenní vektory

- Některé klonovací vektory se mohou integrovat
- Duplikace genů – komplementační studie
- Záměna genů, deletované *attP* místo

Využití - klonování

- Tzv. fosmidy –
 - kombinace plazmidů a fágů
 - pakování in vitro
 - Vytváření chromosomálních knihoven
 - Stejně dlouhé fragmenty
 - Může být i degradovaná chDNA – blunt end cloning



Viry archaea

□ dsDNA viry

- Rozdílné jak v morfotypech i vlastnostech genomu
- Většina charakterizovaných - infekce hypertermofilů
- 40 virových druhů

□ Klasifikace a morfologie

- Podle tvarů virionů
- Velká diversita – rozdílná od virů bakterií i eukaryot

Morfologie a klasifikace

- Tyčky a filamenta
 - Rudoviridae
 - Lipothrixviridae
- Vřetenovité
 - Fuselloviridae
- Kapkovitého a lahvovitého tvaru
 - Guttaviridae
 - Ampullaviridae
- Sférického a ikozahedrického tvaru
 - Globuloviridae
- Hlavička bičík
 - Myoviridae

Vřetenovité

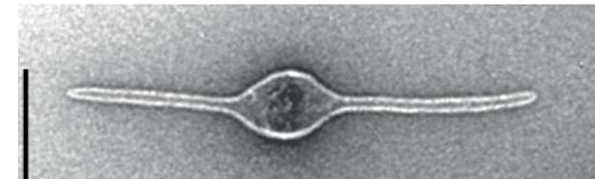
□ Fuselloviridae

- Asociované s hypertermofily a halofily
- Uprostřed rozšířený tvar na konci zakončené 1-2 bičíky
- Velikost 55 x 88 nm
- Složení obalu je neznámé – obsahují lipidy hostitele
- Sekvence transkripčních promotorů podobná eukaryotickým
- Kruhová DNA , pozitivně supercoiled
- Funkční integráza, integrace preferenčně do tRNA genů
- Nelyzují hostitele
- Replikace virové DNA je indukovaná UV, mitomycin A
- Většina genů je transkribována konstitutivně



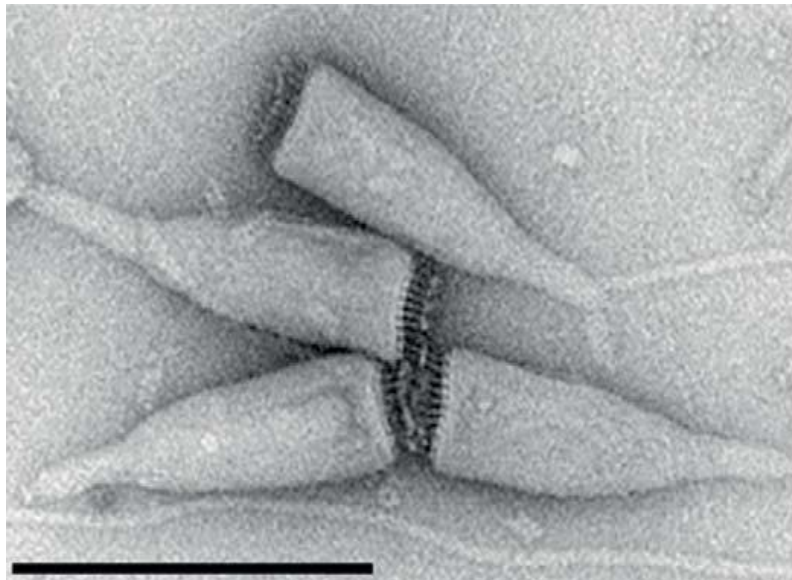
□ Acidianus

- Dva ocásky
- Změna morfologie po opuštění hostitele - maturace ocásků



Kapkovitého a lahvovitého tvaru

- Délka 230 nm, šířka 4 nm na úzkém konci, 75 nm na širokém
 - Tvar způsobený obalem virionu z prstencově stočeného nukleoproteinu
- Lineární genom
 - Neintegruje se do chromosomu
 - Replikace vireově kodovanou polymerázou, primer – proteinem připojeným na konec DNA



Tyčky a filamenta

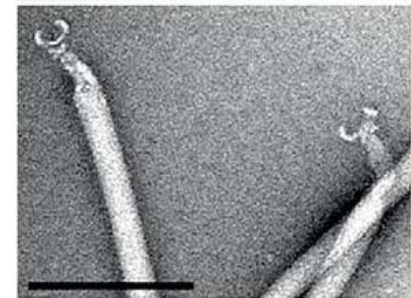


□ Rudiviridae

- Infikují hypertermofily – *Sulfolobus*, *Acidianus*
 - Lineární dsDNA s koncovými invertními repeticemi (0,5 – 2 kb)
 - Nehybné tyčky bez obalu – široké 23 nm, dlouhé 600-900nm
 - Virionové tělo je z nukleoproteinu – dsDNA a jeden obalový protein

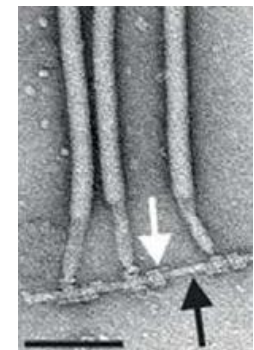
□ Lipothrixviridae

- Složitější obal –
 - dva DNA vazebné proteiny, lipidy hostitele
 - Diversita terminálních struktur
 - Podílejí se na adsorpci na hostitele – mop like struktura



□ Nelyzují buňky –

- přetrvávají v buňkách –
 - rovnováha mezi dělením buněk a replikací fága
 - Není indukce UV, mytomicinem
- Neintegrují se do chromosomu



Sférického a ikozahedrického tvaru

□ Sfěrické

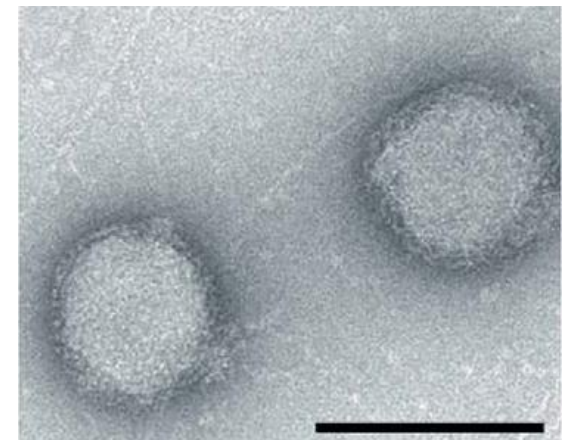
■ Čtyři druhy popsané

- Obalené, 100 nm v průměru, s sférickými výčnělky
- Lineární dsDNA s 190 bp ITR

□ Ikozahedrání

■ Neobalené, lipidy obsahující vrstva, bez bičků

- Morfologicky podobné bakteriálním Tectoviridae
- Krystalová struktura obalového proteinu podobná též Tectoviridae



Hlavička a bičík

- Polyhedrální hlavička a kontraktilní bičík
- Infikují metanogeny a halofily
 - Podobné bakteriofágům – myoviridae – Φ H, Φ Ch1
 - Replikace lytickým cyklem – 170 partikulí
 - Vytvářejí pravé lysogeny –
 - Φ Ch1 se integruje
 - Φ H přetrvává v cyklické formě
 - Při replikaci se vytvářejí konkatamery,
 - pac místa, mechanismus plné hlavy - relativně nespecifický
 - Genom je vysoce variabilní
 - Duplikace, inverse, obsahují invertovatelné oblasti
 - Transkripce je časovaná



Archaea - Genetické přístupy

1. Většina archaea vyžadují extrémní růstové podmínky
 - Není růst v koloniích
 - Klonování
 - Screening mnoha klonů
 - Jiná stavba buněk
 - Nefungují antibiotika působící na bakteriální buněčnou stěnu
2. Transkripce a translace více podobná eukaryím
 - Markery a plazmidy používané v bakteriální genetice nejsou transkribovány a translatovány – nereplikují se

Archaea - Genetické přístupy

1. Nové systémy – posledních 20 let

- Fúze archaea promotorů s rekombinantními geny
- Isolace archaea plazmidů –
 - příprava podvojných plazmidů
- Kultivační podmínky umožňující růst v koloniích
 - Halofilní euryarcheota – standartní agarové plotny s přídavkem 12-25% NaCl a Mg⁺
 - Anaerobní methanogeny – přísně anaerobní podmínky – v uzavřených boxech – standartní agar
 - Hypertermofilní metanogeny – speciální nádobí i komponenty pevných médií
- Typické systémy pro transfer genů
 - Pružný parakrystalický protein a glycoproteinová S- vrstva
 - Rigidní formy obsahující pseudomureinovou monovrstvu
 - heteropolysacharidová vrstva s chemickými vlastnostmi chondroitinu

Archaea - Genetické přístupy - transformace

- Systémy pro S - vrstvu -
 - Příprava sféroplastů -
 - rozrušení S vrstvy přidavkem EDTA
 - Transformace
 - Regenerace sféroplastů přidáním divalentních kationtů
- Rigidní buněčná stěna – Methanosarcina
 - Růst v nízkých koncentracích solí – jednovrstevný růst – sféroplasty jako u S –vrstev
 - Methanothermobacter – pseudomurein
 - Sféroplasty inkubací s pseudomurein endopeptidasou

Table 2. Gene transfer methods for archaea

Type	Method	Species	Reference
Transformation	Polyethylene glycol (PEG)-mediated	<i>Haloferax volcanii</i> , <i>Haloarcula</i> spp., <i>Halobacterium</i> spp., <i>Methanococcus</i> <i>maripaludis</i> , <i>Pyrococcus abyssi</i>	24–26, 67, 109
		<i>Methanococcus voltae</i> , <i>Sulfolobus</i> spp.	22, 83, 98
	Electroporation	<i>Methanosarcina</i> spp.	73
	Liposome-mediated	<i>Methanosarcina</i> spp.	73
Transduction	CaCl ₂ with heat shock	<i>Sulfolobus solfataricus</i> , <i>Pyrococcus furiosus</i>	2
	ΨM1-mediated	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	71
Conjugation	Cell mating	<i>Haloferax volcanii</i> , <i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	39, 92
	Plasmid mediated	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	97

Archaea - Genetické přístupy

- **Markery – vybrány z archaea i bakterií**
 - **Halofily – většina heterologních proteinů je denaturována**
 - Mevinolin - rezistence k 3-hydroxyl-3methyl glutaryl koenzymu A reduktáze inhibitoru – inhibuje syntézu isoprenoidní lipidickou část řetězce u archaea
 - Novobiocin – rezistence ke gyrase inhibitoru
 - Anisomycin, sparsomycin, thiostrepton – inhibitory proteinů
 - Spontáně izolované mutanty rezistentní k 5-fluoroorotic kyselině
 - Auxotrofní mutanty – histidin, leucin, thymidin, tryptofan
 - **Metaogeny – jsou sensitivní k antibiotikům které inhibují syntézu proteinů**
 - Puromycin, neomycin, pseudomycin
 - Puromycin transacetylase ze *Streptomyces alboniger* –
 - rezistence k puromycinu
 - Promotor z methyl coenzym M reduktázy z *Methanosarcina*
 - Spontání mutace v isoleucin t-RNA –rezistence k pseudomycinu
 - **Hypertemofily**
 - Hygromycin – hygromycin fosfotransferáza z *E. coli* s promotorem pro *S. solfataricus* aspartát aminotransferáza

Archaea - Genetické přístupy

- Vektory –
 - halofily, metanogeny a nemetanogenní hypertermofily
 - Podvojně plazmidy – *E. coli*
- Halofily
 - pHV2 – miniplazmid – 2 ori (pHV a R6K), mevinolin, ampicilin
- Metanogeny
 - pC2A - 2ori – pV2A a ColE1) puromycin, ampicilin
- Hypertermofily
 - pGT5 –
 - pEXSs – ori z fága SVV1 - hygromycin

Archaea - Genetické přístupy

- Nespecifická mutageneze –
 - UV a chemicky – snadná izolace x obtížná lokalizace
 - Transpozony –
 - mariner deriváty se selekcí a ori archaea i *E. coli*
 - Lokalizace – restrikce chromozomu a ligace do *E. coli* plazmidů
 - Tepelný šok, fixace dusíku, struktura buněčné stěny

Archaea - Genetické přístupy

Knock out systémy

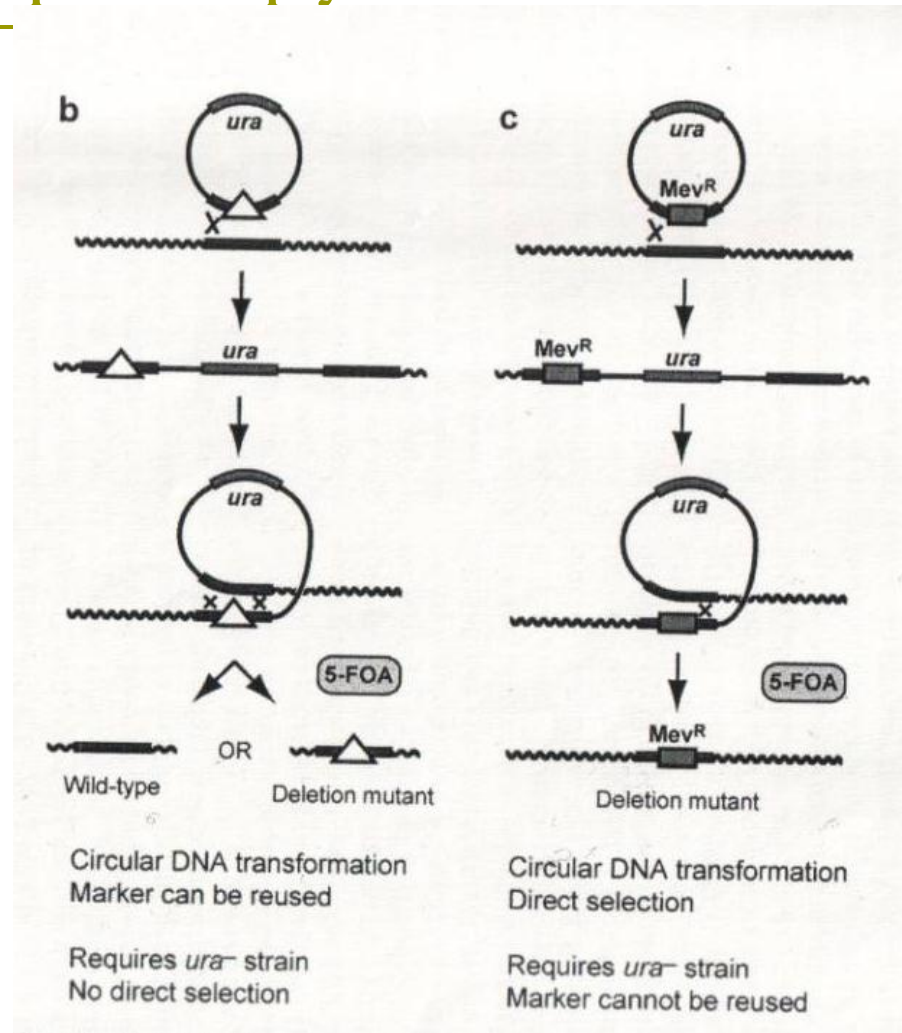
Dvoustupňový systém –

Transformace
nereplikujícího se
cirkulárního plazmidu
Ztráta markeru

Halofilní bakterie –

obnovení uracilové
auxotrofie - vyžaduje
ura auxotrof

Mevinolin – *mevR* –
přímá selekce



Archaea - Genetické přístupy

- Reportérové geny –
 - Halofilní bakterie - salt tolerantní β – galaktozidáza
 - Modifikovaný derivát GFP
 - Bakteriorodopsin – bop gen na plazmidu v bop- mutantu
 - purpurové zbarvení kolonií
 - Metanogenní bakterie –
 - β – galaktozidáza, β – glucuronidaza z E. coli
 - Trehaláza – Bacillus subtilis
 - Vždy archaea promotory a terminátory