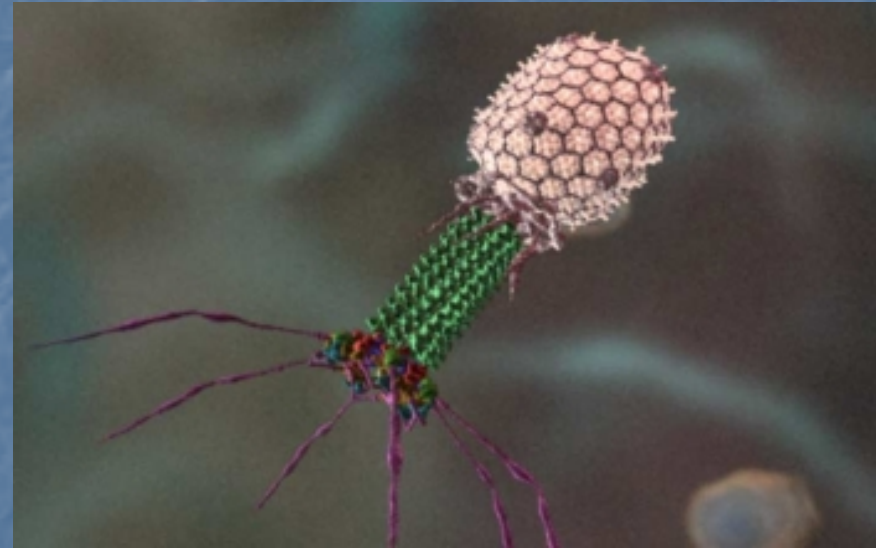


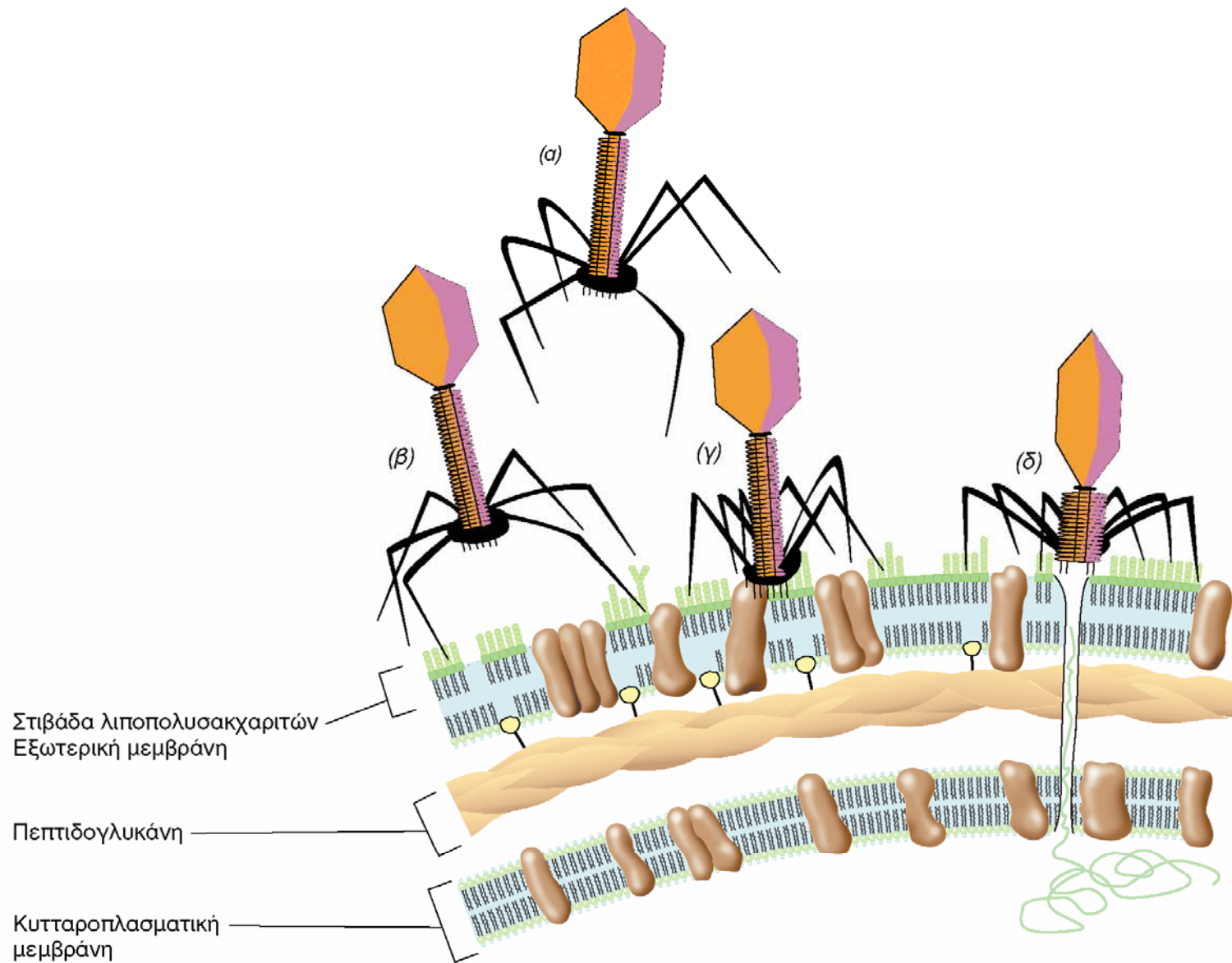
Επισκόπηση των βακτηριακών ιών (βακτηριοφάγων ή φάγων)

- Οι ιοί των βακτηρίων εμφανίζουν μεγάλη ποικιλότητα και προσβάλλουν τόσο Βακτήρια όσο και Αρχαία. Οι καλύτερα μελετημένοι βακτηριοφάγοι προσβάλλουν βακτήρια της γαστρεντερικής ομάδας.
- Το γενετικό υλικό των φάγων μπορεί να είναι μονόκλωνο, δίκλωνο DNA ή RNA αλλά αυτοί με δίκλωνο DNA έχουν μελετηθεί περισσότερο
- Η μελέτη των φάγων οδήγησε στην κατανόηση βασικών εννοιών του ιϊκού πολλαπλασιασμού και στην χρήση τους ως εργαλείων γενετικής μηχανικής
- Υπάρχουν 2 διαφορετικοί βιολογικοί κύκλοι φάγων: ο επιθετικός και ο ήπιος τους οποίους θα εξετάσουμε εν συντομία

T4: Ένας επιθετικός φάγος

- Το ιόσωμα του φάγου T4 αποτελείται από μία εικοσαεδρική κεφαλή που συνδέεται με μία πολύπλοκη ουρά. Η ουρά αυτή αποτελείται από έναν ελικοειδή σωλήνα στον οποίο συνδέεται μία θήκη, ένας λαιμός με περιλαίμιο και μία σύνθετη τελική πλάκα όπου προσαρτώνται επιμήκη αρθρωτά ουραία ινίδια. Συνολικά το ιόσωμα διαθέτει πάνω από 25 τύπους πρωτεϊνών

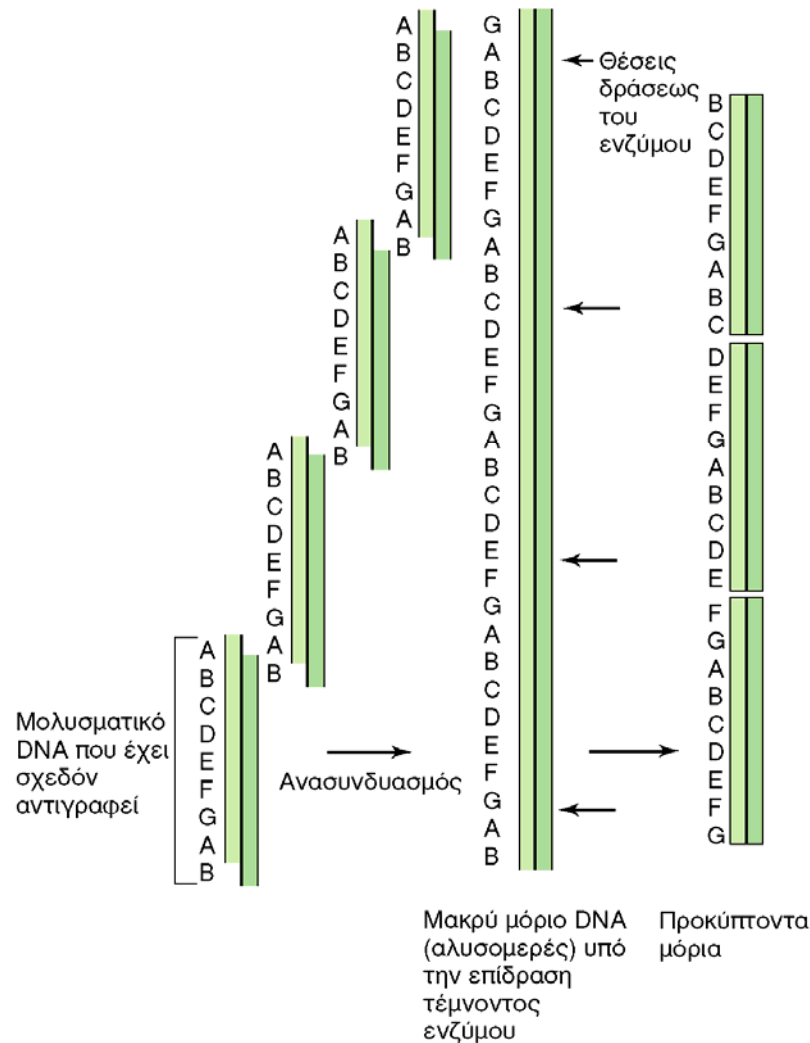




Εικόνα 9.10 Προσκόλληση του ιοσώματος του βακτηριοφάγου T4 στο κυτταρικό τοίχωμα της *Escherichia coli*, και διείσδυση του DNA του φάγου. (a) Μη προσκολλημένο ιόσωμα. (β) Προσκόλληση στο τοίχωμα μέσω της αλληλεπίδρασης των μακρών ουραιών ινιδίων με τον πυρήνα του λιποπολυσακχαρίτη της εξωτερικής μεμβράνης. (γ) Επαφή του κυτταρικού τοιχώματος με τις ακίδες στο άκρο του κορμού της ικκής ουράς. (δ) Συστολή της θήκης του ουραιοί στελέχους και διείσδυση του DNA. Για λεπτομέρειες σχετικά με τα κυτταρικά τοιχώματα των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, βλ. Τμήμα 4.9.

Γονιδίωμα του T4

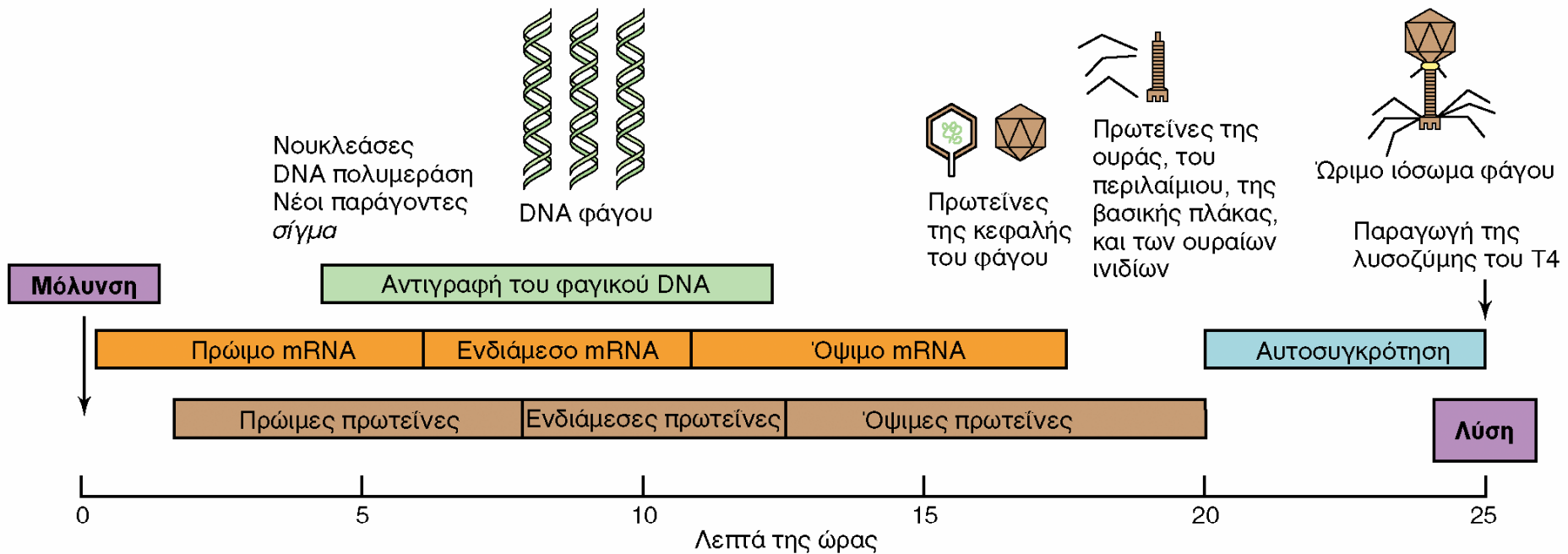
- Αποτελείται από δίκλωνο γραμμικό μόριο DNA αποτελούμενο από περίπου 170 Kb και κωδικοποιεί περισσότερες από 250 πρωτεΐνες
- Η αλληλουχία του γονιδιώματος προσδιορίστηκε πλήρως αλλά στην πραγματικότητα το γονιδίωμα κάθε μεμονωμένου ιοσώματος διαφέρει από τα υπόλοιπα. Το DNA των ιοσωμάτων έχει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες σε κάθε άκρο μήκους 3-6 Kb που μπορούν να ανασυνδυαστούν. Ο μηχανισμός συσκευασίας του DNA στο ιόσωμα γίνεται με απότμηση του από ένα μακρύ μόριο το οποίο περιέχει αρκετά ισοδύναμα του γονιδιώματος τα οποία συνδέονται σε σειρά συγκροτώντας ένα αλυσομερές (concatamer)
- Η απότμηση από το αλυσομερές γίνεται όταν γεμίσει η κεφαλή του ιοσώματος ανεξάρτητα από το ακριβές μήκος του μορίου που προκύπτει
- Χαρακτηριστικό του DNA είναι ότι περιέχει την τροποποιημένη βάση 5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνη. Η θέση της υδροξυμεθυλομάδας υφίσταται γλυκοζυλίωση προστατεύοντας το από τα ένζυμα περιορισμού



Εικόνα 9.13 Παραγωγή μορίων DNA μικρού μήκους στον T4, με κυκλικά παραλλαγμένες αλληλουχίες. Αυτές οι αλληλουχίες δημιουργούνται με την αποτμητική δράση ενός ενζύμου, το οποίο τέμνει σταθερά μήκη του DNA ανεξάρτητα από την αλληλουχία βάσεων που περιέχονται σε αυτά. Αριστερά: σχεδόν πλήρη αντίτυπα του μολύνοντος γονιδιώματος του T4. Βέλος αριστερά: ανασυνδυασμός (🔗 Τμήμα 10.5). Βέλη στο μέσο: θέσεις δράσεως του ενζύμου· βέλος δεξιά: τα προκύπτοντα μόρια DNA, μήκους ενός μικρού γονιδιώματος το καθένα.

Τα επιμέρους συμβάντα κατά τη μόλυνση με T4

- Στην αρχή της μόλυνσης ο T4 κατευθύνει την σύνθεση του RNA, των πρωτεϊνών του και στην συνέχεια την αντιγραφή του δικού του DNA.
- Ένα λεπτό της ώρας μετά την έναρξη της μόλυνσης αναστέλλει τον μεταβολισμό του ξενιστή (σύνθεση DNA, RNA και πρωτεϊνών) και ξεκινά η μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων του φάγου. Η μετάφραση αυτών των πρωτεϊνών ξεκινά λίγο αργότερα και μέσα σε 4 λεπτά αρχίζει και η αντιγραφή του DNA του φάγου.
- Τα γονίδια του T4 μπορούν να διαιρεθούν σε 3 ομάδες ανάλογα με τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούν: τις πρώιμες, τις ενδιάμεσες και τις όψιμες. Οι δύο πρώτες είναι τα ένζυμα που συμμετέχουν στην αντιγραφή και μεταγραφή του DNA. Οι όψιμες είναι οι πρωτεΐνες της κεφαλής και της ουράς καθώς και τα ένζυμα που βοηθούν την απελευθέρωση των ιοσωμάτων από τον ξενιστή



Εικόνα 9.15 Η χρονική σειρά των συμβάντων κατά τη μόλυνση με φάγο T4. Αμέσως μετά τη διείσδυση του DNA παράγονται οι πρώιμες και οι ενδιάμεσες πρωτεΐνες που κωδικοεύουν τις νουκλεάσες, την DNA πολυμεράση, τους νέους T4-ειδικούς παράγοντες *σ* τους οποίους επάγει ειδικά ο εισαχθείς φάγος, και διάφορες άλλες πρωτεΐνες που αφορούν την αντιγραφή του φαγικού DNA. Τα όψιμα mRNA κωδικοεύουν τις δομικές πρωτεΐνες του φαγικού ιοσώματος, καθώς και τη λυσοζύμη του T4 που απαιτείται για τη λύση του ξενιστικού κυττάρου και την απελευθέρωση των νεοπαραχθέντων φαγικών ιοσωμάτων.

Ο T4 τροποποιεί την RNA πολυμεράση του ξενιστή

- Παρόλο που ο T4 έχει μεγάλο γονιδίωμα δεν κωδικοποιεί την δική του RNA πολυμεράση αλλά χρησιμοποιεί την πολυμεράση του ξενιστή την οποία σταδιακά τροποποιεί ώστε να αναγνωρίζει υποκινητές του φάγου και όχι πλέον του ξενιστή. Τα πρώιμα γονίδια του φάγου διαβάζονται απευθείας από την πολυμεράση του ξενιστή με την χρήση ξενιστικών παραγόντων σίγμα. Οι πρώιμες πρωτεΐνες του φάγου τροποποιούν την υπομονάδα α της ξενιστικής πολυμεράσης ώστε να αναγνωρίζει πλέον τους υποκινητές των ενδιάμεσων γονιδίων του T4. Τα όψιμα γονίδια του T4 προκειμένου να μεταγραφούν απαιτούν την σύνθεση ενός νέου παράγοντα σίγμα από τον φάγο.

T4 πρωτεΐνες

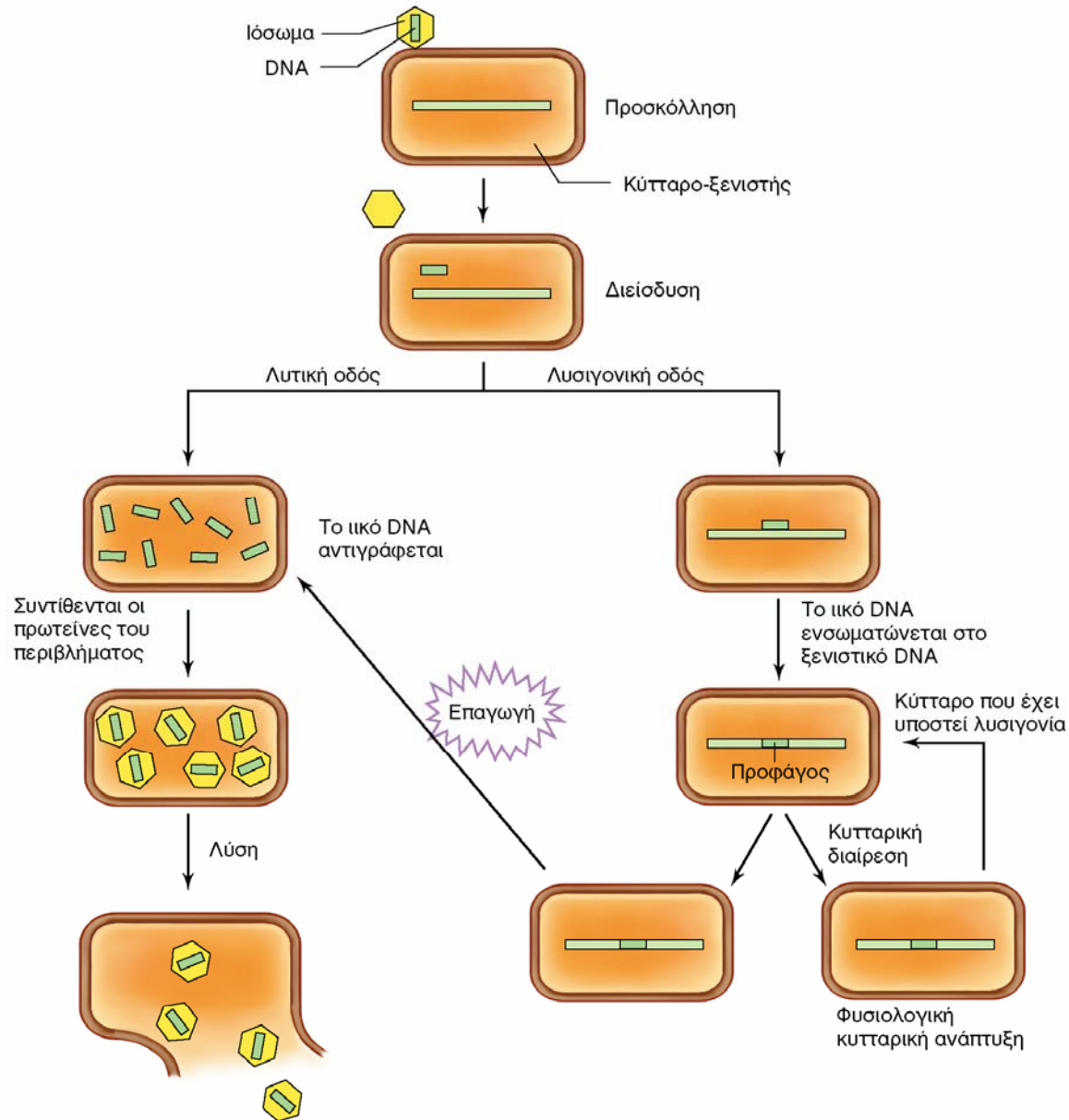
- Περισσότερες από 250 πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από τον T4. Περίπου το ένα τέταρτο αυτών συμμετέχει στην σύνθεση και την επεξεργασία του DNA του φάγου. Κάποιες είναι νουκλεάσες που καταστρέφουν το DNA του ξενιστή προκειμένου να παραχθούν δομικά υλικά για το DNA του ιού
- Άλλες είναι δομικές πρωτεΐνες του ιοσώματος. Η κεφαλή και η ουρά συγκροτούνται ανεξάρτητα η μία από την άλλη. Το DNA του φάγου συσκευάζεται στην κεφαλή ενώ η ουρά και τα ουραία ινίδια προστίθενται αργότερα.
- Προκειμένου να απελευθερωθούν τα ιοσωμάτια ο φάγος επάγει την σύνθεση λυσοζύμης. Ο λυτικός κύκλος διαρκεί συνολικά 25 λεπτά και πάνω από 100 ιοσωμάτια απελευθερώνονται από τον κατεστραμμένο ξενιστή

Ήπιοι Φάγοι

- Οι ήπιοι φάγοι διακρίνονται από την ικανότητα τους να εισέρχονται σε μία κατάσταση που λέγεται λυσιγονία. Στην λυσιγονία τα περισσότερα γονίδια του φάγου δεν εκφράζονται αλλά το γονιδίωμα του φάγου ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα του ξενιστή και αντιγράφεται με αυτό
- Τα βακτήρια που επιτρέπουν το φαινόμενο αυτό λέγονται λυσιγόνα και κάτω από κάποιες συνθήκες μπορούν αυθόρμητα να παράγουν εκ νέου ιοσωμάτια.
- Η λυσιγονία έχει οικολογική σημασία δεδομένου ότι τα περισσότερα βακτήρια στην φύση είναι λυσιγόνα για έναν ή περισσότερους φάγους.
- Η λυσιγονία δεν παρατηρείται μόνο στους φάγους αλλά και σε πολλούς ιούς των ζώων

Επισκόπηση του βιολογικού κύκλου ενός ήπιου φάγου

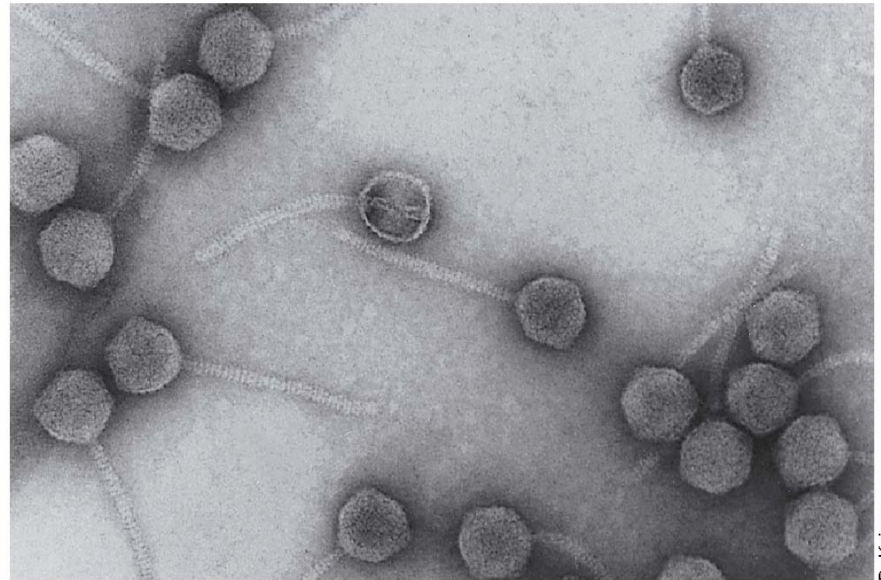
- Η μόλυνση ενός βακτηρίου από έναν φάγο δεν προκαλεί την καταστροφή του. Ούτε καν η αντιγραφή του γονιδιώματος του φάγου καταστρέφει το βακτήριο. Το καταστροφικό γεγονός είναι η **έκφραση** του γονιδιώματος του φάγου. Άρα αν το βακτήριο καταφέρει να ελέγξει την έκφραση του ιϊκού γονιδιώματος δεν υπάρχει καταστροφή του.
- Οι ήπιοι φάγοι βρίσκονται μέσα στον ξενιστή σε μια λανθάνουσα μορφή που λέγεται **προφάγος**. Ο προφάγος ενσωματώνεται στο βακτηριακό χρωμόσωμα και τα γονίδια του δεν εκφράζονται λόγω μίας ειδικής κατασταλτικής πρωτεΐνης του φάγου. Η κατασταλτική αυτή πρωτεΐνη ελέγχει την έκφραση οποιουδήποτε εισερχόμενου γονιδιώματος του ίδιου φάγου προκαλώντας **ανοσία** του ξενιστή
- Αν όμως απενεργοποιηθεί ο καταστολέας ή παρεμποδιστεί η σύνθεση του τότε ο προφάγος εισέρχεται στον λυτικό κύκλο



Εικόνα 9.16 Οι συνέπειες της μόλυνσης από έναν ήπιο Βακτηριοφάγο. Οι δύο εναλλακτικές οδοί της μόλυνσης είναι είτε η αντιγραφή και απελευθέρωση του ώριμου ιού (λύση) είτε η ενσωμάτωση του ιικού DNA στο ξενιστικό DNA (λυσιγονία). Υπό ορισμένες συνθήκες, πάντως, μπορεί και το λυσιγονικό κύτταρο να οδηγηθεί στην παραγωγή ώριμων ιών και στη λύση.

Λάμδα: Ένας ήπιος φάγος

- Ίσως ο καλύτερα μελετημένος ήπιος φάγος είναι ο λάμδα που μολύνει την *Escherichia coli*.
- Το γονιδίωμα του αποτελείται από ένα γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA που έχει στο 5' άκρο κάθε κλώνου μία μονόκλωνη ουρά 12 νουκλεοτιδίων. Αυτές οι ουρές είναι συμπληρωματικές, έτσι όταν τα δύο άκρα του DNA του φάγου βρεθούν ελεύθερα μέσα στο βακτήριο ζευγαρώνουν και το γονιδίωμα μετατρέπεται σε ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο



D. Kaiser

Εικόνα 9.17 Ο βακτηριοφάγος λάμδα, όπως φαίνεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετά από αρνητική χρώση. Η κεφαλή κάθε ιοσώματος έχει διάμετρο περίπου 65 nm.

Μόλυνση με τον λάμδα και η λυτική οδός

- Το ιοσωμάτιο του λάμδα προσκολλάται σε έναν ειδικό πρωτεϊνικό υποδοχέα της *Escherichia coli* και το DNA διοχετεύεται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Αμέσως το DNA κυκλοποιείται και αν το βακτήριο δεν είναι λυσιγονικό αρχίζει η έκφραση του γονιδιώματος
- Η μεταγραφή του RNA γίνεται με τη χρήση της RNA πολυμεράσης του ξενιστή. Από τα πρώτα μεταγραφήματα προκύπτουν οι πρωτεΐνες N και Cro που συμμετέχουν στην γονιδιακή ρύθμιση. Η πρωτεΐνη Cro συμμετέχει στην διαδικασία επιλογής μεταξύ λυσιγονίας και λυτικού κύκλου. Όταν παράγεται μεγάλη ποσότητα ο λάμδα ακολουθεί ανεπιστρεπτή τον λυτικό κύκλο.
- Μία άλλη πρωτεΐνη, η Q (***πρωτεΐνη αντιτερματισμού***) όταν υπερβεί κάποια ποσότητα επιτρέπει τη σύνθεση του μεταγραφήματος R2. Μετάφραση του R2 οδηγεί στην σύνθεση των όψιμων πρωτεϊνών δηλαδή στις απαραίτητες πρωτεΐνες για τη σύνθεση του ιοσωματίου και τη λύση του κυττάρου

Λυσιγονία

- 2 πράγματα πρέπει να συμβούν για να έχουμε λυσιγονία: να εμποδιστεί η παραγωγή όλων των όψιμων πρωτεϊνών και να ενσωματωθεί ένα αντίτυπο του γονιδιώματος του λάμδα στον χρωμόσωμα του ξενιστή
- Το γονίδιο *cI* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη (**καταστολέας του λ**) που καταστέλλει την σύνθεση των όψιμων πρωτεϊνών. Τα γονίδια *cII* και *cIII* κωδικοποιούν πρωτεΐνες που βοηθούν την έκφραση του καταστολέα *cI*
- Η ενσωμάτωση του DNA του λάμδα γίνεται πάντα σε μια συγκεκριμένη θέση του χρωμοσώματος. Η διαδικασία αυτή απαιτεί την παρουσία ενός εξειδικευμένου ενζύμου (ενσωματάση) που δρα στις θέσεις προσκόλλησης του DNA και κωδικοποιείται από το γονίδιο *int*. Ο υποκινητής του γονιδίου αυτού ενεργοποιείται από την πρωτεΐνη *cII*

Λυτική αύξηση του λάμδα μετά από επαγωγή

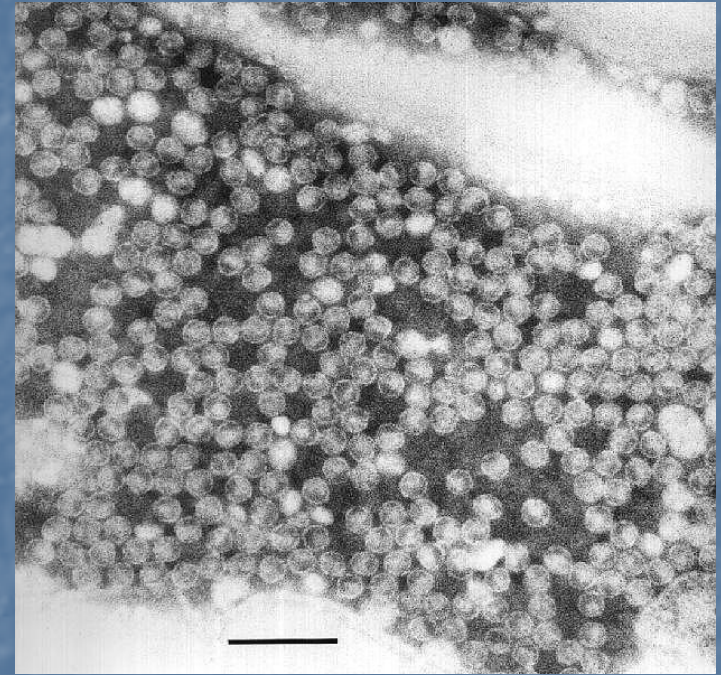
- Παράγοντες που καταστρέφουν το DNA επάγουν ένα λυσιγονικό ως προς τον λάμδα βακτήριο να εισέλθει τον λυτικό κύκλο. Η υπεριώδης ακτινοβολία, οι ακτίνες X και ορισμένες χημικές ενώσεις είναι τέτοιου είδους παράγοντες
- Μετά την καταστροφή του DNA ενεργοποιείται ένας αμυντικός μηχανισμός του βακτηρίου που λέγεται απόκριση SOS. Μία συστοιχία γονιδίων ενεργοποιείται και βοηθούν το βακτήριο να επιβιώσει.
- Μια βακτηριακή πρωτεΐνη που επάγεται με αυτόν τον τρόπο είναι η RecA. Η πρωτεΐνη αυτή μετατρέπεται σε ένα είδος πρωτεάσης που εκτός των άλλων καταστρέφει και τον καταστολέα του λάμδα (cI) με αποτέλεσμα την έκφραση των όψιμων γονιδίων του λάμδα και την έναρξη του λυτικού κύκλου

Μετατροπή φάγου

- Η φαινοτυπική αλλαγή του ξενιστή που επέρχεται μέσω λυσιγονίας από έναν ήπιο φυσικό ιό ονομάζεται **μετατροπή φάγου**
- Δύο περιπτώσεις μετατροπής φάγου έχουν μελετηθεί αναλυτικά: Η αλλαγή στην δομή ενός πολυσακχαρίτη της κυτταρικής επιφάνειας της *Salmonella anatum* και η μετατροπή μη τοξινοπαραγωγών στελεχών του *Corynebacterium diphtheriae* σε τοξινοπαραγωγά
- Η πληροφορία για τις αλλαγές αυτές σχετίζεται με το γονιδίωμα του φάγου κατά την διάρκεια της λυσιγονίας. Για αυτό τον λόγο η λυσιγονία έχει εξελικτική σημασία αφού οδηγεί σε σημαντική γενετική τροποποίηση του ξενιστή

RNA Φάγοι (MS2)

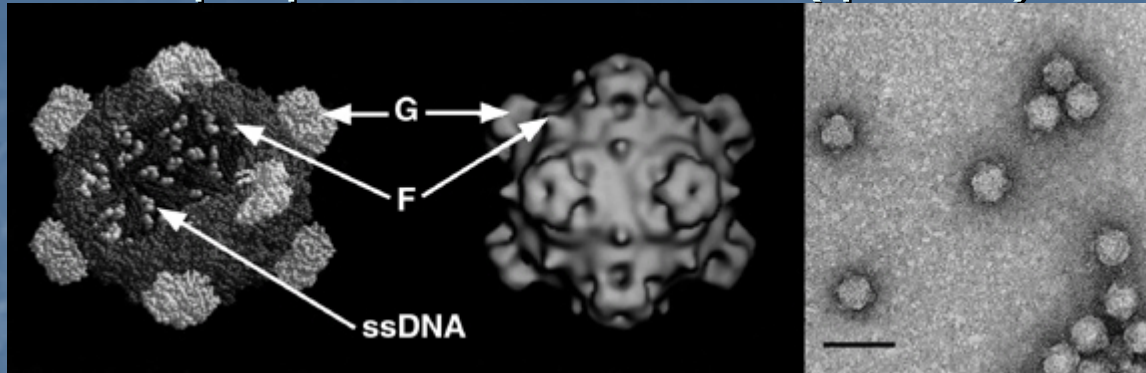
- Υπάρχουν φάγοι που το γονιδιώμα τους αποτελείται από μονόκλωνο RNA και προσβάλουν εντεροβακτήρια που περιέχουν **συζευκτικό πλασμίδιο**. Το πλασμίδιο αυτό επιτρέπει σε ένα βακτήριο να γίνει δότης γενετικού υλικού κατά την βακτηριακή σύζευξη.
- Οι φάγοι αυτοί είναι μικρού μεγέθους (26 nm) και εμφανίζουν εικοσαεδρική συμμετρία.



Πολλαπλασιασμός του MS2

- Το μικρό γονιδίωμα (3569 νουκλεοτίδια) του MS2 περιέχει 4 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια που κωδικοποιούν αντίστοιχες πρωτεΐνες, την πρωτεΐνη ωρίμανσης, καψιδίου, λύσης και την αντιγραφάση του RNA .
- Το RNA είναι «θετικό» δηλ. μπορεί να λειτουργήσει ως mRNA και να μεταφραστεί αμέσως. Το «θετικό» RNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο από την **RNA αντιγραφάση** για την σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου και αυτός εκ νέου για την σύνθεση ενός νέου «θετικού» κλώνου.
- Η πρωτεΐνη ωρίμανσης μπορεί να καταστείλει την σύνθεση της αντιγραφάσης και επιτρέπει έτσι την σύνθεση της πρωτεΐνης του καψιδίου
- Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γονίδιο της πρωτεΐνης λύσης το οποίο **αλληλεπικαλύπτεται** με το γονίδιο της πρωτεΐνης καψιδίου και την αντιγραφάση. Το φαινόμενο αυτό είναι συνηθισμένο σε πολύ μικρά γονιδιώματα και έχει εξελικτικές συνέπειες. Η συγκρότηση των ιοσωμάτων οδηγεί στην λύση του ξενιστή

Φάγοι μονόκλωνου DNA (φΧ174)



- Πολύ μικροί ιοί, μονόκλωνο κυκλικό γονιδίωμα DNA (5386 bp), εικοσαεδρικό ιοσωμάτιο. Χαρακτηριστική είναι η παρουσία αλληλοεπικαλυπτόμενων γονιδίων.
- Κατά την μόλυνση το μονόκλωνο DNA αποχωρίζεται από το καψίδιο και μετατρέπεται σε μια δίκλωνη μορφή (**αντιγραφικό ενδιάμεσο RF**) με την βοήθεια πρωτεϊνών του ξενιστή (DNA πολυμεράση, λιγάση, γυράση) Η αντιγραφή του RF γίνεται με τον **μηχανισμό κυλιόμενου κύκλου**
- Το αντιγραφικό ενδιάμεσο χρησιμοποιείται για την σύνθεση του mRNA το οποίο στην συνέχεια μεταφράζεται. Στην συνέχεια γίνεται συγκρότηση του ιού και λύση του ξενιστή (protein E)

Φάγος Μι: ένας μεταθετός ιός

- Ήπιος δίκλωνος DNA ιός, με την ασυνήθιστη ιδιότητα να αντιγράφεται ως μεταθετό στοιχείο. Προκαλεί μεταλλάξεις στο γονιδίωμα του ξενιστή καθώς απενεργοποιεί γονίδια του κατά την ενσωμάτωση του.
- Εργαλείο γενετικής μηχανικής, δημιουργία μεταλλαγμένων βακτηρίων.
- Σχετικά μεγάλο γονιδίωμα (39 κιλοβάσεις), αποτελείται από εικοσαεδρική κεφαλή, ουρά και 6 ουριαία ινίδια.
- Η ενσωμάτωση του στον ξενιστή γίνεται με την βοήθεια μιας μεταθετάσης και η αντιγραφή του γίνεται πάντοτε ως τμήμα ενός μεγαλύτερου κομματιού DNA (περιλαμβάνει τμήμα του ξενιστή)

