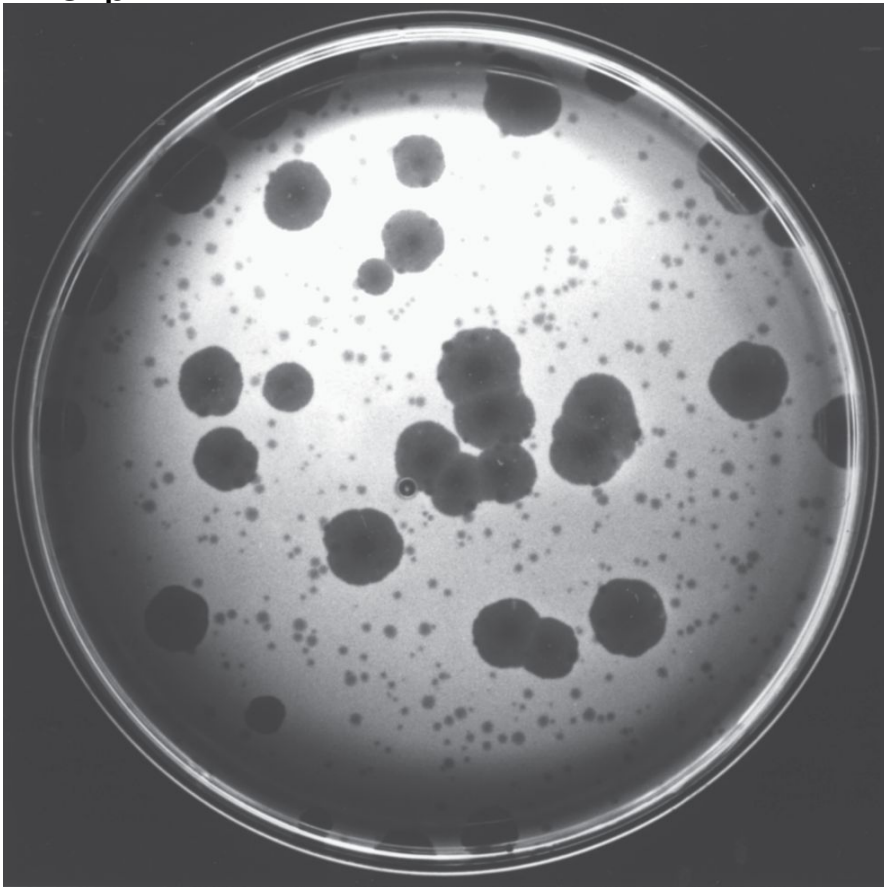


Бактериофа

Бактериофаги (или просто **фаги**) – вирусы бактерий.

Сам термин произошел от греческого слова «поедать». Такое название фаги получили по феномену «выеденных» дыр в бактериальных газонах на чашках Петри:



Фаг T7 – большие дыры

Фаг M13 – маленькие дыры

Общее единомоментное количество фагов на Земле составляет около 10^{31} . Каждую секунду они заражают примерно 10^{23} бактериальных клеток!

Типичная форма фагов



Ножка нужна, чтобы прикрепляться к бактериальной поверхности и «протыкать» ее.

Далее из тела фага внутрь бактерии «впрыскивается» ДНК.

Фаги бывают очень разные

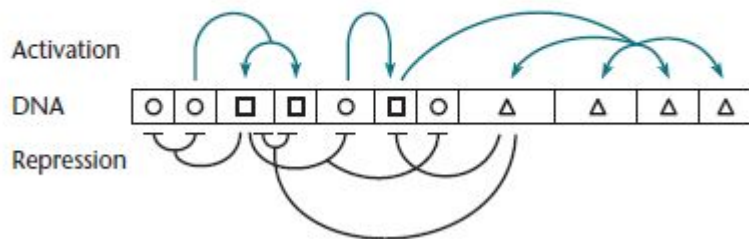
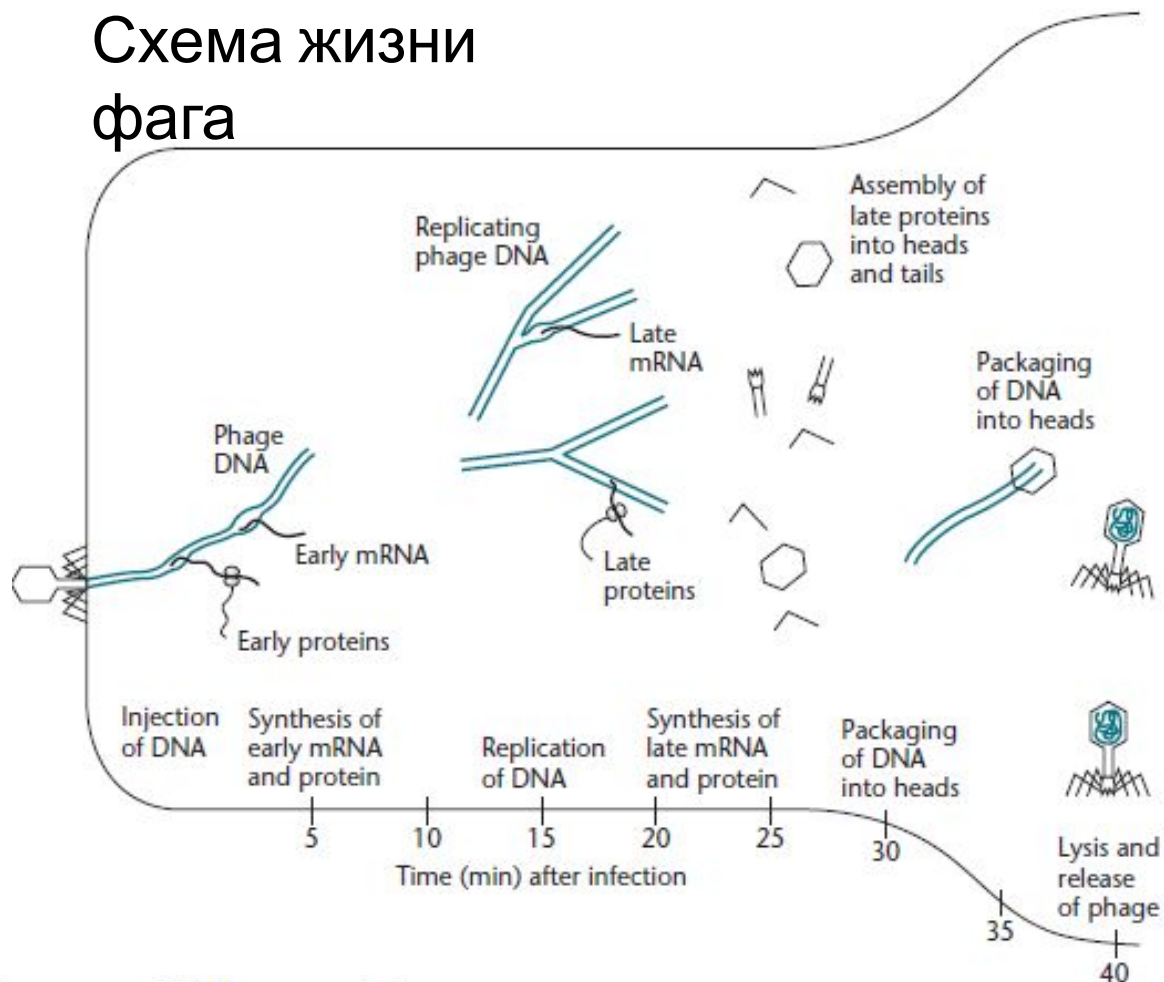
Family	Example(s)	Characteristic(s) ^a
<i>Siphoviridae</i>	λ , N15, T1, T5	Linear dsDNA, long tail
<i>Podoviridae</i>	T3, T7, P22, N4, ϕ 29	Linear dsDNA, short tail
<i>Myoviridae</i>	T4, P1, P2, Mu, SPO1	Linear dsDNA, large phage, contractile tail
<i>Microviridae</i>	ϕ X174	Circular ssDNA, spherical capsid
<i>Inoviridae</i>	M13, f2, CTX ϕ	Circular ssDNA, filamentous
<i>Leviviridae</i>	QB, R17, MS2	ssRNA, spherical
<i>Cystoviridae</i>	ϕ 6	dsRNA, segmented, envelope
<i>Corticoviridae</i>	PM2	Internal membrane
<i>Plasmaviridae</i>	L2 (<i>Mycoplasma</i>)	No capsid, lipid envelope
<i>Lipothrixviridae</i>	TTV-1 ^b (Archaea)	Filamentous, tail fibers, dsDNA

Но смысл их существования всегда одинаков:

1. Найти подходящую бактерию и впрыснуть в нее свою ДНК (РНК)
2. Экспрессировать внутри бактерии свои гены (только там они и могут экспрессироваться)
3. Собрать внутри клетки кучу новых фаговых частиц
4. Выйти наружу (часто, но не всегда – посредством убийства клетки-хозяина)

И все сначала!

Схема жизни фага



А вот схема экспрессии фаговых генов внутри бактериальной клетки.

Фаги с одноцепочечной кольцевой ДНК



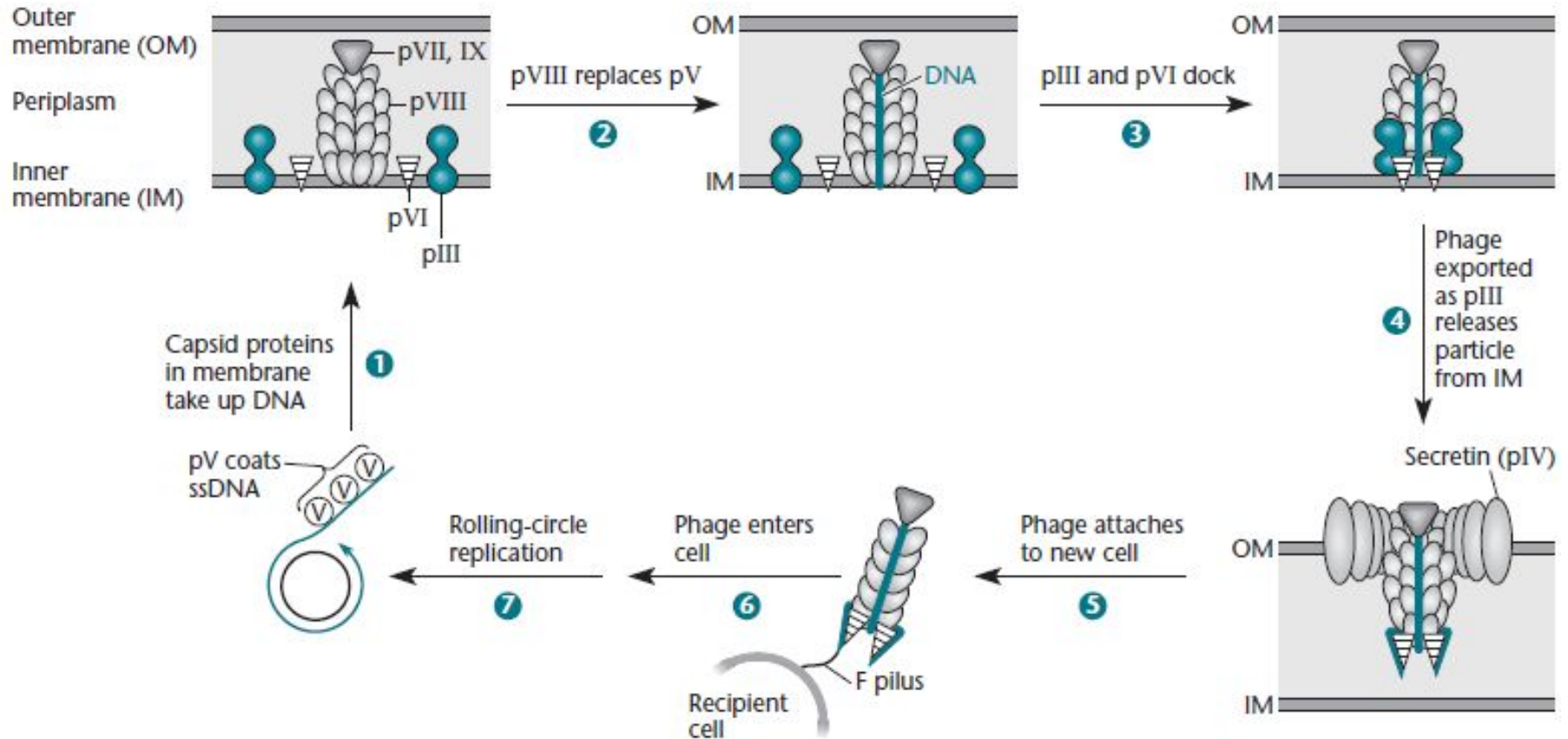
Икосаэдрические фаги (φX174)

Обладают типичной сферической формой, связываются с поверхностью бактерии, впрыскивают в клетку свою ДНК, та размножается, после чего происходит лизис клетки и выход новых собранных фаговых частиц наружу. Инфекция, вызываемая такими фагами, «острая» и всегда приводит к смерти пациента, то есть бактерии.

Филаментные фаги (M13, f1)

Обладают вытянутой формой. Это «мужские» фаги – они связываются только с пилусом донора при конъюгации. Проникают в клетку целиком, после чего белок оболочки деградирует, и ДНК высвобождается. После репликации фаговой ДНК и сборки новых фагов они выходят наружу через мембрану клетки, не убивая ее. Таким образом, инфекция, вызываемая этими фагами, «хроническая» и вялотекущая.

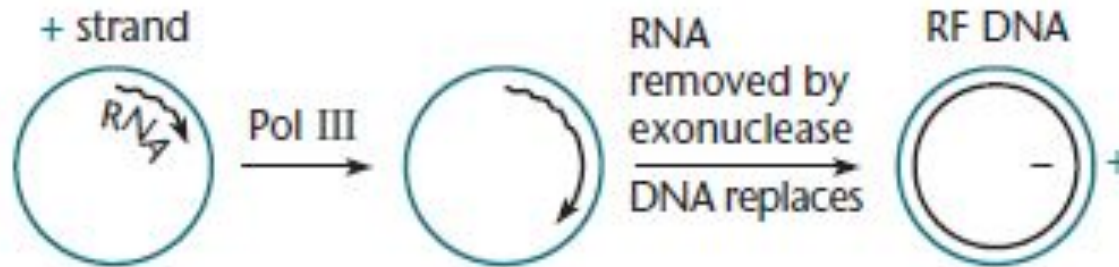
Выход филаментных фагов из бактериальной клетки



Процесс обеспечивается фаговыми белками. Фаговая частица собирается в периплазме, в нее вставляется фаговая ДНК, после чего фаговый белок секретин формирует пору во внешней мембране бактерии, через которую фаг и выходит наружу.

Репликация у оцДНК-фагов

Первый этап репликации – синтез так называемой репликативной формы ДНК (RF). В клетку попадает оцДНК (+ДНК), с которой не могут синтезироваться фаговые белки. Так что клеточная машинерия репликации обеспечивает достройку второй цепочки ДНК (-ДНК), в результате чего образуется дцДНК, или RF.

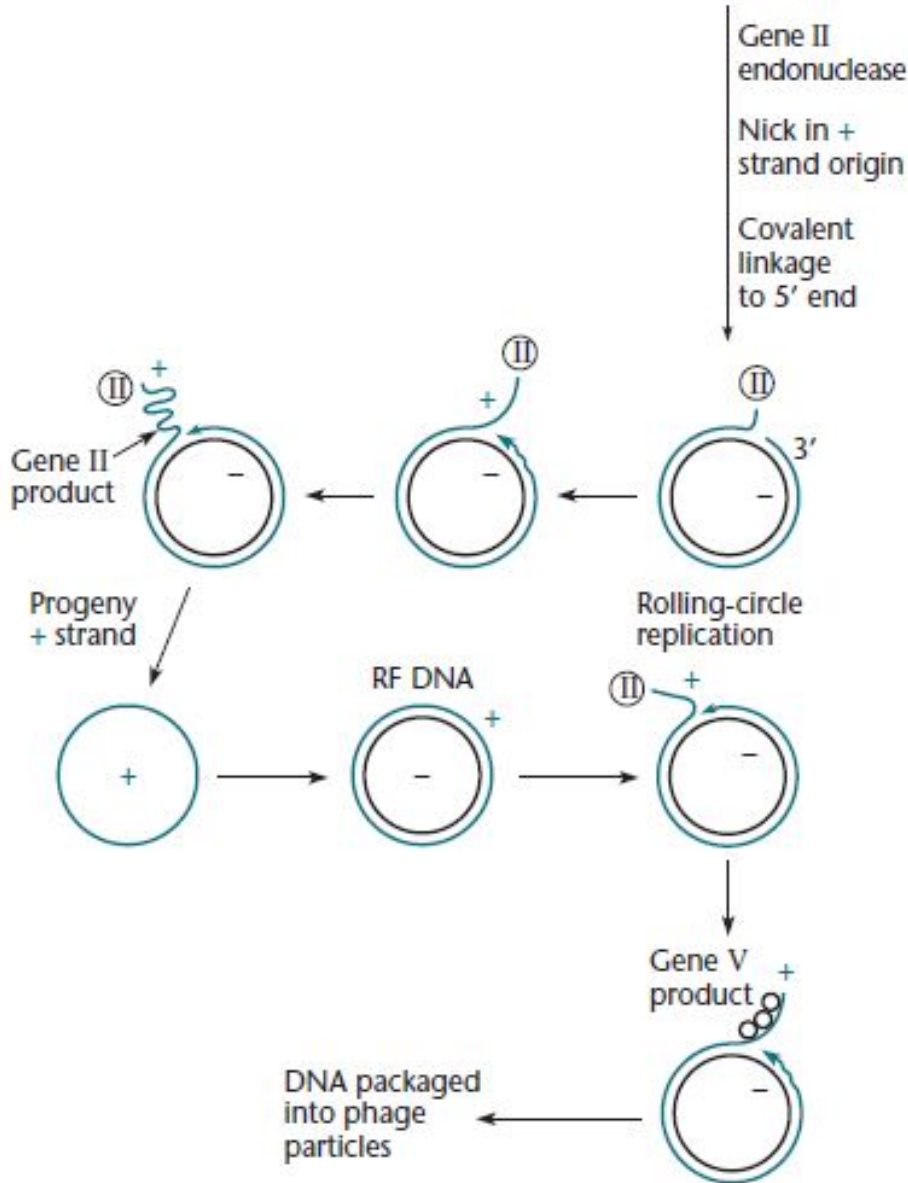


Фаговая ДНК обманывает РНК-полимеразу III, которая вообще-то может синтезировать затравку только на дцДНК. Однако фаговая оцДНК формирует шпильку в районе ориджина, и РНК-полимераза воспринимает ее как двуцепочечную. Дальше все идет по стандартному бактериальному механизму.

Так дело обстоит у фага M13. А у фага φX174 все сложнее – там на ориджине формируется целая праймосома, состоящая из практически всех бактериальных белков репликации.

Репликация у оцДНК-

фагов



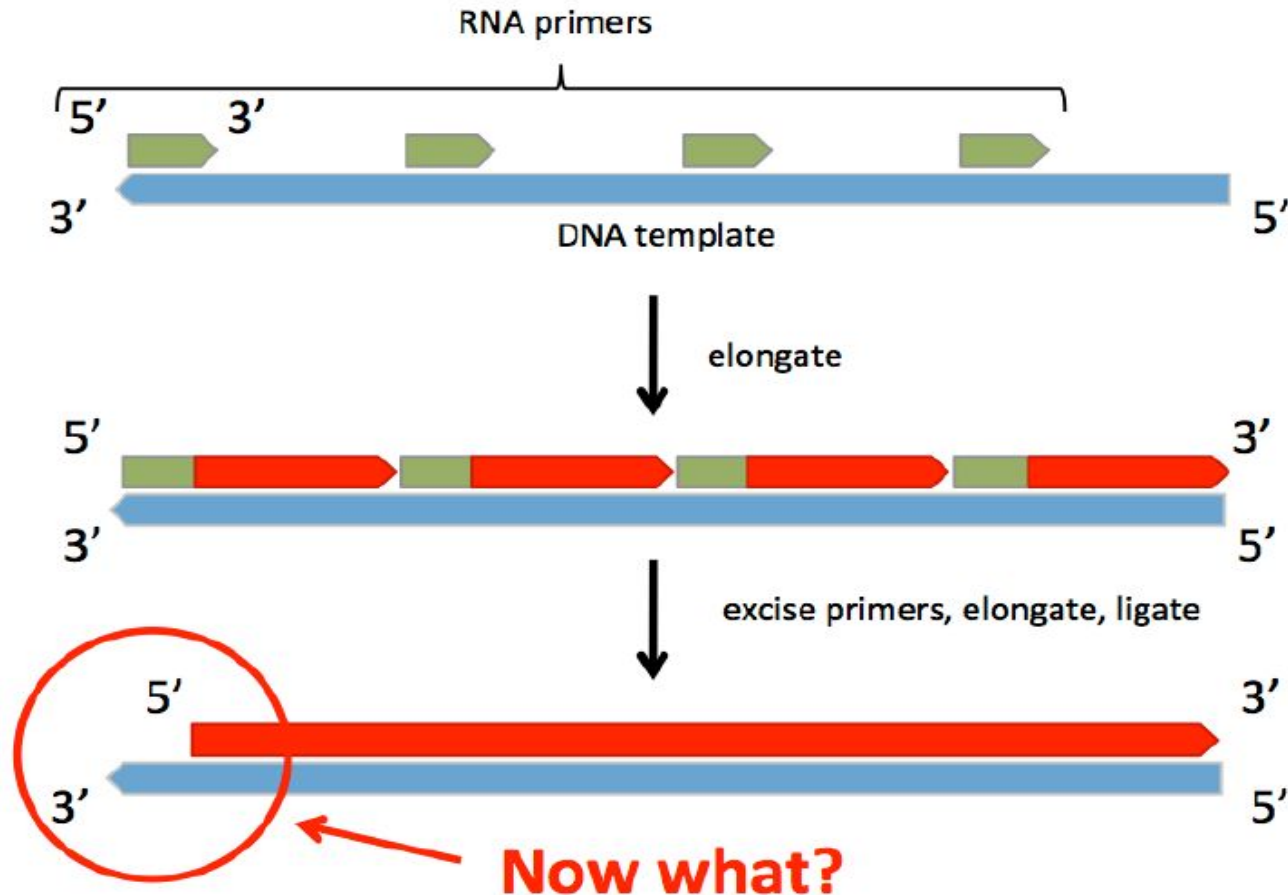
С первой же синтезированной в клетке RF начинает экспрессироваться ген II, кодирующий эндонуклеазу. Она вносит ник в +цепь RF и ковалентно присоединяется к 5'-концу ника. После этого начинается репликация по типу катящегося кольца силами клеточных ферментов: старая +цепь вытесняется, новая +цепь синтезируется на матрице –цепи. В результате образуется новая RF и свободная +цепь, которая также достраивается до RF.

Процесс продолжается до тех пор, пока не накопится достаточного количества продукта гена V. Этот белок покрывает собой свободную +цепь, предотвращая синтез новых RF. Таким образом, происходит накопление +цепей, которые в этот момент начинают упаковываться в фаговые частицы. Затем они выходят наружу, либо через лизис клетки (фХ174), либо оставляя клетку в живых (M13).

Фаги с двуцепочечной линейной ДНК

Чаще всего если фаг маленький, то его ДНК кольцевая, а если большой – то линейная.

С точки зрения репликации у линейной ДНК есть один большой недостаток – обрывающиеся концы, которые ДНК-полимераза не может реплицировать, поскольку нет возможности отщипнуть куда-либо затравку

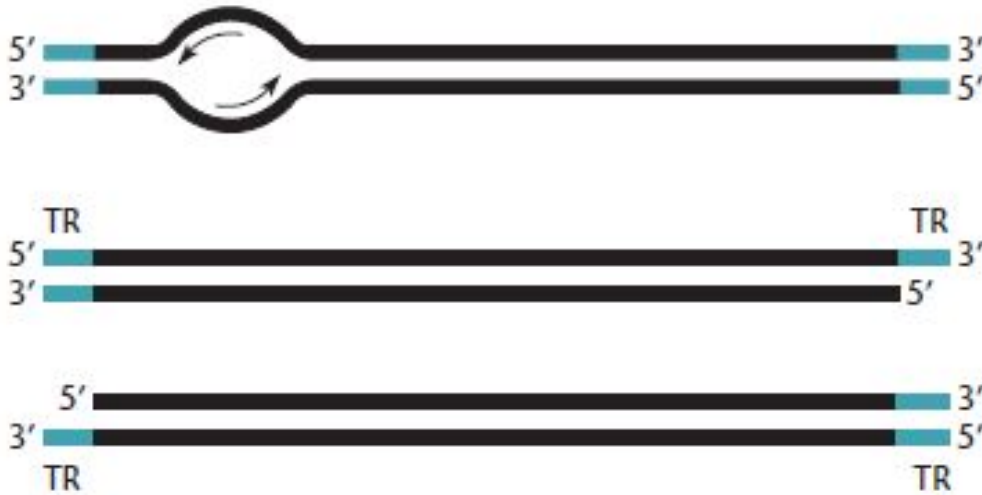


Фаги с двуцепочечной линейной ДНК

Эукариоты решают эту проблему при помощи теломеразы, но у фагов ничего похожего нет.

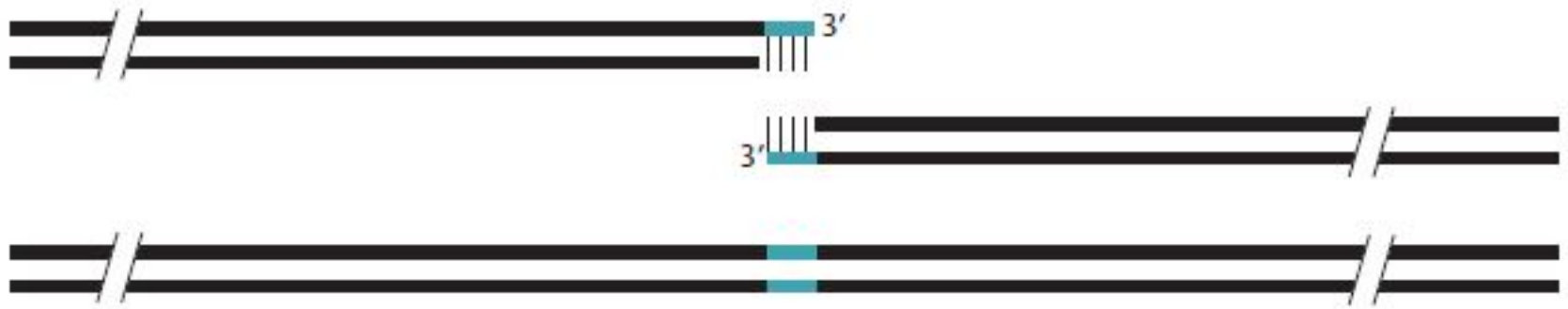
Зато у фагов бывает вот так:

1. Использование белка как затравки для синтеза ДНК
2. Циклизация ДНК перед репликацией
3. Формирование конкатемеров с последующим их нарезанием. Этот путь самый часто встречающийся, именно так поступают известные фаги Т3 и Т7.



ДНК этих фагов на обоих концах содержит одинаковые последовательности. В результате двунаправленной репликации получаются две двуцепочечные молекулы, в каждой из которых дочерняя цепь с 5'конца чуточку недостроена.

Фаги с двуцепочечной линейной ДНК – T3, T7



Так это же липкие концы!

Они и слипаются, а потом приходит лигаза и сшивает две молекулы ДНК в одну длинную.

Перед упаковкой в фаговые частицы ДНК нарезается по специальным участкам, расположенным вплотную к концам исходных молекул. Затем концы тех молекул, которые оказались неполными, как-то достраиваются (скорее всего, на матрице полных молекул), и все они радостно упаковываются.

Фаги с двуцепочечной линейной ДНК

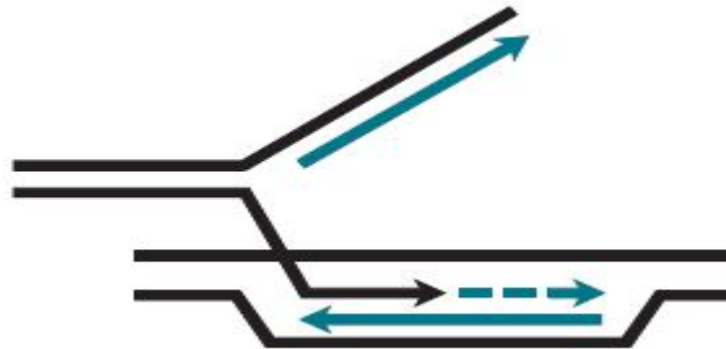
– T4

У ДНК фага T4 на концах тоже повторы.

Репликация ДНК этого фага происходит в две стадии. Сначала происходит репликация бактериального типа с нескольких хорошо охарактеризованных ориджинов:



Когда фаговой ДНК в клетке становится много, начинается совсем другая репликация, при которой концевой повтор одной молекулы ДНК может служить затравкой для синтеза на другой молекуле. В результате образуются крупные разветвленные конкатемеры, которые потом каким-то образом нарезаются и упаковываются в фаговые частицы.



Фаговый лизис

Как мы уже знаем, некоторые фаги не убивают клетку, которую покидают. Однако же большинство фагов все же так не делают – они вызывают гибель бактериальной клетки, чтобы выйти из нее наружу. Этот процесс называется фаговым лизисом.

Простейшие маленькие фаги, типа фХ174, используют однобелковую систему лизиса. Фаговый белок лизиса ингибирует ферменты биосинтеза компонентов клеточной стенки бактерии. При делении бактериальной клетки клеточной стенки не хватает на двоих, и это вызывает лизис, после чего фаги могут выйти наружу.

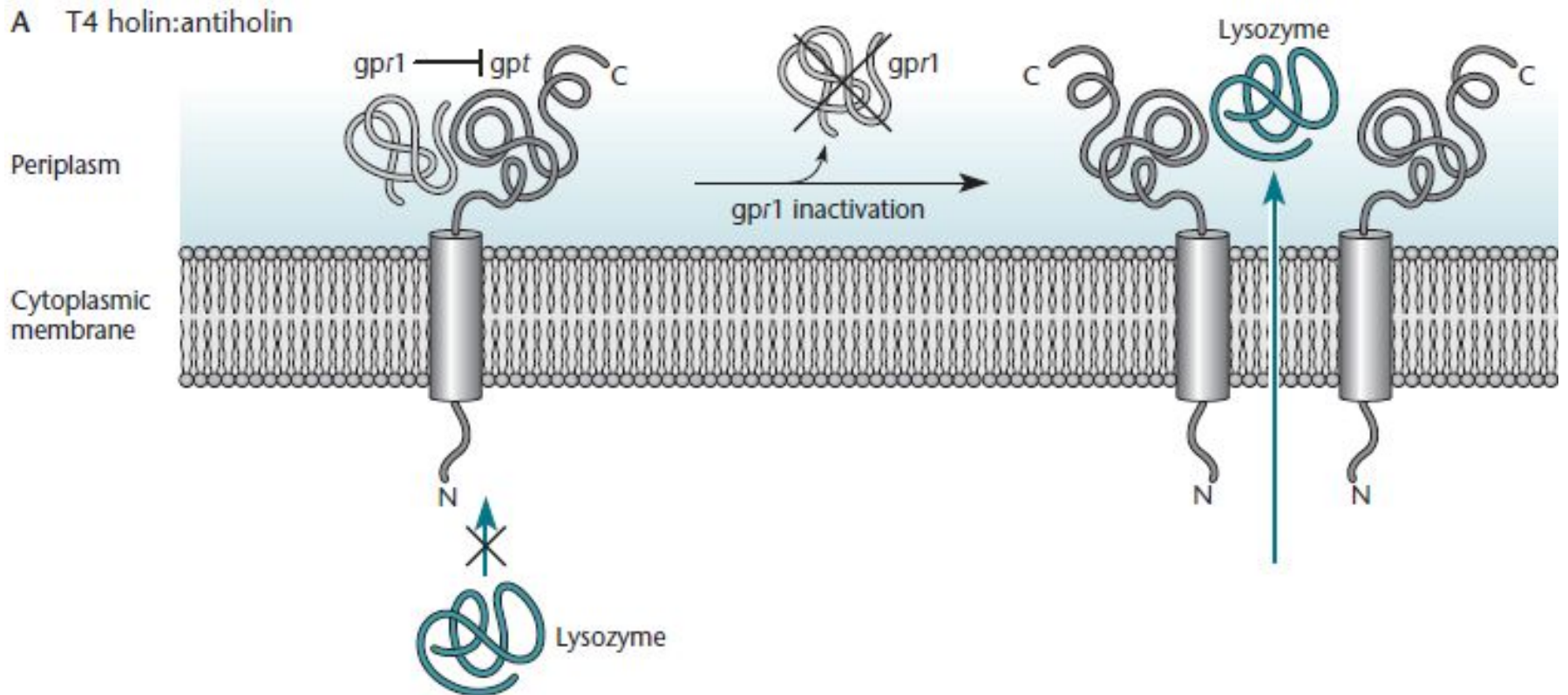
Такая стратегия лизиса не очень выгодна. Получается, что фаги могут размножиться в бактериальной клетке только до первого клеточного деления. И если только фаг попал в клетку не сразу же после предыдущего деления, к моменту следующего деления количество фаговых частиц будет не очень большим. А клетка-то уже лизируется, надо выходить наружу!

Более типичная система лизиса (у фагов грам- бактерий) состоит из нескольких типов белков:

- Эндолизины – разрушают клеточную стенку,
- Спанины – по-видимому, отделяют внешнюю мембрану от клеточной стенки,
- Холины – формируют поры во внутренней мембране, через которые проходят эндолизины,
- Антихолины – ингибируют холины до тех пор, пока не придет правильное время для лизиса.

Фаговый лизис – система фага T4

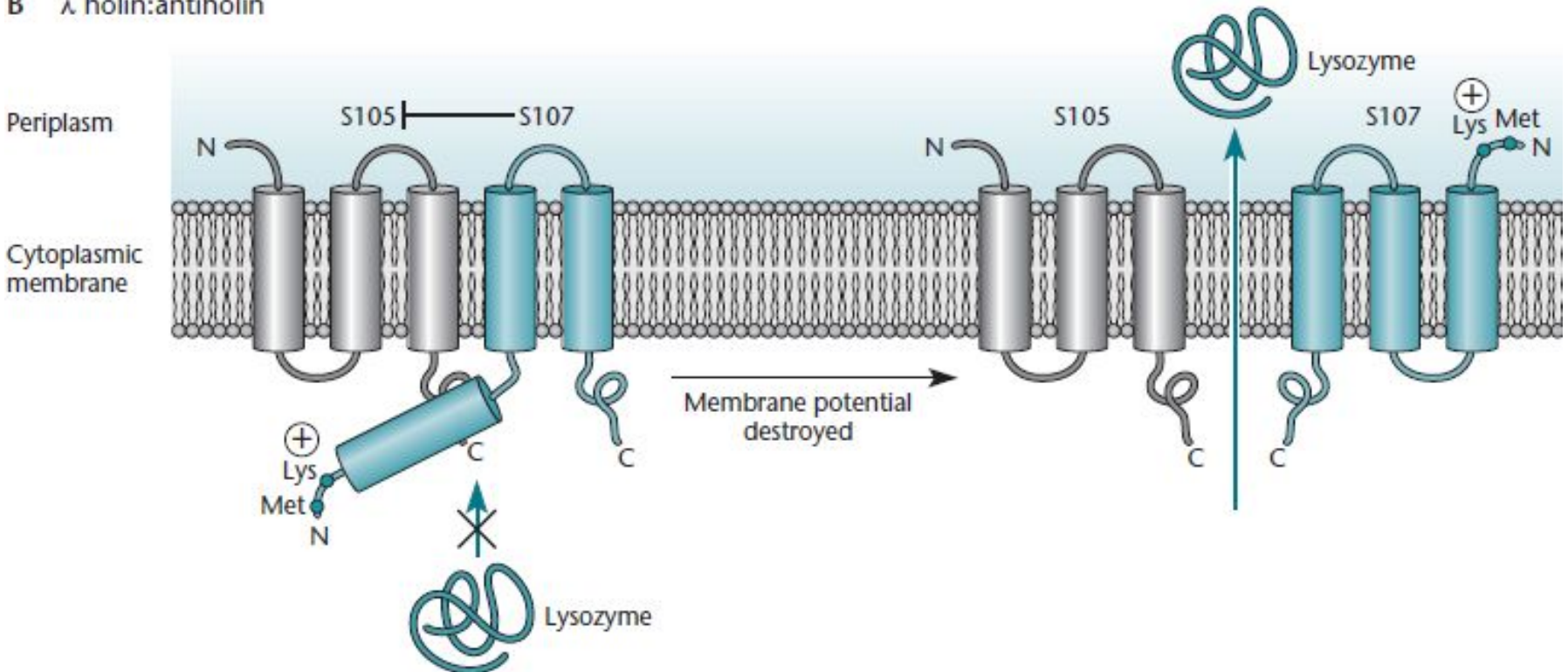
Антихолин связан с холином в периплазме и не дает тому сформировать канал в мембране. Когда наступает время лизиса, антихолин каким-то образом (неизвестно каким) инактивируется, холин наконец-то может сформировать канал во внутренней мембране, и эндолизин выходит в периплазму, чтобы уничтожить клеточную стенку.



Фаговый лизис – система фага лямбда

Здесь все по-другому. Для формирования канала нужны два белка – S105 и S107. Они почти идентичны, только у S107 на N-конце лишние лизин и метионин. N-конец поэтому не может пролезть через мембрану из-за мембранного потенциала. Из-за этого S107 встраивается в мембрану неправильно и в таком виде ингибирует S105. Когда подходит время лизиса, мембранный потенциал снимается (непонятно почему), S107 встраивается в мембрану уже правильным образом и вместе с S105 формирует канал, куда идет лизоцим и разрушает клеточную стенку.

B λ holin:antiholin



Бактериальные системы борьбы с фагами

Если бы бактерии не умели сопротивляться фагам – и тех и других было бы на много порядков меньше. Но они умеют, и очень неплохо.

Систем бактериальной защиты от фагов существует довольно много.

1. Системы рестрикции-модификации

В бактериальных клетках есть эндонуклеазы, которые узнают некий короткий участок ДНК и разрезают его, но только в том случае, если нуклеотид рядом с участком разрезания не модифицирован (или наоборот, модифицирован) должным образом.

Пример: у Т-четных фагов цитозины модифицированы гидроксиметильной группой. Именно ее и узнает специальная эндонуклеаза рестрикции грам- бактерий, после чего происходит разрезание ДНК фага

2. Abi-системы

Abi – сокращение от abortive infection. Такие системы убивают бактериальную клетку раньше, чем фаг успел как следует в ней размножиться. Эволюционный смысл этих систем неочевиден, но только если не принять во внимание биопленки, в которых бактерии с одинаковым геномом группируются вместе. Если одна клетка совершает суицид после инфекции, она спасает от инфекции своих близнецов.

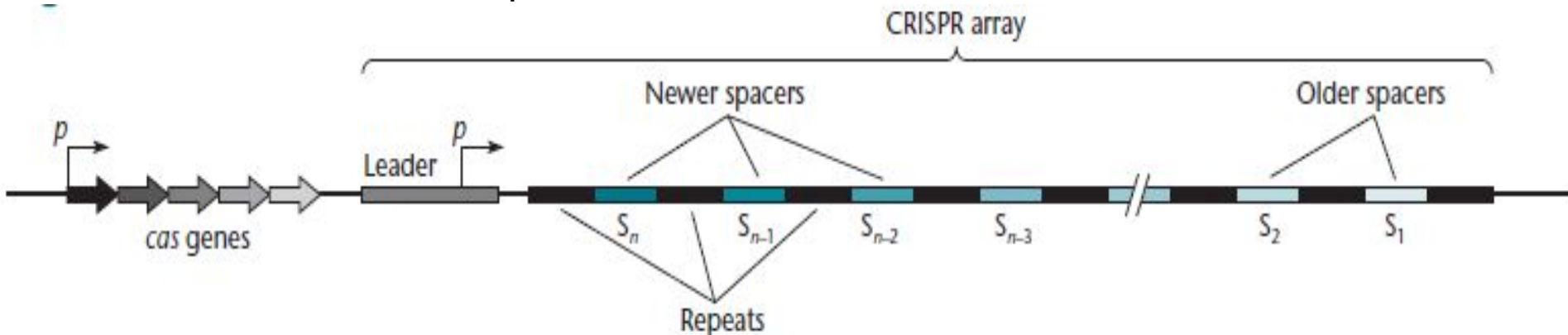
Чаще всего в состав Abi-систем входят протеазы, которые как-то активируются при фаговой инфекции и разрезают какой-либо обязательный компонент системы трансляции. Синтез белка останавливается, клетка гибнет.

CRISPR-локусы и бактериальный иммунитет

CRISPR – аббревиатура от cluster of regularly interspaced short palindromic repeats. Этот способ борьбы бактерий с инфекциями был открыт сравнительно недавно и изучен хуже остальных. Однако уже сейчас ясно, что это не что иное, как система бактериального иммунитета, позволяющая предотвращать заражение клетки фагом, если такой же фаг уже бывал в этой клетке. Против плазмид это, кстати, тоже работает.

Локус CRISPR состоит из:

- Генов Cas (CRISPR-associated, о них позже),
- Лидерного участка с промотором,
- Множества одинаковых повторов размером около 20-30 нуклеотидов каждый, разделенных так называемыми спейсерами. Как выяснилось, сиквенс каждого спейсера идентичен сиквенсу участка ДНК плазмиды или фага, которые способны находиться в данной бактерии.

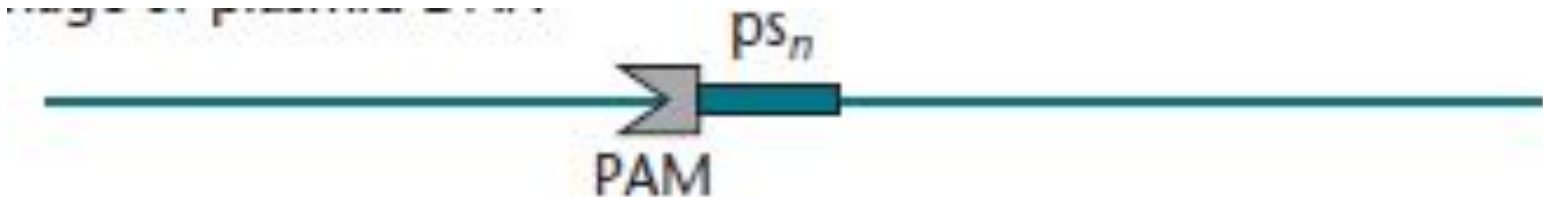


Работа CRISPR-системы

Удлинение CRISPR-

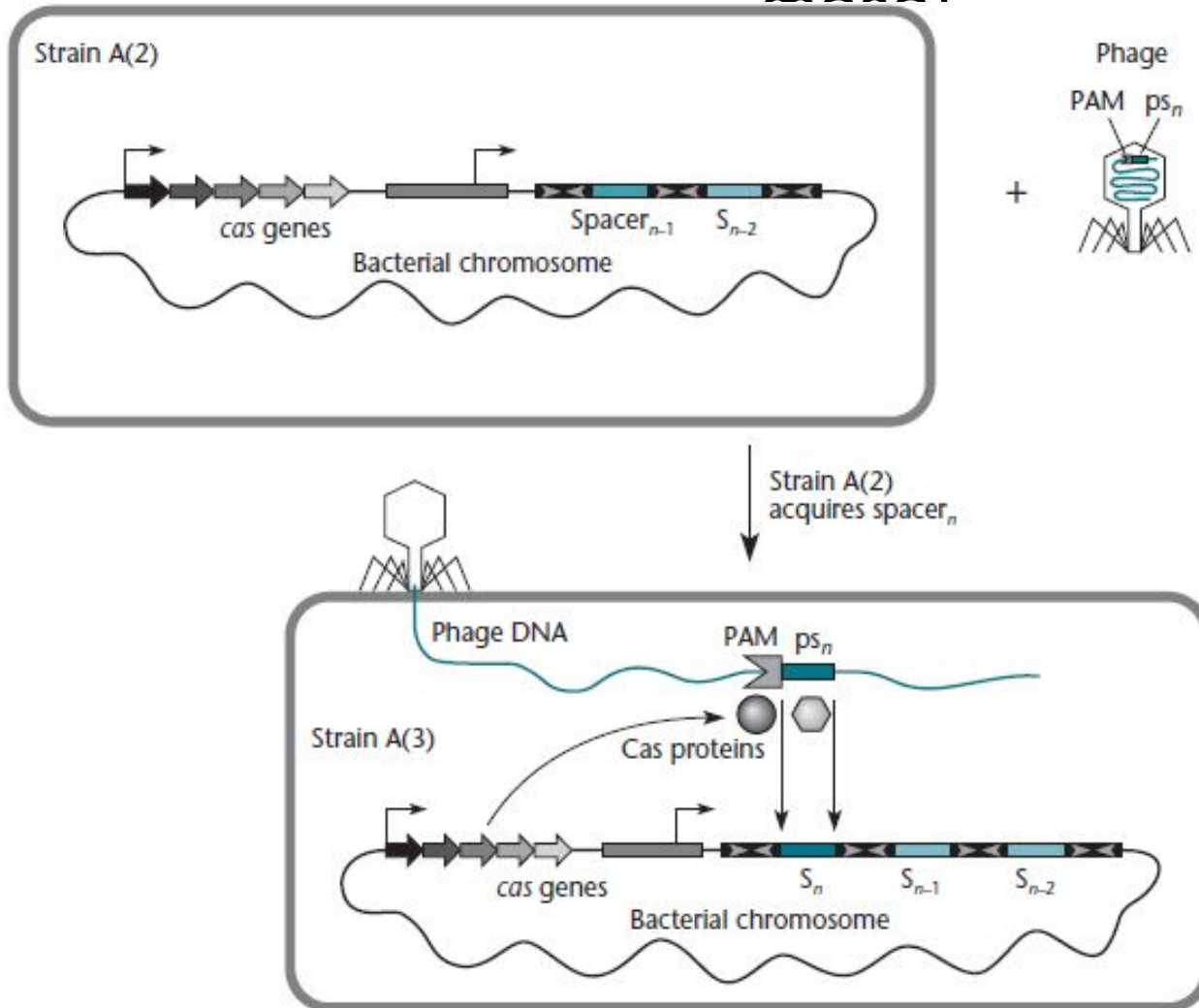
локуса

В бактериальную клетку попал фаг или плазмид. В чужеродной ДНК имеется так называемый протоспейсер (ps), который затем превратится в новый спейсер CRISPR-локуса, а также короткая последовательность PAM (protospacer adjacent motif). Это – мишень для Cas-белков.



Работа CRISPR-системы

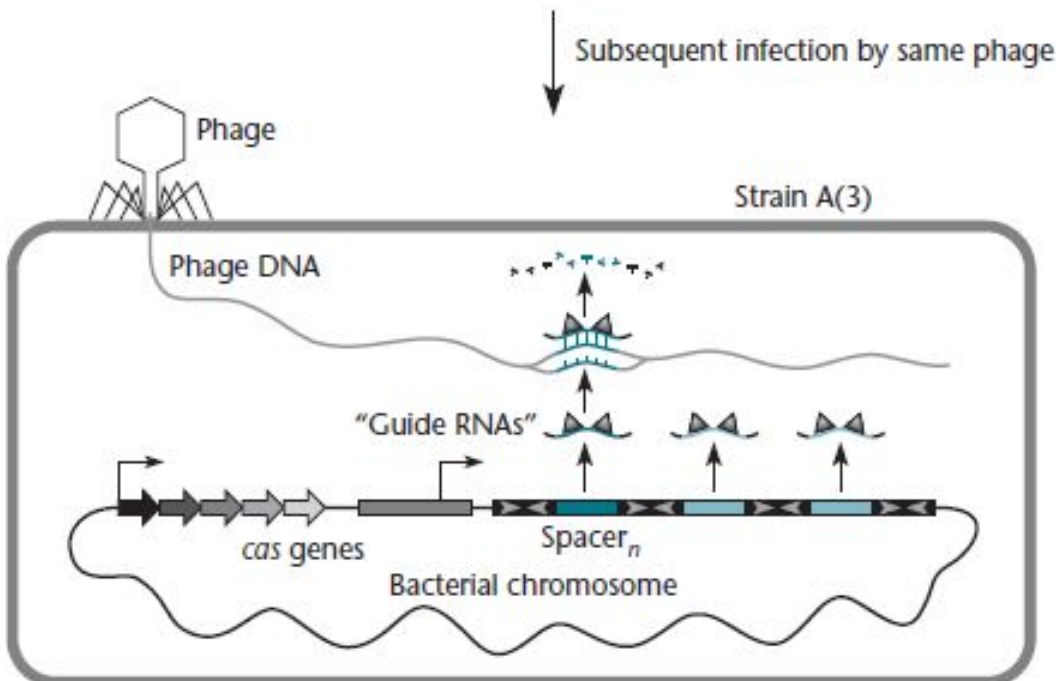
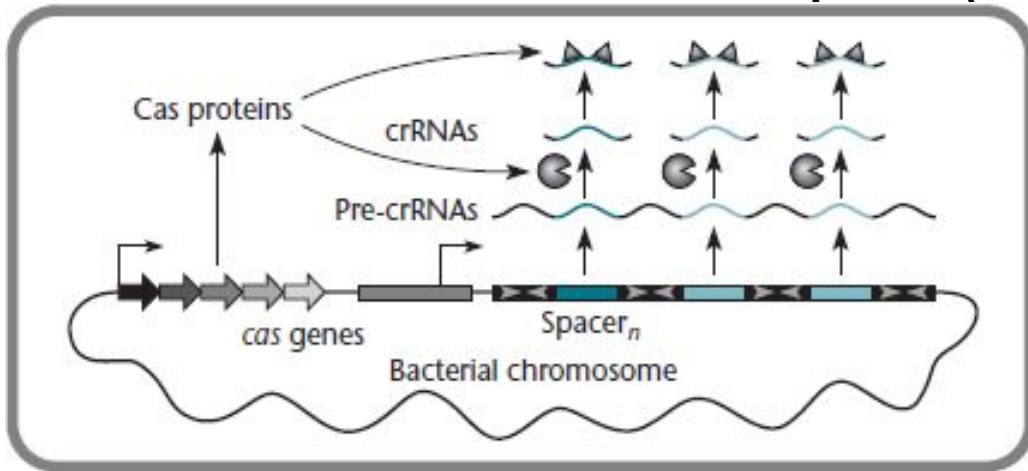
Удлинение CRISPR-локуса (адаптивная фаза)



Cas-белки узнают PAM в ДНК-пришельце и вырезают из него протоспейсер, который вставляется в CRISPR-локус бактериальной ДНК и становится новым спейсером в его составе.

Работа CRISPR-системы

Защита от фагов и плазмид (иммунная)



CRISPR-локус транскрибируется с промотора в линкере с образованием длинной РНК. Она затем нарезается по участкам, расположенным в повторах, с образованием коротких РНК, строго соответствующих по сиквенсу спейсерам (их называют гидовыми РНК). Если в клетку попадает фаг или плаزمид, в свое время попавшие в CRISPR-локус, соответствующая гидовая РНК связывается с комплементарным участком и привлекает к РНК-ДНК дуплексу один из Cas-белков с эндонуклеазной активностью. Он связывается зависимым от РАМ образом и вносит в дуплекс двуцепочечный разрыв, уничтожая чужеродную ДНК.