

UNIVERZITETNI DOKTORSKI ŠTUDIJ BIOMEDICINA

SEMINAR pri predmetu Mikrobiologija

Tjaša Stošički

**NANOMOTOR BAKTERIOFAGOV ZA PAKIRANJE DNA V
KAPSIDO**

MODERATOR SEMINARJA

Prof. dr. Srečko Koren, dr. med., spec. klin. mikrobiol

LJUBLJANA, 8.3 2013

IZVLEČEK

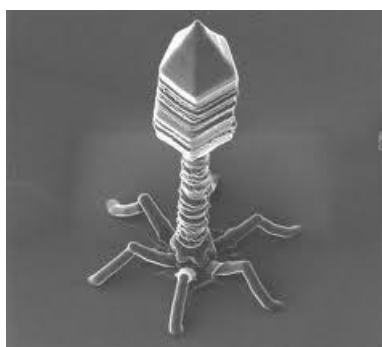
Med najbolj kompleksne dele replikacijskega cikla bakteriofagov spada pakiranje virusne DNA v prokapsido. Prokapsida je namreč velika od 50 do 100 nm, virusna DNA pa je dolga tudi do 14 000 nm. Repni bakteriofagi zato uporabljajo nanomotorje, ki s hidrolizo ATP pretvorijo kemično energijo v fizično. Ta energija pa se nato porabi za vnos DNA v prokapsido. DNA vstopi v prokapsido skozi portalni obroč, ki ga tvori več portalnih proteinov. Za prepoznavo virusne DNA molekule in pridobivanje energije za njeno pakiranje pa sta odgovorni velika in mala terminazna podenota. Končni rezultat pakiranja je virion z zelo kompaktnim kromosomom, tlak v kapsidi pa lahko naraste tudi do 60 MPa.

VSEBINA

Uvod

Virusi so genetski elementi, ki imajo svoj genetski material, ne morejo pa se sami pomnoževati, ampak so odvisni od gostiteljske celice. Od gostiteljske celice namreč dobijo energijo in metabolne intermedie, prav tako pa v gostiteljski celici poteka sinteza virusih proteinov. Virusi so potemtakem obligatni znotrajcelični paraziti, ki naseljujejo različne organizme: bakterije, arheje, živali in rastline (1). Zaradi njihove številčnosti se predvideva, da imajo zelo pomembno vlogo v ekologiji našega planeta. Na vsako bakterijo na Zemlji naj bi namreč bilo 10 virusov (2).

Bakteriofagi so virusi, ki okužijo bakterije. Obstaja več vrst bakteriofagov, najštevilčnejši med njimi pa so repni bakteriofagi, ki so sestavljeni iz proteinske glave oziroma kapside in repa (slika 1). Velikost kapside, v kateri se nahaja virusna DNA varira med 50 in 100 nm, rep pa je dolžine do 200 nm. Večina repnih bakteriofagov vsebuje linearno dvoverižno molekulo DNA, ki je močno skoncentrirana v kapsidi. Čeprav dolžina DNA med fagi varira pa je koncentracija DNA znotraj faga med različnimi vrstami zelo podobna in sicer približno 450 mg/ml (3) in je do 100x bolj kompaktna kot v raztopini (2).



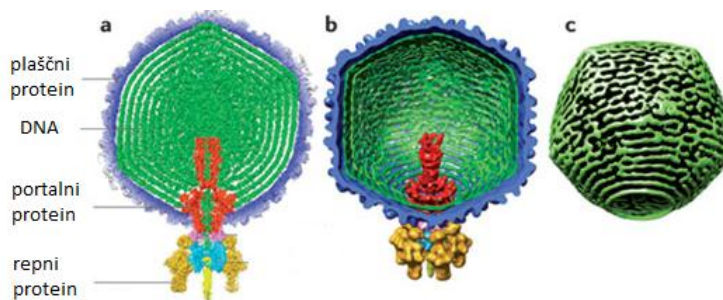
Slika 1: struktura T4 bakteriofaga (4)

Pri virusih obstajata dva načina pakiranja DNA v kapsido. Virusno kapsido lahko virusi zgradijo okoli virusnega genoma ali pa genom zapakirajo v že zgrajeno prokapsido. Za slednji način je potreben močan motor, ki pridobiva energijo iz hidrolize ATP (5).

Pakiranje DNA v kapsido pri repnih bakteriofagih poteka s pomočjo motorja, mehanizmi pakiranja pa so podobni pri vseh bakteriofagih (2).

Organizacija DNA v repnih bakteriofagih

Produkt pakiranja genoma v bakteriofage je zelo kompaktna dsDNA. Že sama primerjava velikosti kapside in dolžine virusne DNA, da vedeti, da mora biti DNA zelo stisnjena (npr. 14 000 nm dolg kromosom phaga λ se mora zapakirati v kapsido s premerom 60 nm). Energetsko je neugodno zapakirati dsDNA v takšno konfiguracijo zaradi nabojev, upogibanja DNA in ostalih faktorjev, zato je nujno potreben nek močan energijsko odvisen motor, ki da energijo za pakiranje DNA (2).

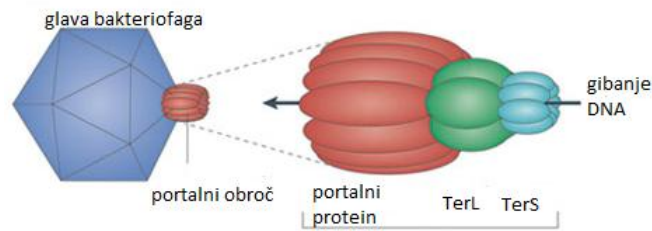


Slika 2: zgradba viriona bakteriofaga P22

Med pakiranjem DNA v kapsido pritisk v kapsidi naraste tudi da 60 MPa. Ta pritisk pa je potem na voljo pri ejejkciji DNA v gostiteljsko celico (6).

Komponente motorja

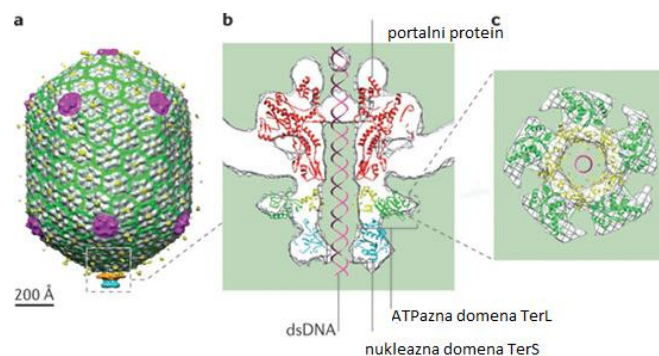
Molekularni motor, ki pakira DNA v prokapsido je sestavljen iz treh proteinov (slika 3): portalnega proteina, ki sestavi portalni obroč in dveh terminaz, ki prepoznavata in pakirata DNA (TerL in TerS). Ti proteini so zelo divergentni in se med vrstami zelo razlikujejo v aminokislinski sestavi. Zaradi podobne strukture proteinov motorja pri vseh bakteriofagih, pa sklepajo, da vsi izvirajo iz enega skupnega prednika in so se potem razvili vsak posebej ampak še vedno uporabljajo podoben mehanizem (2).



Slika 3: sestava nanomotorja virusa za pakiranje DNA v kapsido(2)

DNA se v prokapsido prenese skozi portalni obroč, ki je sestavljen iz portalnih proteinov. Skozi center portalnega obroča poteka kanal skozi katerega DNA vstopi v virion med pakiranjem oziroma izstopi med sprostitvijo DNA v bakterijo. Številni DNA vezavni proteini, ki so prisotni v gostiteljski celici, v prokapsido ne vstopijo, saj je kanal portalnega proteina preozek (2).

Poleg portalnega proteina pa je pomemben del pakiranja DNA tudi prepoznavna in rezanje DNA molekule, za kar sta odgovorni velika (TerL) in mala (TerS) podenota terminaze. Številni bakteriofagi uporabljajo DNA podvojevalne mehanizme, pri katerih nastane več kopij bakteriofagnega genoma, ki se držijo skupaj (konkatemere). Velika podenota terminaze pa reže konkatemero na posamezne kromosomske enote. Po rezanju se eden izmed nastalih koncev usmeri proti motorju in v prokapsido, nato poteče DNA pakiranje v prokapsido, do drugega rezanja pa pride po tem, ko je kapsida napolnjena z DNA (2).



Slika 4: motor za pakiranje DNA bakteriofaga T4(2)

TerL je sestavljena iz dveh domen, domena amino konca vsebuje Walker A/B motiv, ki je značilen za proteine, ki so vpleteni v hidrolizo ATP. S hidrolizo ATP na aktivnem mestu, TerL prispeva energijo potrebno za pakiranje DNA. C konec TerL domene pa vsebuje nukleazno mesto, kjer pride do rezanja konkatemere med pakiranjem. C in N domeni terminaze morata biti povezani skupaj, da lahko opravljata svojo funkcijo pakiranja. Linker med njima je sestavljen iz majhnih AK in omogoča fleksibilnost, ki jo motor potrebuje med pakiranjem (5). Pomembna je tudi povezava med TerL in TerS, TerL ima namreč 50x večjo ATPazno aktivnost, ko je povezana s TerS. Prav tako pa se ATPazna aktivnost stimulira, ko je terminaza povezana s prokapsido(7). TerS pa je navadno odgovoren za prepoznavanje DNA, ki se bo pakirala in iniciacijo vnosa. Ne ve pa se še, če ima kakšno vlogo pri samem vnosu (2).

Pakiranje

Obstaja že veliko modelov, ki opisujejo molekularni mehanizem motorja, ki vnaša DNA v prokapsido faga. Večina raziskovalcev je mnenja, da motor pridobiva energijo iz hidrolize ATP, nekateri pa menijo, da nekaj energije prinesejo tudi elektrostatske interakcije med virionom in prokapsido. Ker je mesto vezave ATP in nukleazno mesto na N koncu TerL predvidevajo, da terminaza sama fizično premakne DNA, z energijo, ki jo dobi pri hidrolizi ATP. Drugi pa so mnenja, da se cepitev DNA prenese na portalni protein, ki nato premakne DNA. Noben izmed načinov pa še ni bil popolnoma potrjen oziroma zavrnjen (8).

Maksimalne hitrosti pakiranja DNA v prokapsido pa so od 180- 1800 bp/s in korelirajo z dolžino DNA fagov (pri fagih z večjo DNA je hitrost višja), kar bi lahko pomenilo, da motor dela tako hitro kot mora pri posameznem fagu. Za pakiranje 2 bp pa se porabijo dve molekuli ATP. Hitrost se med samim pakiranjem spreminja in sicer, bolj kot je prokapsida polna, počasnejša je hitrost, saj je zaradi vedno bolj polne kapside pakiranje oteženo. Sile, ki jih ti motorji lahko proizvajajo se gibljejo med 60 in 110 pN, kar pomeni, da je to eden izmed najmočnejših molekularnih motorjev. Sposoben je namreč generiranja sile, ki je več kot 8x večja od motorja kinezina, 20x večja od motorja miozina in 2x večja od motorja RNA polimeraze v *Esheria coli* (9).

Zaključek pakiranja in disociacija motorja

Potem, ko je fagni kromosom popolnoma zapakiran v prokapsido pride do rezanja DNA, ki sprostí zapakirano DNA iz konkatemere. Fagi imajo mehanizme, ki prepoznajo kdaj je DNA v prokapsidi dosegla določeno gostoto in signalizira nukleaznemu delu terminaze, da izvede rezanje DNA. Primeri teh mehanizmov so npr: upočasnjevanje premikanja DNA medtem ko se prokapsida vedno bolj polni ali glede na silo, ki jo mora motor generirati, da pakiranje poteka. Noben izmed modelov pa še ni bil potrjen (2).

Ko je pakiranje končano se terminaza sprostí iz viriona. Po sprostitvi terminaznih proteinov, DNA ni več stabilno pakirana v kapsidi in bi lahko začela uhajati ven, zato je potrebno kanal zapreti. Obstajajo različni načini za zaprtje kanala. Pri bakteriofagu Pss se na portalni obroč vežeta dva proteina, ki kanal zapreta nato pa se na novo nastalo strukturo poveže še rep. Pri bakteriofagu λ se rep poveže direktno na portalni obroč. Ti proteini in rep se morajo potem pred injiciranjem odstraniti oziroma spremeniti svojo konformacijo, da lahko virus inicira svojo DNA v gostiteljsko celico (10).

ZAKLJUČEK

DNA pakirajoči motor bakteriofagov je najmočnejši do zdaj poznani molekularni motor. Nedavni napredek glede strukture DNA pakirajočih proteinov in razvoj novih tehnik na tem področju so omogočili veliko bolj podroben opis mehanizma pakiranja DNA v prokapsido. Veliko vprašanj pa kljub novi tehnologiji še vedno ostaja odprtih. Kljub temu pa lahko nanomotorje že zdaj uporabljamo za mnoge aplikacije. Nanomotorje bi tako lahko uporabili npr za dostavo nukleinskih kislin preko membran in pri novejših tehnikah sekvenciranja.

LITERATURA

1. Madian M, Martinko J, Stahl D, Clark D. Biology of microorganisms. San Francisco: Pearson education;2012.
2. Cajens S. The DNA- packaging nanomotor of tailed bacteriophages. Nature reviews 2011; 9: 647-57.
3. Letellier L, Boulanger P, Plancon L, Jacquot P, Santamaria A. Front biosci 2004; 9: 1228-339
4. Kontan R, Matsui S. Artificial nano T4 bacteriophage. University of Hyogo 2005.
Dosegljivo na:www.zyvexlabs.com/EIPBNuG/2005MicroGraph.html
5. Sun S, Rao V B, Rossman M G. Genoma packaging in viruses. Curr opin struct biol 2010; 20: 114-20.
6. Chemla Y R, Aathavan K, Michelis J, Grimes S, Jardine P J, Anderson D L, et al. Mechanism of force generation of a viral DNA packagink motor. Cell 2005; 122: 683-92.
7. Sun S, Kondabagil K, Draper B, Alam T I, Bowman V D, Zhang Z, et al. The structure of the phage T4 DNA packaging motor suggests a mechanism dependent on electrostatic forces. Cell 2008; 135: 1251- 62.
8. Zhang Z, Kottadiel V I, Vafabakhsh R, Dai L, Chemla Y R, Ha T, et al. A promiscuous DNA packaging machine from bacteriophage T4. PLOS biol 2011;9: e1000592.
9. Koti J S, Morais M C, Rajagopal R, Owen B A L, McMurray C T, Anderson D L. DNA packaging motor assembly intermediate of bacteriophage Φ 29. J Mol Microbiol 2008;382: 1114-32.
10. Oliviera L, Alonso J C, Tavares P. A defined *in vitro* system for DNA packaging by the bacteriophage SPP1: insights into the headful packaging mehanism. J Mol Biol 2005; 353: 529-39.

