

Viren-Genome

Inhalt

1. Einleitung
2. RNA-Viren
3. DNA-Viren

1. Einleitung

Im folgenden werden einige für die Genetik bedeutungsvolle Viren vorgestellt.

Da Viren den Stoffwechsel der Wirtszelle mitbenutzen, kommen sie mit einem sehr geringen Informationsgehalt aus. Ihre Genome enthalten daher im wesentlichen nur Gene für virusspezifische Funktionen, wie z.B. die Synthese des Proteinanteils des Virus. Außerdem ist meistens ein Gen für die Replikation der Virus-Nucleinsäure vorhanden. Wichtig sind auch Gene für die Reife, die Zusammensetzung der Viren aus Nucleinsäure und Protein, und die Adsorption an den Wirt.

→ **Die kleinsten Viren** kommen daher mit einem sehr geringen Informationsgehalt von nur 4 Genen aus, von denen

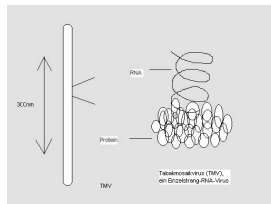
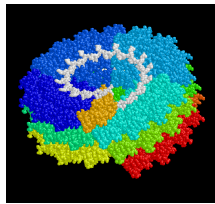
- eins das Hüllprotein
- eins das Replikationsprotein
- eins das Reifungsprotein und
- eins das Lyse-Protein codiert.

→ **Die großen Viren** mit komplizierter gebauten Proteinhüllen haben allerdings wesentlich größere Genome.

2. RNA-Viren

Für RNA-Viren ist das Einzelstrang-RNA-Molekül als Informationsspeicher charakteristisch. Die Virus-RNA stellt den (+)-Strang dar, an dem bei der Replikation der (-)-Strang gebildet wird. Die Replikation erfolgt über Doppelstrang-RNA. Bei typischen Pflanzenviren besteht die RNA oft aus 2-3 Segmenten, die gemeinsam oder getrennt in Hüllen verpackt werden können. Die RNA enthält oft nur die Information für 1-2 Hüllproteine. Bei der Merkmalsausbildung ist keine Transkription erforderlich, da bereits RNA vorliegt.

Zu den RNA-Viren gehören die meisten Pflanzen- und Tierviren.
Von den Pflanzenviren ist das Tabakmosaik-Virus (TMV) besonders gut untersucht.



- Es ist eine stabförmige Partikel von 300nm Länge.
 - Die zentrale Einzelstrang-RNA-Schraube besteht aus 6400 Nucleotiden.
- Obwohl die RNA von TMV unsegmentiert ist, gibt es einige Stämme, bei denen ein spezifisches RNA-Segment separat in Proteinhüllen verpackt wird.

Das Hüllprotein setzt sich aus 2130 gleichen Protein-Untereinheiten zusammen.

Die RNA-Phagen sind günstige Versuchsobjekte, weil sie:

1. einen kurzen Infektionszyklus haben (~ 30 min) und
2. hohe Phagenausbeuten ergeben (~ 2×10^{12} pfu/ml) [pfu = Plaque forming units].

Phagen vermehren sich, indem ihre DNA oder RNA in ein Bakterium injiziert wird:

Die Phagenhülle bleibt außerhalb des Bakteriums.

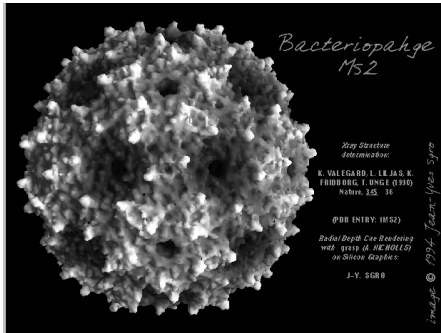
- Bei der Infektion heften sich die Phagen an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche des Bakteriums an, die für verschiedene Phagen unterschiedlich sind.
- Die in die Bakterienzelle gelangte Nucleinsäure dient als Muster für die Replikation, bei der 100-10.000 neue Nucleinsäure-Moleküle entstehen, und für die Synthese der Phagenproteine.
- Dann wird die Phagen-Nucleinsäure in Proteinhüllen verpackt, die Zelle lysiert und die Phagen frei.

Der Gesamte Zyklus dauert etwa 15-60 Minuten.

- Die freiwerdenden Phagen infizieren neue Bakterien und lysieren sie.
- In einem Bakterienrasen entstehen dadurch Plaques (Löcher).
- Ihre Anzahl gibt den Titer der Phagen an, die bei der Infektion auf der Petrischale plattiert worden sind.

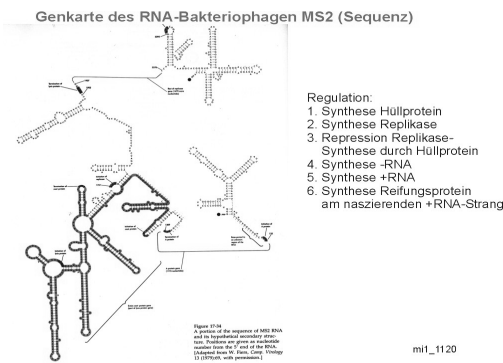
Der RNA-Phage MS2 (MS = male specific) vermehrt sich in E.-coli-Zellen, die entsprechende Plasmide (z.B. F) enthalten. Wie die ähnlichen Phagen Q β , M12, R17 oder f2 hat MS2 ein sehr kleines Genom (Abbildung!):

Die erste vollständige Nucleotid-Sequenzanalyse gelang der Gruppe FIERS (1976). Am Beispiel von MS2 war damit zum ersten Mal die Möglichkeit gegeben, die Organisation eines Genoms zu analysieren.



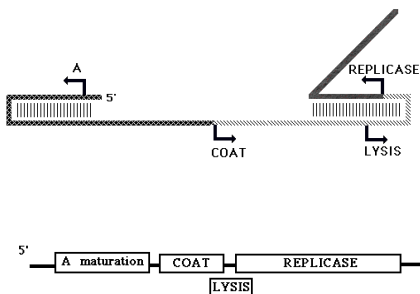
- Es besteht aus **3.569 Nucleotiden** und
- beginnt am 5'-Ende mit einer 129 Nucleotide langen untranslatierten Sequenz (Leader).
- **Das erste Gen** ist das A-Protein-Gen mit der Startsequenz GUG und 1.179 Nucleotiden.

Das **A-Protein** ist verantwortlich für die Zusammensetzung der Phagen aus Nucleinsäure und Protein;
Es ist nur einmal in der Phagenhülle vorhanden und spielt auch eine Rolle für die Adsorption an den Wirt.



- Zwischen A-Protein-Gen und Hüllprotein-Gen, das nur aus 390 Nucleotiden besteht, befindet sich ein Bereich aus 27 Nucleotiden.
- Die Phagen-Hülle besteht aus 180 Molekülen dieses Proteins.
- **Das letzte Gen** ist das Replikase-Gen mit 1.635 Nucleotiden. Es ist durch einen Bereich von 36 Nucleotiden vom Hüllprotein-Gen getrennt.

Die Bereiche zwischen den Genen sind für die Translationskontrolle wichtig, durch die erreicht wird, daß pro Molekül A- Protein eine große Anzahl des Hüllproteins gebildet werden.



- Ein **4. Gen** umfaßt einen Teil des Hüllprotein-Gens und des Replikase-Gens, sowie die Lücke zwischen beiden.

An diesem nur 225 Nucleotide großem Gen wird in einem um +1 verschobenen Leserahmen ein **Lysis-Protein** gebildet.

- Am 3'-Ende befinden sich 174 untranslatierte Nucleotide.

Das RNA-Molekül von MS2 liegt, wie für RNA-Moleküle typisch, nicht als linearer Faden vor, sondern ist durch Basenpaarungen innerhalb des Moleküls zu der in der Abbildung (Teil B) dargestellten Sekundärstruktur aufgefaltet. Von großer Bedeutung sind auch die RNA-Tumor-Viren.

3. DNA-Viren

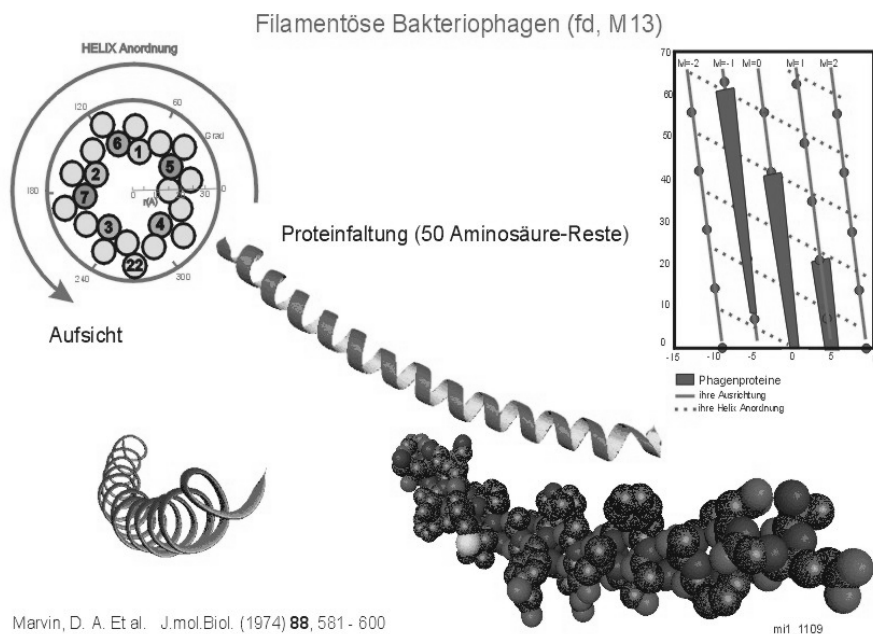
Die DNA-Viren besitzen bevorzugt Doppelstrang-DNA.

- Als Beispiel für Doppelstrang-DNA-Phagen werden im folgenden λ , T4 und T7 beschrieben
- Als Vertreter der Einzelstrang-Phagen werden M13 und ϕ X174 vorgestellt

M13 (M = München) ist ein filamentöser Phage, dessen ssDNA aus 6.407 Nucleotiden besteht. Das Genom umfaßt 10 Gene, von denen

- die Gene II und V für die Replikation verantwortlich sind,
- die Gene III, VI, VIII und IX für die Bildung des Hüllproteins und
- die Gene I und IV für morphogenetische Prozesse;

→ die Funktion der Gene VII und X sind noch unbekannt



Vermehrung

Als Rezeptor für M13 dienen die **Sexpili von E.coli-Zellen**, die F- oder ähnliche Plasmide enthalten.

Die Phagen-DNA stellt den (+)-Strang dar, nach dem in der Zelle eine Replikative Form (RF) gebildet wird, die sich etwa 100fach vermehrt.

Dann geht die Replikation in eine Rolling Circle Replikation über:

- Die Nukleotidsequenz des Gens B ist ein Teil der Nukleotidsequenz des Gens A. Die Zugehörigkeit der Nucleotide zu Triplets, das Leseraster der Translation, ist aber in beiden Genen verschieden. Ähnlich ist es mit dem Gen E, das in das Gen D eingeschachtelt ist und ebenfalls in anderer Phase translatiert wird.

Solche Ineinanderschachtelungen von Genen, wie sie zuerst für ϕ X174 beschrieben worden sind, wurden inzwischen auch für andere Genome nachgewiesen.

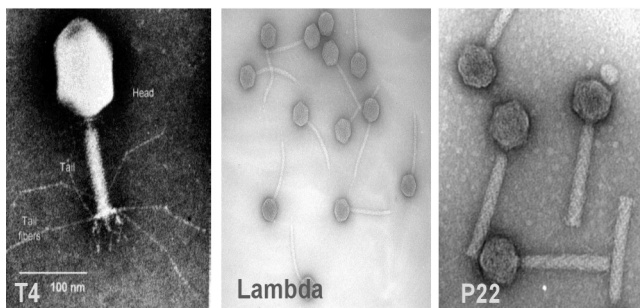
Bei der Infektion

- gelangt Einzelstrang-DNA, (+)-Strang, in die Zelle.
- Mit Hilfe der Wirtsenzyme wird ein komplementärer DNA-Strang (-)-Strang synthetisiert.
- Diese Doppelstrang-DNA repliziert sich mit Hilfe des A-Proteins und mit Hilfe von Wirtsenzymen zu etwa 20 Kopien.
- Die (-)-Stränge sind das Muster für die Synthese der mRNA, nach der die Virus-Hüllproteine hergestellt werden. Wenn genügend Proteine vorhanden sind, werden etwa 200 (+)-Stränge synthetisiert.
- Die Proteine der Gene B, C und D sind für die Verpackung der DNA, in die Proteinhülle verantwortlich.
- Das Gen E-Protein bewirkt die Lyse der Zelle und damit das Freiwerden der Phagen.

Im Anfangsteil des Gens A befindet sich der Replikationsstartpunkt (Origin).

Die großen Doppelstrang-DNA-Phagen, wie T4, T7 oder λ , besitzen wesentlich mehr Gene als die bisher beschriebenen Viren, um ihren erheblich komplizierteren Bau realisieren zu können.

Struktur verschiedener Bakteriophagen



Wirte: E. coli

E. coli

Salmonella

EM-Bilder nach Kontrastierung

mil_1103

Um die Wirtszelle zu diesen Leistungen umzufunktionieren, sind viele viruscodierte Proteine und Enzyme erforderlich.

- Einige Virus-Genprodukte werden gleich nach der Injektion benötigt, man bezeichnet sie als **frühe** mRNA oder frühe Proteine.
- Andere, die **späte** mRNA und die späten Proteine, werden erst in der zweiten Phase der Virus-Morphogenese gebraucht.

Die frühen Gene werden im allgemeinen durch Verwendung von E.-coli-RNA-Polymerase synthetisiert, die späten durch virusspezifische Polymerasen.

Die zeitlich gestaffelte Folge der Proteine kann auch dadurch erreicht werden, daß ein großes Operon vorhanden ist, an dem lange polycistronische Messenger gebildet werden, in denen die Information für die späten Gene am 3'-Ende lokalisiert ist. Oft wird die zeitliche Folge der Genaktivität durch Verwendung eigener σ -Faktoren der RNA-Polymerase geregelt. Dazu werden die σ -Faktoren der Wirtszelle verändert oder völlig neue virusspezifische σ -Faktoren synthetisiert. Die Proteine der Gene 33 und 55 von T4 ersetzen z.B. den σ_{70} -Faktor der E.-coli-RNA-Polymerase. Diese neuen σ -Faktoren binden nicht an die σ_{70} -spezischen Promotor-Regionen, sondern an phagenspezifische Promotor-Bereiche mit veränderter Consens-Sequenz.

Wie die kleinen Phagen benutzen die großen den Proteinbiosynthese-Apparat der Wirtszelle weitgehend.

Die T-Phagen gehören zu den besonders gut untersuchten Viren.

→ Einige für die allgemeine Genetik bedeutungsvolle Fakten sind durch Untersuchungen an ihnen gewonnen worden, z.B. die Erforschung des Csitrons und wichtige Teilergebnisse bei der Erforschung der Rekombination.

Man unterscheidet die geradzahligen von den ungeradzahligen T-Phagen.

Als Vertreter dieser Gruppen werden im folgenden T7, dem T5 sehr ähnlich ist, und T4, dem T2 sehr ähnlich ist, aufgeführt.

- In der genetischen Forschung spielen diese großen Phagen heute keine so große Rolle mehr. Die wichtigsten Ergebnisse werden mit Hilfe kleiner Viren oder Plasmide erarbeitet.
- Die T-Phagen sind in der letzten Zeit insbesondere zu Untersuchung der Morphogenese (T4) und des zeitlichen Ablauf der Genaktivierung (T7) herangezogen worden.

Die T7-Phagen adsorbieren (wie andere Phagen) mit dem Schwanzteil an die E.-coli-Zelle und injizieren ihre lineare Doppelstrang-DNA in die Zelle.

- Das Genom ist 40 kb, genau 39.936 bp groß und sequenziert.
- Die Proteine von 44 Genen sind bekannt.

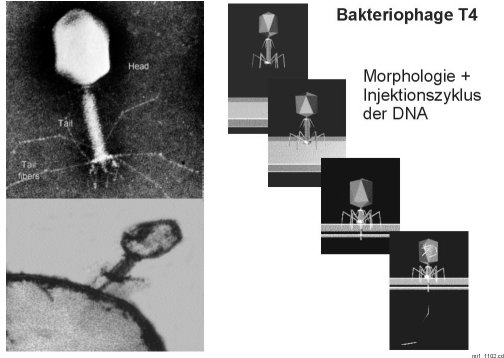
Sie können drei Gruppen zugeordnet werden:

- den frühen Genen,
- den Genen für den DNA-Stoffwechsel und
- den späten Genen.

→ Die frühen Gene werden durch E.-coli-RNA-Polymerase zu einer Messenger transkribiert und durch Rnase III in Teile gespalten, die den Genen entsprechen.

- **Zu den frühen Genen** gehört das Gen für die T7-RNA-Polymerase, durch die die restlichen 80% des Genoms, die Gene der Gruppe II und III, transkribiert werden. Die T7-RNA-Polymerase besteht nur aus einem Polypeptid und erkennt die T7-spezifischen Promotor-Regionen.
- **Die Gene für den DNA-Stoffwechsel** enthalten die Information für die Replikationsenzyme, um T7-Kopien herzustellen, und Nucleasen für den Abbau der Wirts-DNA, um Nucleotide für die Phagen-DNA-Synthese zu gewinnen.
- **Die späten Gene** sind Informationsträger für die Virushüllproteine und die Reifung der Phagen sowie für die Lyse der Zellen.

Das Genom der geradzahigen T-Phagen enthält eine große Anzahl von Genen, von denen ein großer Teil für die Synthese der Phagenbestandteile und ihr Zusammenfügen verantwortlich ist. T4 ist einer der gut untersuchten großen Phagen.



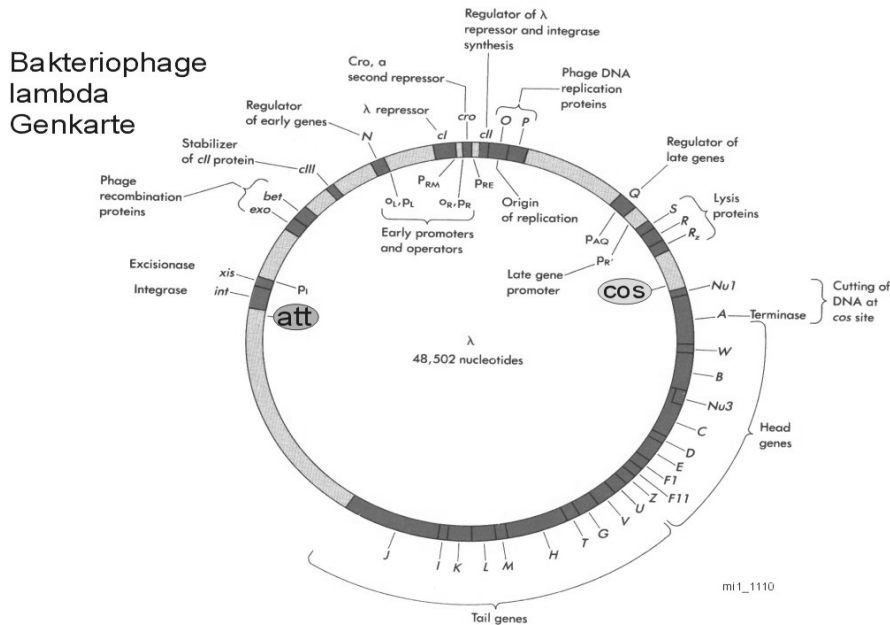
- Wie die Abbildung zeigt, ist die Phagenhülle in Kopf- und Schwanzteil gegliedert.
- Sein Genom besteht aus linearer Doppelstrang-DNA und umfaßt 160 kb.
- Bei der Replikation der DNA werden sehr lange DNA-Moleküle (die ein Vielfaches des T4-Genoms ausmachen) gebildet.

Man nennt solche DNA-Moleküle **CONCATAMERE**.

Beim Verpacken der DNA in den Phagenkopf (bei der Synthese der Phagen) werden die Moleküle aufgeschnitten (headful-Mechanismus). Das so entstehende DNA-Molekül ist etwas länger als ein Genom, es ist daher circular permutiert.

Zu den am besten untersuchten Doppelstrang-DNA-Phagen gehört aber **λ** .

Die Phagen bestehen aus einem Kopfteil, der das lineare DNA-Molekül enthält und dem Schwanzteil.



Das Genom von λ besteht aus 48 kb, in denen die Information für etwa 50 Gene enthalten ist. Abschnitte ohne bekannte Funktion sind kaum vorhanden.

λ ist ein Beispiel für einen temperenten Phagen.

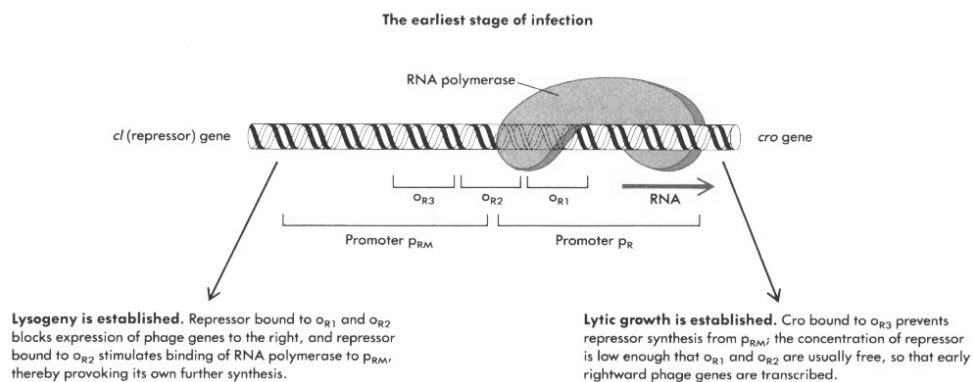
Der Phage kann den lytischen Zyklus durchlaufen oder den lysogenen Zustand übergehen.

- Beim lytischen Zyklus:**
- werden die Phagen in der E.-coli-Zelle vermehrt und durch Lyse freigesetzt.
 - Das Bakterium wird lysogen für den Phagen, wenn der Phage ins Bakteriengenom eingebaut wird.
- Der Phage liegt dann als Prophage vor und wird gemeinsam mit dem Bakteriengenom vermehrt.

Das Genom besteht aus 3 Hauptabschnitten. Der linke Arm ist für die Synthese von Phagenkopf- und Schwanzprotein verantwortlich, der mittlere Teil für die Etablierung von λ als Prophage und der rechte Arm für die DNA-Synthese, die Regulation der frühen Gene, die Induktion der späten Gene und Lyse.

Das zeigt, daß die Gene für ein Endprodukt oder einen Prozeß in einer Region, in einem Cluster und zu einem großen Teil in einem Operon, angeordnet sind.

lambda: Start der Infektion



mil_1111

Nach der Infektion wird das lineare Molekül ringförmig geschlossen.
Dabei werden die einsträngig vorliegenden 12 Nucleotide an den Enden des linearen Moleküls (kohäsive Enden m , m') durch komplementäre Basenpaarungen geschlossen.

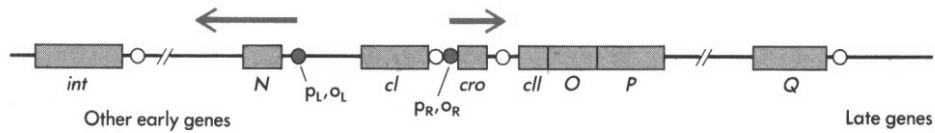
Die Replikation und Transkription erfolgt an der ringförmig geschlossenen DNA.

- Das Genom kann in vier Messenger transkribiert werden, von denen zwei im Uhrzeigersinn (rechtsherum, R) und zwei dem entgegengesetzt (linksherum, L) synthetisiert werden.
- Ob alle Messenger entstehen, hängt davon ab, ob der lytischen oder der lysogene Zustand vorliegt.

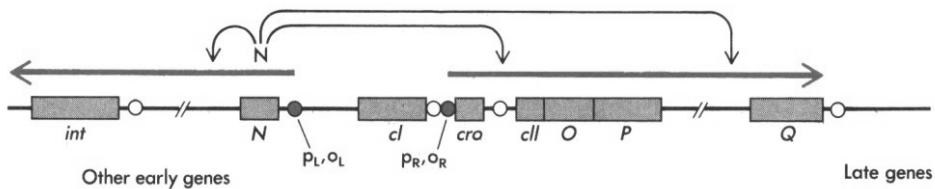
Der R1-Messenger wird gleich nach der Infektion durch E.-coli-RNA-Polymerase synthetisiert und bestimmt die erste Phase der Entwicklung von λ , die auf die Replikation orientiert ist.

Bakteriophage lambda Regulation 1

Both pathways of phage growth begin when RNA polymerase binds the early promoters p_L and p_R , and makes mRNA for the *N* and *cro* genes.



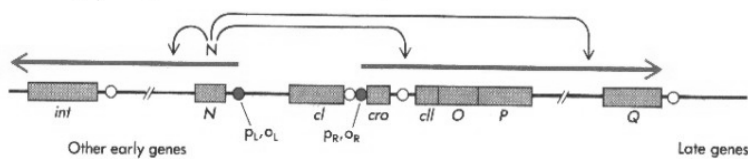
N protein then acts at three sites to extend RNA synthesis to other early genes; *O* and *P* proteins allow DNA synthesis to begin; *cII* protein is made and begins to act as described below.



mi1_1112

Danach entscheidet sich, ob der lytische Zyklus oder der lysogene Weg eingeschlagen werden.

Bakteriophage lambda Regulation 2



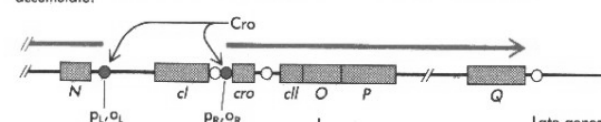
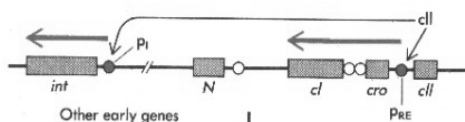
The following two pathways then occur in competition

Toward lysogenic development:
dominance of repressor

Toward lytic development:
dominance of Cro

cII protein stimulates synthesis of mRNA for repressor from promoter p_{RE} and mRNA for integrase from promoter p_i .

Cro protein occupies the operators o_R and o_L , preventing synthesis of repressor mRNA from promoter p_{RM} , but allowing enough rightward transcription for *Q* protein to accumulate.



mi1_1113

Wenn der lytische Zyklus abläuft:

- werden die späten Gene induziert.
- Eine Transkription der Gene für Kopf-, Schwanz- und Lysenproteine erfolgt (R2-Messenger).

→ Der Replikationsmodus ändert sich in der Weise, daß jetzt nach dem Rolling-Circle-Modell repliziert wird und multimere λ -Genome gebildet werden:

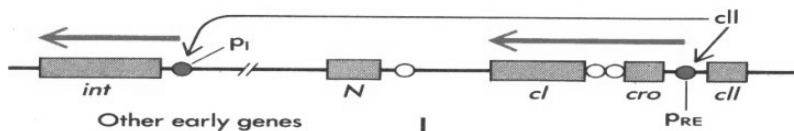
- Bei der Verpackung in das Kopfprotein wird an den kohäsiven Enden geschnitten, so daß Einzelgenome entstehen.
- Der Bereich, an dem der R2-Messenger gebildet wird, überschneidet sich in einem großen Teil mit dem Bereich, an dem der R1-Messenger gebildet wird. Sein Promotor wird durch das phagenspezifische Q-Genprodukt aktiv, das wahrscheinlich anstelle von σ wirkt.
- R2-Messenger werden mit größerer Häufigkeit als R1-Messenger gebildet.

Damit der lysogene Weg gewährleistet werden kann erfolgt eine Repression der Gene für den lytischen Zyklus.

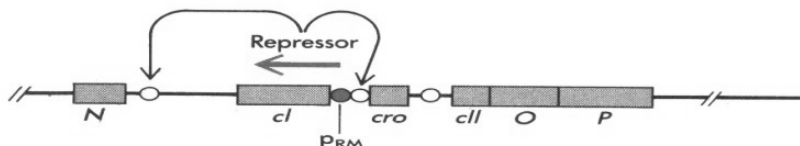
Toward lysogenic development: ↘

Bakteriophage lambda Regulation 4 : Lysogenie

cII protein stimulates synthesis of mRNA for repressor from promoter P_{RE} and mRNA for integrase from promoter P_I .



If enough repressor is made, it binds O_R and O_L , blocking RNA synthesis from the early promoters; furthermore, repressor bound to O_R stimulates synthesis of more repressor mRNA from P_{RM} , so that its concentration is maintained in the cell; integrase promotes integration of phage DNA, and lysogeny is established.



mi1_1115

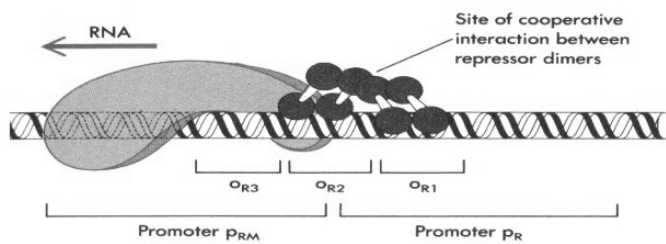
Der Einbau von λ ins E.-coli-Chromosom erfolgt durch ortsspezifische Rekombination. Dabei tritt eine Rekombination zwischen dem Anheftungsort von λ ($attP$) und dem von E.-coli ($attB$) auf.

Nach dieser Rekombination ist λ ein Teil des E.-coli-Chromosoms, ein Prophage. Für den Einbau ist das *int*-Protein notwendig. Beim Übergang in den lytischen Zustand wird die Phage wieder frei, indem das Bakterienchromosom und das λ -Genom wieder ringförmig geschlossen werden.

Für diesen Vorgang sind die Proteine der λ -Gene int und xis zuständig.

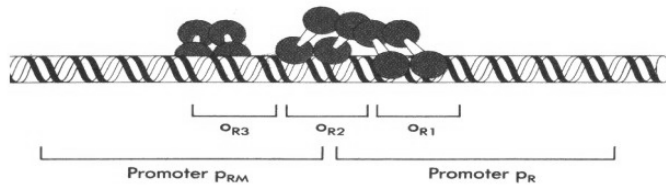
- Im λ -Prophagen wird nur der L1-Messenger synthetisiert, nach dem das cI-Genprodukt, der λ -Repressor, gebildet wird.

Er blockiert die Operatorregionen OL und OR und verhindert damit die Expression von L2- und R1- (und R2-) -Messengern.

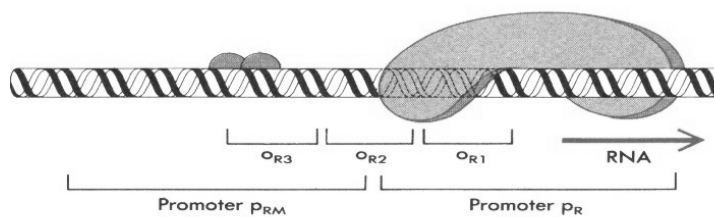


lambda:
C1 - Funktion

If its concentration becomes excessive, repressor binds O_{R3} and blocks its own synthesis.

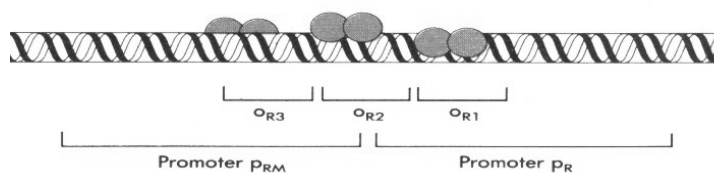


mi1_1116



lambda:
cro - Funktion

Cro binds O_{R1} and O_{R2} when its concentration rises, blocking promoter p_R ; this prevents further synthesis of Cro and also limits expression of other rightward early genes.



mi1_1117

Die Untersuchungen an λ haben u.a. wesentlich zum Verständnis der Regulation der Genaktivität beigetragen. Wenn die λ -DNA nicht ins Bakterienchromosom integriert wird, was bei der Mutante λ_{dv} der Fall ist, wird der Phage wie ein Plasmid in der Zelle repliziert. Eine plasmaartige Replikation ist auch für die DNA einiger anderer Phagen charakteristisch.

Vielen Dank für Ihr Interesse
Daniel Röhgens