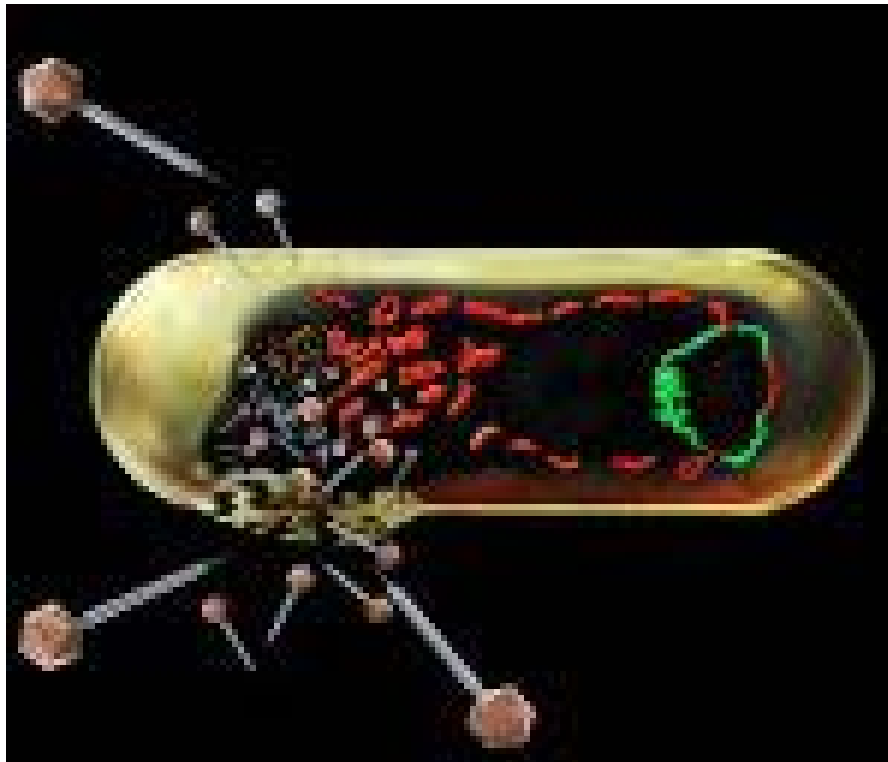


Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda



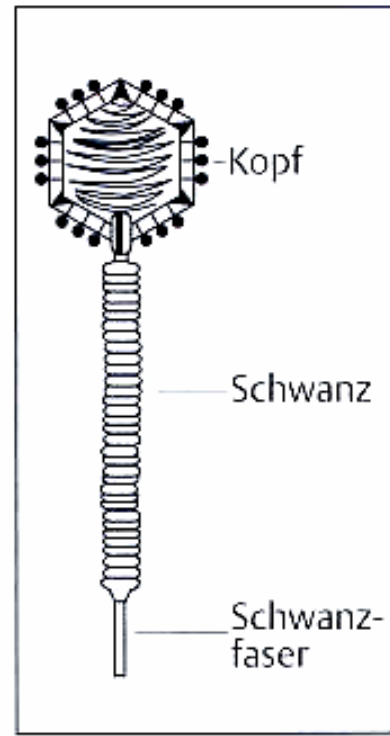
Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda

Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda:

- Die Infektion von *E. coli* mit dem Phagen beginnt mit der Adsorption an einen spezifischen Rezeptor, gefolgt vom Eindringen der Phagen-DNA in die Bakterienzelle.
- Anschließend wird das Phagen-Genom durch die RNA-Polymerase abgelesen.

Es ergeben sich zwei mögliche Entwicklungswege:

- **Lytische Vermehrung:** Replikation der Phagen-DNA, Synthese der Phagenpartikel, Lyse des Wirts
- **Lysogene Entwicklung:** Phagen-DNA wird ins Bakterien-Genom eingebaut und von Generation zu Generation weitergegeben. Gene der lytischen Vermehrung sind abgeschaltet



Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda

Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda:

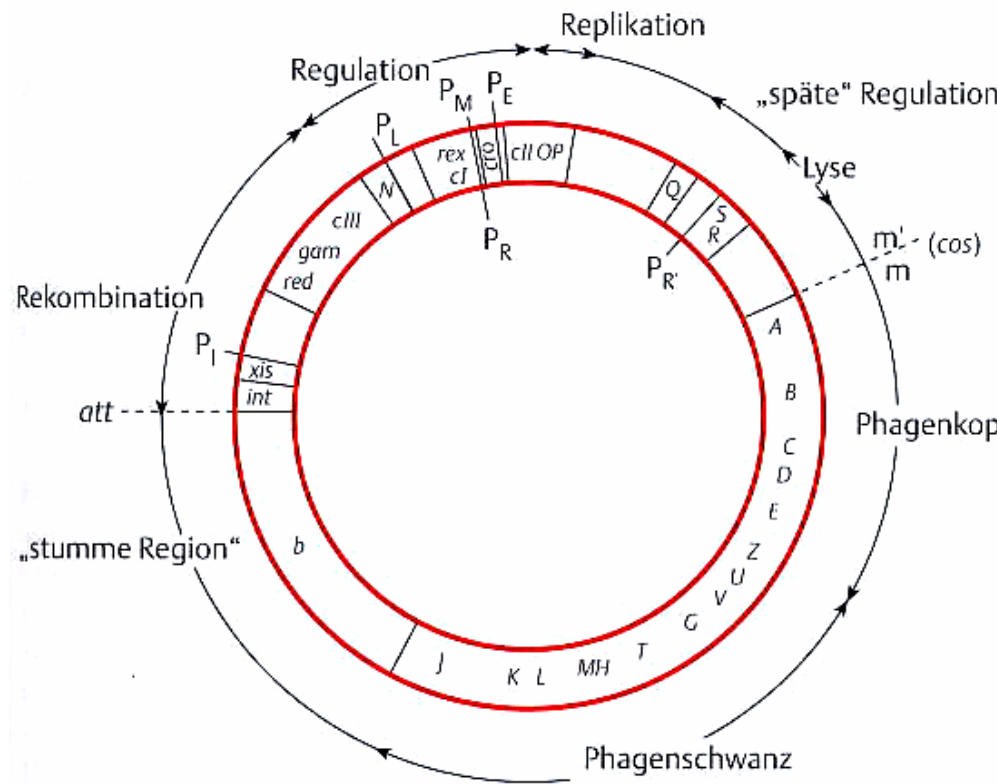
Das Lambda-Genom:

48502 Nucleotide lange
doppelsträngige DNA die an ihren
Enden 12 Nucleotide lange
Einzelstrangüberhänge aufweist.

Überhänge sind Komplementär und
können über H-Brückenbindungen
geschlossen werden.

Nach erfolgter Infektion schließt die
bakterielle Ligase den Doppelstrangring
kovalent.

Der lambda-Phage wurde über
zahlreiche Mutationen funktionell
kartiert

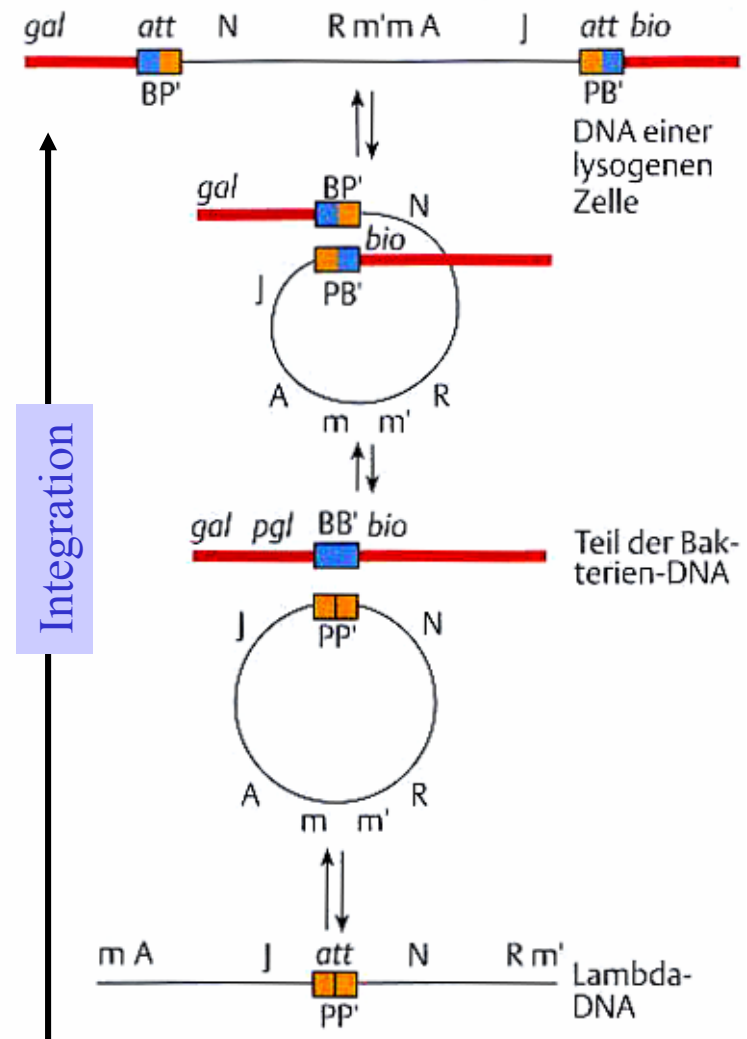


Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda

Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda:

Integration und Exzision des Phagen:

- Die Lambda-DNA ist an den beiden m'/m Stellen zum Ring verknüpft (kohäsive Enden, *cos-sites*)
- An der att-Stelle erfolgt die Integration der Phagen-DNA ins bakterielle Genom
- Die att-Stelle auf der Lambda-DNA bestehen aus 2 Bereichen PP' ebenso wie die entsprechende Stelle im Bakterien-Genom BB' .
- Bevorzugte Integrationsstellen befinden sich in Nachbarschaft des *gal*- und des *bio*-Operons.
- Fehlen diese BB' -Stellen kann die Phagen-DNA auch an anderen Stellen im Genom mit einer geringeren Effizienz integrieren,

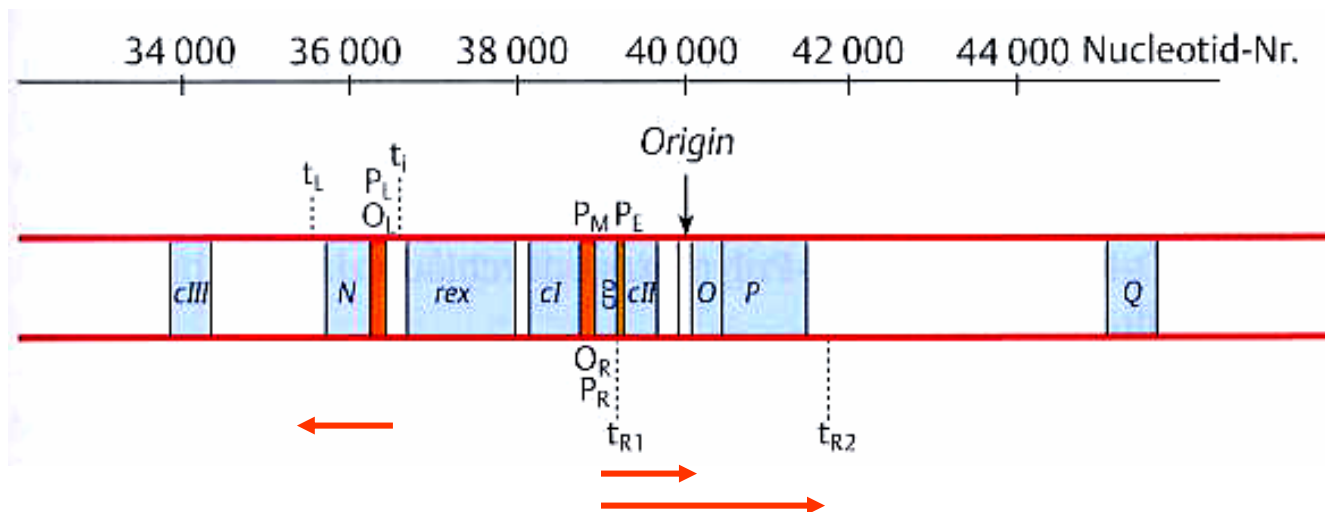


Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda

Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda:

Die frühe Transkription des Phagen:

- Nach dem Ringschluss wird durch die Wirtszellen-RNA-Polymerase beginnend an dem Promotor P_R die mRNA bis zum Terminator t_R1 synthetisiert.
- Der Stop ist nicht vollständig und es erfolgt ebenfalls eine Synthese bis t_R2
- Vom Promotor P_L wird bis zum t_L1 transkribiert die Termination wird durch das Terminationsprotein von *E. coli* (Rho)
- Es werden also die Produkte der Gene *cro*, *cII*, *O*, *P* und *N* gebildet.
- N Wirkt als Antiterminator und ermöglicht eine Transkription über t_R1 , t_R2 und t_L1 hinaus.

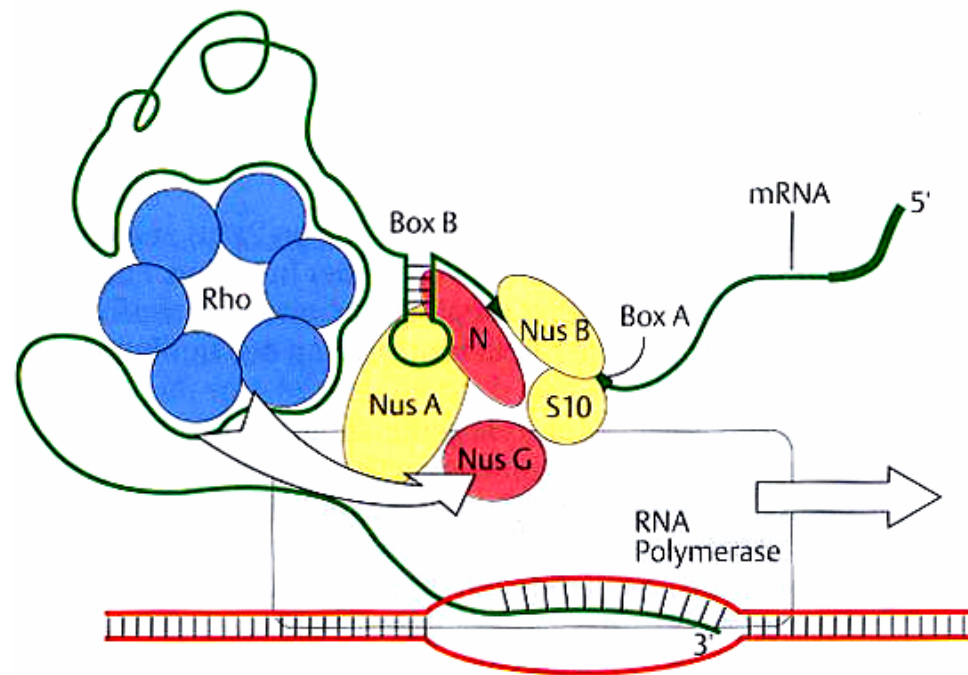


Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda

Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda:

Die Antitermination durch das N-Protein bzw. Q-Protein:

- Die RNA-Polymerase durchläuft eine bestimmte Sequenz (***nutR*** zwischen *cro* und *cII* und *nut2* hinter P_L).
- Die gebildete mRNA bildet eine Sekundärstruktur (**Box-B**) an die sich das Phagenkodierte **Protein N** und die Bakteriellen Proteine **Nus A**, **Nus B**, **Nus G** und **S10** heften und die Rho-Termination aufheben.
- Das **Q-Protein** benötigt eine DNA-Sequenz (***qut***), es bindet dort an die DNA und springt auf die vorbeilaufende RNA-Polymerase auf. Dieser Komplex kann jedes Terminations-Signal umgehen.



Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda

Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda:

Lysogene oder lytische Entwicklung:

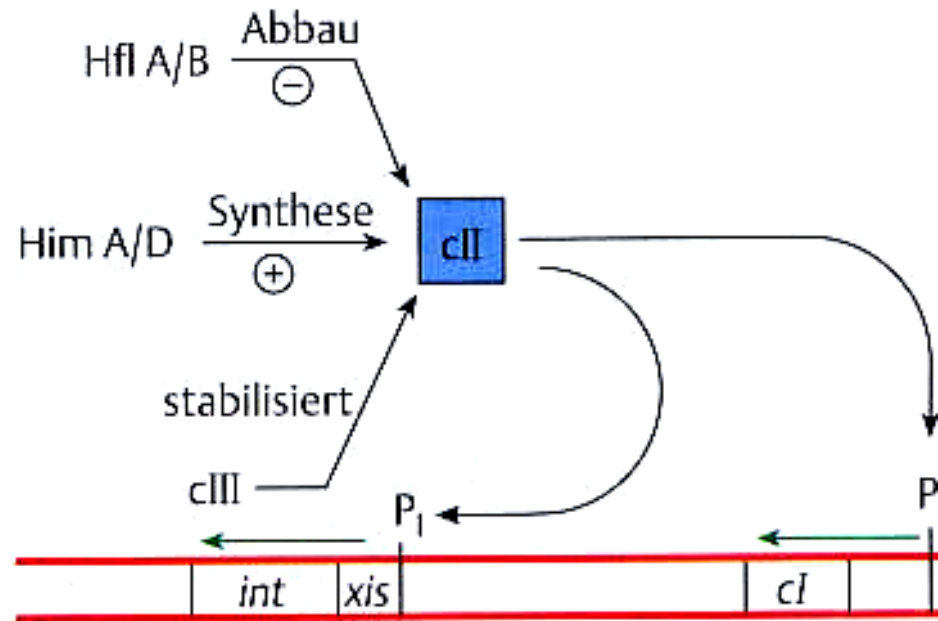
- Nach der Transkription der frühen Gene erfolgt die Entscheidung über Lyse oder Lysogenie.

- Das **Protein cII** steht im Mittelpunkt wobei die intrazelluläre Konzentration entscheidend ist

Wirkende Faktoren:

Bakterielles **Hfl AB** (Protease) zerstört cII
Das **Him AD**-Dimer stimuliert die Synthese von cII und vermittelt die sg. „*host immunity function*“, lysogene Bakterien sind gegen Lambda-Infektionen immun.
cIII stabilisiert cII (Schützt gegen Abbau)

cII ist ein Aktivator für P_E und P_I es werden die Gene *cI*, *rex* und *xis-int* transkribiert

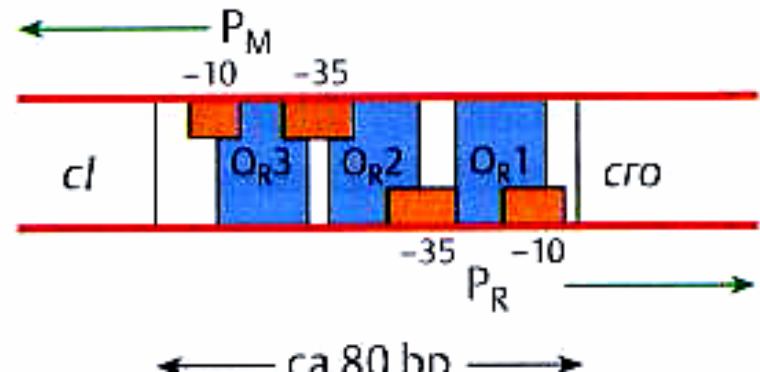
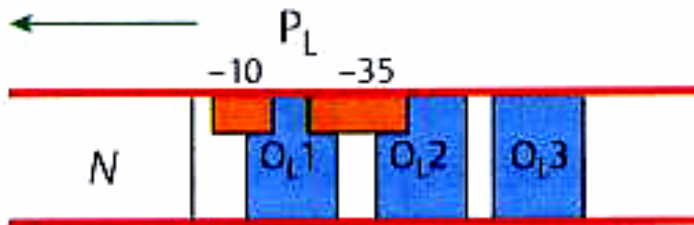


Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda

Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda:

Der Lambda-Repressor cI :

- Das Produkt des cI -Gens ist der Lambda-Repressor (zwei identische Untereinheiten)
- Dieser bindet an je drei Operatorsequenzen im PL und im PM Promotor (O_L1 , O_L2 , O_L3 , O_R1 , O_R2 , O_R3)
- Die Operator-Sequenzen überlappen die wesentlichen Bereiche der Promotoren (-10 und -35 Box) und daher findet die RNA-Polymerase keinen Zugang mehr. Nahezu das gesamte Lambda-Genom ist stillgelegt.
- Auch cI kann nicht über vom P_E aus synthetisiert werden da der Lambda-Repressor im Wege der RNA-Polymerase steht.
- Die Expression von cI wird vom Promotor P_M übernommen und so wird stetig Repressor nachgeliefert.

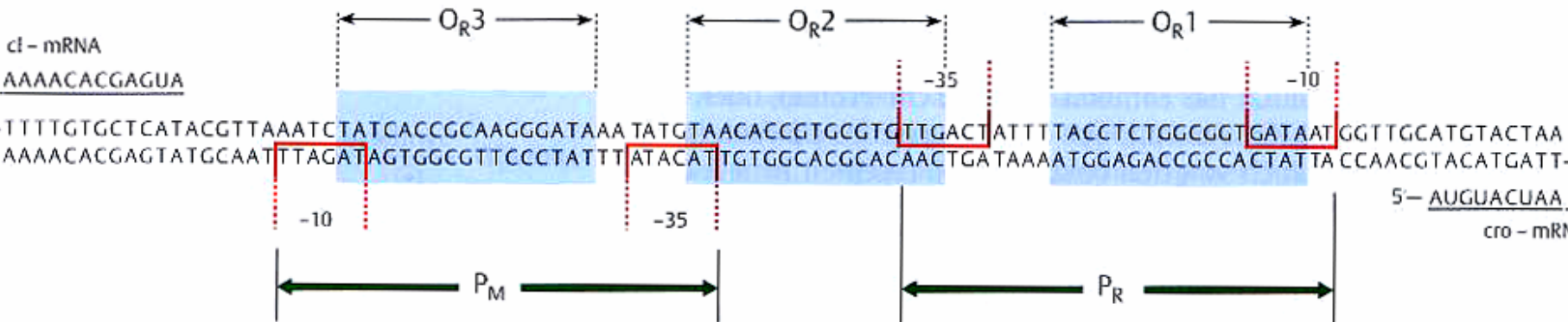


Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda

Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda:

Die Autoregulation des Lambda-Repressor cI , Ereignisse am Promotor P_M und P_R :

- Der Lambda-Repressor hat die größte Affinität zu O_R1 .
- Die Bindung an O_R1 fördert über Protein-Protein Interaktion die Bindung an O_R2
- Ist O_R1 und O_R2 gebunden wirkt cI als **Repressor für P_R** aber als **Aktivator für P_M** (es tritt mit der RNA-Polymerase in Wechselwirkung und verstärkt den schwachen Promotor P_M).
- Steigt die intrazelluläre Konzentration von cI so kann es auch an O_R3 binden und wirkt nun als Repressor von P_M .
- **Die Autoregulation von cI ist sowohl Aktivierend als Reprimierend**



Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda

Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda:

Vergleich der Promotoren P_R und P_M, und der Bindungsstellen für cI:

- P_M ist auf grund seiner Sequenzabweichungen vom Idealpromotor ein schwacher Promotor
- P_R entspricht nahezu dem Ideal-Promotor
- Sequenzunterschiede in O_R1, 2, 3 und O_L1, 2, 3 bedingen die unterschiedlichen Affinitäten von cI

	-35		-10
Konsensus	5'-TTGACA - 17 bp -	TATAAT-3'	
P _M	5'-T A G A T A - 17 bp -	T A G A T T -3'	
P _R	5'-TTGAC T - 17 bp -	G A T AAT-3'	

cI-Bindestellen im Lambda-Genom

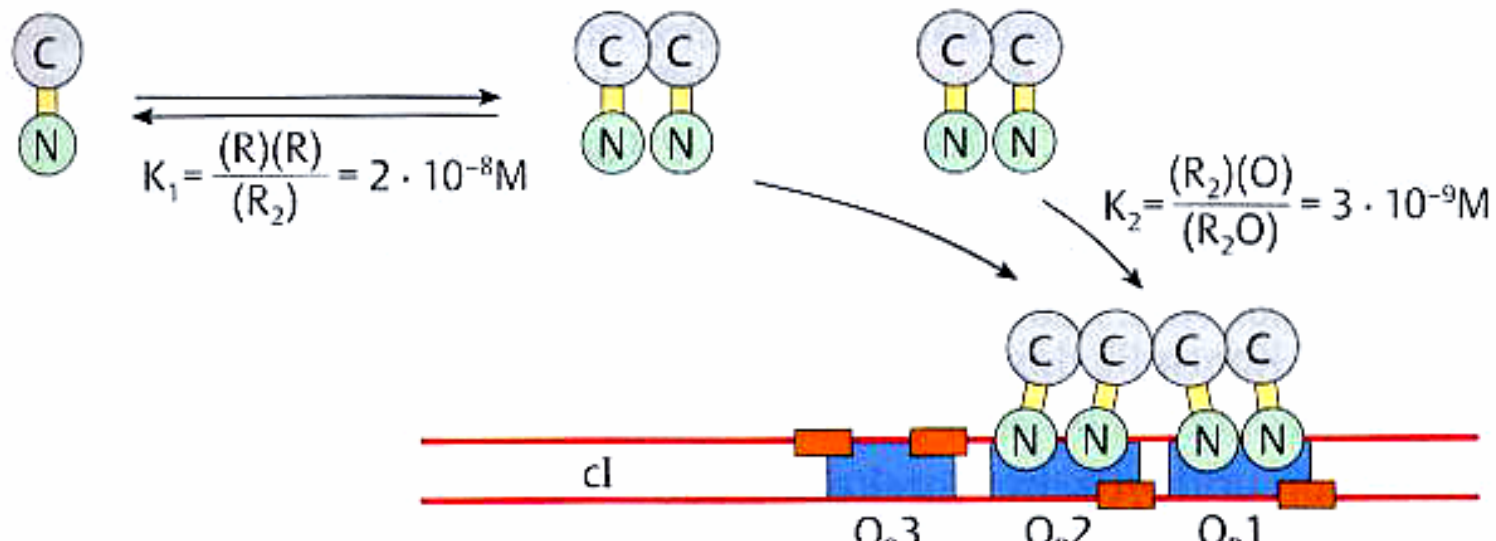
	T A T C A C C G C C A G T G G T A	
	A T A G T G G C G G T C A C C A T	
O _L 1	T A C C T C T G G C G G T G A T A	
	A T G G A G A C C G C C A C T A T	
O _R 1	T A T C T C T G G C G G T G T T G	
	A T A G A G A C C G C C A C A A C	
O _L 2	T A T C A C C G C A G A T G G T T	
	A T A G T G G C G T C T A C C A A	
O _L 3	T A A C A C C G T G C G T G T T G	
	A T T G T G G C A C G C A C A A C	
O _R 2	T A T C A C C G C A A G G G A T A	
	A T A G T G G C G T T C C C T A T	
O _R 3		

Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda

Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda:

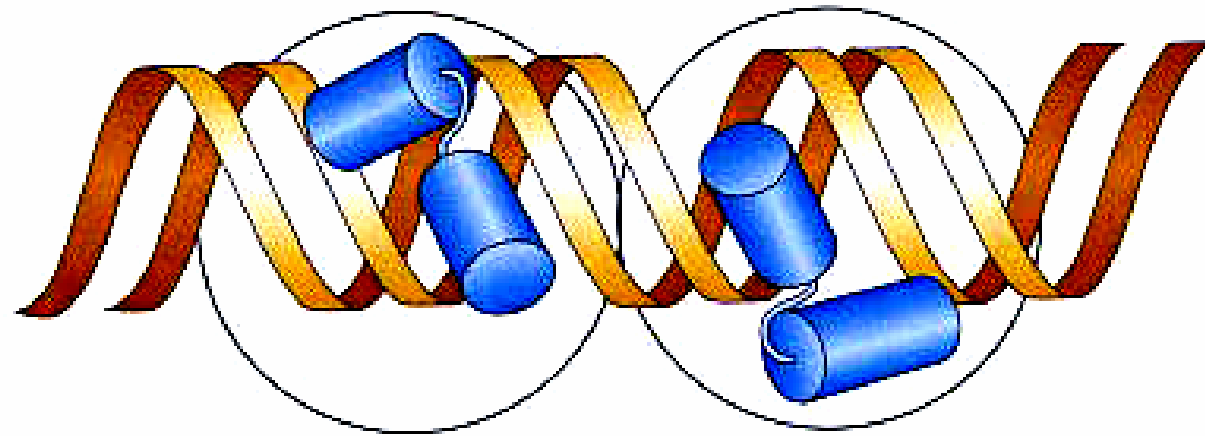
cI Dimerisation und DNA-Bindung:

- Bei einer Konzentration von 10^{-9} M liegt der Repressor als Monomer vor
- Bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-8}$ M ist die Hälfte und bei $4 \cdot 10^{-7}$ M 95% dimerisiert.
- Die Assoziationskonstante zwischen dem Repressor (*cI*-Genprodukt) und $O_R1, 2$ liegt bei $3 \cdot 10^{-9}$ M (P_R ist so gut wie immer blockiert)
- Die Affinitätskonstante zu O_R3 ist um den Faktor 25 niedriger, sinkt die intrazelluläre Repressor-Konzentration auf ein Viertel wird O_R3 frei und *cI* kann über P_M transkribiert werden



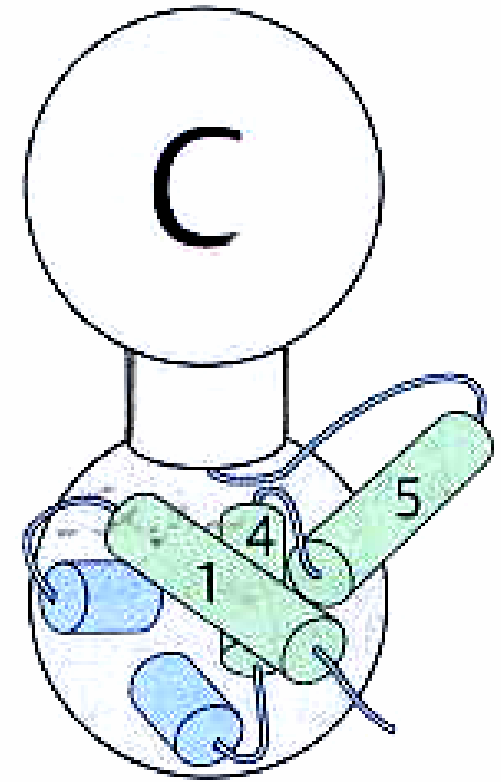
Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda

Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda:



Domänenstruktur des Lambda-Repressors:

- Der Lambda-Repressor besteht aus 2 Domänen einer **Protein-Protein Interaktions-Domäne** und einer DNA-Bindungs-Domäne
- Die **DNA-Bindungs-Domäne** ist ein Helix-Turn-Helix-Motiv

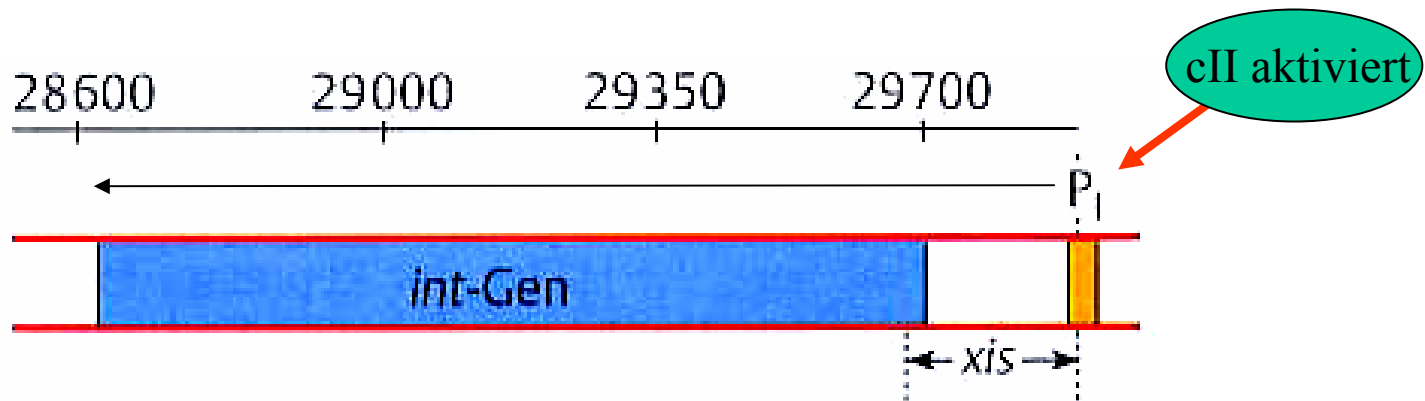


Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda

Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda:

Die Transkription des *int*-Gens:

- Das Produkt des *int*-Gens sowohl für die Integration als auch für die Exzision notwendig.
- Das *xis*-Gen ist nur bei der Exzision nötig
- Geht der Phage in Lysogenie ist nur das *int*-Gen aktiv
- Dies wird durch eine Verschachtelung der beiden Gene erreicht (das Ende von *xis* überlappt mit dem Beginn von *int*)
- Der Promotor für P_I liegt innerhalb von *xis* und liefert keine komplette *xis*-mRNA
- Das cII-Protein ist für die Bindung der RNA-Polymerase an P_I notwendig
- cII ist instabil und durch Blockade von über den Lambda-Repressor sinkt der cII Spiegel rasch.
- *int* wird daher nur vorübergehend transkribiert und nach erfolgter Integration verfällt die Aktivierung von P_I und somit die Expression von *int*.



Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda

Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda:

Der Wechsel in den lytischen Infektionsweg:

Im Zuge der Zellschädigung erfolgt die SOS-Antwort von *E. coli*.

- Das **RecA Protein** (SOS-Antwort) wird verändert und aktiviert eine **Protease**
- Diese Protease **zerstört** unter anderem den **Lambda-Repressor**
- Die Promotoren P_R und P_L werden frei und die **Gene N** und **cro** werden transkribiert
- **Protein N** ermöglicht durch die **Antitermination** die Transkription über t_L sodass *cIII*, *gam*, *red*, *xis* und *int* exprimiert werden (*xis* und *int* werden für die Exzision aus des Phagen-genoms aus dem Bakteriengenom benötigt)
- **Protein N** hat auch t_R1 und t_R2 bis zu **Gen Q** auf
- als erstes wird **cro** transkribiert. Dessen Produkt bindet an die Operatoren OR1, 2, 3 mit zum Lambda-Repressor umgekehrter Reihenfolge und **blockiert** so das **cI-Gen** (Lambda-Repressor)
- **cro** Schaltet durch binden an O_L die Transkription über P_L und später über P_R ab. Dies erfolgt aber erst zu einem Zeitpunkt wo genügend Proteine für die **Exzision**, die **DNA-Replikation** (O- und P-Proteine) und genügend **Q-Protein** gebildet sind.
- Das **Q-Protein** kontrolliert Positiv die Expression des stärksten Lambda-Promotors P_R , dadurch werden die **Lysis-Gene** (*R*, *S*) und die Gene für die Struktur-Proteine der **Phagen-Hülle** exprimiert
- **Die Voraussetzungen für die Lyse sind geschaffen**

Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda

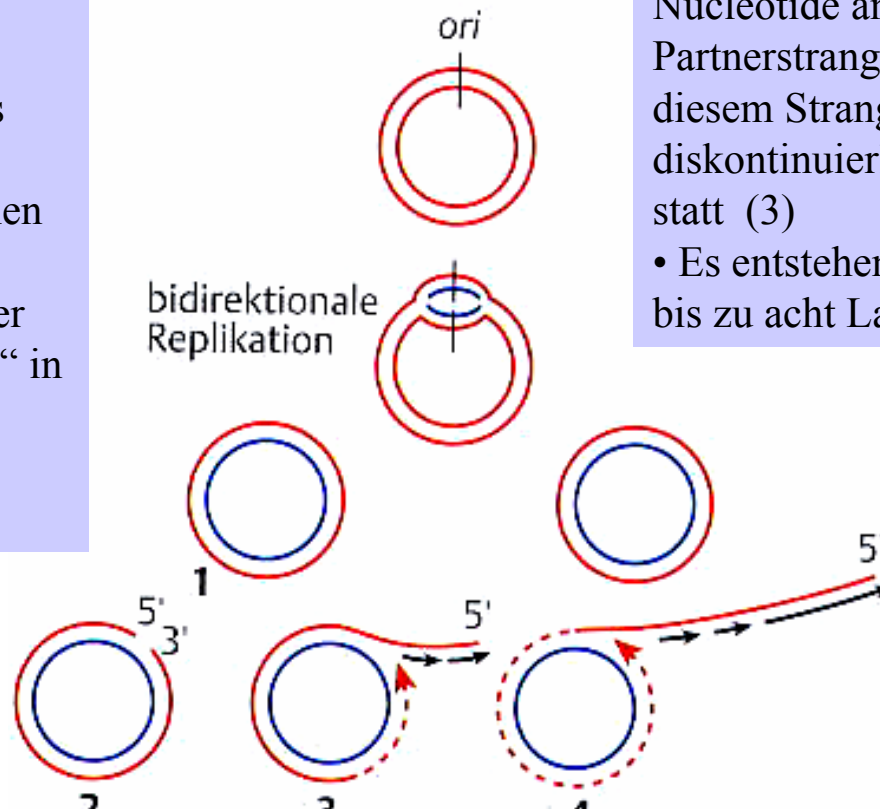
Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda:

Lambda-Replikation:

- Die Replikation wird am Origin (im Bereich des O-Gens) initiiert
- Es sind dafür die Proteine O und P notwendig
- Die DNA wird entwunden
- Die Entwundene DNA dient als Matrize für die Replikation.
- So entstehen ca. 50 Nachkommen DNA Ringe
- Diese werden im Anschluss über das System des „rollenden Rings“ in lineare, End zu End verknüpfte Lambdamoleküle abgeschrieben (Concatemere)

Lambda-Replikation:

- Ein DNA-Strang wird gespalten (1, 2)
- Am 3'OH ende werden Nucleotide angeheftet und der Partnerstrang wird verdrängt, an diesem Strang findet eine diskontinuierliche Strang-Synthese statt (3)
- Es entstehen lange Ketten von bis zu acht Lambdamolekülen (4)



Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda

Regulation von Genen des Bakteriophagen Lambda:

Der Zusammenbau der Phagen-Partikel:

Die wesentlichen Bauelemente (Kopf und Schwanz) werden unabhängig gebildet und anschließend als Bauelemente zusammengefügt

