

# Replikacja DNA bakteriofaga $\lambda$ – nowe odkrycia dokonane przy użyciu starego modelu badawczego

Grzegorz Węgrzyn<sup>1,✉</sup>

Alicja Węgrzyn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański, Gdańsk

<sup>2</sup>Pracownia Biologii Molekularnej Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk afiliowana przy Uniwersytecie Gdańskim, Gdańsk

<sup>✉</sup>Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; e-mail: wegrzyn@biotech.univ.gda.pl, tel. (058) 346 30 14, faks: (058) 301 00 72

Artykuł otrzymano 23 sierpnia 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 23 sierpnia 2005 r.

**Słowa kluczowe:** replikacja DNA, czynniki transkrypcyjne, bakteriofag  $\lambda$ , regulacja rozwoju wirusa, białko DnaA, białko SeqA

**Podziękowania:** Autorzy dziękują członkom ich zespołów za pełną entuzjazmu pracę nad zrozumieniem mechanizmów regulacji replikacji DNA bakteriofaga  $\lambda$ . Badania te były finansowane w ramach grantów Ministerstwa Nauki i Informatyzacji (projekty nr 3 P04A 029 22 oraz 3 P04A 049 24)

## STERSZCZENIE

Bakteriofag  $\lambda$  jest modelem w badaniach z dziedziny biologii molekularnej od ponad pięćdziesięciu lat. Mimo tego, ostatnie lata przyniosły znowu (podobnie jak poprzednie okresy) wiele nowych wyników doświadczeń, które nie tylko rozszerzyły naszą wiedzę na temat molekularnych mechanizmów funkcjonowania tego wirusa lecz także rzuciły nowe światło na zagadnienia ogólnych prawidłowości w regulacji przepływu i przekazywania informacji genetycznej. W tym artykule przedstawiamy osiągnięcia z ostatniego okresu dotyczące głównie prac nad mechanizmami regulacji replikacji DNA bakteriofaga  $\lambda$ . Opisane tutaj w skrócie badania doprowadziły między innymi do poznania składu dziedzicznego kompleksu replikacyjnego  $\lambda$  oraz biologicznej roli szybkiej degradacji białka  $\lambda$ O pozostającego poza tym kompleksem, zaproponowania regulacji zmiany typu replikacji DNA bakteriofaga z wczesnej (model  $\theta$ ) na późną (model  $\sigma$ ), wyjaśnienia mechanizmu aktywacji transkrypcji przez replikacyjne białko DnaA i wykazania aktywności stymulatora transkrypcji przez inne białko regulujące replikację DNA – SeqA. Wyniki te mogą mieć istotne znaczenie w lepszym zrozumieniu regulacji replikacji DNA nie tylko bakteriofaga  $\lambda$  lecz także innych organizmów.

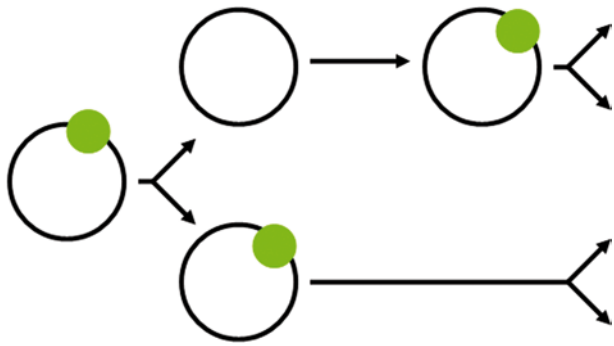
## BAKTERIOFAG $\lambda$ JAKO CIĄGŁE WAŻNY MODEL BADAWCZY

Bakteriofag  $\lambda$ , po raz pierwszy opisany ponad 50 lat temu, odegrał kluczową rolę w rozwoju biologii molekularnej. Badania nad tym wirusem dostarczyły podstawowych wiadomości o regulacji i przebiegu takich procesów jak na przykład inicjacja transkrypcji, antyterminacja transkrypcji, inicjacja replikacji DNA, funkcjonowanie białek szoku termicznego, ogólna i miejscowo-specyficzna rekombinacja DNA, tworzenie się wielobiałkowych i nukleoproteinowych kompleksów czy kontrola rozwoju na etapie wyboru alternatywnych dróg rozwojowych [1]. Mimo obecnego stanu zaawansowania badań genetycznych i biochemicznych nad znacznie bardziej skomplikowanymi organizmami, włącznie z człowiekiem, bakteriofag  $\lambda$  – być może dla niektórych niespodziewanie – nadal odgrywa niezwykle ważną rolę w poznawaniu szczegółów podstawowych procesów biologicznych zachodzących na poziomie molekularnym. Przykłady popierające to twierdzenie można znaleźć w artykułach przeglądowych opublikowanych w ostatnich latach [1-9]. Szczególnie praca autorstwa Friedman'a i Court'a [1] pokazuje dobitnie, że badania prowadzone w oparciu o bakteriofaga  $\lambda$  mogą w dalszym ciągu przynieść rezultaty o ogólnobiologicznym znaczeniu i zadziwić możliwościami jakie daje ten wirus w poznawaniu molekularnych mechanizmów zjawisk biologicznych. Znamienny jest także tytuł tego artykułu, w wolnym tłumaczeniu brzmiący: „Bakteriofag  $\lambda$ : żyje, ma się dobrze i robi swoje”. Podobny wydźwięk mają również dwie inne niedawno opublikowane prace podkreślające znaczenie badań nad bakteriofagiem  $\lambda$  we współczesnej biochemii i biologii molekularnej [8,9].

W 1999 r. opublikowaliśmy w *Postęпах Biochemii* artykuł dotyczący regulacji replikacji DNA bakteriofaga  $\lambda$  i plazmidów od niego pochodzących [10]. W niniejszej pracy chcielibyśmy przestawić postęp jaki dokonał się od tamtego czasu w rozumieniu procesów, dzięki którym możliwa jest kontrola replikacji materiału genetycznego tego wirusa.

## KOMPLEKS REPLIKACYJNY BAKTERIOFAGA $\lambda$

Bakteriofag  $\lambda$  koduje dwa białka replikacyjne, O i P, niezbędne do specyficznej inicjacji replikacji z rejonu *ori* $\lambda$ . Pozostałe białka replikacyjne wykorzystywane w tym procesie są kodowane przez genom gospodarza – *Escherichia coli* [6, 7, 10]. Wcześniej proponowane hipotezy zakładały, że po utworzeniu kompleksu replikacyjnego w rejonie *ori* $\lambda$  i rozpoczęciu replikacji, struktura ta ulega rozpadowi i do rozpoczęcia każdej nowej rundy replikacyjnej niezbędne jest złożenie takiego kompleksu od nowa. Jednakże kolejne lata badań doprowadziły do



**Rysunek 1.** Schemat replikacji DNA  $\lambda$  zachodzącej według modelu  $\theta$ . Kompleks replikacyjny (zielone kółko) zawierający białka O, P, DnaB i DnaK jest dziedziczony po każdej rundzie replikacji DNA bakteriofaga lub plazmidu  $\lambda$  przez jedną z dwóch potomnych cząsteczek DNA (duże kółka). Na drugiej kopii, utworzony musi być nowy kompleks. Do inicjacji replikacji niezbędna jest dodatkowo aktywność białek DnaJ i GrpE oraz proces aktywacji transkrypcyjnej *ori $\lambda$* . Dokładniejsze objaśnienia w tekście.

stwierdzenia, że raz utworzony kompleks replikacyjny  $\lambda$ , zawierający białko O chronione przed proteolizą przez inne elementy tego kompleksu, po rozpoczęciu nowej rundy replikacyjnej nie rozpada się lecz jako stabilna struktura jest dziedziczony przez jedną z dwóch potomnych kopii DNA [2, 3, 5, 6, 10]. Na drugiej kopii replikonu kompleks replikacyjny musi faktycznie powstać od nowa, ale samo jego utworzenie nie jest sygnałem do rozpoczęcia replikacji, jak to wcześniej sugerowano. Obecnie wydaje się, że sygnałem takim może być aktywacja transkrypcyjna *ori $\lambda$* , czyli transkrypcja przechodząca w rejonie *origin* (Rys. 1) [3, 5]. Nieznany jest jeszcze dokładny mechanizm w jaki transkrypcja może aktywować inicjację replikacji, ale wydaje się iż najważniejsze w tym procesie mogą być zmiany topologii DNA jakie zachodzą podczas transkrypcji, obserwowane w doświadczeniach *in vitro* [11, 12]. W szczególności kluczowe mogą być te zmiany, które występują w przypadku istnienia białka specyficznie związanego z DNA (jak na przykład białka O faga  $\lambda$  [11] lub kompleksu replikacyjnego) w transkrybowanym rejonie.

Pomimo jednoznacznego stwierdzenia dziedziczenia stabilnego kompleksu replikacyjnego  $\lambda$ , do niedawna nieznany był jego skład białkowy. Badania przeprowadzone techniką sieciowania molekularnego białko-DNA *in vivo*, immunoprecypitacji a następnie identyfikacji rejonu DNA związanego z danym białkiem przy pomocy PCR wykazały, że kompleks taki zawiera białka O i P faga  $\lambda$  oraz białka komórkowe: DnaB i DnaK [13]. O ile obecność w stabilnym kompleksie replikacyjnym białka O i P oraz helikazy DnaB nie jest zaskoczeniem, to stwierdzenie w tej strukturze białka szoku termicznego (białka opiekuńczego) DnaK było raczej niespodziewane. Wyniki te rzucają zatem nowe światło na udział białek opiekuńczych w procesie replikacji DNA. Jest to tym bardziej istotne, że zjawisko dziedziczenia kompleksu replikacyjnego, po raz pierwszy wykazane na przykładzie plazmidów pochodzących od bakteriofaga  $\lambda$ , zostało następnie wykryte w przypadku innych replikonów, zarówno prokariotycznych [14] jak i eukariotycznych [3].

Kompleks replikacyjny  $\lambda$  może być dziedziczony przez jedną z dwóch potomnych cząsteczek DNA przez wiele generacji komórkowych, jest zatem strukturą bardzo stabilną.

Jednakże niektóre warunki stresowe, jak na przykład nagły wzrost temperatury, powodują jego dysocjację od DNA i degradację przynajmniej niektórych jego elementów [3, 10]. Inne warunki stresowe, jak na przykład naświetlanie promieniami UV, nie powodują co prawda rozpadu kompleksu replikacyjnego  $\lambda$  ale uniemożliwiają utworzenie stabilnego kompleksu, przy czym replikacja DNA bakteriofaga  $\lambda$  może w dalszym ciągu zachodzić [15]. Zatem możliwe jest utworzenie dwóch rodzajów kompleksów replikacyjnych  $\lambda$ , stabilnego i niestabilnego, w zależności od warunków środowiskowych. Do tej pory nieznan jest ani skład ani mechanizm funkcjonowania kompleksu niestabilnego.

Pomimo iż białko  $\lambda$ O jest stabilizowane w kompleksie replikacyjnym, jego okres półtrwania jest wyjątkowo krótki (około 60-90 sekund), gdy występuje ono w stanie wolnym (nie związanym z DNA i innymi białkami) w komórce [2, 4, 10]. Szybka degradacja białka O jest wynikiem działania proteazy ClpP/ClpX. Pojawiło się zatem pytanie jaka jest fizjologiczna rola tej szybkiej proteolizy białka replikacyjnego skoro jego stabilna frakcja odpowiada za regulację replikacji DNA? Badania przeprowadzone z wykorzystaniem mutantów w genach *clpP* i *clpX* wykazały, że założenie iż ilość białka O nie ma istotnego znaczenia regulacyjnego gdyż występuje jego stabilna frakcja może być prawdziwe w przypadku bakterii hodowanych w bogatych pożywkach, ale poziom białka O dostępnego do tworzenia nowych kompleksów replikacyjnych jest głównym czynnikiem limitującym replikację plazmidów  $\lambda$  w wolno rosnących hodowlach komórek *E. coli* [16]. Można zatem zaproponować, że rolą szybkiej degradacji niezwiązanej formy białka O jest obniżenie efektywności replikacji DNA bakteriofaga  $\lambda$  w wolno rosnących komórkach gospodarza. W takich warunkach preferowany jest cykl lizogeniczny tego faga, zatem replikacja DNA powinna być negatywnie regulowana [7]. Faktycznie, okazało się iż w wolno rosnących hodowlach komórek *E. coli* cykl lizogeniczny bakteriofaga  $\lambda$  jest zaburzony w przypadku występowania mutacji w genie *clpP* lub *clpX* [17].

## WCZESNA I PÓŻNA REPLIKACJA DNA BAKTERIOFAGA $\lambda$

We wczesnej fazie rozwoju litycznego replikacja DNA bakteriofaga  $\lambda$  rozpoczyna się w miejscu *ori $\lambda$*  i przebiega według modelu  $\theta$  („z kółka w kółko”), w którym potomne nici DNA syntetyzowane są z reguły w obydwu kierunkach od miejsca *origin* [4, 6, 7, 10]. Po kilku (zwykle pięciu lub sześciu) rundach replikacji wczesnej (około 15 minut po infekcji w optymalnych warunkach wzrostu komórki gospodarza) następuje przejście do replikacji według modelu  $\sigma$  („toczącego się koła”) [4,6,7,10]. W jej wyniku powstają konkatameryczne struktury DNA złożone z wielu jednostkowych genomów  $\lambda$ , które następnie mogą być pakowane do potomnych, wcześniej uformowanych główek fagowych.

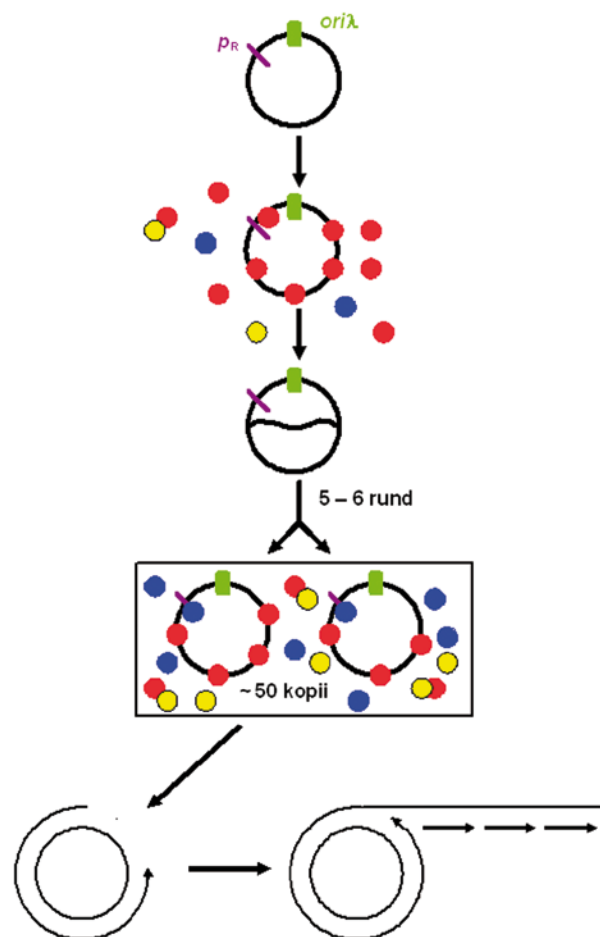
Roger McMacken wraz ze swoją grupą badawczą zaproponował model przejścia od replikacji  $\theta$  do replikacji  $\sigma$ , który jak dotąd, choć nie udowodniony bezpośrednio, jest powszechnie uznawany [7,10]. Model ten zakłada, że replikacja  $\sigma$  jest poprzedzana jedną rundą jednokierunkowej replikacji według modelu  $\theta$  zainicjowanej w miejscu *ori $\lambda$* . Po takiej rundzie następowałoby odsunięcie końca 5' synte-

tyzowanej nici prowadzącej (ciągłej) przez nowo tworzony koniec 3' tejże nici. Kluczowe pytanie, na które powinna być znaleziona odpowiedź w celu zrozumienia regulacji zmiany typu replikacji DNA podczas rozwoju wirusa dotyczyło mechanizmu zapoczątkowania jednokierunkowej replikacji DNA  $\lambda$  według modelu  $\theta$ .

Sugestie co do białek, mogących brać udział w regulacji zmiany typu replikacji podczas rozwoju bakteriofaga  $\lambda$ , wypływały z badań genetycznych [18, 19] i wskazywały na potencjalne zaangażowanie białek  $\lambda P$  i DnaA w tym procesie. Dopiero jednak szczegółowe doświadczenia z zastosowaniem technik przesunięcia gęstościowego DNA, dwukierunkowej elektroforezy agarozowej DNA i mikroskopii elektronowej pozwoliły na zaproponowanie szczegółowej hipotezy [20]. Według tej hipotezy, procesy przegrupowania kompleksu  $ori\lambda$ - $\lambda O$ - $\lambda P$ -DnaB przy udziale białek szoku termicznego, DnaK, DnaJ i GrpE oraz umieszczenia helikazy DnaB (uwolnionej od blokującego jej aktywność białka P) w odpowiednich miejscach i w orientacji pozwalającej następnie na replikację w dwóch kierunkach są powiązane z aktywacją transkrypcyjną  $ori\lambda$ , zachodzącą podczas transkrypcji inicjowanej z promotora  $p_R$ . W związku z tym, mniej efektywna transkrypcja z promotora  $p_R$  może powodować obniżenie poziomu aktywności transkrypcyjnej  $ori\lambda$ . To z kolei powoduje zainstalowanie tylko jednego kompleksu helikazy DnaB, a co za tym idzie prowadzi do zainicjowania replikacji jednokierunkowej, przechodzącej następnie w replikację typu  $\sigma$ . Kluczową rolę w tym modelu odgrywa bakteryjne białko DnaA, które pozytywnie reguluje transkrypcję z promotora  $p_R$ . Zatem aktywność białka DnaA jest niezbędna do częstego inicjowania dwukierunkowej replikacji typu  $\theta$  z  $ori\lambda$  w komórkach *E. coli*. Omawiana hipoteza zakłada, iż po kilku rundach replikacji według modelu dwukierunkowej  $\theta$  w komórce pojawia się wiele kopii genomu  $\lambda$  (około 50 kopii po 5-6 rundach replikacyjnych) co w powiązaniu z występowaniem dużej ilości miejsc wiążących DnaA w obrębie DNA  $\lambda$  powoduje wymiarczkowanie białka DnaA w komórce. Taka sytuacja może prowadzić do mało wydajnej aktywacji transkrypcyjnej  $ori\lambda$ , która z kolei może wystarczać na zainicjowanie tylko jednokierunkowej replikacji typu  $\theta$ , która następnie przechodzi w replikację typu  $\sigma$  [20]. Ostatnie badania wskazują, że inne białka też są zaangażowane w tę regulację. Mianowicie, białko P prawdopodobnie oddziałuje z DnaA [21] i hamuje jego aktywność [22]. Ponieważ P jest białkiem stabilnym w komórce *E. coli*, akumuluje się ono podczas rozwoju litycznego, mogąc efektywnie hamować funkcje DnaA, a przez to aktywację transkrypcyjną  $ori\lambda$  w późniejszej fazie infekcji. W podobny sposób akumuluje się w zakażonej komórce białko Cro, kodowane przez bakteriofaga  $\lambda$ , które w wysokich stężeniach staje się represorem promotora  $p_R$ . Wstępne wyniki badań wskazują, że faktycznie Cro może brać udział w procesie regulacji kierunkowości replikacji DNA  $\lambda$ , podobnie jak białko SeqA, nowo odkryty regulator transkrypcji [S. Barańska, M. Narajczyk, A. Węgrzyn, G. Węgrzyn, dane niepublikowane]. Aktualny model regulacji zmiany typu replikacji DNA bakteriofaga  $\lambda$  podczas jego cyklu rozwojowego w komórce *E. coli* przedstawia Rys. 2.

## ROLA BIAŁKA DnaA W REGULACJI TRANSKRYPCJI I REPLIKACJI DNA BAKTERIOFAGA $\lambda$

Kluczowa rola białka DnaA w regulacji replikacji DNA bakteriofaga  $\lambda$  została przedstawiona powyżej. Warto jednak raz jeszcze podkreślić, że białko to reguluje replikację rozpoczynającą się z  $ori\lambda$  poprzez stymulację aktywacji transkrypcyjnej *origin*, czyli transkrypcji z promotora  $p_R$ . Ciekawym zjawiskiem jest natomiast niezgodność plazmidów  $\lambda$  z niektórymi mutacjami punktowymi w genie *dnaA* gospodarza, przejawiająca się niemożnością wprowadzenia dzikiego typu plazmidu  $\lambda$  do komórek tych mutantów (*dnaA46*, *dnaA204* i *dnaA508*), co z kolei może być zniwelowane przez mutację typu  $\pi$  w genie P na plazmidzie  $\lambda$ . Wymienione wyżej mutacje w genie *dnaA* powodują fenotyp temperaturo-wrażliwości bakterii, ale niezgodność z plazmidem  $\lambda$  występuje również w temperaturze permissywnej (30°C). W tych warunkach można co prawda obserwować



**Rysunek 2.** Hipotetyczny mechanizm zmiany typu replikacji DNA bakteriofaga  $\lambda$  z modelu  $\theta$  na model  $\sigma$ . W krótkim czasie po infekcji białko DnaA znajduje się w komórce w wystarczającej ilości do związania się z rejonem promotora  $p_R$  (na jednej lub kilku kopiach genomu bakteriofaga) i jego stymulacji, co skutkuje efektywną aktywacją transkrypcyjną  $ori\lambda$  i dwukierunkową replikacją typu  $\theta$ . W tym czasie, białka Cro i P występują w stosunkowo małych ilościach. Po kilku rundach replikacji, białko DnaA zostaje wymiarczkowane przez dużą liczbę sekwencji je wiążących, położonych w obrębie genomu bakteriofaga. Ponadto rosnąca ilość białka P powoduje inaktywację DnaA a rosnąca ilość białka Cro powoduje represję promotora  $p_R$ . W związku z tym aktywacja transkrypcyjna  $ori\lambda$  jest nieefektywna co powoduje rozpoczęcie jednokierunkowej replikacji typu  $\theta$ , przechodzącej po jednej rundzie w replikację typu  $\sigma$ . Białko SeqA (nie pokazane na schemacie) ma jedynie modyfikujący wpływ na tę regulację w trakcie rozwoju bakteriofaga. Szczegółowy opis tej hipotezy zawarty jest w tekście. Objasnienia symboli: czarne duże kółko – genom bakteriofaga  $\lambda$ , zielony prostokąt –  $ori\lambda$ , fioletowa poprzeczna linia – promotor  $p_R$ , czerwone kółka – białko DnaA, niebieskie kółka – białko Cro, żółte kółka – białko P.

obniżenie aktywności promotora  $p_R$ , ale jest to obniżenie zaledwie kilkukrotne przy jednoczesnej całkowitej niemożności uzyskania komórek transformowanych plazmidem  $\lambda$  [6]. Ostatnio zaproponowany został podwójny mechanizm tej niezgodności. Okazało się bowiem, że produkty zmutowanych alleli *dnaA* mogą być mniej aktywne w tworzeniu kompleksów replikacyjnych w *oriC* (miejscu startu replikacji chromosomalnego DNA bakterii) przypuszczalnie w wyniku słabszego oddziaływania z helikazą DnaB. W związku z tym w obecności dzikiego typu białka P, które dodatkowo obniża aktywność DnaA [21, 22], przegrywa ono zdecydowanie konkurencję o helikazę DnaB z tym białkiem fagowym [23]. Niemożność replikacji DNA powoduje, iż nawet jeśli plazmid  $\lambda$  mógłby replikować się w komórkach niosących mutację w genie *dnaA*, to komórki takie nie byłyby w stanie przeżyć i utworzyć kolonii bakteryjnej. Mutacja typu  $\pi$  w genie *P* powoduje zmniejszenie powinowactwa jego produktu do DnaB [24], a zatem umożliwia skuteczniejsze konkurowanie o helikazę przez częściowo defektywne cząsteczki białka DnaA [23].

Niezwykle istotne wydawało się dokładne poznanie mechanizmu stymulacji aktywności promotora  $p_R$  przez białko DnaA, tym bardziej, że białko to wiąże się do rejonu DNA położonego za promotorem (ang. *downstream*) [25]. W rejonie tym występują dwa miejsca słabo wiążące DnaA (w okolicach pozycji +18 i +200 w stosunku do miejsca startu transkrypcji z  $p_R$ ) i oba są absolutnie konieczne do tego wiązania – modyfikacja któregośkolwiek z nich powoduje całkowitą utratę zdolności DnaA do oddziaływania z tym rejonem DNA [26].

Szczegółowa analiza biochemiczna wykazała, że DnaA jest czynnikiem stymulującym dwa etapy inicjacji transkrypcji z promotora  $p_R$ : wiązanie się polimerazy RNA do promotora i opuszczanie promotora [27]. Wydaje się prawdopodobne, że w rejonie promotora  $p_R$  białko DnaA tworzy skomplikowane przestrzenne struktury nukleoproteinowe, wprowadzające zmiany w topologii DNA i mogące ułatwiać rozpoczęcie transkrypcji.

Ciekawą obserwacją było stwierdzenie, że replikacja plazmidów  $\lambda$  jest zahamowana w mutancie *cgtA*, kodującym małe białko wiążące GTP [28]. Ten proces jest również zależny od białka DnaA, gdyż okazało się, że jego poziom jest istotnie obniżony w mutancie *cgtA* zaś nadprodukcja DnaA częściowo znosi wpływ tej mutacji na replikację bakteriofaga  $\lambda$  [28].

#### **BIĄTKO SeqA – CZYNNIK REPLIKACYJNY REGULUJĄCY TRANSKRYPCJĘ GENÓW BAKTERIOFAGA $\lambda$**

Omawiane w poprzednim rozdziale białko DnaA jest inicjatorem replikacji DNA chromosomu bakteryjnego, jednak kontroluje replikację DNA  $\lambda$  poprzez regulację transkrypcji. Kolejnym białkiem replikacyjnym, które w komórkach *E. coli* wykazuje równocześnie aktywność regulatora inicjacji transkrypcji jest produkt genu *seqA*. Po raz pierwszy wykazano funkcję tego białka jako czynnika transkrypcyjnego badając aktywność promotora  $p_R$  bakteriofaga  $\lambda$  [29]. Okazało się, że promotor ten jest stymulowany przez białko SeqA zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Co ciekawe, podobnie jak w przypad-

ku białka DnaA, miejsca wiązania SeqA (sekwencje GATC) niezbędne do stymulacji transkrypcji rozpoczynającej się z promotora  $p_R$  położone są za miejscem inicjacji syntezy RNA (pozycje około +80 i +100) [29,30]. Dalsze badania wykazały, że SeqA może również aktywować inne promotory, na przykład dwa promotory bakteriofaga  $\lambda$  stymulowane przez białko cII:  $p_i$  i  $p_{aQ}$ . [31]. Stymulacja tych promotorów zachodziła *in vivo* i *in vitro*, jednak w systemie *in vitro* tylko w obecności białka cII i tylko wtedy gdy białko SeqA było preinkubowane z matrycą DNA przed dodaniem białka cII [31]. Stąd wniosek, że SeqA może stymulować aktywację promotorów  $p_i$  i  $p_{aQ}$  poprzez ułatwianie działania cII jako specyficznego aktywatora (na przykład ułatwiając wiązanie się cII do DNA w okolicach promotora).

Podczas inicjacji replikacji chromosomu bakteryjnego białko DnaA i SeqA działają antagonistycznie, odpowiednio jako stymulator i inhibitor tego procesu. Wzajemne funkcjonalne oddziaływania pomiędzy tymi białkami zaobserwowano również w rejonie promotora  $p_R$  [32]. Oba białka łączą się w rejonach położonych za miejscem startu transkrypcji. Nie udało się jednak wykazać ich współdziałania w stymulacji aktywności tego promotora, a wręcz przeciwnie, w doświadczeniach transkrypcji *in vitro* okazało się, że zwiększona ilość jednego z tych białek hamuje stymulacyjne działanie drugiego [32]. Sugeruje to raczej współzawodnictwo DnaA i SeqA o wiązanie się w rejonie promotora  $p_R$ . Fizjologiczne znaczenie tego procesu zostało wykazane na przykładzie replikacji plazmidów pochodzących od bakteriofaga  $\lambda$  w komórkach *E. coli* niosących różne allele genów *dnaA* i *seqA*, gdzie obserwowano supresję efektów mutacji w genie *dnaA* przez mutację w genie *seqA* [32].

Wzajemne zależności pomiędzy DnaA i SeqA były obserwowane także w innych doświadczeniach. Dla przykładu, produkt zmutowanego allelu *dnaA204*, bardzo niestabilny w komórkach *E. coli*, wykazuje znacznie podwyższony czas półtrwania gdy bakterie są jednocześnie pozbawione genu *seqA* [33]. Podwójne mutanty (w genach *dnaA* i *seqA*) wykazują ponadto inne ciekawe fenotypy, jak na przykład poważne zmiany właściwości błon komórkowych [34]. Mechanizm powstawania tych zmian nie jest jeszcze wyjaśniony, ale można przypuszczać, że zjawisko to wynika albo ze zmienionej transkrypcji wielu genów (w wyniku zaburzeń jej regulacji przy braku aktywności DnaA i SeqA), których produkty są zaangażowane w tworzenie prawidłowej struktury błony, lub też z właściwościami samych białek DnaA i SeqA, gdyż oba wykazują powinowactwo do błon biologicznych. Pierwsza z tych hipotez wydaje się mniej prawdopodobna gdyż badania z wykorzystaniem mikromacierzy DNA nie wykazały istotnych różnic w poziomach mRNA genów ważnych z punktu widzenia struktury błony komórkowej w bakteriach pozbawionych genu *seqA* w porównaniu ze szczepami dzikiego typu [35].

#### **REPLIKACJA PLAZMIDÓW POCHODZĄCYCH OD BAKTERIOFAGA $\lambda$**

Plazmidy  $\lambda$  – czyli replikony pochodzące z genomu bakteriofaga  $\lambda$  i zawierające wszystkie geny i sekwencje sygnałowe niezbędne do replikacji w komórkach *E. coli* – są od dawna wygodnymi modelami używanymi w badaniach

nad replikacją pozachromosomowych elementów genetycznych. Wiadomo było, że wśród wielu rodzajów naturalnych plazmidów replikujących się według modelu  $\theta$  jedne replikują się jednokierunkowo, a inne dwukierunkowo. Jednakże badania nad replikacją plazmidów  $\lambda$  wykazały, że w populacji jednego rodzaju plazmidu w komórkach *E. coli* mogą występować zarówno cząsteczki replikujące się jednokierunkowo, jak i cząsteczki replikujące się dwukierunkowo [36]. Ten sam cykl doświadczeń wykazał, że kierunkowość replikacji plazmidów  $\lambda$  nie zależy od tego, czy proces ten jest przeprowadzany przez dziedziczny czy nowo utworzony kompleks replikacyjny [36].

Doświadczenia przeprowadzone przed ponad trzydziestu laty sugerowały, że promotor  $p_{O'}$ , położony pomiędzy genami *cII* i *O*, może mieć znaczenie w replikacji DNA  $\lambda$  [37]. Przypuszczano wówczas, że produkt transkrypcji z tego promotora, *oop* RNA, stanowi primer dla syntezy DNA. Późniejsze badania, wskazujące na aktywność tego transkryptu jako antysensownego RNA w stosunku do mRNA genu *cII*, spowodowały, że hipotezy o roli  $p_O$  nie brano pod uwagę przez długi czas. Jednakże rezultaty niedawno opublikowanych doświadczeń wskazują, że rejon tego promotora jest ważny w regulacji replikacji plazmidów  $\lambda$ . Stwierdzono bowiem wyraźne obniżenie efektywności replikacji tych plazmidów w przypadku mutantów niosących punktową mutację w rejonie -10 promotora  $p_{O'}$ , która ponad stukrotnie obniża efektywność wiązania się polimerazy RNA do tego promotora [38]. Zrozumienie mechanizmu regulacji replikacji plazmidów  $\lambda$ , w którym wykorzystywany jest promotor  $p_O$  wymaga jednak dalszych badań.

Oprócz doświadczeń zmierzających do zrozumienia regulacji inicjacji replikacji z *ori $\lambda$* , plazmidy  $\lambda$  były ostatnio wykorzystywane jako narzędzia w badaniach nad replikacją innych plazmidów. Konstrukcja plazmidu  $\lambda$  o precyzyjnie regulowanej liczbie kopii (dzięki wymianie promotora  $p_R$  na umożliwiający precyzyjną kontrolę efektywności inicjacji transkrypcji promotor  $p_{tet}$ ) umożliwiła pozytywną weryfikację wcześniej zaproponowanej tzw. „hipotezy katastrofy dimerów”, według której utworzenie dimerów i multimerów plazmidowych prowadzi do szybkiej utraty plazmidu z linii komórkowej w warunkach braku silnej presji selekcyjnej [39]. Zmodyfikowany plazmid  $\lambda$  z promotorem  $p_{tet}$  zamiast  $p_R$  może być ponadto wygodnym wektorem do klonowania genów, gdyż umożliwia precyzyjną regulację liczby kopii (w zakresie od 1 do około 100 na komórkę) sklonowanego fragmentu DNA [40]. Wydaje się, że takie wektory mogą być szczególnie użyteczne w przypadku klonowania i nadekspresji genów, których produkty są toksyczne dla komórek *E. coli*. Plazmid niosący taki gen może być utrzymywany w niskiej liczbie kopii zabezpieczając w ten sposób komórkę przez negatywnymi skutkami wyciekającej się spod kontroli jego ekspresji, natomiast w momencie rozpoczęcia nadprodukcji, liczba kopii klonowanego genu może być podwyższona wielokrotnie [40]. Wreszcie wykorzystanie zjawiska dziedziczenia kompleksu replikacyjnego pozwoliło na zasugerowanie, że toksyna *Kid*, produkt genu znajdującego się na naturalnym plazmidzie R1, może działać przed składaniem kompleksu replikacyjnego ale nie po jego utworzeniu [41].

## MODULACJA REPLIKACJI DNA PRZEZ CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE

Prace prowadzone w ostatnim okresie wykazały, że obok procesów kluczowych dla kontroli inicjacji replikacji DNA z *ori $\lambda$* , opisanych powyżej, replikacja ta może być dodatkowo modulowana przez fagowe i komórkowe czynniki transkrypcyjne, a ponadto produkty ekspresji genów fagowych wpływają na replikację chromosomu komórki gospodarza. Dla przykładu, białko *cII*, aktywator transkrypcji z promotorów niezbędnych w cyklu lizogenicznym bakteriofaga, jest silnie toksyczne dla komórek *E. coli*. Ostatnio wykazano, że białko to hamuje proces replikacji DNA, prawdopodobnie w wyniku oddziaływania na aktywność helikazy *DnaB* [42]. Ekspresja genu *cII* podlega z kolei wielostopniowej regulacji [7]. Jego transkrypcja rozpoczyna się z promotora  $p_R$ , zatem wszystkie czynniki kontrolujące aktywność tego promotora mają wpływ na poziom mRNA genu *cII*. Jako że białko *cII* wydaje się być najistotniejszym regulatorem decydującym o rozpoczęciu przez bakteriofaga  $\lambda$  cyklu litycznego bądź lizogenicznego w zależności od warunków środowiskowych [7], szczególnie ważne wydają się w tym przypadku być czynniki działające w komórce *E. coli* w odpowiedzi na zmiany warunków zewnętrznych. Jednym z nich jest specyficzny nukleotyd, czterofosforan guanozyny (*ppGpp*), syntetyzowany w dużych ilościach w komórce w odpowiedzi na brak aminokwasów. *ppGpp* w znaczący sposób moduluje transkrypcję zarówno z promotora  $p_R$ , jak też z promotorów aktywowanych przez białko *cII*, regulując w ten sposób rozwój bakteriofaga  $\lambda$  [43]. Interesującym może być fakt, że stymulacja aktywności promotora  $p_{aO}$  bakteriofaga  $\lambda$  była pierwszym opisanym przypadkiem bezpośredniej pozytywnej regulacji transkrypcji przez *ppGpp* w oczyszczonym układzie *in vitro* [44]. Z kolei badania nad mechanizmem hamowania aktywności promotora  $p_R$  przez *ppGpp* wykazały, iż nukleotyd ten moduluje kilka (a nie jeden, jak poprzednio sądzono) etapów inicjacji transkrypcji, mianowicie wiązanie polimerazy RNA do promotora, tworzenie kompleksu otwartego i jego stabilizację oraz opuszczanie promotora [45].

Jak wspomniano wcześniej, poziom białka *cII* w zakażonej bakteriofagiem  $\lambda$  komórce powinien być regulowany w odpowiedzi na warunki środowiskowe. Negatywnym regulatorem translacji mRNA genu *cII* jest antysensowny transkrypt, *oop* RNA. Transkrypt ten ulega poliadenylacji przez produkt genu *pcnB*, co prowadzi do zwiększonego tempa jego degradacji [46, 47]. Wykazano, że wydajność ekspresji genu *pcnB* (kodującego poli(A) polimerazę I), a co za tym idzie wydajność poliadenylacji RNA, w komórkach *E. coli* jest odwrotnie proporcjonalna do tempa wzrostu hodowli bakteryjnej [48]. W związku z tym, białko *cII* jest wydajniej syntetyzowane w wolno rosnących komórkach. Niespodziewanie okazało się jednak, że aby białko to mogło być w pełni funkcjonalne, potrzebna jest dodatkowa aktywność innego białka kodowanego przez genom bakteriofaga  $\lambda$ , *cIII*, które znane było do niedawna tylko jako inhibitor proteazy *HflB* (inaczej zwanej *FtsH*), odpowiedzialnej m.in. za degradację *cII* [49]. Wyniki badań genetycznych sugerują, że *cIII* może być białkiem opiekuńczym, specyficznym dla białka *cII* [49].

Mimo, że – jak wynika z powyższego opisu – białko cII spełnia kluczową funkcję w regulacji rozwoju bakteriofaga  $\lambda$ , mechanizm jego oddziaływania z DNA i polimerazą RNA podczas aktywacji transkrypcji jest stosunkowo słabo poznany. Dopiero niedawno opublikowane prace wskazały, że cII może oddziaływać z podjednostką  $\alpha$  polimerazy RNA oraz pozwoliły na określenie orientacji podjednostki  $\alpha$  oddziałującej z białkiem cII [50, 51]. Wydaje się, że niedawne rozwiązywanie struktury krystalicznej białka cII [52, 53] powinno przyspieszyć prace nad mechanizmem działania tego czynnika regulującego zarówno transkrypcję jak i replikację DNA.

## PODSUMOWANIE

Przedstawione w tym artykule wyniki badań z ostatnich kilku lat wskazują, że regulacja replikacji DNA jest znacznie bardziej skomplikowana niż wydawało się to jeszcze niedawno, gdy tworzone pierwsze modele molekularnej kontroli tego kluczowego dla rozwoju każdego organizmu procesu. Stosunkowo proste replikony, takie jak genom bakteriofaga  $\lambda$  i plazmidy od niego pochodzące, stanowią zatem wciąż bardzo wygodne i wydajne modele badawcze, pozwalające stosunkowo szybko uzyskiwać informacje z jednej strony bardzo szczegółowe, a z drugiej o dużym poziomie ogólności. Wydaje się, że przełomem mogącym doprowadzić do wyjaśnienia molekularnego mechanizmu kontroli inicjacji replikacji DNA bakteriofaga  $\lambda$  mogłoby być szczegółowe zrozumienie roli transkrypcji w regulacji tego procesu. Interesujące mogą być także badania nad ewolucją genomu fagów lambdoidalnych. Wydaje się na przykład, że konserwowane ewolucyjnie nie są poszczególne geny z regionu replikacyjnego bakteriofaga  $\lambda$  ale rejon 5' genu *O* oraz moduł złożony z rejonu 3' tego genu i całego genu *P* [54]. Nie ulega zatem wątpliwości, że badania nad biologią molekularną bakteriofaga  $\lambda$  mogą przynieść jeszcze wiele bardzo ważnych i ciekawych odkryć.

## PIŚMIENNICTWO

- Friedman DI, Court DL (2001) Bacteriophage lambda: alive and still doing its thing. *Curr Opin Microbiol* 4: 201-207
- Węgrzyn G (1999) Replication of plasmids during bacterial response to amino acid starvation. *Plasmid* 41: 1-16
- Węgrzyn A, Węgrzyn G (2001) Inheritance of the replication complex: a unique or common phenomenon in the control of DNA replication? *Arch Microbiol* 175: 86-93
- Węgrzyn G, Węgrzyn A, Barańska S, Czyż A (2001) Regulation of bacteriophage lambda development. *Recent Res Dev Virol* 3: 375-386
- Węgrzyn G, Węgrzyn A (2002) Stress responses and replication of plasmids in bacterial cells. *Microb Cell Factor* 1: 2
- Węgrzyn G, Węgrzyn A (2002) Regulation of bacteriophage  $\lambda$  DNA replication. *Curr Topics Virol* 2: 187-194
- Węgrzyn G, Węgrzyn A (2005) Genetic switches during bacteriophage lambda development. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 79: 1-48
- Ptashne M (2004) Genetic switch: phage  $\lambda$  revised. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Dodd IB, Shearwin KE, Egan JB (2005) Revisited gene regulation in bacteriophage  $\lambda$ . *Curr Opin Genet Dev* 15: 145-152
- Węgrzyn A, Węgrzyn G (1999) Regulacja replikacji DNA bakteriofaga  $\lambda$  i plazmidów  $\lambda$ . *Postępy Biochem* 45: 5-11
- Leng F, McMacken R (2002) Potent stimulation of transcription-coupled DNA supercoiling by sequence-specific DNA-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9139-9144
- Leng F, Amado L, McMacken R (2004) Coupling DNA supercoiling to transcription in defined protein system. *J Biol Chem* 279: 47564-47571
- Potrykus K, Barańska S, Węgrzyn A, Węgrzyn G (2002) Composition of the  $\lambda$  plasmid heritable replication complex. *Biochem J* 364: 857-862
- Potrykus K, Wróbel B, Węgrzyn A, Węgrzyn G (2000) Replication of *ori $\lambda$* -based plasmid DNA during the stringent and relaxed responses of *Escherichia coli*. *Plasmid* 44: 111-126
- Węgrzyn A, Węgrzyn G (2000) Formation and stability of bacteriophage  $\lambda$  replication complexes in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 41: 157-160
- Węgrzyn A, Czyż A, Gabig M, Węgrzyn G (2000) ClpP/ClpX-mediated degradation of the bacteriophage  $\lambda$  O protein and regulation of  $\lambda$  phage and  $\lambda$  plasmid replication. *Arch Microbiol* 174: 89-96
- Czyż A, Zielke R, Węgrzyn G (2001) Rapid degradation of bacteriophage  $\lambda$  O protein by ClpP/ClpX protease influences the lysis-versus-lysogenization decision of the phage under certain growth conditions of the host cells. *Arch Virol* 146: 1487-1498
- Konopa G, Barańska B, Węgrzyn A, Węgrzyn G (2000) Bacteriophage and host mutants causing the rolling-circle  $\lambda$  DNA replication early after infection. *FEBS Lett* 472: 217-220
- Glinkowska M, Węgrzyn A, Węgrzyn G (1999) Replication of bacteriophage  $\lambda$  in the *Escherichia coli dnaA  $\Delta$ rac* hosts. *Genetics*, 151: 1633-1635
- Barańska S., Gabig M, Węgrzyn A, Konopa G, Herman-Antosiewicz A, Hernandez P, Schwartzman JB, Helinski DR, Węgrzyn G (2001) Regulation of the switch from early to late bacteriophage  $\lambda$  DNA replication mode. *Microbiology* 147: 535-547
- Datta I, Bamik-Maiti S, Adhijori L, San S, Das N, Mandal NC (2005) The mutation that makes *Escherichia coli* resistant to  $\lambda$  P gene-mediated host lethality is located within the DNA initiator gene *dnaA* of the bacterium. *J Biochem Mol Biol* 38: 89-96
- Datta I, San S, Sil AK, Mandal NC (2005) The bacteriophage lambda DNA replication protein P inhibits the *oriC* DNA- and ATP-binding functions of the DNA replication initiator protein DnaA of *Escherichia coli*. *J Biochem Biol Mol* 38: 97-103
- Glinkowska M, Konopa G, Węgrzyn A, Herman-Antosiewicz A, Weigel C, Seitz H, Messer W, Węgrzyn G (2001) The double mechanism of incompatibility between  $\lambda$  plasmids and *Escherichia coli dnaA(ts)* host cells. *Microbiology* 147: 1923-1928
- Konieczny I, Marszałek J (1995) The requirement for molecular chaperones in  $\lambda$  DNA replication is reduced by the mutation  $\pi$  in  $\lambda P$  gene, which weakens the interaction between  $\lambda P$  protein and DnaB helicase. *J Biol Chem* 270: 9792-9799
- Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn A, Błaszczak A, Taylor K, Węgrzyn G (1998) DnaA-stimulated transcriptional activation of *ori $\lambda$* : *Escherichia coli* RNA polymerase  $\beta$  subunit as a transcriptional activator contact site. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4241-4246
- Konopa G, Szalewska-Pałasz A, Schmidt A, Śrutkowska S, Messer W, Węgrzyn G (1999) The presence of two DnaA-binding sequences is required for efficient interaction of the *Escherichia coli* DnaA protein with each particular weak DnaA box region. *FEMS Microbiol Lett* 174: 25-31
- Glinkowska M, Majka J, Messer W, Węgrzyn G (2003) The mechanism of regulation of bacteriophage  $\lambda$  *p<sub>R</sub>* promoter activity by *Escherichia coli* DnaA protein. *J Biol Chem* 278: 22250-22256
- Ulanowska K, Sikora A, Węgrzyn G, Czyż A (2003) Role of the *cgTA* gene function in DNA replication of extrachromosomal elements in *Escherichia coli*. *Plasmid* 50: 45-52.
- Słomińska M, Węgrzyn A, Konopa G, Skarstad K, Węgrzyn G (2001) SeqA, the *Escherichia coli* origin sequestration protein, is also a specific transcription factor. *Mol Microbiol* 40: 1371-1380

30. Strzelczyk B, Słomińska-Wojewódzka M, Węgrzyn G, Węgrzyn A (2003) Non-random distribution of GATC sequences in regions of promoters stimulated by the SeqA protein of *Escherichia coli*. Acta Biochim Pol 50: 941-945
31. Słomińska M, Konopa G, Ostrowska J, Kędzierska B, Węgrzyn G, Węgrzyn A (2003) SeqA-mediated stimulation of a promoter activity by facilitating functions of a transcription activator. Mol Microbiol 47: 1669-1679
32. Słomińska M, Konopa G, Barańska S, Węgrzyn G, Węgrzyn A (2003) Interplay between DnaA and SeqA proteins during regulation of bacteriophage  $\lambda$   $p_R$  promoter activity. J Mol Biol 329: 59-68
33. Słomińska M, Wahl A, Węgrzyn G, Skarstad K (2003) The degradation of mutant initiator protein DnaA204 by proteases ClpP, ClpQ and Lon is prevented when DNA is SeqA-free. Biochem J 370: 867-871
34. Węgrzyn A, Wróbel B, Węgrzyn G (1999) Altered biological properties of cell membranes in *Escherichia coli* *dnaA* and *seqA* mutants. Mol Gen Genet 261: 762-769
35. Lobner-Olsen A, Marinus MG, Hansen FG (2003) Role of SeqA and Dam in *Escherichia coli* gene expression: a global/microarray analysis. Proc Natl Acad Sci USA 100: 4672-4677
36. Barańska S, Konopa G, Węgrzyn G (2002) Directionality of  $\lambda$  plasmid DNA replication carried out by the heritable replication complex. Nucleic Acids Res 30: 1176-1181
37. Hayes S, Szybalski W (1975) Role of *oop* RNA primer in initiation of coliphage lambda DNA replication, W: Goulin M, Hanawalt P (red.) DNA synthesis and its regulation, Benjamin, Menlo Park, CA, str. 486-512.
38. Potrykus K, Perzyło E, Węgrzyn G (2002)  $p_{\sigma}$  a promoter for *oop* RNA synthesis, has a role in replication of plasmids derived from bacteriophage  $\lambda$ . Plasmid 47: 210-215
39. Herman-Antosiewicz A, Węgrzyn G (1999) Regulation of copy number and stability of phage  $\lambda$  derived pTC1 plasmid in the light of the dimer/multimer catastrophe hypothesis. FEMS Microbiol Lett 176: 489-493
40. Herman-Antosiewicz A, Obuchowski M, Węgrzyn G (2001) A plasmid cloning vector with precisely regulatable copy number in *Escherichia coli*. Mol Biotechnol 17: 193-199
41. Potrykus K, Santos S, Lemonnier M, Diaz-Orejas R, Węgrzyn G (2002) Differential effects of Kid toxin on two modes of replication of lambdoid plasmids suggest that this toxin acts before, but not after, the assembly of the replication complex. Microbiology 148: 2489-2495
42. Kędzierska B, Glinkowska M, Iwanicki A, Obuchowski M, Sojka P, Thomas MS, Węgrzyn G (2003) Toxicity of the bacteriophage  $\lambda$  *cII* gene product to *Escherichia coli* arises from inhibition of host cell DNA replication. Virology 313: 622-628.
43. Słomińska M, Neubauer P, Węgrzyn G (1999) Regulation of bacteriophage  $\lambda$  development by guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate. Virology 262: 431-441
44. Potrykus K, Węgrzyn G, Hernandez VJ (2004) Direct stimulation of the  $\lambda$   $p_{aQ}$  promoter by the transcription effector guanosine-3',5'-(bis)pyrophosphate in a defined *in vitro* system. J Biol Chem 279: 19860-19866
45. Potrykus K, Węgrzyn G, Hernandez VJ (2002) Multiple mechanisms of transcription inhibition by ppGpp at the lambda  $P_R$  promoter. J Biol Chem 277: 43785-43791
46. Wróbel B, Herman-Antosiewicz A, Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn G (1998) Polyadenylation of *oop* RNA in the regulation of bacteriophage  $\lambda$  development. Gene 212: 57-65
47. Szalewska-Pałasz A, Wróbel B, Węgrzyn G (1998) Rapid degradation of polyadenylated *oop* RNA. FEBS Lett 432: 70-72
48. Jasiński J, Węgrzyn G (2003) Growth-rate-dependent RNA polyadenylation in *Escherichia coli*. EMBO Rep 4: 172-177
49. Latała B, Obuchowski M, Węgrzyn G (2001) Bacteriophage  $\lambda$  *cIII* gene product has an additional function apart from inhibition of *cII* degradation. Virus Genes 22: 127-132
50. Kędzierska B, Lee DJ, Węgrzyn G, Busby SJW, Thomas MS (2004) Role of the RNA polymerase  $\alpha$  subunits in CII-dependent activation of the bacteriophage  $\lambda$   $p_E$  promoter: identification of important residues and positioning of the  $\alpha$  C-terminal domains. Nucleic Acids Res 32: 834-841
51. Marr MT, Roberts JW, Brown SE, Klee M, Gussin GN (2004) Interactions among CII protein, RNA polymerase and the  $\lambda$   $p_{RE}$  promoter: contacts between RNA polymerase and the -35 region of  $p_{RE}$  are identical in the presence and absence of CII protein. Nucleic Acids Res 32: 1083-1090
52. Datta AB, Panjekar S, Weiss MS, Chakrabarty P, Parrack P (2005) Structure of  $\lambda$  *cII*: implications for recognition of direct repeat DNA by an unusual tetrameric organization. Proc Natl Acad Sci USA 102: 11242-11247
53. Jain D, Kim Y, Maxwell KL, Beasley S, Zhang R, Gussin GN, Edwards AM, Darst SA (2005) Crystal structure of bacteriophage  $\lambda$  *cII* and its DNA complex. Mol Cell 19: 259-269
54. Wróbel B, Węgrzyn G (2002) Evolution of lambdoid replication modules. Virus Genes 24: 163-171

## Bacteriophage $\lambda$ DNA replication - new discoveries made using an old experimental model

Grzegorz Węgrzyn<sup>1,✉</sup>, Alicja Węgrzyn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, University of Gdańsk, 24 Kładki St., 80-822 Gdańsk, Poland

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Biology (affiliated with the University of Gdańsk), Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, 24 Kładki St., 80-822 Gdańsk, Poland

✉e-mail: węgrzyn@biotech.univ.gda.pl

**Key words:** DNA replication, transcription factors, bacteriophage  $\lambda$ , regulation of viral development, DnaA protein, SeqA protein

### ABSTRACT

Bacteriophage  $\lambda$  is a model in molecular biology studies since over fifty years. Nevertheless, studies of recent years (similarly to previous time periods) resulted in many new experimental results which not only expanded our knowledge on molecular mechanisms of functions of this virus, but also shed new light on general rules of the transduction and transfer of genetic information. In this review, we present recent achievements of studies on mechanisms of regulation of bacteriophage  $\lambda$  DNA replication. Between others, these studies led to determination of the composition of  $\lambda$  inherited replication complex, indication of the biological role of rapid degradation of free  $\lambda$ O protein, description of the proposal of regulation of the switch from early ( $\theta$ ) to late ( $\sigma$ )  $\lambda$  DNA replication mode, elucidation of the mechanism of transcription regulation by a replication protein DnaA and demonstration of the activity of transcription stimulator by another replication regulator - the SeqA protein. These results may be important to better understand regulation of DNA replication of not only bacteriophage  $\lambda$  but also other organisms.