

Received: 2007.07.30
Accepted: 2007.09.07
Published: 2007.10.02

Struktura chromosomu bakteryjnego*

Structure of bacterial chromosome

Agnieszka Kois¹, Magdalena Świątek¹, Jolanta Zakrzewska-Czerwińska^{1,2}

¹ Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, PAN we Wrocławiu

² Uniwersytet Wrocławski, Wydział Biotechnologii

Streszczenie

Zastosowanie zaawansowanych technik mikroskopowych oraz nowych metod biologii komórki umożliwiło wykazanie, że bakteryjny, chromosomowy DNA jest gęsto upakowany zajmując stosunkowo niewielką część komórki. Bakteryjny chromosom (nukleoid) składa się z topologicznie niezależnych, superzwiniętych pętli zwanych domenami. Struktura nukleoidu jest dynamiczna – dzięki domenowej strukturze chromosomu jego poszczególne regiony mogą brać udział w różnych procesach komórkowych (replikacja, transkrypcja i segregacja), które często zachodzą jednocześnie. Niskocząsteczkowe histonopodobne białka (HU, H-NS, IHF, Fis, Lrp i Dps) oraz wysokocząsteczkowe białko SMC (structural maintenance of chromosomes) kondensują chromosomowy DNA poprzez jego zakrzywanie, łączenie i owijanie. SMC dodatkowo uczestniczy w procesie segregacji chromosomów.

Słowa kluczowe:

chromosom bakteryjny • białka histonopodobne • SMC

Summary

Recent advances in microscopic and cell biological techniques have revealed that bacterial chromosomal DNA is folded into a compact structure occupying a relatively small part of the cell. The bacterial chromosome (nucleoid) is organized into independently supercoiled loops called domains. The structure of the nucleoid is highly dynamic, as the domain organization enables the chromosomal DNA to undergo structural changes during different cellular processes (replication, transcription, and segregation) that take place simultaneously in a bacterial cell. Small nucleoid-associated proteins (HU, H-NS, IHF, Fis, Lrp, and Dps) and the high-molecular-weight protein SMC (structural maintenance of chromosomes) facilitate compaction of chromosomal DNA by bending, bridging, and wrapping. In addition, SMC protein is involved in chromosome segregation.

Key words:

bacterial chromosome • histone-like proteins • SMC

Full-text PDF:

http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/11273.pdf

Word count:

2993

Tables:

1

Figures:

6

References:

41

Adres autorki:

prof. dr hab. Jolanta Zakrzewska-Czerwińska, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, PAN, Zakład Mikrobiologii, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: zakrzew@iitd.pan.wroc.pl

* Praca finansowana ze środków Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego, projekt badawczy nr 301 2035 33.

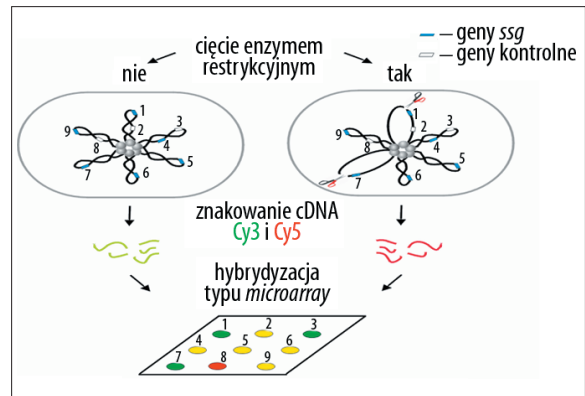
WSTĘP

Do niedawna chromosom bakteryjny (nukleoid) postrzegano jako amorficzny twór zanurzony w cytoplazmie. Dopiero rozwój zaawansowanych technik biologii molekularnej, a zwłaszcza wykorzystanie białek fluorescencyjnych oraz nowych technik mikroskopowych pozwoliły na lepsze poznanie wewnątrzkomórkowej struktury komórki bakteryjnej w tym nukleoidu. Chromosom bakteryjny występuje zazwyczaj w postaci pojedynczej, kowalencyjnie zamkniętej cząsteczki dwuniciowego DNA. Istnieją również mikroorganizmy, które mają liniowy chromosom, np. *Borrelia burgdorferii* [29] czy *Streptomyces coelicolor* [23]. Ponadto, u niektórych bakterii stwierdzono obecność więcej niż jednego chromosomu, np. u *Burkholderia cenocepacia* występują trzy chromosomy (<http://www.genomesonline.org/>). Ciekawym przykładem jest *Agrobacterium* – organizm mający dwa chromosomy, z których jeden jest liniowy, a drugi kowalencyjnie zamkniętą cząsteczką DNA (<http://www.genomesonline.org/>). Wielkość chromosomu bakteryjnego mieści się najczęściej w zakresie od 0,6 Mz (*Mycoplasma genitalium*) do około 10 Mz (*Streptomyces avermitilis*) (<http://www.genomesonline.org/>). Należy jednak pamiętać, że dotychczas poznano niewielki odsetek bakterii żyjących na naszej planecie w związku z czym zakres ten może się powiększyć. Niedawno odkryto, że endosymbiotyczna bakteria, *Carsonella ruddii* (żyje w owadach – koliszkach, żywiących się sokiem roślinnym) ma najmniejszy z dotychczas poznanych chromosomów; składający się z zaledwie 160 tysięcy zasad [28]. Z kolei analiza chromosomu bakterii śluzowej, *Sorangium (Polyangium) cellulosum So ce56* (projekt sekwencjonowania w toku) wykazała, że jest on największy spośród dotychczas poznanych bakteryjnych chromosomów; jego wielkość wynosi 13,0 Mz.

W przeciwieństwie do organizmów eukariotycznych, u bakterii chromosomy DNA nie jest związany z histonami, ani nie jest otoczony błoną komórkową. Jednak i w komórce bakteryjnej chromosomy DNA musi przyjąć taką strukturę przestrzenną, by mógł odpowiednio pomieścić się w jej wnętrzu. U *Escherichia coli*, rozwinięta nić chromosowego DNA (1600 μm) jest około 1000 razy dłuższa od długości tej komórki bakteryjnej. W określonych warunkach nukleoid *E. coli* zajmuje zaledwie 1/5 objętości komórki [7]. Stopień upakowania DNA – wyrażany przez stosunek długości DNA do długości przedziału, w którym jest on zawarty (dla bakterii jest to długość komórki) – w zależności od rodzaju komórki bakteryjnej i fazy cyklu komórkowego może przybierać wartości od kilkuset do kilku tysięcy, np. stopień upakowania chromosomalnego DNA w egzosporach Gram-dodatniej bakterii z rodzaju *Streptomyces* wynosi około 3000. Dla porównania stopień upakowania chromosomu 22 człowieka (15 mm) podczas mitozy jest równy około 10 000. Tak więc upakowanie DNA w komórkach bakteryjnych jest mniejsze niż w jądrach eukariotycznych.

STRUKTURA CHROMOSOMU BAKTERYJNEGO

U bakterii, w przeciwieństwie do organizmów eukariotycznych, procesy cyklu komórkowego – replikacja, segregacja i podział komórki, mogą zachodzić jednocześnie. W komórkach bakteryjnych, zwłaszcza szybko rosnących, chromo-



Ryc. 1. Model doświadczenia (hybrydyzacja microarray), dzięki któremu wykazano, że chromosom bakteryjny składa się z niezależnie superzwiniętych domen – pętli (na ryc. zaznaczono schematycznie jedynie kilka domen w rzeczywistości chromosom ma kilkaset pętli) [wg 30 – zmodyfikowany]. W centrum chromosomu zaznaczono rdzeń białkowy. W tym doświadczeniu badano poziom ekspresji genów *ssg* (*ssg* – supercoiling sensitive genes), których aktywność promotorowa jest uzależniona od stopnia superskręcenia DNA. W różne pozycje chromosomu wprowadzono unikalne sekwencje rozpoznawane przez „rzadkotnące” enzymy restrykcyjne (geny tych endonukleaz obecne na chromosomie). Przecięcie enzymem restrykcyjnym (indukowana ekspresja genu kodującego endonukleazę) miejsca w określonej domenie chromosomu powoduje jej relaksację, a w konsekwencji spadek aktywności genów *ssg*. cDNA otrzymano za pomocą RT-PCR na matrycy wyizolowanego mRNA i wyznakowano znacznikami fluorescencyjnymi: *Cy3* (zielonym, próbka referencyjna) lub *Cy5* (czerwonym, badana próbka). Hybrydyzację przeprowadzono z sondą, którą stanowiły zmieszane próbki wyznakowane oboma znacznikami *Cy3* i *Cy5*. Schematycznie zaznaczono tylko sygnały hybrydyzacji pochodzące od dziewięciu genów: sześciu *ssg* i trzech kontrolnych. Zielone plamki wskazują, że ekspresja genów *ssg* i kontrolnego w próbce referencyjnej jest wyższa niż w próbce badanej. Czerwone plamki oznaczają, że ekspresja genu kontrolnego jest na wyższym poziomie w próbce badanej niż w próbce referencyjnej. Żółte plamki wskazują, że ekspresja określonych genów *ssg* i kontrolnych w obu próbkach jest na tym samym poziomie

som bakteryjny charakteryzuje się dynamiczną strukturą; jego określone regiony są zaangażowane w różne procesy: replikację, transkrypcję czy segregację. Na podstawie wielu różnorodnych obserwacji mikroskopowych zauważono, że nukleoid nie jest strukturą homogenną, oraz że istnieje ścisła współzależność pomiędzy organizacją jego określonych regionów, a ich aktywnością np. transkrypcyjną [7]. W chromosomie bakteryjnym można wyróżnić dwa poziomy jego organizacji: w skali makro i mikro, które dotyczą odpowiednio globalnej budowy, upakowania chromosomu i lokalnej struktury DNA chromosomalnego.

Obecnie uważa się, że chromosom bakteryjny składa się z kilkuset topologicznie niezależnych, superzwiniętych pętli (domen) przypominając swoim kształtem rozetę (ryc. 1). Centralną część tej rozety stanowi rdzeń, który składa się z białek i prawdopodobnie również z RNA. Dotychczas nie udało się zidentyfikować białek rdzenia chromosomu bakteryjnego. Za strukturę chromosomu w skali makro są odpowiedzialne topozomerazy, białka rdzenia oraz biał-

Tabela 1. Charakterystyka białek histonopodobnych *E. coli*

Białko, masa cząsteczkowa, liczba cząsteczek na komórkę*	Oddziaływanie z DNA
Białka zaginające DNA	
HU 9,5 kDa, 30 000-55 000	wiązanie nieswoiste, zginanie DNA w zakresie 60–140°
IHF 11 kDa, 12 000	rozpoznaje sekwencje 5'-C/TAANNNTTGATA/T-3', średnio zakrzywia DNA o 160°
Fis 11,2 kDa, 60 000	rozpoznaje sekwencje 5'-G/TNNC/TA/GNNA/TNNC/TA/GNCC/A-3', gdzie N dowolny nukleotyd, zakrzywia DNA w zakresie 50–90°
Białka kohezyjne – łączące nici DNA	
H-NS 15,5 kDa, 20 000	wiązanie nieswoiste
Lrp, 18,9 kDa, 2 500	wiązanie swoiste 5'-AGAATTTATTCT-3', wokół oktamerów Lrp może się owijać DNA
Dps, 18,7 kDa, 6 000	wiązanie nieswoiste, tworzenie struktur pętli

* W logarytmicznej fazie wzrostu [3].

ka SMC (patrz niżej). Topoizomerazy wprowadzają lewoskrętne superzwinienia w podwójnej prawoskrętnej helisie DNA. Uważa się również, że sekwencja nukleotydowa DNA chromosomu bakteryjnego determinuje jego strukturę; występowanie długich ciągów A_n (n – kilkanaście nukleotydów) powoduje zakrzywienie DNA, co promuje tworzenie pętli chromosomu. Ponadto, na strukturę chromosomu w skali makro mają wpływ te procesy komórkowe, które obejmują rozległe obszary chromosomu – replikacja, segregacja.

Zastosowanie mikroskopii elektronowej pozwoliło wykazać, że u *E. coli* występuje około 500 superzwinionych pętli; średnia długość pojedynczej domeny wynosi w przybliżeniu 10 kbp [13,19,30,36]. Doświadczenia z wykorzystaniem genu reporterowego, którego aktywność jest zależna od stopnia superskręcenia DNA wykazały, że poszczególne domeny są topologicznie niezależne, a ich położenie zmienne (szczegółowy opis tego doświadczenia zamieszczono na ryc. 1, poziom ekspresji genów topozależnych badano za pomocą hybrydyzacji typu microarray). A zatem, wprowadzenie przerw w nici DNA, będących skutkiem uszkodzenia bądź procesu komórkowego, powoduje relaksację tylko pojedynczej domeny, bez wpływu na topologię całego chromosomu (ryc. 1). Taka organizacja nukleoidu nie tylko przyczynia się do jego upakowania [19], ale również zapewnia jego dynamiczny charakter; chromosom podlega ciągłym rearanżacjom przestrzennym, w trakcie których określone domeny pojawiają się, a inne zanikają.

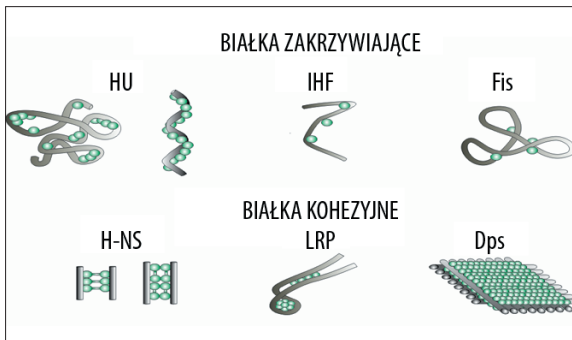
Na lokalną strukturę w skali mikro DNA chromosomu mają wpływ przede wszystkim białka histonopodobne (patrz niżej) oraz białka uczestniczące w określonym procesie komórkowym związanym z danym, krótkim fragmentem chromosomu, np. transkrypcja genu.

CHARAKTERYSTYKA BIAŁEK HISTONOPODOBNYCH

W komórkach organizmów eukariotycznych, chromosomy DNA jest silnie związany z zasadowymi białkami o małej masie cząsteczkowej, zwanymi histonami. Białka te odgrywają rolę w upakowaniu materiału genetycznego;

osiem cząsteczek histonów tworzy rdzeń, wokół którego jest nawijany DNA, co prowadzi do jego kondensacji i utworzenia struktury zwanej nukleosomem. Ze względu na stosunkowo duży stopień upakowania DNA w komórkach bakterii, zaczęto poszukiwać bakteryjnych, zasadowych białek zdolnych do wiązania się z DNA i mających wpływ na jego kondensację. Najwięcej badań dotyczących struktury chromosomów bakteryjnych prowadzono na dwóch modelowych organizmach *E. coli* (Gram-ujemna bakteria) i *B. subtilis* (Gram-dodatnia bakteria). Chociaż wykazano, że bakterie nie mają homologów histonów, to odkryto inne małe, zasadowe białka, które pełnią podobne do nich funkcje – odgrywają rolę w upakowaniu i organizacji nukleoidu. Białka te występują również w stosunkowo dużej liczbie kopii w komórce bakteryjnej (tabela 1). Ze względu na podobieństwo funkcjonalne do histonów białka te nazywano histonopodobnymi (histone-like proteins). Białka te są często oznaczane skrótem NAP (nucleoid-associated proteins) i należą do nich: HU (heat unstable protein), IHF (integration host factor), H-NS (histon-like nucleoid structuring protein), Fis (factor for inversion stimulation), Lrp (leucine-responsive regulatory protein) i Dps (DNA-binding proteins from starved cells). Masa cząsteczkowa tych białek nie przekracza 20 kDa. NAP występują w postaci multimerów: dimerów (np. IHF, H-NS, HU, Fis), oktamerów (Lrp) czy też dodekamerów (Dps). Białka te pełnią nie tylko funkcję strukturalne, ale również regulatorowe. Wiele z nich znanych jest jako regulatory w procesach transkrypcji (np. IHF, H-NS, Fis, Lrp), rekombinacji i naprawie DNA (np. HU) oraz inicjacji replikacji (np. Fis, HU, IHF) [24,35]. Białka histonopodobne wykazują różną swoistość względem DNA. HU, H-NS, Dps wiążą DNA nieswoiście. Natomiast IHF, Fis rozpoznają kilkunastonukleotydowe odcinki DNA o stosunkowo mało rygorystycznej sekwencji konsensowej. Największą swoistość substratową wykazuje białko Lrp. W tabeli 1 podano ogólną charakterystykę białek uczestniczących w kondensacji DNA.

Białka NAP można sklasyfikować według ich wpływu na strukturę DNA: białka zaginające DNA – HU, Fis, IHF (ryc. 2) oraz białka łączące sąsiednie nici DNA (kohezyjne) – H-NS, Lrp (ryc. 2) [24]. Białka HU, Fis, IHF zagina-



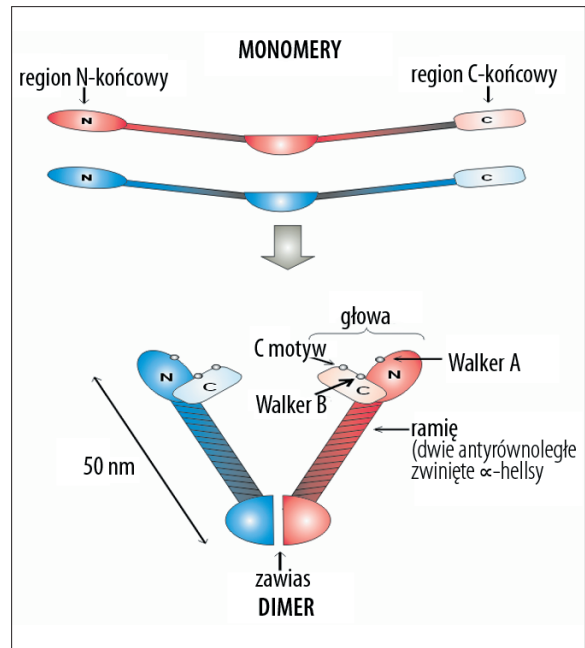
Ryc. 2. Kompleksy DNA z białkami histonopodobnymi [wg 35 – zmodyfikowany]. Białka histonopodobne (bez względu na stopień ich oligomeryzacji) przedstawiono schematycznie w postaci zielonych kulek (opis w tekście)

ją DNA w zakresie od 50° (Fis) do nawet 180° (IHF) (ryc. 2, tabela 1) [31]. Dimery białek H-NS łączą ze sobą dwie nici DNA w ten sposób, że każda z cząsteczek dimeru wiąże jedną z dwóch sąsiadujących ze sobą nici DNA. W ten sposób powstają połączenia mostkowe pomiędzy dwoma niciami DNA. Przypuszcza się również, że dimery H-NS mogą się wiązać do jednej z nici DNA, a w wyniku oddziaływań pomiędzy parami dimerów dochodzić może do połączenia dwu nici DNA (ryc. 2). Natomiast, oktamery białka Lrp pełnią nie tylko funkcję łącznika pomiędzy dwoma niciami DNA, ale również mogą owijać podwójną nić DNA wokół pojedynczego oktamery (ryc. 2) [4].

Pośród białek histonopodobnych na uwagę zasługują Dps, które kondensują DNA w sposób odmienny od przedstawionych. Charakterystyczną cechą białek Dps jest ich zdolność do tworzenia oligomerów (dodekamerów), które przyjmują postać wydrążonej w środku kuli. Białka te wiążą się nieswoiście z DNA, poprzez oddziaływanie dodatnio naładowanych N-końcowych reszt aminokwasowych, znajdujących się we wnętrzu dodekameru z ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi DNA, co prowadzi do kondensacji i utworzenia pętli DNA [10,24]. Uważa się, że związanie DNA promuje oddziaływania pomiędzy dodekamerami Dps, w wyniku czego tworzą się równoległe ułożone płaszczyzny – warstwy dodekamerów białek Dps (ryc. 2). Taka wielowarstwowa struktura umożliwia efektywne upakowanie DNA.

Ekspresja białek kondensujących DNA zależy od fazy wzrostu komórki. U *E. coli*, w fazie logarytmicznej (tabela 1), obserwuje się największy poziom ekspresji białek Fis, H-NS, HU (powyżej 20 000 cząsteczek na komórkę), natomiast w fazie stacjonarnej, gdy komórka musi być odporna m.in. na stres głodowy, białek Dps i IHF [1]. Poziom białka Dps przy przejściu z fazy logarytmicznej do stacjonarnej wzrasta z 600 do 180 000.

Dzięki wykorzystaniu mikroskopii sił atomowych (atomic force microscopy – AFM) zbadano strukturę nukleoidu *E. coli* podczas wzrostu komórki [21]. Wykazano, że z udziałem białek histonopodobnych (HU, IHF, H-NS itp.) nukleoid przechodzi strukturalne zmiany, w wyniku których tworzą się coraz bardziej złożone struktury; początkowo włókna o grubości 40 nm, które następnie owijając się wokół siebie tworzą strukturę supersolenoidu o grubości 80 nm. W wyniku tych zmian powstają wspomniane już pętłe (domeny)



Ryc. 3. Struktura domenowa białka SMC (opis w tekście) [wg 32 i 38 – zmodyfikowano]

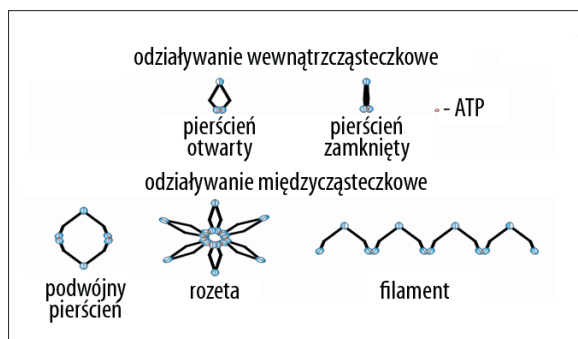
chromosomu (ryc. 1) – taką strukturę uważa się za podstawową postać chromosomu bakteryjnego. W fazie stacjonarnej chromosomu DNA, pod wpływem białek Dps, ulega jeszcze większemu upakowaniu; superskręcone pętłe przyjmują strukturę przypominającą rafę koralową [6].

Komórki bakteryjne, pozbawione jednego z histonopodobnych białek, mają zazwyczaj prawidłowy fenotyp, co wskazuje, że niektóre z funkcji NAP mogą być dopełniane przez inne, np. pojedyncze mutanty HU i IHF są zdolne do przeżycia, podczas gdy podwójny mutant HU/IHF może być letalny [20]. Wykazano, że mutanty pozbawione białek Dps nie są zdolne do przeżycia długiego okresu głodu i wykazują nadwrażliwość na stres oksydacyjny [2,9].

CHARAKTERYSTYKA BIAŁEK SMC

Istotną rolę w kondensacji chromosomalnego DNA odgrywają również białka SMC (structural maintenance of chromosomes), które ze względu na dużą masę cząsteczkową (~150–200 kDa) nie są zaliczane do omawianych w poprzednim rozdziale białek histonopodobnych. Białka SMC oprócz dużej masy cząsteczkowej charakteryzują się unikalną strukturą domenową. Składają się z dwóch N- i C-końcowych domen globularnych (zwanymi głowami), dwóch α -helis (coiled-coil motif) – ramion oraz centralnie położonego zawiasu (hinge). Obecność elastycznego elementu zawiasowego umożliwia fizyczne zbliżanie i oddalanie dwóch domen globularnych (ryc. 3). Przeprowadzone badania *in vitro* wykazały, że białka SMC występują w roztworze głównie w postaci dimeru, w którym ramiona SMC składają się z dwóch przeciwrównoległe zwinętych α -helis. Długość każdego ramienia wynosi około 50 nm, co odpowiada 150 pz DNA [5,11,32].

Analiza porównawcza białek SMC różnych organizmów wykazała obecność trzech konserwatywnych motywów struk-

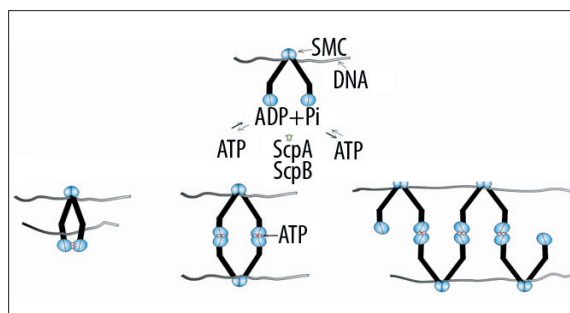


Ryc. 4. Oddziaływania wewnątrz- i międzycząsteczkowe białek SMC [wg 17 – zmodyfikowany]

turalnych: Walkera A, Walkera B oraz motywu C, które warunkują aktywność ATP-azową białka. Na N- końcu każdej domeny globularnej białka SMC znajduje się, niezbędny do wiązania ATP, motyw Walkera A. Z kolei na C-końcu domeny globularnej stwierdzono obecność motywów: Walkera B i motywu C, które są odpowiedzialne za wiązanie i hydrolizę ATP. Występowanie tych trzech motywów jest charakterystyczne dla rodziny białek AAA+ (ATPase associated with a variety of cellular activities) [33].

Dotąd nie udało się skryształizować całej cząsteczki białka SMC, prawdopodobnie z powodu jej dużej masy cząsteczkowej i elastycznej struktury zawiasu. Jednak kilka grup badawczych otrzymało kryształy różnych domen. Van den Ent i wsp. [39] skryształizowali N-kończącą domenę białka MukB, które należy do rodziny białek SMC i jest funkcjonalnym analogiem SMC w komórkach *E. coli*. Wykazano, że N- i C-kończąca domena SMC tworzy razem „kanapkę wiążącą nukleotydy” [22, 39]. Na podstawie wyników badań mikroskopii elektronowej białka SMC *B. subtilis* i MukB *E. coli* podejrzewano, że SMC dimeryzuje poprzez regiony *coiled-coil*, a głowa SMC jest tworzona w wyniku oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy N- i C-kończącą domeną dwóch różnych cząsteczek SMC [27]. Jednak analiza uzyskanych kryształów elementu zawiasowego wraz z fragmentem ramion białka SMC z *Thermotoga maritima* udowodniła, że dimeryzacja zachodzi poprzez element zawiasowy, a głowa białka składa się z N- i C-kończących domen pochodzących z tej samej cząsteczki SMC [12] (ryc. 3). Uzyskane dane dodatkowo potwierdziło seria doświadczeń, w których wykazano istnienie w zawiasie konserwatywnych reszt glicyny (G657, G658, G662, G663) niezbędnych w dimeryzacji i motoryce białka SMC [14].

Dzięki mikroskopii elektronowej SMC *B. subtilis* wykazano różne konformacje białka, z czego najbardziej reprezentowaną była struktura V – zgięcia (V-shaped) (ryc. 3). Zaobserwowano również, że dimer SMC może przyjmować konformację pierścienia (ring) lub zamkniętego V-zgięcia (closed V-shaped) (ryc. 4) [27]. Uważa się, że w wyniku oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy głowami różnych dimerów SMC może dojść również do utworzenia struktur multimerycznych, takich jak: podwójny pierścień (double ring), rozeta (rosette), bądź filament (filament) (ryc. 4). Niedawno, dzięki mikroskopii sił atomowych udało się zaobserwować strukturę rozety złożoną z 4 do 8 dimerów, jednak nadal pozostaje niewyjaśnione,



Ryc. 5. Hipotetyczny mechanizm kondensacji DNA za pomocą kompleksów białek SMC [wg 17 i 38 – zmodyfikowano]

czy takie struktury występują *in vivo* w komórkach, a jeśli tak to czy są funkcjonalne [26]. Główną rolę w oddziaływaniach wewnątrz- i międzycząsteczkowych białek SMC odgrywa aktywność ATP-azowa. Udowodniono, że ATP wiąże się do kieszeni utworzonej przez motywy Walkera A i Walkera B jednej podjednostki SMC i oddziałuje z motywem C drugiej podjednostki. Tak jak w przypadku innych ATP-az z rodziny białek AAA+ wprowadzenie mutacji w motywie Walkera A (Lys37 → Ile) białka SMC z *B. subtilis*, zapobiega wiązaniu ATP. Natomiast mutacja w motywie C (Ser1090 → Arg) pozwala na związanie ATP, ale uniemożliwia jego hydrolizę, co w konsekwencji zaburza tworzenie kompleksu głowa-głowa. Z kolei zastąpienie glutaminianu w motywie Walkera B przez glutaminę (Glu1118 → Gln) stabilizuje oddziaływanie głowa-głowa poprzez wolniejszą hydrolizę ATP [14].

W przeciwieństwie do organizmów eukariotycznych, u których występuje co najmniej sześć różnych białek SMC, w komórkach prokariotycznych stwierdzono obecność tylko jednego rodzaju białka SMC. U *Helicobacter pylori*, *Rickettsia prowazekii* i *Methanobacterium thermoautotrophicum* nie zidentyfikowano genu kodującego homolog białka SMC. Nie można jednakże wykluczyć istnienia funkcjonalnych analogów białka SMC u tych organizmów, tak jak w przypadku *E. coli*, u której funkcjonalnym analogiem SMC jest białko MukB.

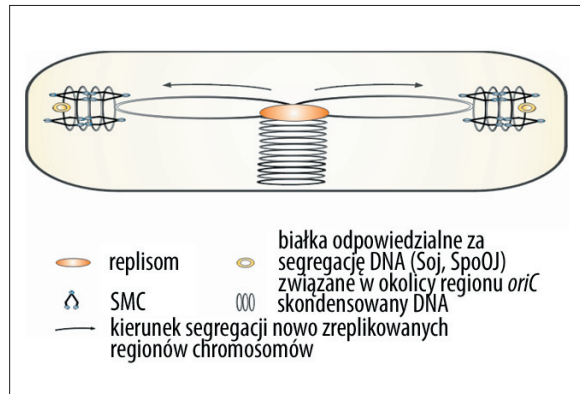
Mechanizm kondensacji chromosomów bakteryjnych przez białka SMC jest słabo poznany. Wykazano, że *B. subtilis* SMC oddziałuje zarówno z ssDNA jak i dsDNA. Białka te wiążą się nieswoiście z DNA poprzez dodatnio naładowane reszty aminokwasowe umiejscowione w zawiasie. Udowodniono również, że obecność domen globularnych SMC nie jest warunkiem koniecznym do wiązania DNA [17]. Według Hirano [15] ATP ma wpływ na sposób wiązania DNA przez białko SMC. Jedynie postać niezwiązana z ATP może się przyłączyć do DNA, tworząc stabilną strukturę pierścienia. Wskazuje się, że prawdopodobnie aktywność ATP-azowa SMC odgrywa ważną rolę w procesie kondensacji poprzez kontrolę oddziaływań wewnątrz- i międzycząsteczkowych pomiędzy domenami globularnymi (ryc. 5). Prawdopodobnie fizyczne zbliżenie głów SMC prowadzi do kondensacji DNA [16, 38]. Niedawne badania prowadzone nad bakteryjnymi SMC wykazały istnienie dwóch kwaśnych białek o małej masie cząsteczkowej, białek oddziałujących z SMC – ScpA i ScpB [34]. Dervyn i wsp. [8] sugerują, że u *B. subtilis* dwie cząsteczki ScpA oddziałują bezpośrednio z dwoma

głowami dimeru SMC, podczas gdy ScpB wiąże się do SMC za pośrednictwem ScpA. Stechiometria tego kompleksu nie jest dokładnie poznana [8]. Zaobserwowano, że silne oddziaływanie dwóch domen N- i C-końcowej SMC występuje w obecności białka ScpA, co sugeruje, że jego związanie promuje utworzenie globularnej domeny głowy białka SMC. Dotychczasowe wyniki badań, wskazują, że ScpA stabilizuje zamkniętą konfigurację białka SMC przez zahamowanie hydrolizy związanego ATP. Tym samym, przyłączenie podjednostek ScpA do domeny głowy SMC, która jest związana z DNA, stabilizuje oddziaływanie kompleksu białko-DNA [40]. Dowiedziono, że wiązanie ATP, bądź jego hydroliza nie są wymagane do tworzenia kompleksu SMC z ScpA i ScpB [26]. Co ciekawe, białko ScpB zawiera motyw helisa-skreć-helisa, stąd zakłada się, że może się wiązać z chromosomowym DNA *in vivo* [37]. Podsumowując, ATP oraz białka towarzyszące ScpA i ScpB prawdopodobnie tworzą wspólny system regulacji aktywności ATP-azowej SMC.

WEWNĄTRZKOMÓRKOWA LOKALIZACJA BIAŁEK HISTONOPODOBNYCH I SMC

Wewnątrzkomórkowa lokalizacja białek NAP i SMC stała się możliwa dzięki zastosowaniu fuzji tych białek z białkami fluorescencyjnymi lub swoistym przeciwciałem skierowanym przeciwko tym białkom. Systematyczne badania lokalizacji poszczególnych histonopodobnych białek u *E. coli* wykazały, że w zależności od swoistości tych białek względem rozpoznawanych sekwencji DNA, białka te są umiejscowione równomiernie (H-NS, Hu, Dps) lub w określonych skupiskach na obszarze chromosomu (Fis) [3]. Białko IHF stanowi wyjątek, ponieważ mimo stosunkowo dużej swoistości substratowej w porównaniu z białkami: H-NS, Hu, Dps nie występuje w postaci określonych skupisk, ale podobnie do tych białek wydaje się związane równomiernie z DNA całego chromosomu. Dotychczas nie zbadano wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka Lrp.

Badania nad bakteryjnymi białkami SMC (MukB) były prowadzone głównie na dwóch organizmach: *B. subtilis* i *E. coli*. Wstępne badania wykazały, że białka te nie charakteryzują się określoną swoistością substratową względem DNA. Wydaje się, że SMC nie są białkami strukturalnymi *per se* chromosomu, ale działanie ich polega na kondensacji nici DNA i jest sprzężone z procesem segregacji chromosomów do potomnych komórek. Analiza lokalizacji białka SMC podczas trwania cyklu komórkowego wykazała, że we wczesnej fazie tego cyklu skupiska białka SMC są obecne w środku komórki. Natomiast w późniejszym etapie są rozdzielone i ułożone blisko obu biegunów komórki – przyszłych centrów nowo powstałych potomnych komórek [25,26] (ryc. 6). Rozdzielenie skupisk SMC następuje w krótkim czasie po zainicjowaniu replikacji, podobnie jak w przypadku nowo zreplikowanych regionów *oriC* (origin of chromosome) [41]. Postuluje się, że białka SMC kondensują nowo zreplikowane regiony sukcesywnie w miarę postępu replikacji chromosomu (ryc. 6). W komórkach *B. subtilis* zauważono, że białka ScpA i ScpB są umiejscowione w tych samych pozycjach co białko SMC, a kompleksy tych trzech białek przemieszczają się z centrum komórki



Ryc. 6. Kondensacja i segregacja nowo zreplikowanych regionów *oriC*.

w kierunku jej biegunów wraz z białkami odpowiedzialnymi za segregację chromosomów, Soj i SpoOJ – homologii odpowiednio białek ParA (ATP-aza) i ParB (wiąże sekwencje *parS*, zlokalizowane w sąsiedztwie regionu *oriC*). U *B. subtilis* mutanty delecyjne genów *smc*, a także *scpA* i *scpB* charakteryzowały się nie tylko brakiem kondensacji chromosomów, ale również zaburzeniami w segregacji chromosomów do komórek potomnych (brak chromosomów u 12% komórek). Natomiast podwójne mutanty delecyjne genów *smc* (bądź *scpA* lub *scpB*) oraz *spoOJ* (gen kodujący białko SpoOJ) wykazały znacznie większe zaburzenia w segregacji niż mutanty pojedyncze (mutant *spoOJ* – brak chromosomów w 1–2% komórek) [18], gdyż brak chromosomów obserwowano aż u 28% komórek.

PODSUMOWANIE

Struktura chromosomu bakteryjnego jest dynamiczna i niejednorodna. Jest wypadkową działania białek odpowiedzialnych za upakowanie chromosomu w skali mikro (białka NAP) i makro (SMC, topoiomerazy) oraz białek uczestniczących w danym momencie w określonym procesie komórkowym, związanym z DNA chromosomowym (replikacja, transkrypcja, segregacja). Pomimo znacznego postępu w badaniach nad strukturą bakteryjnego chromosomu, jaki dokonał się w ostatnich kilku latach nadal niewiele wiadomo o mechanizmach działania wielu z tych białek, a zwłaszcza białek z rodziny SMC.

Chromosom nie jest odizolowaną strukturą w komórce bakteryjnej. Ostatnie badania wskazują na istnienie w komórce bakteryjnej cytoszkieletu (jego ważnym składnikiem jest białko MreB, homolog aktyny). Wstępne dane sugerują, że chromosom czy raczej jego określone regiony są związane z cytoszkieletem, ale nic nie wiadomo na temat mechanizmów tego rodzaju oddziaływań ani białek odpowiedzialnych za przymocowanie DNA do cytoszkieletu. Zapewne w niedalekiej przyszłości zagadnienia te zostaną wyjaśnione.

PODZIĘKOWANIA

Dziękujemy dr Dagmarze Jakimowicz i dr Annie Pawlik za krytyczne uwagi.

PIŚMIENICTWO

- [1] Ali Azam T., Iwata A., Nishimura A., Ueda S., Ishihama A.: Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.*, 1999; 181: 6361–6370
- [2] Altuvia S., Almirón M., Huisman G., Kolter R., Storz G.: The *dps* promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S in stationary phase. *Mol. Microbiol.*, 1994; 13: 265–272
- [3] Azam T.A., Hiraga S., Ishihama A.: Two types of localization of the DNA-binding proteins within the *Escherichia coli* nucleoid. *Genes Cells.*, 2000; 5: 613–626
- [4] Beloin C., Jeusset J., Revet B., Mirambeau G., Le Hegarat F., Le Cam E.: Contribution of DNA conformation and topology in righthanded DNA wrapping by the *Bacillus subtilis* LrpC protein. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 5333–5342
- [5] Britton R.A., Lin D.C., Grossman A.D.: Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. *Genes Dev.*, 1998; 12: 1254–1259
- [6] Ceci P., Cellai S., Falvo E., Rivetti C., Rossi G.L., Chiancone E.: DNA condensation and self-aggregation of *Escherichia coli* Dps are coupled phenomena related to the properties of the N-terminus. *Nucleic Acids Res.*, 2004; 32: 5935–5944
- [7] Dame R.T.: The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Mol. Microbiol.*, 2005; 56: 858–870
- [8] Dervyn E., Noirot-Gros M.F., Mervelet P., McGovern S., Ehrlich S.D., Polard P., Noirot P.: The bacterial condensin/cohesin-like protein complex acts in DNA repair and regulation of gene expression. *Mol. Microbiol.*, 2004; 51: 1629–1640
- [9] Frenkiel-Krispin D., Ben-Avraham I., Englander J., Shimoni E., Wolf S.G., Minsky A.: Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria. *Mol. Microbiol.*, 2004; 51: 395–405
- [10] Grant R.A., Filman D.J., Finkel S.E., Kolter R., Hogle J.M.: The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nature Struct. Biol.*, 1998; 5: 294–303
- [11] Graumann P.L.: SMC proteins in bacteria: condensation motors for chromosome segregation? *Biochimie*, 2001; 83: 53–59
- [12] Haering C.H., Lowe J., Hochwagen A., Nasmyth K.: Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol. Cell.*, 2002; 9: 773–788
- [13] Higgins N.P., Deng S., Pang Z., Stein R., Champion K., Manna D.: Domain behavior and supercoil dynamics in bacterial chromosomes. *The Bacterial Chromosome*. Higgins P.N. (Ed.), ACM Press, Washington, DC, 2005, Chapter 6, 133–153
- [14] Hirano M., Anderson D.E., Erickson H.P., Hirano T.: Bimodal activation of SMC ATPase by intra- and inter-molecular interactions. *EMBO J.*, 2001; 20: 3238–3250
- [15] Hirano M., Hirano T.: Positive and negative regulation of SMC–DNA interactions by ATP and accessory proteins. *EMBO J.*, 2004; 23: 2664–2673
- [16] Hirano M., Hirano T.: Opening closed arms: longdistance activation of SMC ATPase by hinge–DNA interaction. *Mol. Cell.*, 2006; 21: 175–186
- [17] Hirano T.: At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2006; 7: 311–322
- [18] Ireton K., Gunther N.W., Grossman A.D.: Spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 1994; 176: 5320–5329
- [19] Johnson R.C., Johnson L.M., Schmidt J.W., Gardner J.F.: Major nucleoid proteins in the structure and function of the *Escherichia coli* chromosome. *The Bacterial Chromosome*. Higgins P.N. (Ed.), ACM Press, Washington, DC, 2005, Chapter 5, 65–131
- [20] Kano Y., Imamoto F.: Requirement of integration host factor (IHF) for growth of *Escherichia coli* deficient in HU protein. *Gene.*, 1990; 89: 133–137
- [21] Kim J., Yoshimura S.H., Hizume K., Ohniwa R.L., Ishihama A., Takeyasu K.: Fundamental structural units of the *Escherichia coli* nucleoid revealed by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res.*, 2004; 32: 1982–1992
- [22] Lammens A., Schele A., Hopfner K.P.: Structural biochemistry of ATP-driven dimerization and DNA stimulated activation of SMC ATPases. *Curr. Biol.*, 2004; 14: 1778–1782
- [23] Lin Y.S., Kieser H.M., Hopwood D.A., Chen C.W.: The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol. Microbiol.*, 1993; 10: 923–933
- [24] Luijsterburg M.S., Noom M.C., Wuite G.J., Dame R.T.: The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin. A molecular perspective. *J. Struct. Biol.*, 2006; 156: 262–272
- [25] Mascarenhas J., Soppa J., Strunnikov A.V., Graumann P.L.: Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in *Bacillus subtilis* that interact with SMC protein. *EMBO J.*, 2002; 21: 3108–3118
- [26] Mascarenhas J., Volkov A.V., Rinn C., Schiener J., Guckenberger R., Graumann P.: Dynamic assembly, localization and proteolysis of the *Bacillus subtilis* SMC complex. *BMC Cell Biol.*, 2005; 6: 28
- [27] Melby T.E., Ciampaglio C.N., Briscoe G., Erickson H.P.: The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. *J. Cell Biol.*, 1998; 142: 1595–1604
- [28] Nakabachi A., Yamashita A., Toh H., Ishikawa H., Dunbar H.E., Moran N.A., Hattori M.: The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella*. *Science*, 2006; 314: 259–260
- [29] Picardeau M., Lobry J.R., Hinnebusch B.J.: Physical mapping of an origin of bidirectional replication at the centre of the *Borrelia burgdorferi* linear chromosome. *Mol. Microbiol.*, 1999; 32: 437–445
- [30] Postow L., Hardy C.D., Arsuaiga J., Cozzarelli N.R.: Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev.*, 2004; 18: 1766–1779
- [31] Schneider R., Lurz R., Luder G., Tolksdorf C., Travers A., Muskhelishvili G.: An architectural role of the *Escherichia coli* chromatin protein FIS in organising DNA. *Nucleic Acids Res.*, 2001; 29: 5107–5114
- [32] Sherratt D.J.: Bacterial chromosome dynamics. *Science.*, 2003; 301: 780–785
- [33] Smith P.C., Karpowich N., Millen L., Moody J.E., Rosen J., Thomas P.J., Hunt J.F.: ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol. Cell.*, 2002; 10: 139–149
- [34] Soppa J., Kobayashi K., Noirot-Gros M.F., Oesterhelt D., Ehrlich S.D., Dervyn E., Ogasawara N., Moriya S.: Discovery of two novel families of proteins that are proposed to interact with prokaryotic SMC proteins, and characterization of the *Bacillus subtilis* family members SepA and ScpB. *Mol. Microbiol.*, 2002; 45: 59–71
- [35] Stavans J., Oppenheim A.: DNA-protein interactions and bacterial chromosome architecture. *Phys. Biol.*, 2006; 3: R1–R10
- [36] Stein R.A., Deng S., Higgins N.P.: Measuring chromosome dynamics on different time scales using resolvases with varying half-lives. *Mol. Microbiol.*, 2005; 56: 1049–1061
- [37] Strunnikov A.V.: SMC complexes in bacterial chromosome condensation and segregation. *Plasmid*, 2006; 55: 135–144
- [38] Thanbichler M., Shapiro L.: Chromosome organization and segregation in bacteria. *J. Struct. Biol.*, 2006; 156: 292–303
- [39] van den Ent F., Lockhart A., Kendrick-Jones J., Lowe J.: Crystal structure of the N-terminal domain of MukB: a protein involved in chromosome partitioning. *Structure*, 1999; 7: 1181–1187
- [40] Volkov A., Mascarenhas J., Andrei-Selmer C., Ulrich H.D., Graumann P.L.: A prokaryotic condensin/cohesin-like complex can actively compact chromosomes from a single position on the nucleoid and binds to DNA as a ring-like structure. *Mol. Cell Biol.*, 2003; 23: 5638–5650
- [41] Webb C.D., Teleman A., Gordon S., Straight A., Belmont A., Lin D.C., Grossman A.D., Wright A., Losick R.: Bipolar localization of the replication origin regions of chromosomes in vegetative and sporulating cells of *B. subtilis*. *Cell.*, 1997; 88: 667–674