


mgr Marta Kołodziej,
prof. dr hab. Jolanta
Zakrzewska-Czerwińska,

dr Joanna Hołowska 

Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Wydział
Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski

https://doi.org/10.18388/pb.2019_270

✉ autor korespondujący: joanna.holowska@
uwr.edu.pl

Słowa kluczowe: chromosom bakteryjny, kondensyny SMC/MukB, białka NAP

Wykaz skrótów: ChIP-seq – immunoprecypitacja chromatyny połączona z sekwencjonowaniem (ang. *chromatin immunoprecipitation-sequencing*), CID – domeny interakcji chromosomalnych (ang. *chromosomal interaction domains*), NAP – białka wiążące nukleoid (ang. *nucleoid associated proteins*), *oriC* – miejsce inicjacji replikacji chromosomu (ang. *origin of chromosomal replication*), PALM – mikroskopia lokalizacji fotoaktywnej (ang. *photoactivated localization microscopy*), SMC – białko utrzymujące strukturę chromosomu (ang. *structural maintenance of chromosomes*), STORM – mikroskopia stochastycznej rekonstrukcji optycznej (ang. *stochastic optical reconstruction microscopy*)

Podziękowania:

Autorki dziękują Tomaszowi Łebkowskiemu, Damianowi Trojanowskiemu i Marcinowi Wołańskiemu za dyskusje i cenne uwagi w trakcie pisania manuskryptu.

Praca została sfinansowana w ramach grantów Narodowego Centrum Nauki (OPUS 2017/25/B/NZ1/00657 oraz SONATINA 2018/28/C/NZ1/00128).

STRESZCZENIE

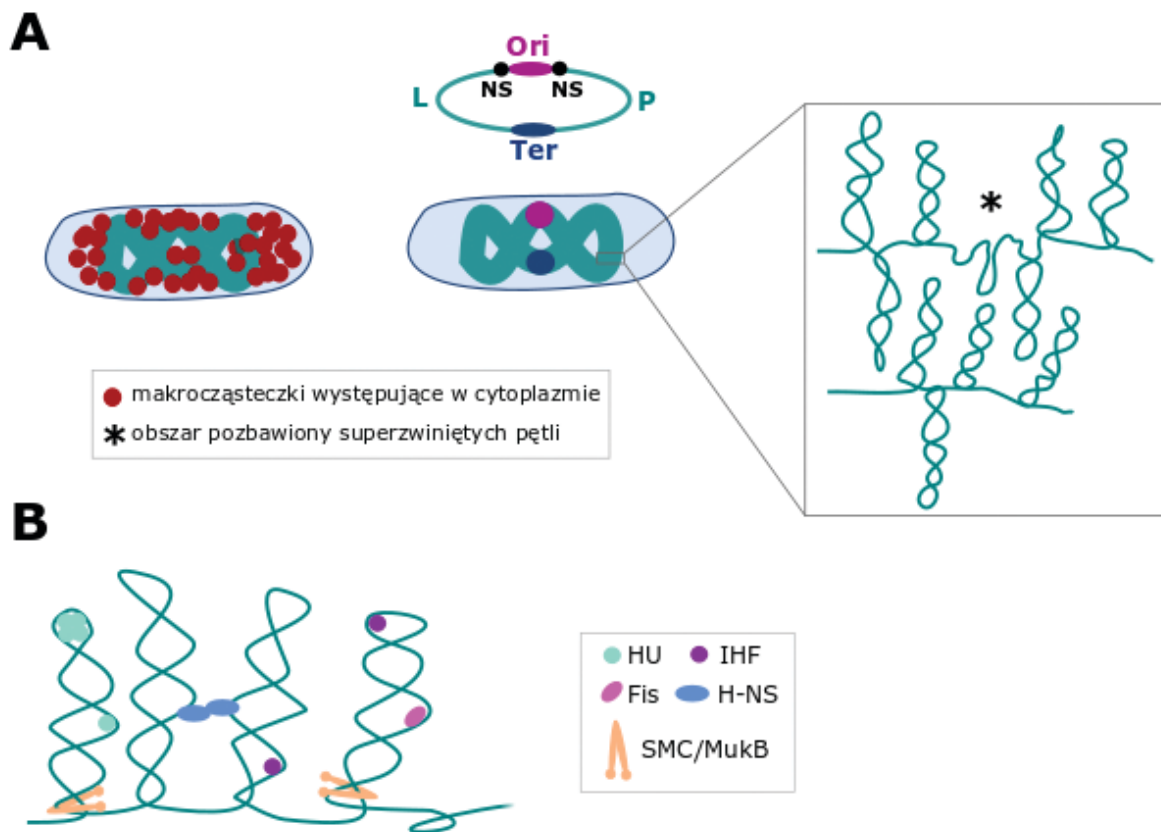
Rozwój zaawansowanych technik obrazowania (tj. mikroskopia wysokorozdzielcza) oraz wysokoprzepustowych metod analizy DNA pozwolił na zrewidowanie dotychczasowego poglądu dotyczącego struktury i organizacji chromosomu bakteryjnego (nukleoidu). Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach sugerują, że nukleoid, podobnie do eukariotycznej chromatyny, wykazuje hierarchiczną organizację. Jednakże, u bakterii chromosom jest poddawany ciągłym modyfikacjom i reorganizacjom topologicznym ze względu na jednocześnie zachodzące procesy replikacji, transkrypcji i translacji. Organizacja dynamicznej i równocześnie silnie upakowanej struktury nukleoidu zależy od czynników fizycznych działających na cząsteczkę chromosomu w małej przestrzeni komórki bakteryjnej oraz jest wynikiem działania wielu białek wiążących się do DNA chromosomalnego. Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie obecnego stanu wiedzy na temat struktury chromatyny bakteryjnej oraz wyjaśnienie fizycznych i molekularnych czynników leżących u podstaw jej organizacji w komórce.

WSTĘP

Chromosom bakteryjny występuje w postaci DNA związanego z licznymi białkami oraz RNA tworząc makrokompleks nukleoproteinowy zwany nukleoidem. W przeciwieństwie do eukariotycznej chromatyny, chromosom bakteryjny nie jest oddzielony żadną fizyczną barierą od pozostałych składników komórki i z tego względu bardzo długo uważany był za nieustrukturyzowany twór zanurzony w cytoplazmie. Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach pozwoliły na zrewidowanie dotychczasowego poglądu na temat struktury chromosomu bakteryjnego, który stopniem organizacji dorównuje niemal eukariotycznej chromatynie. Pierwszy model organizacji nukleoidu został zaproponowany prawie 50 lat temu na podstawie eksperymentu, w którym komórki *Escherichia coli* zostały poddane delikatnej lizie alkalicznej [1]. Uwolniony z komórki chromosom układał się w szereg charakterystycznych, superzwiniętych pętli zebranych wokół gęsto upakowanego rdzenia tworząc strukturę tzw. rozety. Podejrzewano, że rdzeń ten stanowią białka i RNA. Model rozety uważa się obecnie za kontrowersyjny, a charakterystyczny kształt rozety może być artefaktem powstałym w wyniku niefizjologicznej asocjacji zasadowych białek kotwiących DNA w błonie komórkowej [2]. Przedmiotem niniejszego artykułu jest przybliżenie obecnego stanu wiedzy na temat organizacji bakteryjnej chromatyny oraz analiza fizycznych i molekularnych podstaw jej organizacji w komórce.

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA ORGANIZACJĘ CHROMOSOMU BAKTERYJNEGO

U większości bakterii chromosom stanowi pojedynczą, kowalencyjnie zamkniętą cząsteczkę dwuniciowego DNA. Występują jednak bakterie mające więcej niż jeden chromosom (np. *Vibrio cholerae* [3]) lub zawierające chromosom liniowy (np. *Streptomyces* [4], *Borrelia burgdorferi* [5]). Wielkość chromosomu bakteryjnego jest bardzo zróżnicowana – od 0,11 Mbp u obligatoryjnego symbionta *Candidatus Nasuia deltocephalinicola* [6] do nawet 15 Mbp u myksobakterii *Sorangium cellulosum* [7]. W związku z niewielkim rozmiarem komórek bakteryjnych chromosom musi być skondensowany co najmniej tysiąckrotnie [8]. Istnieje kilka różnych mechanizmów odpowiedzialnych za upakowanie i kondensację chromosomalnego DNA, w których uczestniczą cząsteczki wykazujące różną swoistość względem DNA. Jednym z nich jest nieswoisty mechanizm ograniczający objętość nukleoidu poprzez działanie makrocząsteczek obecnych w cytoplazmie [9]. U bakterii, cytoplazma składa się z różnych makrocząsteczek w tym białek i RNA, a niektóre z nich tworzą złożone struktury takie jak rybosomy lub cytoskielet (np. białko MreB). Makrocząsteczki te występują w dużym zagęszczeniu w cytoplazmie (300–400 mg RNA i białka/ml cytoplazmy [10]) i dlatego zjawisko takie często określa się terminem zatłoczenia molekularnego (ang. *molecular crowding*) (Ryc. 1A). Te „stłoczone” makrocząsteczki (ang. *crow-*



Rycina. 1. Model hierarchicznej struktury bakteryjnej chromatyny. (A) Poziomy organizacji chromosomu bakteryjnego: globalna organizacja nukleoidu, podział na makrodomeny (Ori, Ter, lewe (L) i prawe (P) ramie chromosomu oraz dwie nieustrukturyzowane domeny (NS)), organizacja DNA w ramach domen CID (obszar odpowiadający granicy pomiędzy domenami CID oznaczony gwiazdką). (B) Schemat organizacji mikrodomen chromosomalnych przez białka NAP (HU, IHF, Fis, H-NS) oraz kondensyny SMC/MukB.

ding agents) nie oddziałują z DNA, ale w sposób fizyczny wpływają na strukturę nukleoidu głównie ograniczając jego objętość. Kondensacja DNA odbywa się również poprzez neutralizację jego ujemnego ładunku [11]. W procesie tym uczestniczą dodatnio naładowane czynniki, multiwalentne kationy (np. poliaminy) oraz niskocząsteczkowe białka wiążące DNA (NAP, ang. *nucleoid associated proteins*). Białka NAP nie tylko kondensują DNA poprzez neutralizację jego ujemnego ładunku, ale również lokalnie wpływają na jego topologię (Ryc. 1B). Dodatkowo istnieją wysokocząsteczkowe białka SMC (ang. *Structural Maintenance of Chromosomes*; oraz homologi funkcjonalne SMC występujące u Enterobakterii – białka MukB), które w przeciwieństwie do większości białek NAP, kondensują odległe od siebie fragmenty chromosomalnego DNA (Ryc. 1B). Innym ważnym mechanizmem odpowiedzialnym za upakowanie DNA jest kontrola jego superskręcenia. Za utrzymanie homeostazy topologicznej cząsteczki chromosomu w komórce bakteryjnej odpowiadają wyspecjalizowane enzymy zwane topoiizomerazami [12]. Kontrolują one relaksację DNA przecinając jedną (topoiizomerazy typu I) lub dwie jego nici (topoiizomerazy typu II). U większości bakterii podstawowy zestaw topoiizomeraz stanowi topoiizomeraza typu I usuwająca ujemne superskręty oraz działająca przeciwnie gyraza będąca topoiizomerazą typu II. Na organizację nukleoidu mają też wpływ określone sekwencje nukleotydowe chromosomalnego DNA, które przykładowo mogą generować

zakrzywienie DNA lub jego wypętlenie (np. ciąg zasad A) [13].

Oprócz powyżej wspomnianych mechanizmów, organizacja chromosomu bakteryjnego zależy również od fazy wzrostu bakterii, a w konsekwencji od intensywności procesów związanych z przekazywaniem informacji genetycznej (replikacja, transkrypcja i translacja). W fazie logarytmicznego wzrostu, zwłaszcza w często dzielących się komórkach, chromosom musi mieć dynamiczną strukturę tak, aby procesy replikacji i segregacji chromosomu oraz transkrypcji mogły zachodzić jednocześnie. Z drugiej strony, zatłoczenie molekularne związane z intensywną produkcją białek (w często dzielących się komórkach *E. coli* występować może aż 72000 rybosomów na pojedynczą komórkę [14]) ma istotny wpływ na upakowanie chromosomów. Procesy transkrypcji i translacji określonych genów (a zwłaszcza genów zorganizowanych w operony) odbywają się w tym samym miejscu i czasie, w związku z czym większość rybosomów umiejscawia się w bezpośrednim sąsiedztwie nukleoidu, co powoduje jego kondensację.

POZIOMY ORGANIZACJI CHROMOSOMU BAKTERYJNEGO

Podobnie do eukariotycznej chromatyny, chromosom bakteryjny wykazuje hierarchiczną strukturę (Ryc. 1), która jest wypadkową działania czynników fizycznych, oddzia-

ływań na poziomie DNA-białko oraz zależy od procesów zachodzących na różnych etapach cyklu życiowego bakterii (tj. replikacja i segregacja chromosomów, transkrypcja oraz translacja). Badania chromosomu bakteryjnego przy użyciu wysokorozdzielczej mikroskopii fluorescencyjnej (m.in., mikroskopia PALM – *photoactivated localization microscopy*, STORM – *stochastic optical reconstruction microscopy* i 3D-SIM – *3D structured illumination microscopy*) oraz wysokoprępowych analiz DNA (tj. ChIP-seq, *chromatin immunoprecipitation-sequencing*) potwierdziły jego uporządkowaną i równocześnie dynamiczną organizację [15–20]. Bliższe spojrzenie na organizację nukleoidu umożliwiła również metoda 3C (ang. *chromosome conformation capture*) oraz jej pochodne, przede wszystkim technika Hi-C (ang. *high-throughput 3C*), która pozwala określić mapę kontaktów fragmentów DNA, często odległych od siebie, a w konsekwencji zrekonstruować trójwymiarową organizację chromosomu [20].

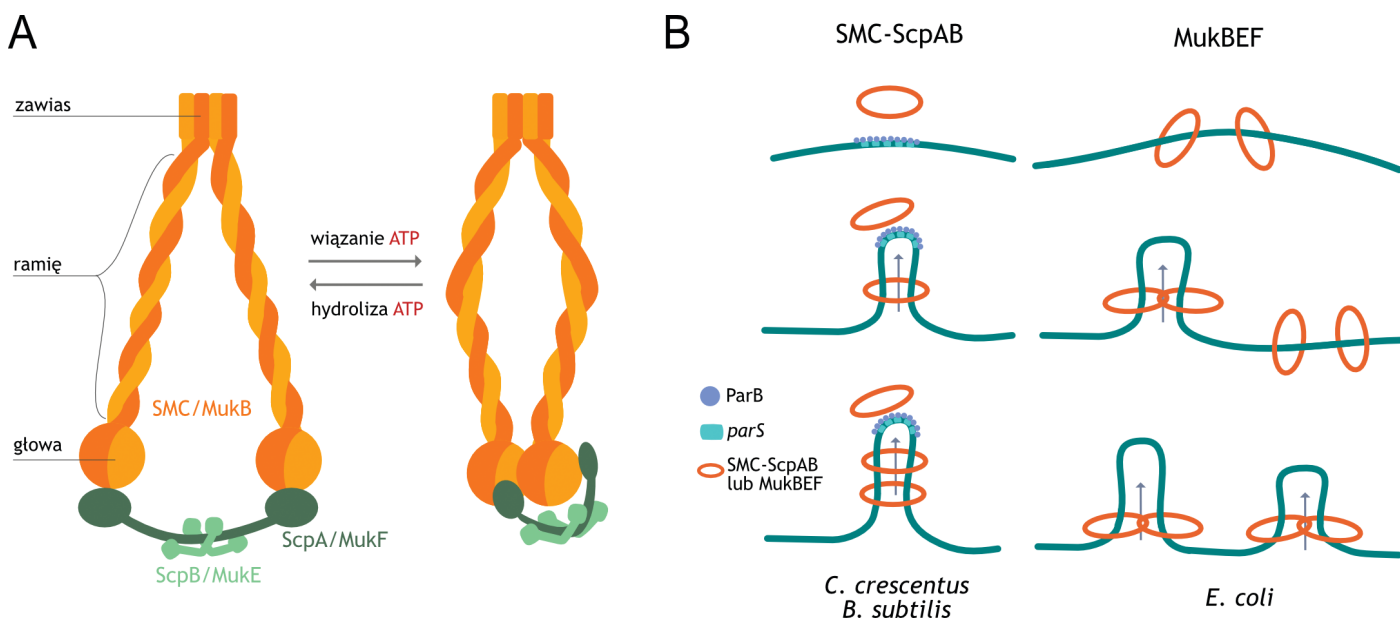
W ujęciu globalnym, chromosom przyjmuje konformację w zależności od rozmiarów i kształtu komórki. Przykładowo, u pałeczkowatej, drapieżnej bakterii *Bdellovibrio bacteriovorus* (namnażającej się w Gram-ujemnych bakteriach) chromosom jest dodatkowo helikalnie skręcony, aby dopasować się do niewielkich wymiarów komórki [21].

Makrodomeny (duże fragmenty chromosomu, o wielkości rzędu Mbp; Ryc. 1A), których istnienie potwierdzono eksperymentalnie dotychczas tylko u *E. coli*, zajmują stałe miejsca w komórce i nie ulegają rekombinacji między sobą [20,22,23]. Przyjmuje się, że chromosom *E. coli* składa się z sześciu takich makrodomen: Ori, Ter (obejmujące odpowiednio region startu oraz terminacji replikacji DNA), lewego i prawego ramienia chromosomu oraz dwóch niestruc-

turyzowanych domen, które flankują makrodomenę Ori. Wyniki ostatnich badań Hi-C u *E. coli* sugerują, że makrodomena Ter charakteryzuje się nietypową strukturą w porównaniu do pozostałych regionów chromosomu [20]. Za organizację domeny Ter odpowiada białko MatP występujące wyłącznie u Enterobakterii. MatP rozpoznaje 13-nukleotydowe motywy (zwane sekwencjami *matS*) i tworząc tetrametry, zbliża nawet znacznie oddalone fragmenty DNA w obrębie makrodomeny Ter [24].

Eksperymenty Hi-C prowadzone na bakteriach modelowych (tj. *E. coli* [20], *Bacillus subtilis* [25] i *Caulobacter crescentus* [16]) pozwoliły na wyodrębnienie dużych (30-400 kbp), wewnątrznie oddziałujących ze sobą regionów DNA, zwanych domenami CID (ang. *chromosomal interaction domains*). Liczba domen CID różni się w zależności od rodzaju bakterii, np. u *C. crescentus* zidentyfikowano 23 takie domeny, natomiast u *E. coli* występuje 31 domen CID. Co ciekawe, występowanie domen CID jest pochodną aktywności transkrypcyjnej w komórce – regiony aktywne transkrypcyjnie wyznaczają ich granice. W związku z dużą aktywnością transkrypcyjną na obrzeżach domen CID, DNA w tych obszarach chromosomu nie występuje w postaci superzwiniętych pętli (obszar zaznaczony gwiazdką na Ryc. 1A), co stanowi naturalne granice pomiędzy domenami. Organizacja bakteryjnej chromatyny na poziomie domen CID jest analogiczna do zaobserwowanych wcześniej eukariotycznych domen TAD (ang. *topologically associated domains*) [26].

Najmniejszą jednostką organizacyjną chromosomu bakteryjnego są mikrodomeny, w których DNA chromosomalny występuje w postaci topologicznie niezależnych, superzwiniętych pętli [27]. U *E. coli* występuje ok. 400 mi-



Rycina. 2. Struktura i proponowany mechanizm działania bakteryjnych kondensyn. (A) Budowa kompleksu SMC-ScpAB/MukBEF oraz zmiany konformacji białek wywołane związaniem ATP. Forma otwarta, w kształcie litery V oraz forma eliptyczna znajdują się odpowiednio po lewej i prawej stronie schematu. (B) Mechanizm kondensacji nukleoidu przez bakteryjne kondensyny (*loop extrusion*). Białko SMC jest rekrutowane w region *oriC* przez białko ParB związane z sekwencjami *parS* (zlokalizowanymi w bezpośrednim sąsiedztwie *oriC*), a następnie przemieszczane wzdłuż chromosomu. Białko MukB wiąże się z chromosomem w losowych miejscach a, następnie spina DNA tworząc pętle.

krodomen o przybliżonej wielkości 10 kpz. Za organizację DNA chromosomalnego na tym poziomie odpowiadają wspomniane wcześniej kondensyny (tj. SMC, MukB) oraz zasadowe białka NAP (Ryc. 1B). Charakterystykę tych białek oraz mechanizm ich działania omówiono w następnych podrozdziałach.

CHARAKTERYSTYKA BAKTERYJNYCH KONDENSYN

Kondensyny z grupy SMC (ang. *Structural Maintenance of Chromosomes*) występują we wszystkich trzech domenach życia [28]. Białka te mają aktywność ATPazową, charakteryzują się dużą masą cząsteczkową (110–170 kDa) i występują w postaci dimerów. Białko SMC składa się z tak zwanej „głowy” (ang. *head*), zdolnej do hydrolizy ATP, która powstaje ze złożenia N- i C-końcowych domen białka (Walker A i Walker B; Ryc. 2A). W centralnym regionie cząsteczki znajduje się domena zawiasowa (ang. *hinge*) odpowiedzialna za dimeryzację, połączona z „głową” superhelikalnym ramieniem. Homodimer SMC oddziałuje z białkami pomocniczymi ScpA i ScpB tworząc asymetryczny, trzyczęściowy pierścień [29]. Kompleks SMC-ScpAB może występować w dwóch formach. Forma otwarta, w kształcie litery V, tworzy się kiedy białko nie jest związane z ATP, natomiast po związaniu ATP i jego hydrolizie „głowy” białka asocjują ze sobą tworząc zamkniętą, eliptyczną strukturę (Ryc. 2A). Podstawową funkcją białek SMC jest zbliżanie relatywnie odległych fragmentów chromosomu poprzez tworzenie pętli na nici DNA. Wykorzystanie techniki Hi-C pozwoliło na wyznaczenie mapy kontaktów pomiędzy poszczególnymi fragmentami chromosomu *in vivo* [16,30]. Z badań prowadzonych na *C. crescentus* i *B. subtilis* wynika, że SMC odpowiada za powstanie oddziaływań dalekiego zasięgu, czyli zbliżanie fragmentów chromosomu oddalonych od siebie o 100 kpz do 1 Mpz. Potwierdza to wcześniejsze hipotezy, które zakładały, że bakteryjna kondensyna oddziałuje z DNA tworząc pętle w procesie nazwanym *loop extrusion* [31,32] (Ryc. 2B). Również badania *in vitro* prowadzone na drożdżowym kompleksie SMC pokazały aktywne, zależne od hydrolizy ATP przemieszczanie DNA przez zamkniętą strukturę kondensyny [33]. Z dotychczasowych badań wynika, że bakterie wykształciły dwie zależne od kondensyn strategie organizowania struktury chromosomu poprzez tworzenie pętli. Pierwsza, opisana dla *B. subtilis* i *C. crescentus*, zakłada rekrutowanie kompleksu SMC-ScpAB przy udziale białka ParB do regionu *oriC* (ang. *origin of chromosomal replication*). ParB oraz wiązane przez to białko sekwencje *parS* są składnikami segrosomu, który bierze udział w segregacji nowozreplikowanych regionów *oriC* do komórek potomnych. Po wprowadzeniu kompleksów SMC-ScpAB w region *oriC* przemieszczają się one w kierunku *ter* (region terminacji replikacji), co prowadzi do kohezji ramion chromosomu [25,34] (Ryc. 2B). Drugą strategię opisano dla Enterobakterii, które nie mają systemu segregacyjnego ParABS, a homologiem funkcjonalnym kompleksu SMC-ScpAB u tych bakterii jest MukBEF. Białko to, podobnie jak u *B. subtilis* i *C. crescentus*, występuje w kompleksie z białkami pomocniczymi MukE i MukF [24]. U *E. coli* MukB, w przeciwieństwie do SMC, nie jest wprowadzane w określone miejsce na chromosomie i zakłada się, że jest ono losowo rekrutowane w różne regiony nukleoidu. Dodatkowo wykazano, że dwa dimery MukB potrzebne są do efektywnego

przemieszczania DNA. W przeciwieństwie do *B. subtilis* czy *C. crescentus*, u *E. coli* nie występuje kohezja ramion chromosomu, a działanie kompleksów MukBEF prowadzi do fizycznego zbliżenia fragmentów nukleoidu zlokalizowanych w obrębie ramion [20,35] (Ryc. 2B).



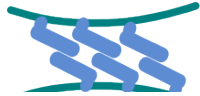



Usunięcie genu *smc* u różnych bakterii manifestuje się odmiennymi defektami we wzroście, segregacji chromosomów i podziałach komórkowych. U *B. subtilis* i *E. coli* w optymalnych warunkach wzrostu (promujących częste podziały komórkowe) delecja genu kodującego odpowiednio kondensyny SMC i MukB jest letalna [36,37]. Natomiast wzrost mutantów delecyjnych w warunkach nieoptymalnych (na podłożu minimalnym lub w obniżonej temperaturze) jest możliwy, jednak występują wówczas liczne defekty związane z segregacją chromosomów w tym powstawanie komórek pozbawionych całkowicie lub częściowo materiału genetycznego (tzw. efekt „gilotynowania” nukleoidu) [38,39]. U *C. crescentus* delecja genu *smc* skutkuje poważnymi defektami w segregacji chromosomów oraz zaburzeniami podziałów komórkowych. Z kolei u bakterii z rzędu promieniowców, *Streptomyces coelicolor* i *Mycobacterium smegmatis*, brak białka SMC nie powoduje znacznych zaburzeń we wzroście [40,41]. Co ciekawe, u niektórych bakterii takich jak *Helicobacter pylori* czy *Rickettsia prowazekii* nie znaleziono genów kodujących to białko [42]. Niewykluczone, że w toku ewolucji bakterie te wykształciły inne, niezależne od SMC i MukB mechanizmy regulujące kondensację i segregację chromosomu, lub też produkują niezidentyfikowane dotąd homologi funkcjonalne kondensyn. Potwierdzeniem tej hipotezy jest niedawne odkrycie nowej grupy kondensyn nazwanych MksBEF (ang. *MukBEF-like SMC proteins*) ze względu na ich stosunkowo wysoką homologię strukturalną do białek MukBEF [43]. Analiza bioinformatyczna wykazała obecność homologów tych białek między innymi u *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, czy *Micrococcus luteus*. Jedyne dostępne badania dotyczące funkcji nowej rodziny kondensyn zostały przeprowadzone na modelu chorobotwórczej bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, u której oprócz MksB występuje również SMC. Usunięcie genu *mksB* u tych bakterii (podobnie jak delecja genu *smc*) prowadzi do powstania komórek pozbawionych nukleoidu, co sugeruje, że białko to może uczestniczyć w segregacji chromosomu [43]. Co ciekawe, u *P. aeruginosa*, unikalny zestaw kondensyn stanowi przełącznik molekularny między różnymi stadiami wzrostu tej patogennej bakterii, co jest istotnym mechanizmem przystosowawczym podczas infekcji [44].

Badania prowadzone w ostatnich latach dostarczyły wielu cennych informacji na temat mechanizmu działania bakteryjnych kondensyn. Niewyjaśnionym pozostaje jednak w jaki sposób kompleks SMC, przesuując się wzdłuż chromosomu, pokonuje przeszkody jakimi są inne białka oddziałujące z DNA czy też wielobiałkowe kompleksy biorące udział w procesach transkrypcji i translacji.

CHARAKTERYSTYKA BIAŁEK NAP (ANG. NUCLEOID ASSOCIATED PROTEINS)

Na organizację bakteryjnej chromatyny wpływają również występujące licznie w komórkach bakteryjnych małe (masa do 20 kD), zasadowe białka NAP. Białka te organi-

Tabela 1. Właściwości głównych białek NAP

Białko	Forma	Swoistość wiązania DNA	Wpływ na procesy komórkowe	Mechanizm wiązania DNA	
HU α /HU β	homo/hetero dimer	sekwencje bogate w pary AT	segregacja chromosomu, inicjacja replikacji, transkrypcja genów, topologia DNA	nawijanie DNA na białkowy oligomer	
IHF α /IHF β	homo/hetero dimer	(A/T)ATCAANNNTT (A/G)	inicjacja replikacji, transkrypcja genów, rekombinacja, transpozycja	zakrzywianie	
H-NS	homodimer	sekwencje bogate w pary AT, zakrzywione DNA	transkrypcja genów, neutralizacja ujemnych superskrętów	mostkowanie	
Fis	homodimer	sekwencje bogate w pary AT	wzrost hodowli w podwyższonej temperaturze, transkrypcja genów, rekombinacja	zakrzywianie o 50-90°	
Lrp	dimer, oktamer lub heksadekamer	(T/C)AG(A/T/C) (A/T)ATT(A/T) T(A/T/G)CT(A/G)	transkrypcja genów	owijanie, zakrzywianie	
Dps	dodekamer	wiązanie nieswoiste	poziom jonów żelaza w komórce, wrażliwość na warunki stresowe	kompaktowanie	

zują chromosom poprzez nieswoiste wiązanie DNA, powodując mostkowanie, zakrzywianie, lub nawijanie DNA na białkowy oligomer (Tabela 1 i Ryc. 1B). Kondensacja chromosomu w skali lokalnej poprzez białka NAP wpływa na globalną strukturę chromosomu bakteryjnego i w wielu przypadkach prowadzi również do zmian w transkrypcji genów [45,46].

Wśród białek NAP występujących u *E. coli* można wyróżnić trzy grupy białek zaginających DNA. Najliczniej produkowanym w komórce i najbardziej konserwowanym białkiem w rodzinie NAP jest HU (ang. *heat-unstable protein*). U *E. coli*, białko HU w zależności od fazy wzrostu, występuje jako homo- lub heterodimer zbudowany z białek HU α i HU β . Podczas gdy w trakcie wzrostu wykładniczego dominuje forma HU $\alpha\alpha$, w fazie stacjonarnej częściej występuje heterodimer HU $\alpha\beta$ [47]. Co ciekawe, homologi HU występujące u promieniowców (np. u *Mycobacterium*) zwiernają unikatową C-końcową domenę bogatą w reszty lizyny charakterystyczne dla rodziny eukariotycznych histonów linkerowych H1/H5 [48]. Białko HU oddziałuje z DNA w małym rowku, wiąże się nieswoiście do DNA, ale preferuje regiony bogate w pary AT, a analiza ChIP-seq pokazała, że u *E. coli* HU wiąże się wzdłuż całego chromosomu [18]. Badania prowadzone na *Mycobacterium smegmatis* wskazują, że homolog białka HU – HupB wiąże się wzdłuż całego chromosomu, ale rozmieszczenie miejsc wiązania nie jest

równomierne. Wiąże się ono najliczniej w okolicach regionu *oriC*, a im bliżej regionu *ter*, tym liczba miejsc wiązania jest mniejsza, co sugeruje, że białko to uczestniczy w organizacji nowozreplikowanych regionów *oriC* chromosomu [49]. Analiza Hi-C przeprowadzona na mutantach *C. crescentus* pozbawionych genów *hupA* i *hupB* pokazała, że białka te mają wpływ na oddziaływania bliskiego zasięgu, natomiast nie mają wpływu na strukturę domen CID [16]. Subkomórkowa lokalizacja białka HU-FP (FP – *fluorescent protein*) u *E. coli* [15], *C. crescentus* [50] oraz *M. smegmatis* [49] wykazała, że wzór fluorescencji kompleksów HU/HupB-FP z DNA odzwierciedla strukturę chromosomu, co umożliwia zastosowanie fuzji tego białka z różnymi fluoroforami jako markera chromosomu bakteryjnego w analizach mikroskopowych w czasie rzeczywistym.

Kolejnym przykładem białka NAP zakrzywiającego DNA jest IHF (ang. *Integration Host Factor*), które pierwotnie zostało zidentyfikowane jako czynnik integracji faga lambda u *E. coli*. Pod względem struktury trzeciorzędowej białko to wykazuje podobieństwo do białka HU jednak mechanizm jego wiązania się do chromosomu jest inny. Podczas gdy HU nieswoiście oddziałuje z DNA, IHF wiąże się do określonych sekwencji nukleotydowych (Tabela 1) powodując powstanie otwartych pętli o kształcie litery U [51]. U Enterobakterii białko to jest zbudowane z dwóch pojed-

nostek α oraz β i podobnie jak HU funkcjonuje w postaci homo- lub heterodimeru [52].

Innym przykładem białka kondensującego chromosom poprzez zakrzywanie DNA jest białko Fis (ang. *Factor for inversion stimulation*), którego poziom w komórce zmienia się w zależności od fazy wzrostu. Jest ono produkowane głównie we wczesnej fazie logarytmicznego wzrostu, podczas częstych podziałów komórkowych, promowanych dostępnością składników odżywczych [47]. Białko Fis występuje jako homodimer i podobnie do innych białek NAP wiąże się do sekwencji bogatych w pary AT (Tabela 1), a analiza ChIP-seq przeprowadzona dla *E. coli* dowiodła, że wiąże się ono do DNA równomiernie wzdłuż całego chromosomu [53]. Zakrzywiając DNA o ok. 50-90° tworzy stabilny nukleoproteinowy kompleks, który efektywnie kondensuje chromosom [54]. Co ciekawe, białko Fis wpływa na superskręcenie chromosomu poprzez stabilizowanie pętli plektonemicznych (tj. mikrodomen) oraz bezpośrednią regulację transkrypcji genu kodującego gyrazę [55,56].

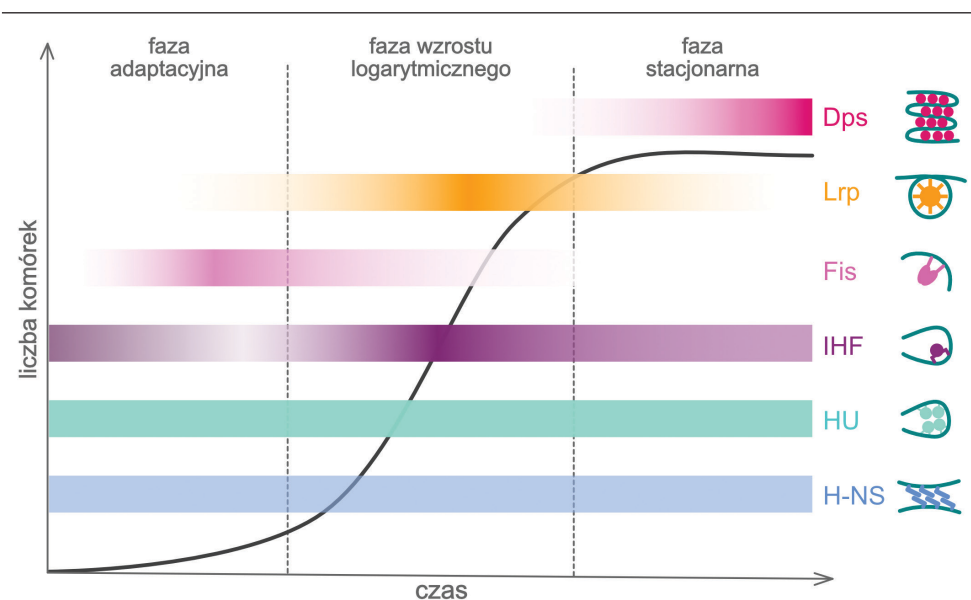
Kondensacja bakteryjnej chromatyny przez białka NAP (H-NS, Lrp i Dps) może odbywać się również poprzez kohezję sąsiednich fragmentów DNA. Białko H-NS (ang. *heat-stable nucleoid-structuring*) wpływa na organizację chromosomu poprzez łączenie odległych fragmentów DNA, co w konsekwencji prowadzi do powstania pętli. Jego homologi pochodzące z różnych mikroorganizmów nie charakteryzują się podobieństwem na poziomie sekwencji aminokwasowej, jednak struktura trzeciorzędowa oraz pełniona przez nie funkcja jest podobna. Białko H-NS jest zbudowane z dwóch domen połączonych elastycznym łącznikiem. Domena C-końcowa jest odpowiedzialna za wiązanie DNA, natomiast N-końcowa wykazuje aktywność dimeryzacyjną [57]. Charakterystyczna budowa i zdolność do oligomeryzacji sprawia, że H-NS i jego homologi są w stanie zbliżać odległe fragmenty chromosomu poprzez tworzenie mostków DNA-H-NS-DNA. W ten sposób organizowane są chromosomalne mikrodomeny (Ryc. 1), co zostało potwierdzone zarówno za pomocą mikroskopii sił atomowych oraz innych badań na poziomie pojedynczej cząsteczki [58-60]. Białko H-NS zostało zidentyfikowane w bibliotece mutantów *E. coli* o obniżonym poziomie negatywnych superskręceń, co wskazuje na to, że podobnie jak inne białka NAP, ma wpływ na superskręcenie chromosomu [61]. Z tego powodu promotory genów, których transkrypcja jest zależna od poziomu superskręcenia, mogą być regulowane przez H-NS [62,63].

Innymi przykładami białek kohezyjnych kondensujących chromosom poprzez nawijanie DNA na białkowy oligomer są Lrp i Dps. W przeciwieństwie do większości białek NAP, które nie wykazują swoistości wiązania, Lrp (ang. *leucine-responsive regulatory protein*) wiąże się do określonej sekwencji nukleotydowej (Tabela 1) [64,65]. Nawijanie DNA na kompleks tworzony przez oligomery Lrp zostało potwierdzone przez badania wrażliwości DNA na działanie DNazy I, w których zaobserwowano ochronę przed hydrolizą DNA na odcinkach ok. 100 pz przez oligomery badanego białka [66]. Wpływ na zmianę struktury DNA potwierdzono za pomocą mikroskopii elektronowej oraz sił atomowych u *B. subtilis* [67]. Lrp może występować w komórce w różnych formach oligomerycznych – jako dimer, oktamer oraz heksadekamer, którego powstawanie jest promowane związaniem

leucyny w roli kofaktora [68,69]. W fazie stacjonarnej, w warunkach niedoboru składników odżywczych najliczniej produkowanym białkiem jest Dps (ang. *DNA-binding protein from starved cells*). Wiąże się ono do DNA nieswoicie powodując jego kondensację i zapewniając fizyczną ochronę przed uszkodzeniami wywołanymi przez stres oksydacyjny, ekspozycję na wysoką temperaturę czy też promieniowanie UV [70,71]. Co ciekawe, białko Dps ma zdolność wiązania jonów żelaza, co nadaje mu właściwości katalazy i umożliwia neutralizowanie wolnych rodników [72]. Usunięcie genu *dps* u *E. coli* zaburza poziom jonów żelaza w komórce, co w konsekwencji prowadzi do zmiany ekspresji genów regulowanych pośrednio przez jony tego metalu [73]. Najnowsze badania pokazują, że Dps nie wpływa bezpośrednio na ekspresję genów, a prawdopodobnie jest jedynie elementem mechanizmu obronnego nukleoidu w momencie stresu środowiskowego (fizyczna ochrona poprzez opłaszczanie DNA) [74].

Poza funkcjami strukturalnymi białka NAP biorą udział w regulacji wielu kluczowych procesów komórkowych. Wprowadzanie pętli oraz zakrzywanie DNA przez białka NAP może ograniczać polimerazie RNA dostęp do określonych promotorów, co wiąże się ze zmianą poziomu ekspresji genów. Taki mechanizm działania został opisany w przypadku białek H-NS, IHF, HU, Lrp oraz Fis [45]. Mostkujące białko H-NS, ze względu na preferencję wiązania się do regionów chromosomu bogatych w pary AT, często kontroluje ekspresję genów pozyskanych na drodze horyzontalnego transferu, a także genów wirulencji oraz genów zaangażowanych w adaptację do zmiennych warunków środowiska, co klasyfikuje H-NS do grupy ksenogenicznych represorów transkrypcji genów [46,75]. Niektóre z białek NAP, np. Fis oraz IHF, mogą również wpływać na ekspresję genów poprzez interakcję z czynnikiem σ^{54} polimerazy RNA, co jest cechą charakterystyczną dla globalnych czynników transkrypcyjnych [76-80]. Białko Fis u Enterobakterii reguluje setki genów, między innymi geny zaangażowane w wirulencję, *quorum sensing*, regulację poziomu superskręcenia DNA (*gyrA*, *gyrB*, *topA*, *rpoA*) oraz odpowiedź na stres środowiskowy [81-84]. Natomiast u *Salmonella Typhimurium* IHF kontroluje geny zaangażowane w procesy wirulencji, syntezy ściany komórkowej czy adaptacji komórek do fazy stacjonarnej [52]. Ważne funkcje regulatorowe pełni również białko Lrp, które kontroluje transkrypcję od 10 do 30% genów u *E. coli* [85,86]. Jego regulom stanowią głównie geny zaangażowane w metabolizm aminokwasów i pobieranie składników odżywczych z otoczenia, ale kontroli podlegają również geny związane z wirulencją oraz tworzeniem pili płciowych [87]. Poza funkcjami regulatorowymi białka NAP wpływają na inne kluczowe procesy komórkowe. Przykładowo, białko HU wpływa na inicjację replikacji poprzez stabilizowanie kompleksu prereplikacyjnego oraz na utrzymanie homeostazy topologicznej chromosomu poprzez bezpośrednie oddziaływanie z topoizomerazą I [88-90]. Natomiast białko IHF podobnie jak HU wpływa na inicjację replikacji, bierze również udział w procesach rekombinacji i transpozycji DNA, natomiast białko Fis bierze udział w regulacji procesu rekombinacji i replikacji chromosomu [91].

Poziom ekspresji poszczególnych białek NAP często jest zależny od fazy wzrostu hodowli i wiąże się z funkcjami,



Rycina. 3. Poziom ekspresji genów kodujących białka NAP u *E. coli* w trakcie cyklu komórkowego. Kolorem czarnym zaznaczono krzywą wzrostu hodowli [106,107].

które pełnią one w komórce (np. udział w inicjacji replikacji, kontrola transkrypcji) (Ryc. 3). Dodatkowo, aktywność białek NAP podlega kontroli poprzez modyfikacje potranslacyjne takie jak acetylacja, fosforylacja czy sukcylnylacja, które powodują zmianę powinowactwa badanych białek do DNA, wpływają na zdolności oligomeryzacyjne oraz interakcje z innymi białkami w komórce (Tab. 2) [92–101]. Przypuszcza się, że taka forma modyfikacji stanowi kolejny poziom regulacji procesów fizjologicznych komórki oraz może stanowić system kontrolny, odpowiedzialny za reakcje komórki na zmieniające się warunki środowiska.

Jak wynika z zebranych powyżej doniesień, białka NAP pełnią krytyczną rolę w utrzymaniu homeostazy procesów komórkowych. Pomimo pełnienia wielu istotnych funkcji w komórce, usunięcie genu kodującego określone białko NAP w większości przypadków nie skutkuje silnymi defektami fenotypowymi oraz nie wpływa znacząco na cykl komórkowy. Przyczyną może być częściowe nakładanie się funkcji poszczególnych białek NAP i prawdopodobnie

dlatego brak jednego z nich nie powoduje istotnych zmian fenotypowych. Możliwe jest również, że na chromosomie bakterii są zakodowane inne, niezidentyfikowane dotąd paralogi białek NAP.

PODSUMOWANIE

Poglądy dotyczące organizacji chromosomu bakteryjnego uległy zmianie na przestrzeni ostatnich lat. Obecnie wiadomo, że nukleoid stopniem zorganizowania dorównuje niemalże eukariotycznej chromatynie. Utrzymanie swoistej homeostazy w organizacji chromosomu bakteryjnego, który jest poddawany ciągłym zamianom i rearanżacjom topologicznym związanym z zachodzącymi w komórce bakteryjnej procesami, jest wypadkową funkcjonowania wielu systemów białkowych (topoizomerazy, kondensyny SMC/MukB, białka NAP), a także wynikiem działania czynników fizycznych (kształt komórki, *molecular crowding*). Pomimo wielu danych na temat organizacji chromosomu uzyskanych przy wykorzystaniu wysokorozdzielczych badań mikroskopowych oraz wysokoprzepustowych analiz DNA, badaczom nie udało się do tej pory zaproponować jednolitego modelu chromosomu bakteryjnego. Powodem może być unikatowość niektórych czynników i systemów odpowiedzialnych za organizację chromosomu. Przykładowo, niektóre białka NAP są swoiste dla danego rzędu mikroorganizmów (np. HupB [49,90] i HupS [102] występujące wyłącznie u promieniowców) lub ich występowanie jest związane ze środowiskiem życia danego gatunku (np. w genomie *Deinococcus radiodurans*, narażonego na nadmierne promieniowanie UV, kodowane są trzy kopie homologa białka HU [103]). Ponadto mechanizm kondensacji chromosomu poprzez działanie kondensyn

które pełnią one w komórce (np. udział w inicjacji replikacji, kontrola transkrypcji) (Ryc. 3). Dodatkowo, aktywność białek NAP podlega kontroli poprzez modyfikacje potranslacyjne takie jak acetylacja, fosforylacja czy sukcylnylacja, które powodują zmianę powinowactwa badanych białek do DNA, wpływają na zdolności oligomeryzacyjne oraz interakcje z innymi białkami w komórce (Tab. 2) [92–101]. Przypuszcza się, że taka forma modyfikacji stanowi kolejny poziom regulacji procesów fizjologicznych komórki oraz może stanowić system kontrolny, odpowiedzialny za reakcje komórki na zmieniające się warunki środowiska.

Tabela 2. Modyfikacje potranslacyjne głównych białek NAP u *E. coli*

Białko	Acetylacja	Sukcylnylacja	Fosforylacja	Inne modyfikacje	Źródło
HU α / HU β	HU α _Lys3 HU α _Lys18 HU α _Lys22 HU α _Lys37 HU α _Lys83	HU α _Lys86 HU β _Lys3 HU β _Lys83 HU β _Lys86	HU α _Lys3 HU β _Lys3 HU β _Lys83 HU β _Lys86	brak danych	Metylacja HU α _Lys37 HU α _Lys83 HU β _Lys83 [94-98]
IHF α / IHF β	IHF α _Lys66 IHF β _Lys65 IHF β _Lys75	IHF β _Lys75	IHF β _Ser4 IHF α _Lys24 IHF α _Lys45	IHF α _Ser47 IHF α _Lys86 IHF β _Lys75	brak danych [94,97-101]
H-NS	Lys6, Lys57, Lys83,	Lys87, Lys96, Lys121	Lys6, Lys96, Lys121	Ser45, Tyr61, Tyr98, Tyr99	Deaminacja Asn103 [94-100, 102,103]
Fis	Lys25			brak danych	[95,98]

różni się znacznie u dotychczas opisanych gatunków bakterii (tj. *E. coli* [104] i *B. subtilis* [105]).

Zaproponowanie jednolitego modelu bakteryjnej chromatyny wymaga dalszych badań, które pozwolą wyznaczyć i zrozumieć sieć zależności pomiędzy różnymi białkami oddziałującymi z DNA pośrednio lub bezpośrednio w celu jego odpowiedniego upakowania w komórce. Unikatowość tych czynników oraz ich często kluczowa rola w warunkach stresu (np. podczas infekcji) stwarza dodatkowo możliwości poszukiwania wśród tych białek nowych celów dla antybiotykoterapii.

PIŚMIENNICTWO

1. Delius H, Worcel A (1974) Electron Microscopic Studies on the Folded Chromosome of *Escherichia coli*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 38: 53–58
2. Macvanin M, Adhya S (2012) Architectural organization in *E. coli* nucleoid. Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech 1819: 830–835
3. Trucksis M, Michalski J, Deng YK, Kaper JB (1998) The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 14464–14469
4. Kieser HM, Kieser T, Hopwood DA (1992) A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. J Bacteriol 174: 5496–5507
5. Ferdows MS, Barbour AG (1989) Megabase-sized linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. Proc Natl Acad Sci U S A 86: 5969–5973
6. Bennett GM, Moran NA (2013) Small, smaller, smallest: the origins and evolution of ancient dual symbioses in a Phloem-feeding insect. Genome Biol Evol 5: 1675–1688
7. Schneiker S, Perlova O, Kaiser O, Gerth K, Alici A, Altmeyer MO, Bartels D, Bekel T, Beyer S, Bode E, i in. (2007) Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. Nat Biotechnol 25: 1281–1289
8. Murphy LD, Zimmerman SB (1995) Condensation and cohesion of lambda DNA in cell extracts and other media: implications for the structure and function of DNA in prokaryotes. Biophys Chem 57: 71–92
9. Jeon C, Jung Y, Ha B-Y (2017) A ring-polymer model shows how macromolecular crowding controls chromosome-arm organization in *Escherichia coli*. Sci Rep 7: 11896.
10. Zimmerman SB, Trach SO (1991) Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. J Mol Biol 222: 599–620
11. de Vries R (2010) DNA condensation in bacteria: Interplay between macromolecular crowding and nucleoid proteins. Biochimie 92: 1715–1721
12. Wang JC (1991) DNA topoisomerases: why so many? J Biol Chem 266: 6659–6662
13. Tolstorukov MY, Virnik K, Zhurkin VB, Adhya S (2016) Organization of DNA in a bacterial nucleoid. BMC Microbiol 16: 22
14. Dennis P (1996) Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell by Growth Rate Molecular evolution of superoxide dismutase genes in halobacteria. View project Ha Bremer Reinier de Graaf Groep
15. Fisher JK, Bourmiquel A, Witz G, Weiner B, Prentiss M, Kleckner N (2013) Four-Dimensional Imaging of *E. coli* Nucleoid Organization and Dynamics in Living Cells. Cell 153: 882–895
16. Le TBK, Imakaev M V., Mirny LA, Laub MT (2013) High-Resolution Mapping of the Spatial Organization of a Bacterial Chromosome. Science (80-) 342: 731–734
17. Nolivos S, Upton AL, Badrinarayanan A, Müller J, Zawadzka K, Wiktor J, Gill A, Arciszewska L, Nicolas E, Sherratt D (2016) MatP regulates the coordinated action of topoisomerase IV and MukBEF in chromosome segregation. Nat Commun 7: 10466
18. Prieto AI, Kahramanoglou C, Ali RM, Fraser GM, Seshasayee ASN, Luscombe NM (2012) Genomic analysis of DNA binding and gene regulation by homologous nucleoid-associated proteins IHF and HU in *Escherichia coli* K12. Nucleic Acids Res 40: 3524–3537
19. Wang X (2006) The two *Escherichia coli* chromosome arms locate to separate cell halves. Genes Dev 20: 1727–1731
20. Lioy VS, Cournac A, Marbouty M, Duigou S, Mozziconacci J, Espéli O, Boccard F, Koszul R (2018) Multiscale structuring of the *E. coli* chromosome by nucleoid-associated and condensin proteins. Cell 172: 771–783.e18
21. Butan C, Hartnell LM, Fenton AK, Bliss D, Sockett RE, Subramaniam S, Milne JLS (2011) Spiral architecture of the nucleoid in *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol 193: 1341–1350
22. Espeli O, Mercier R, Boccard F (2008) DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome. Mol Microbiol 68: 1418–1427
23. Valens M, Penaud S, Rossignol M, Cornet F, Boccard F (2004) Macrodomain organization of the *Escherichia coli* chromosome. EMBO J 23: 4330–4341
24. Mercier R, Petit M-AS, Schbath S, Phane Robin S, Karoui M El, Dé Ric Boccard F, Espéli Li O (2008) The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the *E. coli* Chromosome into a Macrodomain. Cell 135: 475–485
25. Wang X, Brandão HB, Le TBK, Laub MT, Rudner DZ (2017) *Bacillus subtilis* SMC complexes juxtapose chromosome arms as they travel from origin to terminus. Science (80-) 355: 524–527
26. Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, Hu M, Liu JS, Ren B (2012) Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. Nature 485: 376–380
27. Postow L, Hardy CD, Arsuaga J, Cozzarelli NR (2004) Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. Genes Dev 18: 1766–1779
28. Hirano T (2016) Condensin-Based Chromosome Organization from Bacteria to Vertebrates. Cell 164: 847–857
29. Bürmann F, Shin HC, Basquin J, Soh YM, Giménez-Oya V, Kim YG, Oh BH, Gruber S (2013) An asymmetric SMC-kleisin bridge in prokaryotic condensin. Nat Struct Mol Biol 20: 371–379
30. Wang X, Le TBK, Lajoie BR, Dekker J, Laub MT, Rudner DZ (2015) Condensin promotes the juxtaposition of dna flanking its loading site in *Bacillus subtilis*. Genes Dev 29: 1661–1675
31. Goloborodko A, Marko JF, Mirny LA (2016) Chromosome Compaction by Active Loop Extrusion. Biophys J 110: 2162–2168
32. Fudenberg G, Imakaev M, Lu C, Goloborodko A, Abdennur N, Mirny LA (2016) Formation of chromosomal domains by loop extrusion. Cell Rep 15: 2038–2049
33. Terakawa T, Bisht S, Eeftens JM, Dekker C, Haering CH, Greene EC (2017) The condensin complex is a mechanochemical motor that translocates along DNA. Science 358: 672–676
34. Tran NT, Laub MT, Le TBK (2017) SMC Progressively aligns chromosomal arms in *Caulobacter crescentus* but is antagonized by convergent transcription. Cell Rep 20: 2057–2071
35. Bürmann F, Basfeld A, Vazquez Nunez R, Diebold-Durand ML, Wilhelm L, Gruber S (2017) Tuned SMC arms drive chromosomal loading of prokaryotic condensin. Mol Cell 65: 861–872.e9
36. Niki H, Jaffe A, Imamura R, Ogura T, Hiraga S (1991) The new gene *mukB* codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. EMBO J 10: 183–193
37. Britton RA, Lin DC, Grossman AD (1998) Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. Genes Dev 12: 1254–1259
38. Sawitzke JA, Austin S (2000) Suppression of chromosome segregation defects of *Escherichia coli* *muk* mutants by mutations in topoisomerase I. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 1671–1676
39. Wang X, Tang OW, Riley EP, Rudner DZ (2014) The SMC condensin complex is required for origin segregation in *Bacillus subtilis*. Curr Biol 24: 287–292


40. Kois A, Świątek M, Jakimowicz D, Zakrzewska-Czerwińska J (2009) SMC protein-dependent chromosome condensation during aerial hyphal development in *Streptomyces*. *J Bacteriol* 91: 310–319
41. Santi I, McKinney JD (2015) Chromosome Organization and Replication Dynamics in *Mycobacterium smegmatis*. *MBio* 6: e01999-14
42. Nitharwal RG, Verma V, Dasgupta S, Dhar SK (2011) *Helicobacter pylori* chromosomal DNA replication: Current status and future perspectives. *FEBS Lett* 585: 7–17
43. Petrusenko ZM, She W, Rybenkov V V. (2011) A new family of bacterial condensins. *Mol Microbiol* 81: 881–896
44. Zhao H, Clevenger AL, Ritchey JW, Zgurskaya HI, Rybenkov V V. (2016) *Pseudomonas aeruginosa* condensins support opposite differentiation states. *J Bacteriol* 198: 2936–2944
45. Berger M, Farcas A, Geertz M, Zhelyazkova P, Brix K, Travers A, Muskhelishvili G (2010) Coordination of genomic structure and transcription by the main bacterial nucleoid-associated protein HU. *EMBO Rep* 11: 59–64
46. Singh K, Milstein JN, Navarre WW (2016) Xenogeneic silencing and its impact on bacterial genomes. *Annu Rev Microbiol* 70: 199–213
47. Ali Azam T, Iwata A, Nishimura A, Ueda S, Ishihama A (1999) Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J Bacteriol* 181: 6361–6370
48. Sharadamma N, Khan K, Kumar S, Neelakanteshwar Patil K, Hasnain SE, Muniyappa K (2011) Synergy between the N-terminal and C-terminal domains of *Mycobacterium tuberculosis* HupB is essential for high-affinity binding, DNA supercoiling and inhibition of RecA-promoted strand exchange. *FEBS J* 278: 3447–3462
49. Hołowka J, Trojanowski D, Ginda K, Wojtaś B, Gielniewski B, Jakimowicz D, Zakrzewska-Czerwińska J (2017) HupB is a bacterial nucleoid-associated protein with an indispensable eukaryotic-like tail. *MBio* 8: 8 pii: e01272-17
50. Lee SF, Thompson MA, Schwartz MA, Shapiro L, Moerner WE (2011) Super-resolution imaging of the nucleoid-associated protein HU in *Caulobacter crescentus*. *Biophys J* 100: L31–L33
51. Swinger KK, Rice PA (2004) IHF and HU: flexible architects of bent DNA. *Curr Opin Struct Biol* 14: 28–35
52. Mangan MW, Lucchini S, Danino V, Croinin TO, Hinton JCD, Dorman CJ (2006) The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 59: 1831–1847
53. Kahramanoglou C, Seshasayee ASN, Prieto AI, Ibberson D, Schmidt S, Zimmermann J, Benes V, Fraser GM, Luscombe NM (2011) Direct and indirect effects of H-NS and Fis on global gene expression control in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 39: 2073–2091
54. Stella S, Cascio D, Johnson RC (2010) The shape of the DNA minor groove directs binding by the DNA-bending protein Fis. *Genes Dev* 24: 814–826
55. Auner H, Buckle M, Deufel A, Kutateladze T, Lazarus L, Mavathur R, Muskhelishvili G, Pemberton I, Schneider R, Travers A (2003) Mechanism of transcriptional activation by FIS: role of core promoter structure and DNA topology. *J Mol Biol* 331: 331–344
56. Schneider R, Travers A, Kutateladze T, Muskhelishvili G (1999) A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 34: 953–964
57. Gordon BRG, Li Y, Cote A, Weirauch MT, Ding P, Hughes TR, Navarre WW, Xia B, Liu J (2011) Structural basis for recognition of AT-rich DNA by unrelated xenogeneic silencing proteins. *Proc Natl Acad Sci* 108: 10690–10695
58. Dame RT, Wyman C, Goosen N (2000) H-NS mediated compaction of DNA visualised by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res* 28: 3504–3510
59. Dame RT, Noom MC, Wuite GJL (2006) Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation. *Nature* 444: 387–390
60. Chen JM, Ren H, Shaw JE, Wang YJ, Li M, Leung AS, Tran V, Berbenetz NM, Kocincová D, Yip CM, et al. (2008) Lsr2 of *Mycobacterium tuberculosis* is a DNA-bridging protein. *Nucleic Acids Res* 36: 2123–2135
61. Hardy CD, Cozzarelli NR (2005) A genetic selection for supercoiling mutants of *Escherichia coli* reveals proteins implicated in chromosome structure. *Mol Microbiol* 57: 1636–1652
62. Maurer S, Fritz J, Muskhelishvili G (2009) A Systematic *in vitro* study of nucleoprotein complexes formed by bacterial nucleoid-associated proteins revealing novel types of DNA organization. *J Mol Biol* 387: 1261–1276
63. Higgins CF, Dorman CJ, Stirling DA, Waddell L, Booth IR, May G, Bremer E (1988) A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* 52: 569–584
64. Cui Y, Wang Q, Stormo GD, Calvo JM (1995) A consensus sequence for binding of Lrp to DNA. *J Bacteriol* 177: 4872
65. Luijsterburg MS, White MF, Van Driel R, Th. Dame R (2008) The major architects of chromatin: Architectural proteins in bacteria, archaea and eukaryotes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43: 393–418
66. Wang Q, Calvo JM (1993) Lrp, a major regulatory protein in *Escherichia coli*, bends DNA and can organize the assembly of a higher-order nucleoprotein structure. *EMBO J* 12: 2495–2501
67. Beloin C, Jeusset J, Revet B, Mirambeau G, Le Hégarat F, Le Cam E (2003) Contribution of DNA conformation and topology in right-handed DNA wrapping by the *Bacillus subtilis* LrpC protein. *J Biol Chem* 278: 5333–5342
68. Chen S, Calvo JM (2002) Leucine-induced dissociation of *Escherichia coli* Lrp hexadecamers to octamers. *J Mol Biol* 318: 1031–1042
69. de los Rios S, Perona JJ (2007) Structure of the *Escherichia coli* leucine-responsive regulatory protein Lrp reveals a novel octameric assembly. *J Mol Biol* 366: 1589–1602
70. Karas VO, Westerlaken I, Meyer AS (2015) The DNA-binding protein from starved cells (Dps) utilizes dual functions to defend cells against multiple stresses. *J Bacteriol* 197: 3206–3215
71. Calhoun LN, Kwon YM (2011) Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: A review. *J Appl Microbiol* 110: 375–386
72. Zhao G, Ceci P, Ilari A, Giangiacomo L, Laue TM, Chiancone E, Chasteen ND (2002) Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 277: 27689–27696
73. Hantke K (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4: 172–177
74. Janissen R, Arens MMA, Vtyurina NN, Rivai Z, Sunday ND, Eslami-Mossallam B, Gritsenko AA, Laan L, de Ridder D, Artsimovitch I, et al. (2018) Global DNA compaction in stationary-phase bacteria does not affect transcription. *Cell* 174: 1188–1199.e14
75. Will WR, Navarre WW, Fang FC (2015) Integrated circuits: how transcriptional silencing and counter-silencing facilitate bacterial evolution. *Curr Opin Microbiol* 23: 8–13
76. McLeod SM, Aiyar SE, Gourse RL, Johnson RC (2002) The C-terminal domains of the RNA polymerase α subunits: contact site with *fis* and localization during co-activation with CRP at the *Escherichia coli* proP P2 promoter. *J Mol Biol* 316: 517–529
77. Macchi R, Montesissa L, Murakami K, Ishihama A, De Lorenzo V, Berton G (2003) Recruitment of sigma54-RNA polymerase to the Pu promoter of *Pseudomonas putida* through integration host factor-mediated positioning switch of alpha subunit carboxyl-terminal domain on an UP-like element. *J Biol Chem* 278: 27695–27702
78. Grainger DC, Hurd D, Goldberg MD, Busby SJW (2006) Association of nucleoid proteins with coding and non-coding segments of the *Escherichia coli* genome. *Nucleic Acids Res* 34: 4642–4652
79. Kelly A, Goldberg MD, Carroll RK, Danino V, Hinton JCD, Dorman CJ (2004) A global role for Fis in the transcriptional control of metabolism and type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* 150: 2037–2053
80. Keane OM, Dorman CJ (2003) The *gyr* genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are repressed by the factor for inversion stimulation, Fis. *Mol Genet Genomics* 270: 56–65

81. Hirsch M, Elliott T (2005) Fis Regulates Transcriptional Induction of RpoS in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 187: 1568–1580
82. Weinstein-Fischer D, Altuvia S (2007) Differential regulation of *Escherichia coli* topoisomerase I by Fis. *Mol Microbiol* 63:1131–1144
83. Lenz DH, Bassler BL (2007) The small nucleoid protein Fis is involved in *Vibrio cholerae* quorum sensing. *Mol Microbiol* 63: 859–871
84. Lautier T, Nasser W (2007) The DNA nucleoid-associated protein Fis co-ordinates the expression of the main virulence genes in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol* 66: 1474–1490
85. Cho B-K, Barrett CL, Knight EM, Park YS, Palsson BØ (2008) Genome-scale reconstruction of the Lrp regulatory network in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19462–19467
86. Kroner GM, Wolfe MB, Freddolino PL (2019) *Escherichia coli* Lrp regulates one-third of the genome *via* direct, cooperative, and indirect routes. *J Bacteriol* 201: pii: e00411-18
87. Shimada T, Saito N, Maeda M, Tanaka K, Ishihama A (2015) Expanded roles of leucine-responsive regulatory protein in transcription regulation of the *Escherichia coli* genome: Genomic SELEX screening of the regulation targets. *Microb Genomics* 1: e000001
88. Ghosh S, Mallick B, Nagaraja V (2014) Direct regulation of topoisomerase activity by a nucleoid-associated protein. *Nucleic Acids Res* 42: 11156–11165
89. Chodavarapu S, Felczak MM, Yaniv JR, Kaguni JM (2007) *Escherichia coli* DnaA interacts with HU in initiation at the *E. coli* replication origin. *Mol Microbiol* 67: 781–792
90. Holówka J, Trojanowski D, Janczak M, Jakimowicz D, Zakrzewska-Czerwińska J (2018) The origin of chromosomal replication is asymmetrically positioned on the mycobacterial nucleoid, and the timing of its firing depends on HupB. *J Bacteriol* 200: 1–12
91. Huisman O, Faelen M, Girard D, Jaffé A, Toussaint A, Rouvière-Yaniv J (1989) Multiple defects in *Escherichia coli* mutants lacking HU protein. *J Bacteriol* 171: 3704–3712
92. Weinert BT, Schölz C, Wagner SA, Iesmantavicius V, Su D, Daniel JA, Choudhary C (2013) Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation. *Cell Rep* 4: 842–851
93. Kuhn ML, Zemaitaitis B, Hu LI, Sahu A, Sorensen D, Minasov G, Lima BP, Scholle M, Mrksich M, Anderson WF, i in. (2014) Structural, kinetic and proteomic characterization of acetyl phosphate-dependent bacterial protein acetylation. *PLoS One* 9: e94816
94. Okanishi H, Kim K, Fukui K, Yano T, Kuramitsu S, Masui R (2017) Proteome-wide identification of lysine succinylation in thermophilic and mesophilic bacteria. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1865: 232–242
95. Soares NC, Spät P, Krug K, Macek B (2013) Global dynamics of the *Escherichia coli* proteome and phosphoproteome during growth in minimal medium. *J Proteome Res* 12: 2611–2621
96. Weinert BT, Iesmantavicius V, Wagner SA, Schölz C, Gummeson B, Beli P, Nyström T, Choudhary C (2013) Acetyl-phosphate is a critical determinant of lysine acetylation in *E. coli*. *Mol Cell* 51: 265–272
97. Brown CW, Sridhara V, Boutz DR, Person MD, Marcotte EM, Barrick JE, Wilke CO (2017) Large-scale analysis of post-translational modifications in *E. coli* under glucose-limiting conditions. *BMC Genomics* 18: 301
98. Lin M-H, Sugiyama N, Ishihama Y (2015) Systematic profiling of the bacterial phosphoproteome reveals bacterium-specific features of phosphorylation. *Sci Signal* 8: rs10
99. Rice PA, Yang S, Mizuuchi K, Nash HA (1996) Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell* 87: 1295–1306
100. Hansen A-M, Chaerkady R, Sharma J, Díaz-Mejía JJ, Tyagi N, Renuse S, Jacob HKC, Pinto SM, Sahasrabudhe NA, Kim M-S, i in. (2013) The *Escherichia coli* phosphotyrosine proteome relates to core pathways and virulence. *PLoS Pathog* 9: e1003403
101. Gao Y, Foo YH, Winardhi RS, Tang Q, Yan J, Kenney LJ (2017) Charged residues in the H-NS linker drive DNA binding and gene silencing in single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 12560–12565
102. Salerno P, Larsson J, Bucca G, Laing E, Smith CP, Flardh K (2009) One of the two genes encoding nucleoid-associated HU proteins in *Streptomyces coelicolor* is developmentally rRegulated and specifically involved in spore maturation. *J Bacteriol* 191: 6489–6500
103. Bouthier de la Tour C, Armengaud J, Dulermo R, Blanchard L, Devigne A, de Groot A, Ludanyi M, Sommer S (2015) The abundant and essential HU proteins in *Deinococcus deserti* and *Deinococcus radiodurans* are translated from leaderless mRNA. *Microbiology* 161: 2410–2422
104. Niki H, Imamura R, Kitaoka M, Yamanaka K, Ogura T, Hiraga S (1992) *E. coli* MukB protein involved in chromosome partition forms a homodimer with a rod-and-hinge structure having DNA binding and ATP/GTP binding activities. *EMBO J* 11: 5101–5109
105. Sullivan NL, Marquis KA, Rudner DZ (2009) Recruitment of SMC by ParB-parS organizes the origin region and promotes efficient chromosome segregation. *Cell* 137: 697–707
106. Dillon SC, Dorman CJ (2010) Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol* 8: 185–195

Molecular mechanisms involved in bacterial chromatin organization

Marta Kołodziej, Jolanta Zakrzewska-Czerwińska, Joanna Hołówka 

Department of Molecular Microbiology, Faculty of Biotechnology, University of Wrocław

 corresponding author: joanna.holowka@uwr.edu.pl

Key words: bacterial chromosome, condensins SMC/MukB, NAPs

ABSTRACT

Advances in high resolution microscopy techniques and development of high throughput DNA analyses allow to reconsider the views concerning bacterial chromosome (nucleoid). Recent reports show that nucleoid exhibits a hierarchical organization, similarly to the eukaryotic chromatin. However, bacterial chromosome undergoes constant modifications and topological rearrangements due to the ongoing DNA replication, transcription and translation processes. Organization of dynamic and highly compacted nucleoid structure depends on physical factors acting on chromosome molecule inside small cell compartment, and is a consequence of action of many different DNA-binding proteins. The main goal of this review is to present the recent reports on bacterial chromatin structure and to elucidate the physical and molecular factors influencing its intracellular organization.