

Niezwykłe procesy życiowe promieniowców

Równi i równiejsi



Prof. dr hab. Jolanta
Zakrzewska-Czerwińska

JOLANTA ZAKRZEWSKA-CZERWIŃSKA
DAGMARA JAKIMOWICZ

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej, Wrocław
Polska Akademia Nauk
jakimow@iitd.pan.wroc.pl
zakrzew@iitd.pan.wroc.pl



Dr Dagmara Jakimowicz

Badania zespołu Zakładu
Mikrobiologii skupiają
się na molekularnych
podstawach procesów
replikacji i segregacji
chromosomów
promieniowców oraz
Helicobacter pylori

Strzępki bakterii *Streptomyces* zawierają wiele kopii genomu, które jednak, dzięki precyzyjnemu procesowi ich przemieszczania, do powstających zarodników trafiają pojedynczo

Bakterie rodzaju *Streptomyces* nadają glebie charakterystyczny zapach i odgrywają kluczową rolę w obiegu węgla w przyrodzie. Niektóre z wytwarzanych przez nie związków są barwnikami nadającymi koloniom *Streptomyces* osobliwy wygląd, a inne służą do zdobycia przewagi nad innymi organizmami: chitynazy stanowią broń przeciwko głównym konkurentom w glebie – grzybom, a zewnątrzkomórkowe enzymy hydrolityczne pozwalają *Streptomyces* „żywić się” niemal wszystkim. Dla człowieka bakterie te dlate-

go są cenne, że produkują wiele antybiotyków (m.in. streptomycynę, neomycynę, chloramfenikol i tetracykliny), a także substancje o aktywności przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej, immunomodulatory, herbicydy, inhibitory enzymów oraz enzymy wykorzystywane w przemyśle.

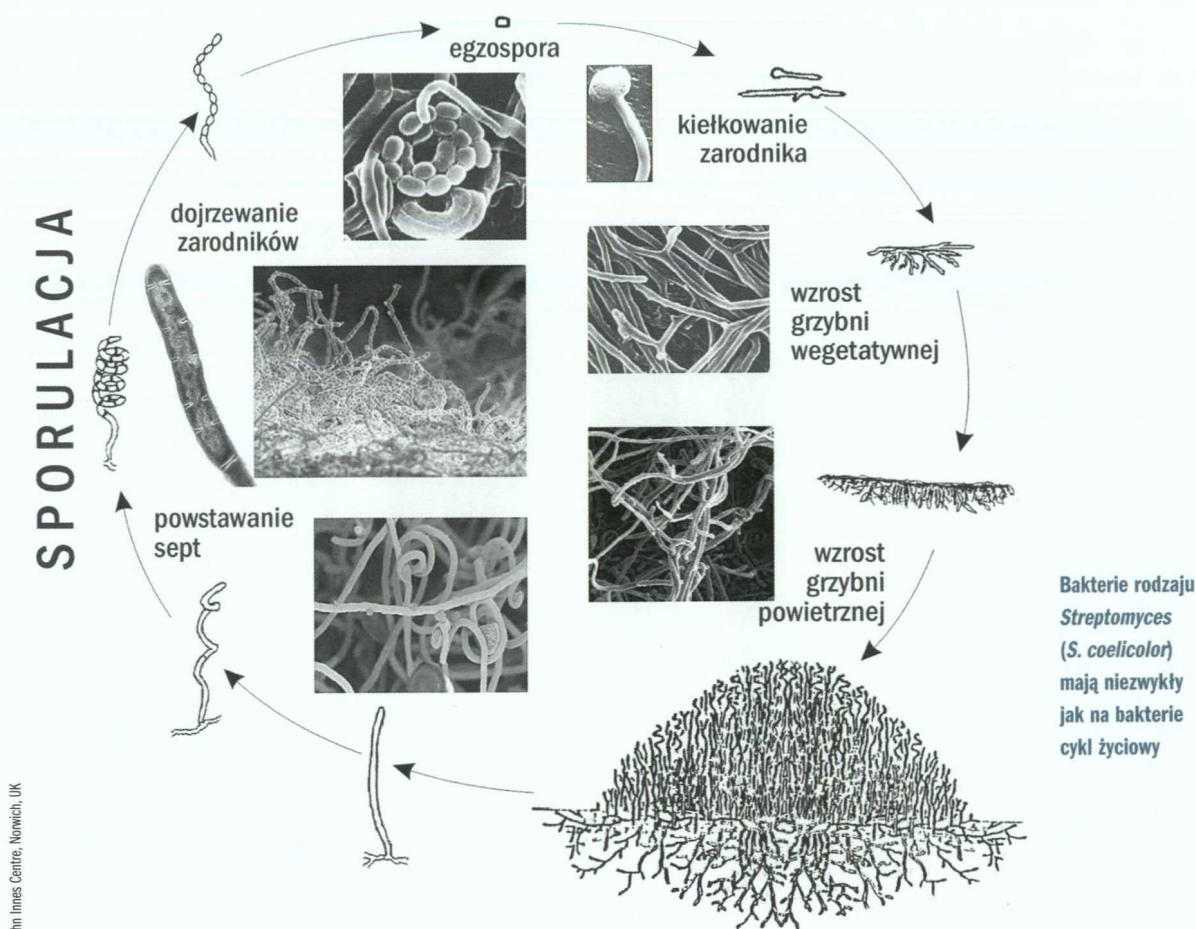
Bakteria jak grzyb

Streptomyces różnią się od bakterii złożonym cyklem życiowym, który przypomina cykl życiowy niedoskonałych grzybów strzępkowych. Dlatego też nazewnictwo dotyczące *Streptomyces* bywa niekiedy mylące – używane są tu terminy stosowane dla grzybów. Zatem bakterie te rosną w postaci wielokomórkowej grzybni wegetatywnej, której strzępki utworzone są przez przylegające do siebie wydłużone komórki zwane kompartmentami. Po wyczerpaniu składników odżywczych w podłożu na powierzchni kolonii tworzy się warstwa grzybni powietrznej, która następnie różnicuje się w łańcuchy zarodników. Wzrost w postaci grzybni ułatwia *Streptomyces* kolonizowanie gleby, a produkcję zarodników opornych na czynniki



East News

Bakterie *Streptomyces* wytwarzają wiele antybiotyków, m.in. streptomycynę. Wyizolowana w 1943 r. okazała się skuteczna w walce z prątkami gruźlicy. Na zdjęciu kryształki streptomycyny w świetle spolaryzowanym



zewnątrznie umożliwia przetrwanie w niekorzystnych warunkach środowiska. Dla przemysłu farmaceutycznego istotny jest fakt, że zmianom form *Streptomyces* towarzyszy produkcja metabolitów wtórnych. Te cechy sprawiają, że *Streptomyces* stanowią obiekt wielu badań dotyczących morfologicznego różnicowania, a szczególnie ciekawa wydaje się czasowo-przestrzenna, wręcz „tkankowo” swoista, regulacja procesów zachodzących w obrębie kolonii tych bakterii.

Mnogość genomów

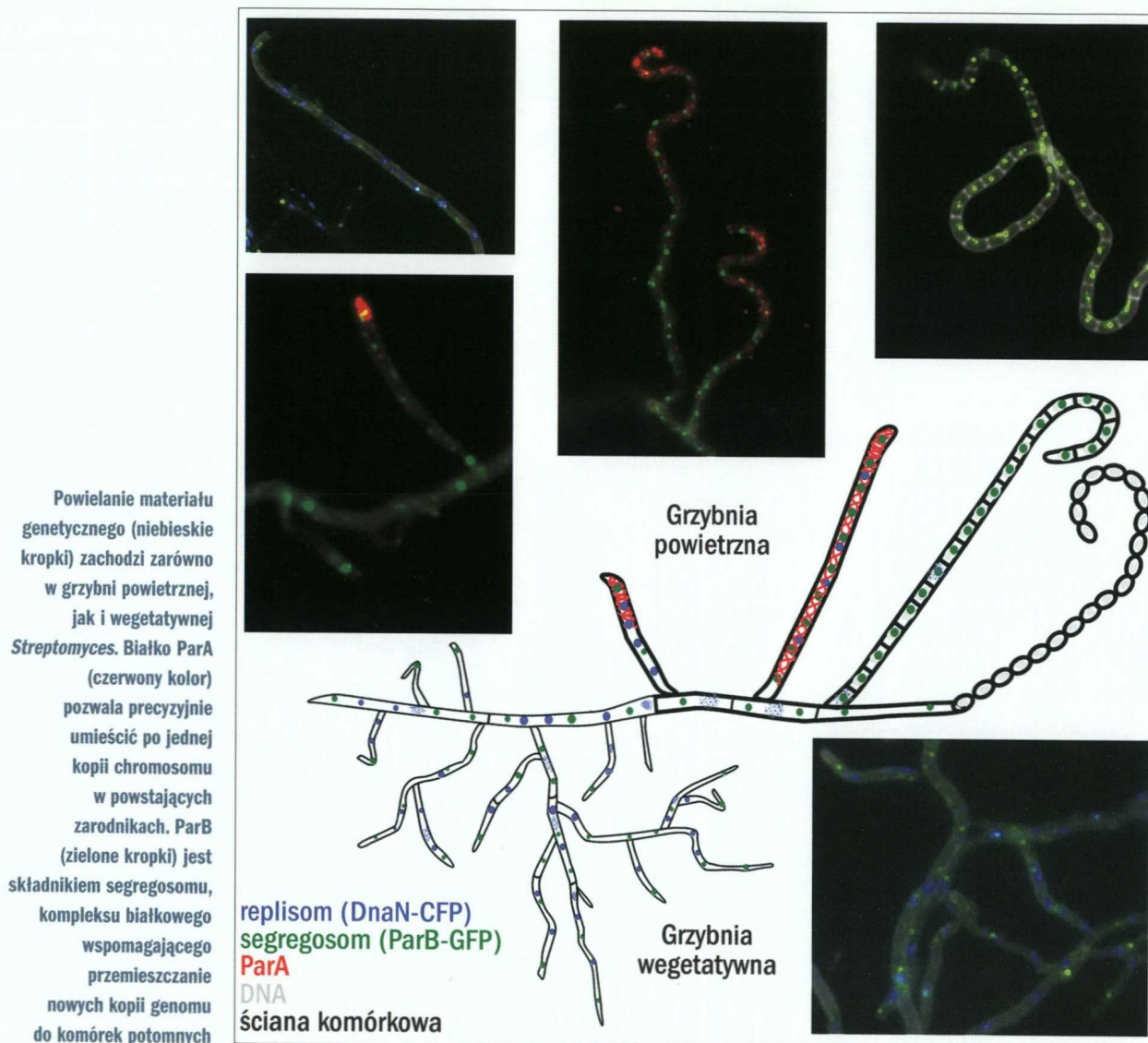
Mówiąc o bakterii, zwykle wyobrażamy sobie pojedyncze komórki zawierające pojedynczy genom – tzw. chromosom bakteryjny. Jednak w przypadku *Streptomyces* w pojedynczym kompartmentie grzybni znajduje się od kilku do kilkunastu chromosomów. Bardzo długie strzępki grzybni powietrznej – sięgające do kilkudziesięciu μm długości (tymczasem typowa komórka bakteryjna to zaledwie kilka μm) – zawierają nawet ponad 50 kopii genomu. Co więcej, chromosomy w grzybni są nieskondensowane, a ich położenie wydaje się nieuporządkowane.

Wobec tej nietypowej cechy bakterii zadaliśmy sobie pytanie, czy wszystkie chromosomy *Streptomyces* są powielane w tym samym czasie, czyli inaczej mówiąc, czy replikacja

chromosomów jest procesem synchronicznym? Aby się o tym przekonać, wykorzystaliśmy znacznik fluorescencyjny. Było to białko niebieskiej fluorescencji, CFP (od ang. *cyan fluorescent protein*), połączone z białkiem DnaN, podjednostką β polimerazy III DNA, która służy do powielania materiału genetycznego w komórkach. Wciąż funkcjonalna polimeraza z dołączonym znacznikiem fluorescencyjnym była dla nas widoczna pod mikroskopem – świeciła w komórkach bakterii na niebiesko. Umożliwiło to nam śledzenie procesu replikacji w obu rodzajach grzybni.

Okazało się, że w obrębie kolonii powielanie DNA (replikacja) nie jest procesem losowym i nie wszędzie zachodzi z tą samą intensywnością. W szybko rosnącej grzybni powietrznej, tam, gdzie powstają zarodniki, istnieje duże „zapotrzebowanie” na chromosomy (każdy z kilkudziesięciu zarodników otrzymuje po jednej kopii). Tam też zaobserwowaliśmy najwyższą aktywność replikacyjną. Natomiast w grzybni wegetatywnej intensywność procesu replikacji była bardzo zróżnicowana: obserwowano zarówno aktywne centra, tzw. replisomy (wszystkie białka uczestniczące w replikacji zgromadzone w jednym miejscu i tworzące „centrum powielania DNA”) widoczne jako wyraźne skupiska fluorescencyjne, jak i fluorescencję rozproszoną

Niezwykłe procesy życiowe promieniowców



Zakład Mikrobiologii, IITD PAN

na (efekt rozmontowania/montowania replisomów). W większości przedziałów grzybni wegetatywnej liczba replisomów była zdecydowanie niższa od liczby obecnych chromosomów, a w części z nich replikacja w ogóle nie zachodziła.

Obserwacje nasze wskazują zatem, że replikacja chromosomów *Streptomyces* jest procesem asynchronicznym i tylko wybrane chromosomy ulegają powielaniu w jednym czasie. Można tutaj zauważyć pewną analogię do replikacji chromosomów w komórkach organizmów wyższych (eukariotycznych). Tam powielanie genomu rozpoczyna się w wielu miejscach na chromosomie, jednak nie we wszystkich jednocześnie, zatem istnieje mechanizm decydujący o tym, które centra replikacji zostają w danym czasie „odpa-

lone”. Podobnie u *Streptomyces* – tylko niektóre chromosomy zostają wybrane do replikacji, nie wiadomo jednak, co o tym decyduje.

Komórki do wynajęcia

Następstwem powielania materiału genetycznego jest jego kondensacja, czyli ściśnięcie DNA (przez co jego struktura jest bardziej zwarta i upakowana), oraz segregacja, czyli przeniesienie/rozdzielenie do komórek potomnych. U bakterii pałeczkowatych, takich jak *Escherichia coli* czy *Bacillus subtilis*, procesy replikacji, kondensacji i segregacji zachodzą jednocześnie, kondensacja i segregacja następują tuż po rozpoczęciu replikacji. Siostrzane nowo zreplikowane regiony są aktywnie przemieszczane w stronę bieguna(-ów) komórki – przyszłych centrów po-

tomnych komórek. Obecnie wiadomo, że segregacja bakteryjnych chromosomów do komórek potomnych jest procesem aktywnym i regulowanym – wymagającym zestawu odpowiednich białek i nakładu energii. U *Streptomyces* procesy kondensacji i segregacji chromosomów poprzedzają tzw. sporulację, czyli proces tworzenia zarodników. Można nawet powiedzieć, że u *Streptomyces* kondensacja i segregacja są „tkankowo” swoiste, bo zachodzą tylko w grzybni powietrznej, tuż po zatrzymaniu intensywnej replikacji, w trakcie tworzenia charakterystycznej dla sporulacji drabinki przegród poprzecznych. Musi to być proces regulowany niezwykle precyzyjnie: segregacji i kondensacji ulega wtedy jednocześnie kilkadziesiąt chromosomów i muszą one zostać tak upakowane, by każdy z nich zmieścił się w niewielkiej przestrzeni pojedynczego zarodnika.

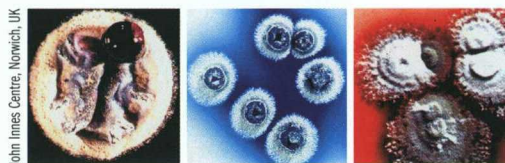
ParA białek

Do kluczowych białek uczestniczących w segregacji chromosomów bakteryjnych należą ParA (enzym o aktywności ATPazy) i ParB (białko wiążące DNA). U *Streptomyces* odpowiadają one za równomierne rozmieszczenie chromosomów wzdłuż grzybni powietrznej. Brak tych białek powoduje zaburzenia segregacji materiału genetycznego: powstanie „pustych” zarodników (bez chromosomów). W trakcie rozwoju grzybni powietrznej białko ParA tworzy charakterystyczne struktury, które zmieniają się wraz ze wzrostem grzybni. W bardzo młodych i krótkich strzępkach grzybni ParA umiejscawia się w samym wierzchołku szczytowego kompartmentu. Wraz z jego wzrostem cząsteczki ParA tworzą długie włókienka (filamenty) o kształcie podwójnej spirali. Funkcją białka ParB jest wiązanie się do specyficznego miejsca na chromosomie bakterii, tzw. sekwencji *parS*. Nasze badania wykazują, że w grzybni powietrznej białko ParB tworzy wokół sekwencji *parS* w obecności filamentu ParA duże kompleksy składające się z białek i kwasów nukleinowych. Są one widoczne w mikroskopie jako wyraźne skupiska fluorescencyjne (ParB w fuzji z białkiem zielonej fluorescencji – GFP – świeci na zielono). Wygląda na to, że filament białka ParA pomaga w równomiernym rozmieszczeniu kilkadziesiąt kompleksów ParB pomiędzy powstającymi w tym czasie przegradami. Taka

przestrzenna organizacja umożliwia precyzyjne rozmieszczenie chromosomów – dzięki temu kilkadziesiąt powstających zarodników otrzymuje po jednym z nich.

Szkielet dynamiczny

Nasze doświadczenia wykazały, że dla aktywnego i dynamicznego rozmieszczania chromosomów ma znaczenie funkcja enzymatyczna białka ParA, czyli aktywność ATPazy. Aktywność ta polega na rozkładzie (hydrolizie) cząsteczki ATP, która jest nośnikiem energii. Szczepy posiadające mutacje w regionie odpowiedzialnym za aktywność ATPazową oraz mutanty, którym usunięto gen *parA*, wykazują duże zaburzenia segregacji DNA – do 30% przedziałów zarodnikowych może być „pustych”. Okazuje się także, że odstępy między powstającymi przegradami zmutowanych komórek są różnej długości. Te obserwacje sugerują, że ParA jest nie tylko pewnego rodzaju rusztowaniem wspomagającym odpowiednie rozmieszczenie chromosomów w trakcie ich segregacji, ale również może być jednym ze składowych elementów dynamicznego szkieletu komórkowego (cytoszkieletu), do którego funkcjonowania potrzebna jest energia. Cytoszkielet ten u *Streptomyces*, podobnie jak ma to miejsce w komórkach organizmów wyższych, odgrywa zapewne istotną rolę podczas podziałów komórkowych. Przypuszcza się także, że białko ParA może odgrywać rolę punktu kontrolnego, koordynującego proces segregacji chromosomów z podziałami komórkowymi. ■



John Innes Centre, Norwich, UK

Wytwarzane przez bakterie *Streptomyces* substancje nadają ich koloniom osobliwy wygląd

Chcesz wiedzieć więcej?

- Hopwood D.A. (2007). *Streptomyces in Nature and Medicine. The Antibiotic Makers*. USA, Oxford: Oxford University Press.
- Jakimowicz D., Żydek P., Kois A., Zakrzewska-Czerwińska J., and Chater K.F. (2007). Alignment of multiple chromosomes along helical ParA scaffolding in sporulating *Streptomyces hyphae*. *Mol Microbiol*, 65, 625–41.
- Ruban-Ośmiałowska B., Jakimowicz D., Smulczyk-Krawczyńska A., Chater K.F., Zakrzewska-Czerwińska J. (2006). Replisome localization in vegetative and aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 188, 7311–7316.