

Received: 08.11.2016
Accepted: 27.07.2017
Published: 08.12.2017

Struktura chromosomu bakteryjnego – metody analizy oddziaływań białko-DNA *in vivo**

Structure of bacterial chromosome: An analysis of DNA-protein interactions *in vivo*

Joanna Hołówka^{1**}, Małgorzata Płachetka^{2**}

¹Institut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

²Uniwersytet Wrocławski, Wydział Biotechnologii

Streszczenie

Badania prowadzone w ostatnich latach ujawniły, że chromosom bakteryjny wykazuje hierarchiczną organizację. Liczne białka wiążące DNA kondensują chromosom lokalnie oraz zapewniają jego odpowiednie upakowanie w skali globalnej. Połączenie zaawansowanych technik biologii molekularnej oraz wysokoprzepustowych metod sekwencjonowania DNA pozwala na precyzyjną analizę struktury chromosomu bakteryjnego w skali lokalnej i globalnej. Przykładowo *in vivo* footprinting oraz ChIP-seq umożliwiają wyznaczenie miejsc wiązania analizowanych białek zarówno w określonym miejscu jak wzdłuż całego chromosomu. Natomiast techniki 3C pozwalają na analizę oddziaływań przestrzennych w skali globalnej. Wgląd w złożone struktury tworzone przez białka odpowiedzialne za organizację chromosomu bakteryjnego zapewniają techniki wysokorozdzielczej mikroskopii fluorescencyjnej.

Słowa kluczowe:

chromosom bakteryjny • białka NAP • *in vivo* footprinting • ChIP-seq • 3C • 4C • 5C • Hi-C • mikroskopia fluorescencyjna

Summary

According to recent reports, bacterial chromosomes exhibit a hierarchical organization. The number of proteins that bind DNA are responsible for local and global organization of the DNA ensuring proper chromosome compaction. Advanced molecular biology techniques combined with high-throughput DNA sequencing methods allow a precise analysis of bacterial chromosome structures on a local and global scale. Methods such as *in vivo* footprinting and ChIP-seq allow to map binding sites of analyzed proteins in certain chromosomal regions or along the whole chromosome while analysis of the spatial interactions on global scale could be performed by 3C techniques. Additional insight into complex structures created by chromosome-organizing proteins is provided by high-resolution fluorescence microscopy techniques.

Keywords:

bacterial chromosome • nucleoid associated proteins (NAP) • *in vivo* footprinting • ChIP-seq • 3C • 4C • 5C • Hi-C • fluorescence microscopy

*Praca finansowana w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki (Maestro, Nr 2012/04/A/NZ1/00057)

**Autorki w równym stopniu uczestniczyły w powstawaniu pracy.

GICID:	01.3001.0010.6696
DOI:	10.5604/01.3001.0010.6696
Word count:	5074
Tables:	–
Figures:	4
References:	62

Adres autorki: mgr inż. Joanna Hołowska, IITD PAN, Zakład Mikrobiologii, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław;
e-mail: holowska.joanna@gmail.com

WSTĘP

Podstawowe procesy komórkowe u bakterii – replikacja chromosomu, segregacja nowo zreplikowanych regionów DNA, transkrypcja i translacja zachodzą jednocześnie. Poszczególne regiony chromosomu muszą być w danej chwili dostępne dla białek biorących udział w tych procesach, co indukuje dynamiczne, lokalne zmiany w organizacji chromosomu. W przeciwieństwie do komórek eukariotycznych, chromosom bakteryjny nie jest oddzielony od pozostałych składników komórki żadną fizyczną barierą i dlatego długo był uważany za amorficzny twór zawieszony w cytoplazmie. Rozwój zaawansowanych metod biologii molekularnej oraz technik mikroskopowych pozwolił na zrewidowanie tego poglądu. Pierwszy model chromosomu bakteryjnego został zaproponowany w latach 70 ub. w. przez Deliusa i Worcela [14] na podstawie analizy zdjęć z mikroskopu elektronowego, które przedstawiały chromosom *Escherichia coli* uwolniony z komórki przez delikatną lizę. Chromosom składający się z kilkuset superskręconych, topologicznie niezależnych pętli układał się w kształt rozety, której rdzeń tworzyły białka oraz RNA. Zaproponowany wówczas rozetowy model organizacji chromosomu został zrewidowany kilkadziesiąt lat później na podstawie dalszych badań i analiz (m.in. metody opisywane w artykule). Wykazano, że w wyniku lizy komórki nastąpiła asocjacja zasadowych białek kotwiczących chromosom w błonie komórkowej powodując powstanie charakterystycznego kształtu rozety [30].

Organizacja chromosomu bakteryjnego

Chromosom bakteryjny (często nazywany nukleoidem) występuje w komórce w postaci DNA związanego z białkami oraz RNA. U większości mikroorganizmów chromosom jest pojedynczą, kowalencyjnie zamkniętą cząsteczką, jednak niektóre bakterie mają więcej niż jeden chromosom (np. *Vibrio cholerae* [49]) lub chromosom liniowy (np. *Streptomyces coelicolor* [26], *Borrelia burgdorferi* [21]). Wielkość genomu bakteryjnego jest również zróżnicowana – waha się od 0,6 Mbp (*Mycoplasma genitalium* [46]) do nawet 14,0 Mbp (*Sporangium cellulosum* [41]). Chromosom bakteryjny, aby zmieścić się w niewielkiej komórce bakteryjnej, musi ulec prawie 1000-krotnemu skondensowaniu [33]. Najnowsze badania prowadzone na organizmach modelowych, takich jak *E. coli*, *Bacillus*

subtilis czy *Caulobacter crescentus*, ujawniły, że struktura chromosomu bakteryjnego jest dynamiczna, a zarazem wysoce zorganizowana [27,51,52]. W ujęciu globalnym chromosom *E. coli* składa się z dużych segmentów DNA, zwanych makrodomenami, które zajmują stałe pozycje w komórce oraz nie ulegają rekombinacji między sobą. Chromosom *E. coli* składa się z czterech takich makrodomen: Ori, lewego (L) i prawego ramienia chromosomu (R) oraz makrodomeny Ter [20,52] (ryc.1). Makrodomeny Ori i Ter obejmują odpowiednio region *oriC* – miejsce startu replikacji DNA oraz region terminacji replikacji. Rozmieszczenie makrodomen chromosomalnych różni się u poszczególnych gatunków bakterii. Chromosom przyjmuje ułożenie L-Ori-R (konfiguracja makrodomen chromosomalnych wzdłuż długiej osi komórki) m.in. w wolno rosnących komórkach *E. coli* czy w trakcie wegetatywnego wzrostu u *B. subtilis*. Konfiguracja makrodomen Ori-Ter jest charakterystyczna m.in. dla *V. cholerae* (chromosom I), szybko rosnących *E. coli* i sporulujących komórek *B. subtilis* [59,61]. Warto również zaznaczyć, że chromosom nie wszystkich bakterii składa się z czterech makrodomen. W chromosomie *C. crescentus* zidentyfikowano aż 23 domeny interakcji chromosomalnych (CID – chromosomal interaction domains), których granice zbiegają się zwykle z położeniem genów charakteryzujących się wysokim poziomem ekspresji [27]. Rekombinacja zachodzi głównie w obrębie poszczególnych domen CID *C. crescentus*, podobnie jak w przypadku makrodomen *E. coli*.

Białka odpowiedzialne za organizację chromosomu

U *E. coli*, DNA w każdej z poszczególnych makrodomen jest zorganizowane w kilkaset superzwinionych, topologicznie niezależnych pętli o wielkości około 10 kbp, zwanych mikrodomenami [38]. Za odpowiednie upakowanie i kondensację DNA na tym poziomie odpowiadają liczne, zarówno wysoko-, jak i niskocząsteczkowe białka. Najbardziej liczną grupą białek związanych z organizacją chromosomu bakteryjnego są niewielkie (ich masa cząsteczkowa nie przekracza 20 kDa), zasadowe białka zwane białkami NAP (nucleoid associated proteins) [29]. Dotychczas zidentyfikowano u *E. coli* kilkanaście głównych grup tych białek, a ich homologi występują również u innych bakterii. Do najlepiej poznanych białek NAP należą: białka HU (heat-unstable proteins), IHF (integration host factor), Fis (factor for inversion stimu-

lation), H-NS (histon-like nucleoid structuring protein), Lrp (leucine-responsive element) oraz Dps (DNA-binding proteins from starved cells) [29,45]. Białka te kondensują DNA zaginając bądź owijając jego nić wokół siebie (np. HU, IHF, Fis) lub łączą ze sobą sąsiednie nici DNA (np. H-NS) (ryc. 2). Oprócz funkcji strukturalnej, białka NAP są zaangażowane w różne inne procesy komórkowe, jak np. replikacja DNA (HU, IHF, Fis), rekombinacja i naprawa DNA (HU) oraz regulacja transkrypcji (IHF, H-NS, HU). Ze względu na różnorodne funkcje białek NAP, ich poziom w komórce zmienia się w różnych etapach wzrostu [15]. W fazie adaptacyjnej przeważają białka zaangażowane w proces inicjacji replikacji (HU, IHF), a w późniejszych etapach wzrostu (np. stacjonarnego) większą rolę odgrywają białka Dps, które w porównaniu do innych białek NAP, mają zdolność wydajnego kondensowania chromosomu [1,15].

Do wysokocząsteczkowych białek organizujących chromosom należą, występujące u wielu gatunków bakterii, białka SMC (structural maintenance of chromosomes) oraz ich funkcjonalny homolog u *E. coli* – MukB [54]. Białka SMC/MukB składają się z ramion zbudowanych z α -helis zakończonych globularnymi domenami, zwanymi głowami oraz elastycznego zawiasu łączącego obydwie ramiona. Białka te wiążą DNA nieswoiście – oddziaływanie odbywa się przez dodatnio naładowane reszty aminokwasowe znajdujące się w domenie zawiasowej [8,24,42]. Kondensacja DNA przez białka SMC jest ściśle skorelowana z procesem segregacji chromosomów potomnych. U *B. subtilis* białka SMC są rekrutowane przez nukleoproteinowy kompleks białka segregacyjnego ParB i sekwencji *parS* (zlokalizowanych w pobliżu *oriC*), zwany segrosomem, co zapewnia efektywną segregację i organizację nowo zreplikowanych regionów chromosomu [47].

Rozplatanie poszczególnych regionów DNA w czasie transkrypcji oraz replikacji chromosomu indukuje lokalne zmiany topologiczne na chromosomie. Za utrzymanie homeostazy topologicznej chromosomu odpowiadają inne wysokocząsteczkowe białka – topoizomerazy [57]. Te wyspecjalizowane w kontroli superskręcenia DNA enzymy usuwają dodatnie lub ujemne superskręty DNA nacinając i przemieszczając nić DNA, a następnie religując wiązanie fosfodiesterowe. Wyróżnia się dwa główne typy topoizomeraz o odmiennym mechanizmie działania: topoizomerazy typu I relaksują DNA nacinając jedną nić, natomiast topoizomerazy typu II nacinają obydwie nici DNA [10,50]. U większości bakterii minimalny zestaw topoizomeraz tworzą usuwająca ujemne superskręty topoizomeraza typu I oraz działająca przeciwnie gyraza, będąca topoizomerazą typu II [48].

Oprócz białek NAP, SMC i topoizomeraz w ramach poszczególnych makrodomen za organizację i upakowanie DNA mogą dodatkowo odpowiadać białka występujące tylko w obrębie określonej makrodomeny. Przykładem takiego białka u *E. coli* jest niedawno zidentyfikowane MatP, które rozpoznaje krótkie sekwencje

DNA występujące tylko w obrębie makrodomeny terminatorowej [32]. W komórkach bakteryjnych występują również białka determinujące lokalizację komórkową konkretnych makrodomen, np. białko ParB bierze udział w organizacji regionu *oriC* u *B. subtilis* i odpowiada za jego aktywną segregację w miarę postępu replikacji DNA [23]. Inne białka, jak np. PopZ z *C. crescentus* [6,18] czy białko HubP z *V. cholerae* [62], kotwiczą makrodomenę Ori na określonym biegunie komórki.

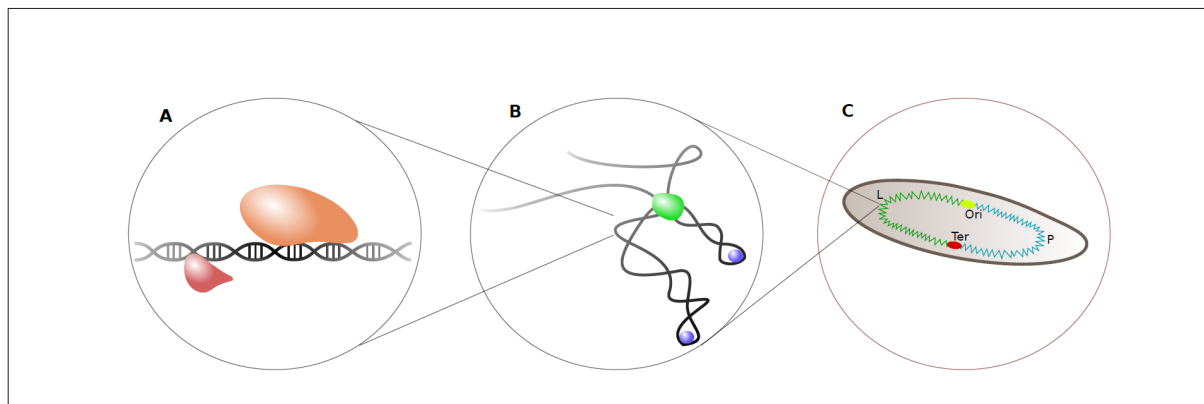
Metody analizy organizacji chromosomu bakteryjnego *in vivo* – oddziaływania DNA-białko

Postęp w biologii molekularnej oraz rozwój wysokorozdzielczych technik mikroskopowych umożliwił analizę oddziaływań białko-DNA, które są podstawą organizacji chromosomu bakteryjnego. W połączeniu z wysokoprzepustowymi metodami analizy DNA oraz bioinformatycznym opracowaniem zgromadzonych danych, metody te umożliwiają badania nad organizacją i dynamiką chromosomu bakteryjnego [13,22,27,31,36,39,58]. Przedmiotem pracy jest przedstawienie technik wykorzystywanych do „rekonstrukcji” struktury chromosomu bakteryjnego *in vivo* zarówno w ujęciu lokalnym (mikrodomeny chromosomalne), jak i w skali globalnej (makrodomeny chromosomalne) (ryc. 1). Metody umożliwiające analizę organizacji chromosomu *in vivo* na poziomie liniowym opierają się na „zamrożeniu” oddziaływań DNA-białko w żywych komórkach w celu wyznaczenia miejsc wiązania konkretnych białek wzdłuż chromosomu (m.in. footprinting *in vivo*, ChIP-seq). W ujęciu globalnym, analizę organizacji i dynamiki chromosomu umożliwiają techniki mikroskopowe (m.in. lokalizacja subkomórkowa fragmentów chromosomu lub całych makrodomen) oraz metody 3C, 4C, 5C i Hi-C (analiza interakcji – ułożenie DNA pomiędzy i wewnątrz makrodomen).

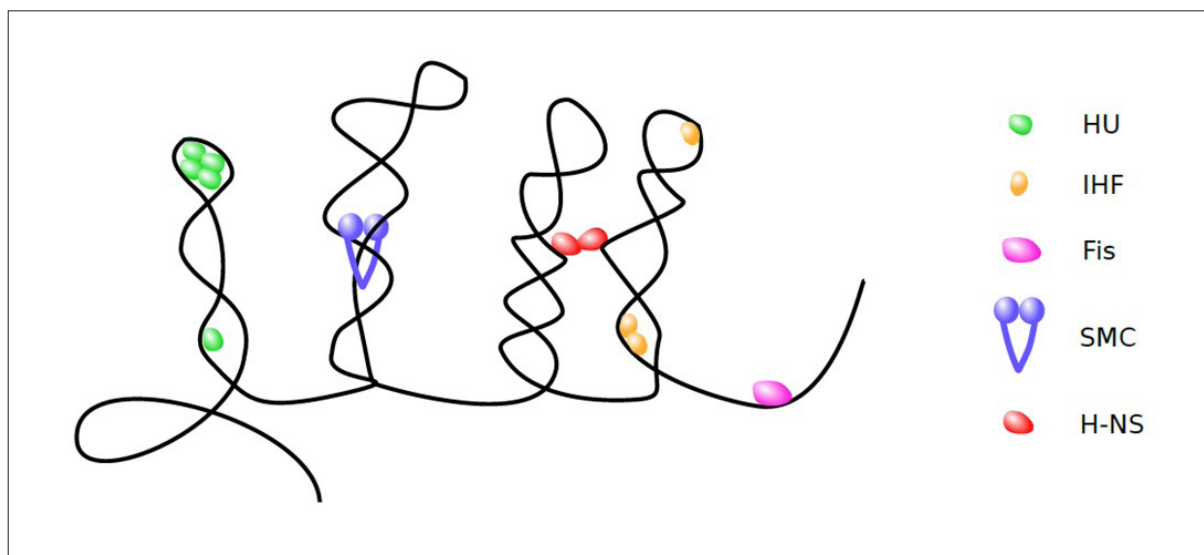
Struktura chromosomu na poziomie liniowym – wyznaczenie miejsc wiązania badanego białka

Analiza organizacji chromosomu bakteryjnego na podstawowym, liniowym poziomie zakłada wyznaczenie sekwencji DNA wiązanych przez dane białko na chromosomie lub konkretnym jego fragmencie. Metodami umożliwiającymi określenie miejsc wiązania badanego białka są m.in. footprinting *in vivo* i immunoprecypitacja chromatyny bakteryjnej *in vivo* połączona z głębokim sekwencjonowaniem (ChIP-seq) [7,25].

Metody footprintingu umożliwiają badanie oddziaływań białek z DNA na poziomie struktur pierwszorzędowych: rozpoznanie i potwierdzenie miejsc wiązania białek do DNA, a także wyznaczenie sekwencji konsensowych dla tych miejsc. Technika polega na modyfikacji DNA w czasie hodowli bakterii z zastosowaniem odpowiednio dobranych czynników, a następnie jego wyizolowaniu i analizie *in vitro*. Analiza opiera się na przeprowadzeniu na otrzymanej w powyższy sposób matrycy DNA reakcji elongacji DNA z użyciem swoistych starterów



Ryc. 1. Poziomy organizacji chromosomu bakteryjnego. A – oddziaływania białko-DNA na poziomie liniowym. B – tworzenie struktur DNA wyższego rzędu poprzez oddziaływania z białkami, które mogą spinać sąsiednie nici lub je zakrzywiać, wpływając tym samym na strukturę mikro- i makrodomen chromosomalnych. C – organizacja chromosomu bakteryjnego na poziomie pojedynczej komórki – podział chromosomu *E. coli* na 4 makrodomeny: Ori, Ter oraz lewe (L) i prawe (R) ramię chromosomu



Ryc. 2. Rodzaje białek odpowiedzialnych za organizację chromosomu bakteryjnego. HU, IHF i Fis kondensują DNA poprzez jego zaginanie lub owijanie; H-NS oraz wysokocząsteczkowe SMC łączą lub zbliżają do siebie sąsiednie nici DNA

i polimerazy DNA (reakcja PE – primer extension). Przykładem takiej metody jest DMS footprinting, w którym do pożywki podaje się niskocząsteczkowy związek siarkoorganiczny DMS (siarczek dimetylu), który wnika do komórek bakteryjnych i metyluje reszty guaniny w DNA nie zmieniając jego topologii [7]. Miejsca na DNA, które były związane przez białka, są osłonięte przed działaniem DMS, a ich wykrycie jest możliwe, ponieważ polimeraza DNA zatrzymuje proces syntezy w chwili zetknięcia się z modyfikowaną zasadą. DMS footprinting *in vivo* zastosowano m.in. w badaniu wiązania białka Lrp na chromosomie *E. coli* [31].

Inna metoda footprintingu opiera się na właściwościach światła UV i jego działaniu na DNA: intensywne światło laserowe o długości fali 266 nm z łatwością penetruje żywe komórki w hodowli i może wprowadzać modyfikacje w strukturze DNA, najczęściej tworząc dimery piry-

midynowe (głównie T^AT i T^AC), które zahamowują dalszą syntezę w reakcji PE [34]. Efektywność tworzenia dimerów wiąże się z lokalną topologią DNA – związanie białek może powodować lokalne zagięcia helisy, co utrudnia dimeryzację pirymidyn przez ich fizyczne oddalenie. Wykorzystując tę właściwość przeprowadzono wiele eksperymentów mających na celu potwierdzenie lokalizacji swoistych miejsc wiązania białka IHF na chromosomie *E. coli* [34,53]. IHF może zaginać nić DNA nawet o ponad 180°, utrudniając tworzenie dimerów pirymidynowych, tym samym umożliwiając wykrycie miejsc wiązania białka w technice UV footprintingu [40].

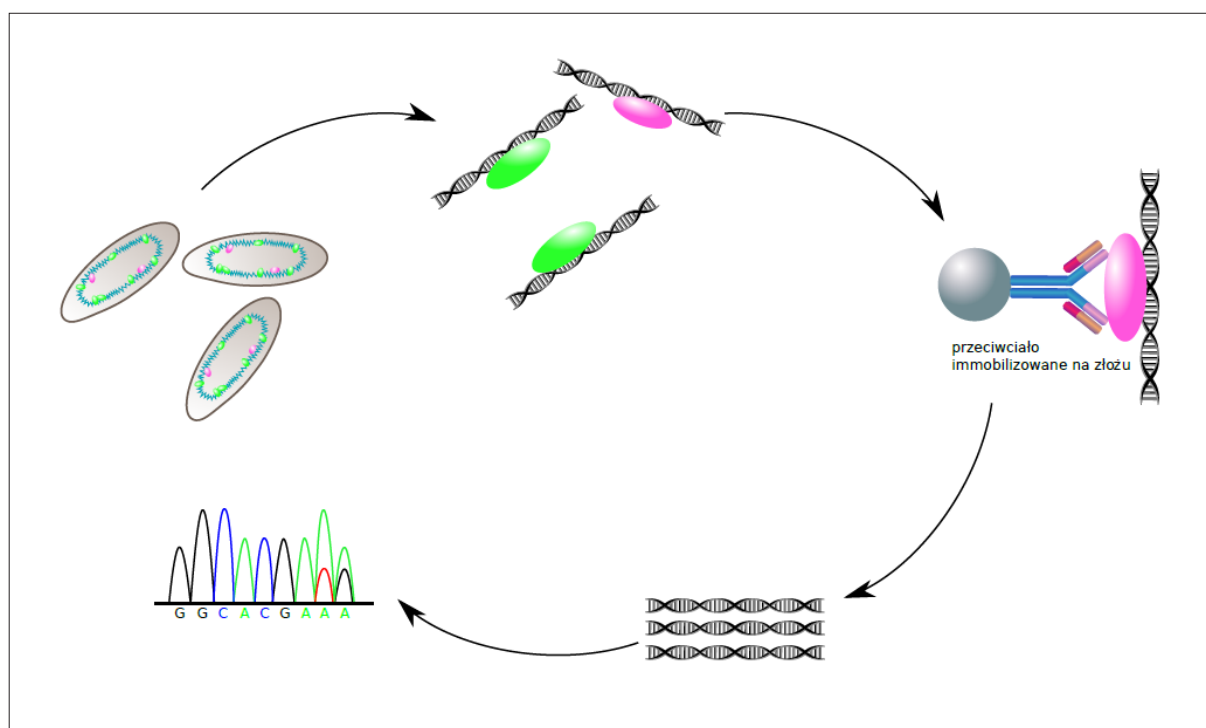
Powyższe rozwiązania służą do wykrywania oddziaływań białko-DNA na poziomie lokalnym. Technika umożliwiającą lokalizację oddziaływań globalnych jest IPOD (*in vivo* protein occupancy display) [55]. IPOD bazuje na sieciowaniu białek z DNA, po którym następuje liza komór-

rek i fragmentacja DNA (np. za pomocą ultradźwięków – sonikacja), a fragmenty DNA niezwiązane z białkami są trawione DNazą I i ekstrahowane z lizatu. Po oczyszczeniu otrzymane fragmenty DNA o długości około 50 pz są znakowane i hybrydowane z mikromacierzą DNA o dużej gęstości, zawierającą cały genom bakteryjny podzielony na krótkie fragmenty. Analiza macierzy pozwala na stworzenie wysokorozdzielczego profilu oddziaływań białko-DNA dla całego genomu. W ten sposób na chromosomie *E. coli* zidentyfikowano regiony szczególnie podatne na wiązanie się białek, zarówno w regionach niekodujących, jak i kodujących [55].

Techniką umożliwiającą globalne mapowanie miejsc wiązania poszczególnych białek na chromosomie jest ChIP-seq (ChIP-seq – chromatin immunoprecipitation with DNA sequencing) [25] (ryc. 3). Oprócz wyznaczenia sekwencji konsensowej, na podstawie analizy zidentyfikowanych miejsc wiązania w genach, obszarach międzygenowych i regionach promotorowych, możliwe jest wyznaczenie potencjalnych genów regulowanych przez badane białko. Technikę ChIP-seq wykorzystano m.in. do zidentyfikowania miejsc wiązania białek HU i IHF na chromosomie *E. coli* [39]. Podstawą metody jest precipitacja kompleksów białko-DNA z wykorzystaniem przeciwciała skierowanego przeciwko badanemu białku lub z zastosowaniem komercyjnie dostępnych przeciwciał skierowanych przeciwko krótkim metkom dołączanym do badanych białek, np. często używanemu

motywowi FLAG [19]. Zastosowanie jako epitopu oligopeptydu, który nie występuje w warunkach naturalnych w komórce zapewnia większą swoistość metody. Ważne jest również aby dodana metka nie zaburzała funkcji analizowanego białka. W takim układzie eksperymentalnym kontrolą negatywną immunoprecypitacji może być szczep typu dzikiego z niezmodyfikowanym genem badanego białka (pozbawionym metki). W przypadku wykorzystania przeciwciała skierowanego przeciwko interesującemu nas białku konieczna jest konstrukcja mutantu delecyjnego jako kontroli negatywnej (co nie zawsze jest możliwe, jeśli delecja danego genu jest letalna).

W pierwszym etapie eksperymentu zostają „zamrożone” *in vivo* oddziaływania białko-DNA z zastosowaniem czynnika sieciującego, np. formaldehydu. Usieciowaną hodowlę poddaje się lizie enzymatycznej lub mechanicznej. Uwolniony z komórek DNA chromosomalny związany z białkami jest następnie fragmentowany np. przez sonikację. Oczekiwany zakres wielkości kompleksów białko-DNA zależy od późniejszej metody sekwencjonowania, zazwyczaj wymagane są fragmenty o długości poniżej 500 pz [9,35]. Lizat zawierający pofragmentowane kompleksy białko-DNA jest poddawany precipitacji z wykorzystaniem przeciwciała swoistego dla badanego białka. W tym celu stosuje się złoża agarozowe opłaszczane przeciwciałem lub białkiem A, które ma duże powinowactwo do immunoglobulin. Alternatywą



Ryc. 3. Schemat przebiegu i immunoprecypitacji chromatynej bakteryjnej *in vivo* połączonej z głębokim sekwencjonowaniem (ChIP-seq – chromatin immunoprecipitation with DNA sequencing). Technika ChIP-seq polega na „zamrożeniu” oddziaływań białek z DNA, a następnie precipitacji kompleksów białko-DNA z wykorzystaniem przeciwciała skierowanego przeciwko badanemu białku. W kolejnych etapach izoluje się uzyskane w wyniku immunoprecypitacji fragmenty DNA i poddaje głębokiemu sekwencjonowaniu w celu mapowania miejsc wiązania danego białka na chromosomie (szczegółowy opis w tekście)

dla złóż agarozowych są kulki magnetyczne opłaszczone odpowiednim przeciwciałem, które umożliwiają izolację kompleksów przeciwciało-białko-DNA z użyciem magnesów [11]. W celu ograniczenia występowania nieswoistych oddziaływań podczas inkubacji lizatu z przeciwciałem stosuje się niewielkie stężenia detergentów w buforach do immunoprecypitacji. Po usunięciu niezwiązanej frakcji kompleksów nukleoproteinowych i przepłukaniu złoża, odwraca się proces sieciowania i izoluje uzyskane w wyniku immunoprecypitacji fragmenty DNA. Dalsza analiza zakłada wykorzystanie głębokiego sekwencjonowania do zmapowania miejsc wiązania badanego białka na chromosomie. Uzyskane fragmenty są odpowiednio znakowane i amplifikowane w celu uzyskania nadreprezentacji obszarów wiązanych przez badane białko. Tak skonstruowane biblioteki poddawane są wysoko przepustowemu sekwencjonowaniu. Otrzymane w wyniku sekwencjonowania odczyty są przyrównywane do sekwencji chromosomu referencyjnego w celu przygotowania mapy wiązania badanego białka [35]. W ten sposób, przez porównanie map wiązania białek MukB i MatP, zidentyfikowano oddziaływanie kompleksu MukBEF z białkiem MatP, które wiąże sekwencje *mats* w obrębie makrodomeny Ter na chromosomie *E. coli* [36].

Poszczególne etapy techniki ChIP-seq wymagają optymalizacji odpowiednich parametrów w zależności od specyfiki badanego białka. Przykładowo dobór ilości całkowitego białka inkubowanego ze złożem zależy od swoistości wiązania badanego białka do DNA oraz od poziomu tego białka w komórce. Ze względu na złożoność i czułość metody, konieczna jest optymalizacja pod kątem wybranego modelu badawczego.

Analiza oddziaływań przestrzennych – struktura mikro- i makrodomen chromosomalnych

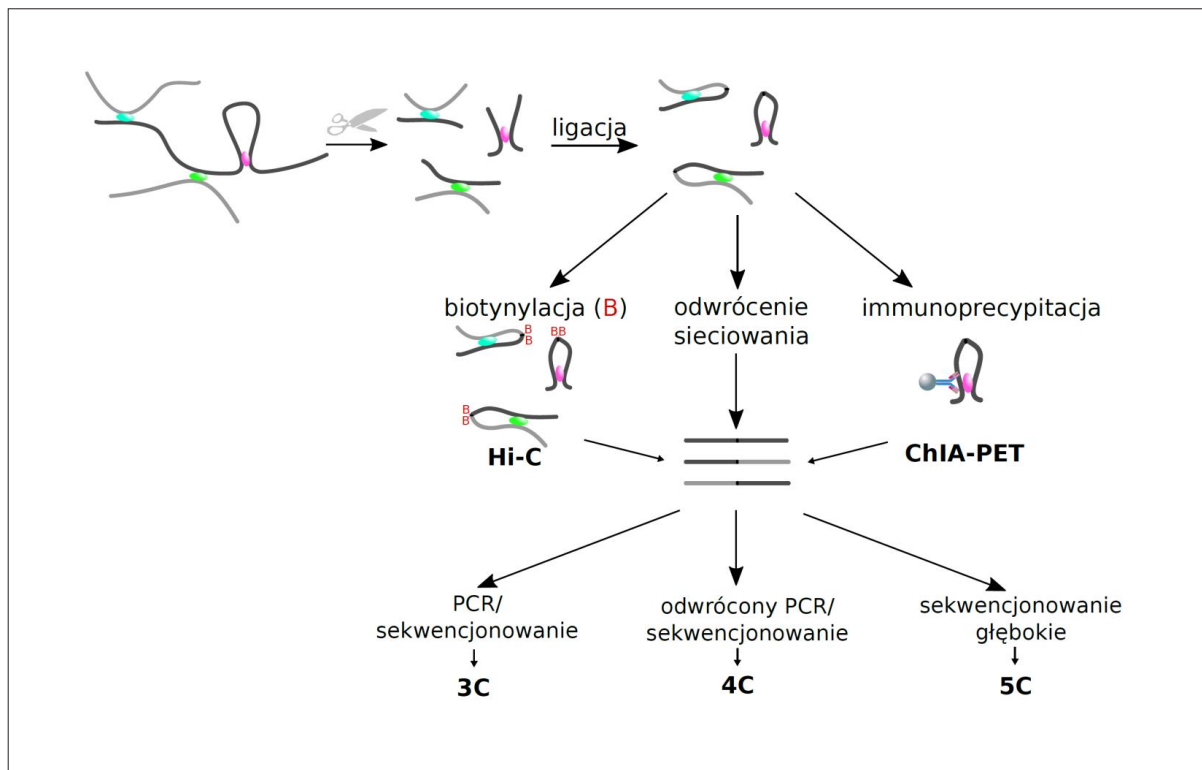
Wymienione wcześniej techniki footprintingu i immunoprecypitacji pozwalają na badanie odpowiednio lokalnych i globalnych oddziaływań białek z chromosomalnym DNA, jednak uzyskane dzięki nim dane nie dają odpowiedzi na pytanie jaki układ przestrzenny tworzą kompleksy białko-DNA, a jedynie dostarczają informacji na temat rozmieszczenia miejsc (sekwencji) wiązanych przez analizowane białko. Poznanie trójwymiarowej organizacji chromosomu jest możliwe dzięki metodzie 3C (chromosome conformation capture), którą zastosowano po raz pierwszy do określenia struktury 3D chromosomu III drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [13].

Główna zasada działania metod 3C opiera się na usiecianiu i tym samym „zamrożeniu” oddziaływań białek z chromosomalnym DNA (najczęściej za pomocą formaldehydu), aby kowalencyjnie związać ze sobą sąsiadujące przestrzennie regiony chromosomu. Po lizie komórek DNA jest fragmentowane enzymami restrykcyjnymi, po czym ligowane. Ligację przeprowadza się w znacznym rozcieńczeniu, dzięki czemu promowane jest powstawanie produktów wewnątrzcząsteczkowych

– a więc takich, w których ligacja nastąpiła między fragmentami DNA występującymi w danym kompleksie nukleoproteinowym. W ten sposób każdy produkt ligacji odzwierciedla interakcję między dwoma często odległymi segmentami DNA, a tym samym ich przestrzenne położenie w komórce. Powstała w ten sposób biblioteka fragmentów DNA, które fizycznie zbliżyły się do siebie w komórce bakteryjnej, poddaje się oczyszczaniu i dalszej analizie.

Obecnie znanych jest już wiele odmian metody 3C, które różnią się od siebie głównie sposobami analizy produktów ligacji. W klasycznym podejściu do 3C pojedyncze produkty ligacji są wykrywane w reakcji PCR z użyciem starterów swoistych dla danego *locus*. Otrzymuje się w ten sposób profil interakcji badanego obszaru z fragmentami chromosomu znajdującymi się w jego bliskim otoczeniu. Nowsza generacja 3C wykorzystuje techniki głębokiego sekwencjonowania do analizy całkowitej mieszaniny po ligacji. W metodzie 4C (circular chromosome conformation capture) produkty ligacji są wykrywane z użyciem „odwróconej” reakcji PCR (inverse PCR), umożliwiając wykrycie oddziaływań konkretnego *locus* z nieznanymi wcześniej partnerami [43]. Inne generacje metod z rodziny 3C do analizy bibliotek ligowanych fragmentów wykorzystują głębokie sekwencjonowanie DNA: stosując 5C (carbon copy chromosome conformation capture) po raz pierwszy wyznaczono globalne powiązania dla konkretnych *loci* na chromosomie. Zaletą takiego podejścia jest możliwość nałożenia na siebie wyników dla wielu fragmentów DNA, a to umożliwi modelowanie 3D domen chromosomu, co wykorzystano przy tworzeniu modelu chromosomu w komórkach *C. crescentus* [51]. W technice Hi-C modyfikacja polega na dołączeniu biotynylowanych adapterów do ligowanych końców, które umożliwiają oczyszczenie na złożu ze streptawidyną produktów ligacji z puli całkowitego wyizolowanego DNA [4]. Następnie uzyskane DNA analizuje się za pomocą głębokiego sekwencjonowania. Stosując metodę Hi-C wyznaczono 23 domeny CID (odrębne, wewnętrznie oddziałujące ze sobą regiony superskręconego DNA) w chromosomie *C. crescentus* [27]. Taki rodzaj hierarchicznej organizacji chromosomu przypomina zaobserwowane wcześniej w eukariontach domeny TAD (topologically associated domain) [16,37]. Wykazano, że domeny CID są stabilne w czasie cyklu komórkowego *C. crescentus*. Ponadto sprawdzono wpływ delekcji dwóch genów kodujących białka związane z nukleoidem, HU1 i HU2, na organizację chromosomu *C. crescentus* [27]. Analiza Hi-C mutantów delecyjnych $\Delta hup1\Delta hup2$ wykazała, że układ CID pozostaje bez większych zmian, natomiast częstość występowania oddziaływań bliskiego zasięgu na chromosomie znacząco zmalała, co wskazuje na udział białek HU w zbliżaniu sąsiednich fragmentów chromosomalnego DNA u *C. crescentus*.

Stworzono również kombinacje 3C z immunoprecypitacją. Przykładem może być metoda ChIA-PET (chromatin interaction analysis by paired-end Tag sequencing), w której ligowane fragmenty DNA wyłapywane są przez



Ryc. 4. Zasada działania metod 3C, 4C, 5C, Hi-C oraz ChIA-PET. Sieciowanie komórek *in vivo* „zamraża” oddziaływanie białek z DNA, w wyniku których często odległe segmenty chromosomu ulegają zbliżeniu. Usieciany i wyizolowany chromosom poddaje się trawieniu enzymami restrykcyjnymi; następnym krokiem jest ligacja otrzymanych fragmentów DNA związanych z białkami i odwrócenie sieciowania w celu pozbycia się zrzębu białkowego. Powyższa procedura generuje bibliotekę fragmentów DNA, która jest pochodną globalnej architektury chromosomu w momencie usieciania. Poszczególne odmiany metody 3C różnią się głównie technikami użytymi do analizy biblioteki DNA (szczegółowy opis w tekście)

przeciwiało skierowane przeciw konkretnemu białku, wiążącemu odległe części chromosomu, a następnie sekwencjonowane [12,28]. Analiza wyników ChIA-PET umożliwia wykrycie na poziomie globalnym interakcji fragmentów chromatyny, w których pośredniczy dane białko. Umożliwia to rozgraniczenie połączeń DNA-białko-DNA od DNA-DNA, które powstają w komórce bez udziału badanego białka.

Wyniki uzyskane w metodach 3C wskazują na prawdopodobieństwo, z jakim dwa odległe fragmenty chromosomu mogą zbliżyć się do siebie w komórce na tyle, by móc ze sobą oddziaływać. Należy jednak pamiętać, że są to dane statystyczne zebrane dla danej populacji, tak więc struktura chromosomu modelowana na podstawie 3C jest średnią struktur wszystkich komórek w populacji w danych warunkach. Poszczególne komórki mogą się między sobą znacznie różnić. Dlatego istotne jest, aby możliwie dokładnie zsynchronizować hodowlę bakteryjną mającą posłużyć za materiał wyjściowy do badań typu 3C.

Jak wykazano na przykładzie *C. crescentus*, techniki 3C pozwalają porównać ze sobą strukturę chromosomu na różnych etapach cyklu życiowego bakterii, a także wykorzystać mutanty delecyjne genów kodujących białka zasocjowane z DNA do lepszego poznania ich udziału w organizacji chromosomu.

Organizacja chromosomu bakteryjnego na poziomie pojedynczej komórki – mikroskopia epifluorescencyjna

Analizę dynamiki i organizacji chromosomu w pojedynczej komórce w czasie rzeczywistym umożliwiają techniki mikroskopii fluorescencyjnej. Stosując fuzje różnych białek wiążących DNA z białkami fluorescencyjnymi można lokalizować określone regiony chromosomu bakteryjnego (całe makrodomeny) lub ich fragmenty w cyklu komórkowym w czasie rzeczywistym [2,22,58,60]. Przykładami metod wykorzystywanych w tym celu są FROS (fluorescent-repressor-operator system) i system ParB-*parS*. W technice FROS wykorzystuje się oddziaływanie represora z rozpoznawanymi przez niego sekwencjami operatorowymi. Stosując fuzję represora TetR lub LacI z różnymi białkami fluorescencyjnymi można lokalizować konkretne regiony chromosomu, w których wprowadzono wielokrotnie powtórzone sekwencje operatorowe – odpowiednio *tetO* lub *lacO*. Lokalizacja poszczególnych regionów chromosomu za pomocą systemu ParB-*parS* polega na wykorzystaniu oddziaływania białka ParB ze swoimi rozpoznawanymi sekwencjami *parS*. Fuzja białka ParB z białkiem fluorescencyjnym pozwala na lokalizację wybranych fragmentów chromosomu, w których wprowadzono sekwencje *parS* [60]. Techniki FROS oraz ParB-*parS* zastosowano m.in. do lokalizacji makrodomeny Ori oraz ustalenia konfiguracji ramion chromosomu *E. coli* [58].

Wizualizację nukleoidu w czasie rzeczywistym przeprowadza się stosując fuzję białek fluorescencyjnych z białkami wiążącymi DNA nieswoiście, które występują w komórce bardzo licznie, np. białko HU (*E. coli* HU: ok. 30 000 – 50 000 cząsteczek na komórkę [1]). Fuzję białka HU z białkiem czerwonej fluorescencji mCherry zastosowano do rekonstrukcji organizacji nukleoidu *E. coli* w czasie rzeczywistym [22]. Wykorzystanie odpowiedniego układu fluoroforów umożliwia również lokalizację subkomórkową kilku białek jednocześnie, np. białek NAP oraz SMC.

Tradycyjna mikroskopia epifluorescencyjna często nie pozwala na lokalizowanie białek bakteryjnych tworzących złożone struktury z zadowalającą rozdzielczością. Problem można rozwiązać wykorzystując algorytmy dekonwolucyjne podczas analizy danych lub stosując mikroskopię konfokalną. Wyciszenie sygnału spoza płaszczyzny ogniskowej, jakie umożliwia otwór konfokalny znajdujący się przed układem detekcyjnym mikroskopu pozwala na uzyskanie wyższej rozdzielczości niż w tradycyjnym mikroskopie fluorescencyjnym. Lepsze rezultaty zapewniają jednak techniki wysokorozdzielczej mikroskopii fluorescencyjnej. Metody takie jak PALM (photoactivated localization microscopy) czy STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) umożliwiają lokalizację pojedynczych cząsteczek fluoroforu ze średnią rozdzielczością 10-55 nm (w przypadku mikroskopu epifluorescencyjnego jest to 200-250 nm) [5,44]. Mikroskopia PALM wymaga stosowania fuzji interesującego nas białka z fotoaktywowalnym fluoroforem, a w mikroskopii STORM badane białko jest znakowane wrażliwym na naświetlanie organicznym barwnikiem skoniugowanym z przeciwciałem. Technika PALM umożliwia prowadzenie obserwacji przyżyciowych, natomiast STORM wymaga wcześniejszego utrwalenia preparatów. Do analizy organizacji chromosomu bakteryjnego techniki te można stosować w celu śledzenia ruchliwości lub lokalizacji pojedynczych cząsteczek. Ma to zastosowanie w przypadku białek charakteryzujących się swoistą lokalizacją subkomórkową, czego przykładem może być analiza ilościowa i lokalizacja cząsteczek białka MukB z *E. coli* za pomocą mikroskopii PALM [2].

PODSUMOWANIE

Poglądy na temat organizacji chromosomu bakteryjnego uległy zmianie w ostatnich latach. Początkowe przeko-

wanie, że nukleoid występuje w komórce bakteryjnej w postaci amorficznego tworów zawieszonych w cytoplazmie zostało zrewidowane w wyniku licznych badań z zastosowaniem technik biologii molekularnej i analiz mikroskopowych. Hierarchiczna struktura chromosomu bakteryjnego swoją złożonością niemal dorównuje eukariotycznej chromatynie. Główną rolę w organizacji chromosomu odgrywają liczne białka z nim związane, m.in. białka NAP i SMC/MukB oraz topoizomerazy, które kontrolują topologię DNA w cyklu komórkowym. Wpływają na organizację poszczególnych regionów chromosomu oraz regulują poziom superskręcenia DNA podczas replikacji i transkrypcji, zapewniając utrzymanie homeostazy topologicznej chromosomu. Niektóre z nich (białka NAP) mogą kontrolować ekspresję genów przez wprowadzanie licznych zagięć, pętli czy łącząc sąsiednie nici DNA, co zapewnia dostosowanie profilu transkrypcji do zmieniających warunków środowiska. Podstawą przystosowania organizmów chorobotwórczych do bytowania w komórkach gospodarza jest regulacja ekspresji niezbędnych do przetrwania genów m.in. przez kontrolę superskręcenia DNA oraz działanie globalnych czynników transkrypcyjnych. Przykładowo, białko Lsr2 (homolog białek H-NS z *E. coli*) jest globalnym regulatorem transkrypcyjnym, koniecznym do przetrwania *Mycobacterium tuberculosis* podczas infekcji [3], natomiast szczep *Helicobacter pylori* pozbawiony genu kodującego białko HU nie przeżywa w fazie stacjonarnej [56]. Inny mechanizm przystosowawczy organizmów chorobotwórczych ilustruje kontrola ekspresji genów wirulencji w zależności od zmian poziomu superskręcenia DNA u *Salmonella enterica* [17]. Szczegółowe badania organizacji chromosomu bakteryjnego oraz białek stanowiących podstawę jego hierarchicznej struktury są kluczowe w kontekście analizy mechanizmów bakteryjnej patogenezy.

PODZIĘKOWANIA

Autorki dziękują prof. dr hab. Jolancie Zakrzewskiej-Czerwińskiej oraz koleżankom i kolegom z Zakładu Mikrobiologii Molekularnej za dyskusje i cenne uwagi w trakcie pisania manuskryptu.

PIŚMIENNICTWO

- [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] Badrinarayanan A., Reyes-Lamothe R., Uphoff S., Leake M.C., Sherratt D.J.: *In vivo* architecture and action of bacterial structural maintenance of chromosome proteins. *Science*, 2012; 338: 528-531
- [3] Bartek I.L., Woolhiser L.K., Baughn A.D., Basaraba R.J., Jacobs W.R.Jr., Lenaerts A.J., Voskuil M.I.: *Mycobacterium tuberculosis* Lsr2 is

a global transcriptional regulator required for adaptation to changing oxygen levels and virulence. *MBio*, 2014; 5: e01106-e01114

[4] Belton J.M., McCord R.P., Gibcus J.H., Naumova N., Zhan Y., Dekker J.: Hi-C: a comprehensive technique to capture the conformation of genomes. *Methods*, 2012; 58: 268-276

[5] Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R., Lindwasser O.W., Olenych S., Bonifacino J.S., Davidson M.W., Lippincott-Schwartz J., Hess H.F.: Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution.

Science, 2006; 313: 1642-1645

[6] Bowman G.R., Comolli L.R., Zhu J., Eckart M., Koenig M., Downing K.H., Moerner W.E., Earnest T., Shapiro L.: A polymeric protein anchors the chromosomal origin/ParB complex at a bacterial cell pole. *Cell*, 2008; 134: 945-955

[7] Brewer A.C., Marsh P.J., Patient R.K.: A simplified method for *in vivo* footprinting using DMS. *Nucleic Acids Res.*, 1990; 18: 5574

[8] 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

[9] Chung D., Park D., Myers K., Grass J., Kiley P., Landick R., Keleş S.: dPeak: high resolution identification of transcription factor binding sites from PET and SET ChIP-Seq data. *PLoS Comput. Biol.*, 2013; 9: e1003246

[10] Cozzarelli N.R.: DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science*, 1980; 207: 953-960

[11] Das P.M., Ramachandran K., vanWert J., Singal R.: Chromatin immunoprecipitation assay. *Biotechniques*, 2004; 37: 961-969

[12] de Laat W., Dekker J.: 3C-based technologies to study the shape of the genome. *Methods*, 2012; 58: 189-191

[13] Dekker J., Rippe K., Dekker M., Kleckner N.: Capturing chromosome conformation. *Science*, 2002; 295: 1306-1311

[14] Delius H., Worcel A.: Electron microscopic studies on the folded chromosome of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1974; 38: 53-58

[15] Dillon S.C., Dorman C.J.: Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010; 8: 185-195

[16] Dixon J.R., Selvaraj S., Yue F., Kim A., Li Y., Shen Y., Hu M., Liu J.S., Ren B.: Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 2012; 485: 376-380

[17] Dorman C.J., Corcoran C.P.: Bacterial DNA topology and infectious disease. *Nucleic Acids Res.*, 2009; 37: 672-678

[18] Ebersbach G., Briegel A., Jensen G.J., Jacobs-Wagner C.: A self-associating protein critical for chromosome attachment, division, and polar organization in *caulobacter*. *Cell*, 2008; 134: 956-968

[19] Einhäuser A., Jungbauer A.: The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2001; 49: 455-465

[20] Espéli O., Mercier R., Boccard F.: DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome. *Mol. Microbiol.*, 2008; 68: 1418-1427

[21] Ferdows M.S., Barbour A.G.: Megabase-sized linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86: 5969-5973

[22] Fisher J.K., Bourniquel A., Witz G., Weiner B., Prentiss M., Kleckner N.: Four-dimensional imaging of *E. coli* nucleoid organization and dynamics in living cells. *Cell*, 2013; 153: 882-895

[23] Graham T.G., Wang X., Song D., Etson C.M., van Oijen A.M., Rudner D.Z., Loparo J.J.: ParB spreading requires DNA bridging. *Genes Dev.*, 2014; 28: 1228-1238

[24] Graumann P.L.: SMC proteins in bacteria: condensation motors for chromosome segregation? *Biochimie*, 2001; 83: 53-59

[25] Johnson D.S., Mortazavi A., Myers R.M., Wold B.: Genome-wide mapping of *in vivo* protein-DNA interactions. *Science*, 2007; 316: 1497-1502

[26] Kieser H.M., Kieser T., Hopwood D.A.: A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *J. Bacteriol.*, 1992; 174: 5496-5507

[27] Le T.B., Imakaev M.V., Mirny L.A., Laub M.T.: High-resolution

mapping of the spatial organization of a bacterial chromosome. *Science*, 2013; 342: 731-734

[28] Li G., Fullwood M.J., Xu H., Mulawadi F.H., Velkov S., Vega V., Ariyaratne P.N., Mohamed Y.B., Ooi H.S., Tennakoon C., Wei C.L., Ruan Y., Sung W.K.: ChIA-PET tool for comprehensive chromatin interaction analysis with paired-end tag sequencing. *Genome Biol.*, 2010; 11: R22

[29] 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

[30] Macvanin M., Adhya S.: Architectural organization in *E. coli* nucleoid. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1819: 830-835

[31] Marasco R., Varcamonti M., La Cara F., Ricca E., De Felice M., Sacco M.: *In vivo* footprinting analysis of Lrp binding to the *ilvIH* promoter region of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1994; 176: 5197-5201

[32] Mercier R., Petit M.A., Schbath S., Robin S., El Karoui M., Boccard F., Espéli O.: The MatP/*matS* site-specific system organizes the terminus region of the *E. coli* chromosome into a macrodomain. *Cell*, 2008; 135: 475-485

[33] Murphy L.D., Zimmerman S.B.: Condensation and cohesion of λ DNA in cell extracts and other media: implications for the structure and function of DNA in prokaryotes. *Biophys. Chem.*, 1995; 57: 71-92

[34] Murtin C., Engelhorn M., Geiselmann J., Boccard F.: A quantitative UV laser footprinting analysis of the interaction of IHF with specific binding sites: re-evaluation of the effective concentration of IHF in the cell. *J. Mol. Biol.*, 1998; 284: 949-961

[35] Myers K.S., Park D.M., Beauchene N.A., Kiley P.J.: Defining bacterial regulons using ChIP-seq. *Methods*, 2015; 86: 80-88

[36] Nolvios S., Upton A.L., Badrinarayanan A., Müller J., Zawadzka K., Wiktor J., Gill A., Arciszewska L., Nicolas E., Sherratt D.: MatP regulates the coordinated action of topoisomerase IV and MukBEF in chromosome segregation. *Nat. Commun.*, 2016; 7: 10466

[37] Nora E.P., Lajoie B.R., Schulz E.G., Giorgetti L., Okamoto I., Servant N., Piolot T., van Berkum N.L., Meisig J., Sedat J., Gribnau J., Barillot E., Blüthgen N., Dekker J., Heard E.: Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation center. *Nature*, 2012; 485: 381-385

[38] Postow L., Hardy C.D., Arsuaga J., Cozzarelli N.R.: Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev.*, 2004; 18: 1766-1779

[39] Prieto A.I., Kahramanoglou C., Ali R.M., Fraser G.M., Seshasayee A.S., Luscombe N.M.: Genomic analysis of DNA binding and gene regulation by homologous nucleoid-associated proteins IHF and HU in *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acids Res.*, 2012; 40: 3524-3537

[40] Rice P.A., Yang S., Mizuuchi K., Nash H.A.: Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell*, 1996; 87: 1295-1306

[41] Schneiker S., Perlova O., Kaiser O., Gerth K., Alici A., Altmeyer M.O., Bartels D., Bekel T., Beyer S., Bode E., Bode H.B., Bolten C.J., Choudhuri J.V., Doss S., Elnakady Y.A. i wsp.: Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat. Biotechnol.*, 2007; 25: 1281-1289

[42] Sherratt D.J.: Bacterial chromosome dynamics. *Science*, 2003; 301: 780-785

[43] Simonis M., Kooren J., de Laat W.: An evaluation of 3C-based methods to capture DNA interactions. *Nat. Methods*, 2007; 4: 895-901

[44] Song D., Loparo J.J.: Building bridges within the bacterial chromosome. *Trends Genet.*, 2015; 31: 164-173

[45] Stavans J., Oppenheim A.: DNA-protein interactions and bacterial chromosome architecture. *Phys. Biol.*, 2006; 3: R1-R10

[46] Su C.J., Baseman J.B.: Genome size of *Mycoplasma genitalium*. *J. Bacteriol.*, 1990; 172: 4705-4707

- [47] Sullivan N.L., Marquis K.A., Rudner D.Z.: Recruitment of SMC by ParB-parS organizes the origin region and promotes efficient chromosome segregation. *Cell*, 2009; 137: 697-707
- [48] Szafran M., Zakrzewska-Czerwińska J., Jakimowicz D.: Bakteryjne topoizomerazy typu I – rola biologiczna i zastosowanie jako potencjalnych celów dla antybiotyków. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 130-142
- [49] Trucksis M., Michalski J., Deng Y.K., Kaper J.B.: The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 14464-14469
- [50] Tse-Dinh Y.C., Beran-Steed R.K.: *Escherichia coli* DNA topoisomerase I is a zinc metalloprotein with three repetitive zinc-binding domains. *J. Biol. Chem.*, 1988; 263: 15857-15859
- [51] Umbarger M.A., Toro E., Wright M.A., Porreca G.J., Bau D., Hong S.H., Fero M.J., Zhu L.J., Marti-Renom M.A., McAdams H.H., Shapiro L., Dekker J., Church G.M.: The three-dimensional architecture of a bacterial genome and its alteration by genetic perturbation. *Mol. Cell*, 2011; 44: 252-264
- [52] Valens M., Penaud S., Rossignol M., Cornet F., Boccard F.: Macrodome organization of the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J.*, 2004; 23: 4330-4341
- [53] Valls M., Buckle M., de Lorenzo V.: *In vivo* UV laser footprinting of the *Pseudomonas putida* σ^{54} Pu promoter reveals that integration host factor couples transcriptional activity to growth phase. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 2169-2175
- [54] van den Ent F., Lockhart A., Kendrick-Jones J., Löwe J.: Crystal structure of the N-terminal domain of MukB: a protein involved in chromosome partitioning. *Structure*, 1999; 7: 1181-1187
- [55] Vora T., Hottes A.K., Tavazoie S.: Protein occupancy landscape of a bacterial genome. *Mol. Cell*, 2009; 35: 247-253
- [56] Wang G., Lo L.F., Maier R.J.: A histone-like protein of *Helicobacter pylori* protects DNA from stress damage and aids host colonization. *DNA Repair*, 2012; 11: 733-740
- [57] Wang J.C.: DNA topoisomerases: why so many? *J. Biol. Chem.*, 1991; 266: 6659-6662
- [58] Wang X., Liu X., Possoz C., Sherratt D.J.: The two *Escherichia coli* chromosome arms locate to separate cell halves. *Genes Dev.*, 2006; 20: 1727-1731
- [59] Wang X., Montero Llopis P., Rudner D.Z.: *Bacillus subtilis* chromosome organization oscillates between two distinct patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014; 111: 12877-12882
- [60] Wang X., Reyes-Lamothe R., Sherratt D.J.: Visualizing genetic loci and molecular machines in living bacteria. *Biochem. Soc. Trans.*, 2008; 36: 749-753
- [61] Wang X., Rudner D.Z.: Spatial organization of bacterial chromosomes. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2014; 22: 66-72
- [62] Yamaichi Y., Bruckner R., Ringgaard S., Möll A., Cameron D.E., Briegel A., Jensen G.J., Davis B.M., Waldor M.K.: A multidomain hub anchors the chromosome segregation and chemotactic machinery to the bacterial pole. *Genes Dev.*, 2012; 26: 2348-2360

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.