Organizacija bakterijskog kromosoma

Kolanović, Dajana

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:835508

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Dajana Kolanović

6823/BT

ORGANIZACIJA BAKTERIJSKOG KROMOSOMA

ZAVRŠNI RAD

Modul: Molekularna genetika

Mentor: Dr. sc. *Višnja Bačun-Družina*, red. prof.

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Završni rad**

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

ORGANIZACIJA BAKTERIJSKOG KROMOSOMA

Dajana Kolanović, 6823/BT

Sažetak: Molekula DNA je izuzetna molekula za pohranu genskih informacija, ali linearno kodiranje zahtijeva neumjereno dugu molekulu i tako su bakterijski kromosomi mnogo dulji nego stanice u kojima se nalaze, otprilike 1000 puta. Ova velika količina DNA predstavlja izazovan organizacijski problem, no bakterijski nukleoid je prostorno orijentiran i vrlo organiziran unutar stanice. Takva organizacija se prenosi s jedne generacije na drugu progresivnom segregacijom kromosoma kćeri te sidrenjem DNA u staničnoj membrani. U mnogim prokariotskim organizmima događa se DNA metilacija, kemijska modifikacija DNA. Najpoznatija uloga metilacije DNA je kao komponenta restrikcijsko-modifikacijskog sustava, ali DNA metilacija može također djelovati neovisno od restrikcijsko-modifikacijskog sustava te imati funkciju u regulaciji genoma.

Ključne riječi: bakterijski kromosom, organizacija DNA, segregacija DNA, metilacija DNA

Rad sadrži: 29 stranica, 6 slika, 1 tablica, 88 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom obliku i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *dr. sc. Višnja Bačun-Družina, red. prof.*

Rad predan: 4. srpnja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb **Final work**

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Biology and Microbial Genetics

BACTERIAL CHROMOSOME ORGANISATION

Dajana Kolanović, 6823/BT

Abstract: The DNA molecule is a remarkably simple and elegant storage medium for genetic information, but linear encoding demands an inordinately long molecule, and so, bacterial chromosomes are much longer than the cells in which they reside, approximately 1000 times. So, this crowded mass of DNA poses a challenging organizational problem, but the bacterial nucleoid is reliably oriented and highly organized within the cell. Such organization is transmitted from one generation to the next by progressive segregation of daughter chromosomes and anchoring of DNA to the cell envelope. DNA methylation is a chemical modification of DNA present in many prokaryotic genomes. The best-known role of DNA methylation is as a component of restriction-modification systems, but DNA methylation may also act independently of RM systems and function in genome regulation.

Key words: bacterial chromosome, DNA organization, DNA segregation, DNA methylation

Thesis contains: 29 pages, 6 figures, 1 table, 88 references

Original in: Croatian

Final work is printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Ph. D. Višnja Bačun-Družina, Full Professor*

Thesis delivered: 4th July 2016

SADRŽAJ

1. UVOD ……...……...… 1
2. TEORIJSKI DIO ……..... 2
2.1. Bakterijski kromosom ...……...……..…..... 2
2.2. Organizacija molekule DNA u bakterijskoj stanici ……..... 2
2.2.1. Model rozete 2
2.2.2. Lokalizacija kromosomske DNA u bakterija 3
2.2.3. Lokalizacija kromosoma u *Escherichia coli* 7
2.3. Segregacija DNA .....……..... 11
2.3.1. Model replikona …….…..... 11
2.3.2. Segregacija putem nenamjenskog modela 12
2.3.3. Segregacija putem namjenskog modela 13
2.3.3.1. Sustav ParABS u *Vibrio cholerae* i *C. crescentus* 13
2.3.3.2. Odsutnost sustava ParABS sustava-ostali mehanizmi ..…… 14

2.4. Metilacija DNA ...……..... 14
2.4.1. Restrikcijsko-modifikacijski sustavi 15
2.4.2. Orfan metiltransferaze ..…….....….... 16
2.4.2.1. DNA metiltransferaze u *Escherichia coli* 16
2.4.2.2. Raspodjela sekvenci GATC u kromosomskoj DNA 18
2.4.2.3. Raspodjela sekvenci CC (A/T) GG u kromosomskoj DNA 20

3. ZAKLJUČAK ……..……..…..... 20
4. LITERATURA ……...…….……..... 22

1. UVOD

Bakterije su prokarioti koji imaju najčešće samo jedan kromosom, a to je prstenasta, dvolančana molekula DNA. Na prvi pogled se možda čini kako organizacija i lokalizacija samo jednog kromosoma u stanici ne bi trebala predstavljati nikakav problem, međutim situacija je puno drugačija. Naime, bakterijski kromosomi su znatno duži nego same stanice u kojima se nalaze te velika količina DNA bi trebala biti kompaktno složena i pouzdano orijentirana kako bi se svi procesi u stanici mogli nesmetano odvijati. Ovdje će se razmatrati kako prvi, tako i nedavni nalazi o visoko uređenoj organizaciji bakterijskih kromosoma, ali i kako se kromosomi vjerno odvajaju svakoj stanici kćeri tijekom diobe. Iako će se ta pitanja razmatrati samostalno, organizacija i segregacija molekule DNA su blisko povezane.

U bakterijskom genomu se također događaju i kemijske modifikacije kao što je npr., metilacija DNA, koja je prisutna u više od 90 % istraživanih organizama. Iako je najpoznatija uloga metilacije DNA kao komponenta restrikcijsko-modifikacijskog sustava, u kojima djeluje u dogovoru s restrikcijskim enzimima kako bi zaštitila integritet prokariotskog genoma, istraživanja u mnogim organizmima pokazuju da metilacija DNA može također djelovati neovisno od restrikcijskih sustava i sudjelovati u regulaciji genoma. Tako metilacija DNA može imati i znatno širu funkciju u biologiji prokariotskih genoma nego što se ranije smatralo. Prožimanje prisutnosti DNA metilacije tijekom prokariotskog razvoja, kao i raznolikost specifičnosti sekvenci i potencijalnih funkcija sustava DNA metilacije ovdje će se razmatrati na primjeru bakterije *Escherichia coli*.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterijski kromosom

Molekula DNA je izuzetno jednostavna struktura za pohranu genskih informacija. Međutim, linearno kodiranje ove vrste zahtijeva neumjereno dugu molekulu te su bakterijski kromosomi mnogo dulji nego stanice u kojima se nalaze. Na primjer, u *Caulobacter crescentus* se nalazi 1,3 mm molekule DNA (4,0 Mpb) u 2 uM stanice. Dakle, bakterijski kromosomi su uglavnom oko 1000 puta duži nego stanice u kojima se nalaze te istovremeno metabolizam DNA predstavlja izazovan organizacijski problem, no bakterijski nukleoid je pouzdano orijentiran i vrlo organiziran unutar stanice. Takva organizacija se prenosi s jedne generacije na drugu progresivnom segregacijom kromosoma kćeri te sidrenjem DNA u staničnoj membrani. Izgleda da je aktivna segregacija preko mitotskog aparata zajednička, ali način segregacije bakterijskog kromosoma značajno se razlikuje od vrste do vrste (Toro i Shapiro, 2010).

2.2. Organizacija molekule DNA u bakterijskoj stanici

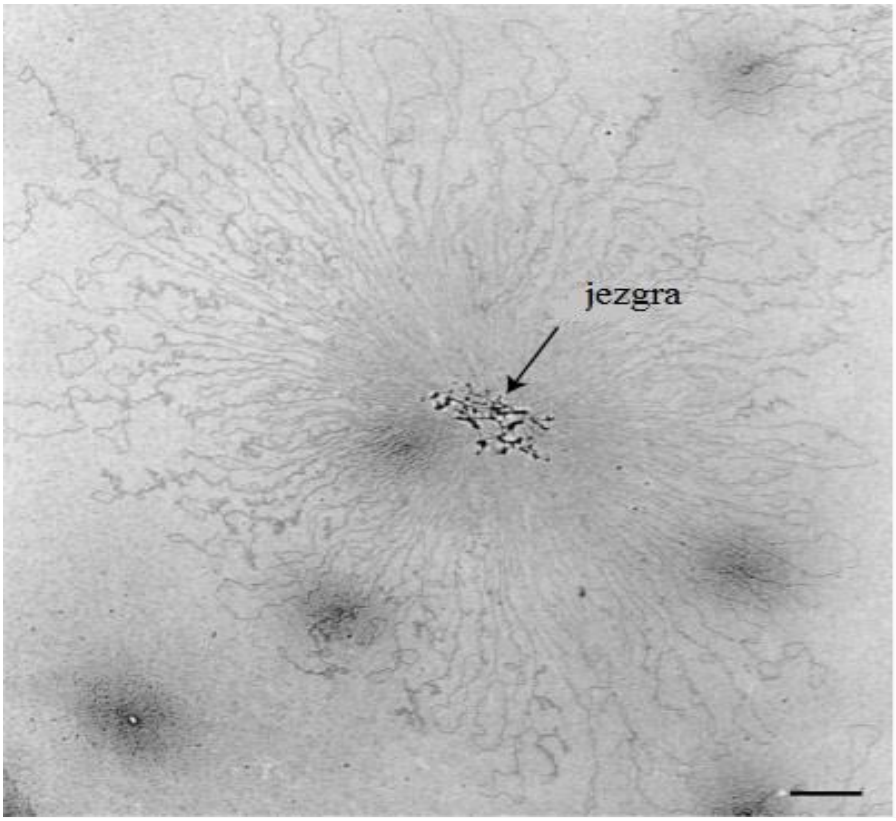
2.2.1. Model rozete

Prva istraživanja o strukturi bakterijskih nukleoida su se pojavila u obliku svjetlosne mikroskopije obojenih uzoraka (npr., Feulgen i Giemsa bojanje) i elektronske mikroskopije tankih presjeka (Robinow i Kellenberger, 1994). Ova proučavanja su pokazala da iako je nukleoid uglavnom odvojen od ostatka citoplazme nije vezan za jezgrinu membranu (Robinow, 1956), a temeljila su se jedino na ograničenoj rezoluciji.

Godine 1971. Stonington i Pettijohn su otvorili nove poglede razvijajući metodu za izoliranje "zgužvanih" kromosoma, tj. slobodne DNA koja ne povećava viskoznost otopine, nježno lizirajući stanice *Escherichia coli* u otopinama visoke ionske jakosti. Tako izolirani kromosomi su sadržavali gotovo svu DNA prisutnu u lizatu, neke proteine i svu početnu RNA (Stonington i Pettijohn, 1971). Ovisno o uvjetima izolacije, kromosomi su dobiveni ili povezani s membranom ili u obliku bez membrane (Kavenoff i Bowen, 1976).

Kad se snimilo elektronskim mikroskopom, izolirani kromosomi su se pojavili kao neprekinute rozete sa središnjom jezgrom od koje nekoliko desetaka petlji zrači prema van (slika 1) (Delius i Worcel, 1974). Ova organizacija je bila osjetljiva na RNazu, sugerirajući ulogu RNA u održavanju cjelovitosti jezgre (Kavenoff i Bowen, 1976). Izolirani kromosomi su također pokazali dvofazni odziv na povećanje koncentracije etidijevog bromida, što je ukazivalo na očuvanost DNA superzavojnice. Dosljedno sa studijama elektronske

mikroskopije, nekoliko desetaka DNaza je kataliziralo nickove (zareze), koji su potrebni kako bi se dobio potpuno opušteni kompleks molekule DNA (Worcel i Burgi, 1972).



Slika 1. Organizacije DNA po modelu rozete. Elektronska mikrografija izoliranih (bez membrane) kromosoma iz *E. coli*. Prilagođeno prema Kavenoff i Bowen (1976).

Dakle, model rozete dao je prvi uvid u visoko organizirane strukture bakterijskog kromosoma. Slika koja se pojavila, pokazivala je da se kromosom sastoji od središnje jezgre održane zajedno interakcijama RNA i DNA molekula. Između 12-80 topološki neovisnih petlji ili područja superzavijenosti zrače iz ove jezgre (slika 1). Iako sve domene imaju istu količinu superzavoja, jedno lančani lom u jednoj od petlji eliminira samo superzavoj u toj domeni, ostavljajući ostatak kromosoma nepromijenjen (Worcel i Burgi, 1972). Postojanje područja (domena) superzavijenosti potvrđeno je *in vivo* istraživanjima (Sinden i Pettijohn, 1981).

2.2.2. Lokalizacija kromosomske DNA u bakterija

Budući da su kromosomi izolirani korištenjem metode Stonington i Pettijohn (1971), odvojeni su od ostatka stanice pa model rozete ne može dati nikakva predviđanja o unutar staničnoj lokalizaciji bilo kojeg slijeda (sekvence) DNA.

Prvi pokazatelj da bakterijski kromosom ima specifičnu orijentaciju unutar stanice došao je iz genetskih istraživanja u *Bacillus subtilis* (Wu i Errington, 1994). U uvjetima gladi, *B. subtilis* prolazi proces sporulacije, koji dijeli stanicu u veliki odjeljak za majku stanicu i mali odjeljak za predsporu (Barak i Wilkinson, 2005). Ova asimetrična podjela zahvaća približno 30 % od kromosoma u predsporu, a odvajanje ostatka kromosoma pokreće protein SpoIIIE (Burton i sur., 2007). U mutantu *spoIIIE* izostane DNA translokacija i 70 % kromosoma ostane zadržano u stanici majci. Model zadržane DNA bio je ponovljiv od stanice do stanice, što je ukazivalo da kromosom ima specifičnu orijentaciju s obzirom na podjelu septuma, barem za vrijeme sporulacije (Wu i Errington, 1994).
Nekoliko godina kasnije, postignuta je direktna vizualizacija položaja kromosomskog lokusa ishodišta replikacije. Mohl i Gober (1997) su pokazali da u *C. crescentus* protein ParB, koji se specifično veže na mjesto u blizini ishodišta replikacije nazvano *Cori*, dok se u drugim bakterijama zove *oriC*, je uvijek lokaliziran na staničnim polovima (slika 2A). Istovremeno, Webb i suradnici (1997) su prilagodili prvobitni postupak za vizualizaciju DNA lokusa u eukariotskim stanicama (Robinett i sur., 1996), za vidjeti poziciju ishodišta replikacije *oriC* i kraja replikacije *ter* u *B. subtilis*. U ovoj metodi, veliki broj mjesta *lacO*, otprilike 250, raspoređenih u tandemu, su umetnuti u kromosom na određeno mjesto. Naknadna ekspresija fuzije LacI-GFP rezultira u vezanju LacI-GFP na područje *lacO* i stvara lokaliziranu fluorescentnu mrlju, koja se može vizualizirati sa specijalnom kamerom (*engl*. charge coupled device, CCD). Koristeći ovu metodu, Webb i suradnici (1997) su potvrdili da je u *B. subtilis* ishodište replikacije *oriC* lokalizirano na staničnim polovima tijekom sporulacije. Nadalje, oni su pokazali da se takav lokalizacijski raspored nalazi i u vegetativnim stanicama, a da je gen *ter* lokaliziran na suprotnom polu u novonastalim stanicama (slika 2C, D) (Webb i sur., 1997).

Sposobnost za sinkronizaciju *C. crescentus* stanica je odigrala važnu ulogu u sljedećem otkriću jer je tako istraživačima omogućeno lako slijediti lokalizacijski model DNA u staničnom ciklusu. Jensen i Shapiro (1999) su koristili fluorescentnu hibridizaciju *in situ* (*engl*. fluorescence *in situ* hybridization, FISH) za praćenje pozicije gena *Cori i ter* u sinkroniziranim stanicama. Primijetili su da od gena *Cori* počinje stanični ciklus na starom polu, dok je gen *ter* smješten na novom polu. Nakon što se gen *Cori* udvostruči, brzo se i

smjesti u bipolarno mjesto. U međuvremenu, gen *ter* bude odmaknut od pola i preseljen u sredinu stanice. Pred kraj staničnog ciklusa, gen *ter* se udvostruči, ostavljajući zrcalnu sliku konformacije kromosoma (Jensen i Shapiro, 1999).

Nakon što je utvrđeno da geni *Cori* i *ter* strogo definiraju lokalizaciju ovisno o staničnom ciklusu, pitanje kako je organiziran ostatak kromosoma postaje sve zanimljivije (Breier i Cozzarelli 2004). Teleman i suradnici (1998) označili su četiri kromosomske pozicije, 359º, 90º, 181º i 270º na kružnom kromosomu, dok *oriC* odgovara za 0º, u stanicama *B. subtilis* te su zaključili da mjesta na intermedijarnim pozicijama na kromosomu leže između lokusa *oriC* i *ter* (slika 2C). Sličan model je predložen za *C. crescentus* na temelju pulsirajućeg označavanja kromosoma u sinkroniziranim stanicama. Pokazalo se da se rano replicirana DNA lokalizira u blizini staničnih polova, dok je kasno replicirana DNA lokalizirana bliže sredini stanice, a srednje replicirana DNA je lokalizirana između lokusa *oriC* i *ter* (Jensen i sur., 2001).

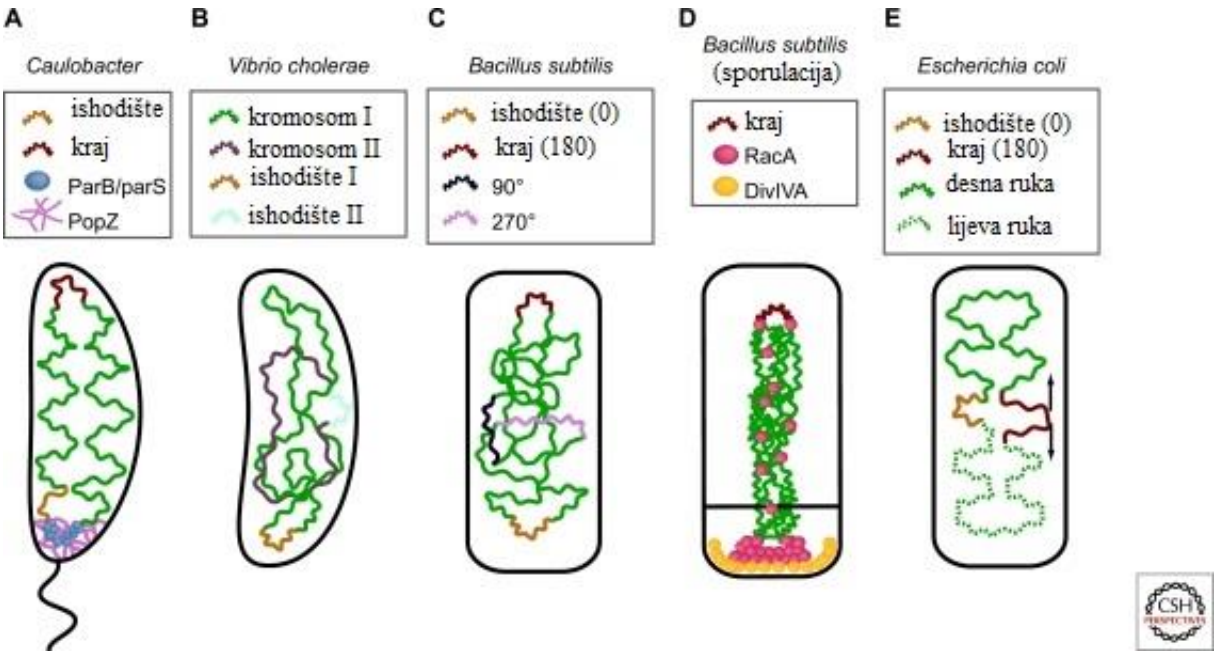
Navedeni rezultati ukazuju da je u bakterijskim stanicama cijeli kromosom organiziran, ali odlučujući dokaz je dobiven 2004. godine, kada su Viollier i suradnici (2004) razvili računske metode za mjerenje položaja fluorescentnih mjesta. Koristeći metodu temeljenu na transpozonima, napravljen je niz od 112 sojeva od kojih svaki nosi lokus *lacO* na drugoj poziciji, a mjeri se njihov položaj u više od 500 stanica. Pronađen je linearni odnos između položaja bilo kojeg DNA lokusa na kromosomskoj karti i njegovog položaja unutar stanice. Dakle, lokus koji je na 1/3 udaljenosti između lokusa *Cori* i *ter* na kromosomskoj karti, naći će se na 1/3 puta između starih i novih polova (slika 2A) (Viollier i sur. 2004). Važno je imati na umu da je bakterijski kromosom općenito kružna molekula, a ishodište i kraj replikacije se nalaze na suprotnim krajevima kruga. Dvije ruke kromosoma ili replikori čine međusobno paralelu, s jednog staničnog pola na drugi (slika 2A). Dakle, linearna organizacija se koristi za označavanje linearnog odnosa između položaja DNA lokusa u parovima baza i njegove unutar stanične lokacije.

Postavlja se važno pitanje o zadržavanju kromosoma na određenom mjestu te postoji li mjesto ili možda nekoliko mjesta vezanosti DNA na staničnu membranu, a koja istovremeno osiguravaju njegovu pravilnu lokalizaciju. Doista, postoje. Tijekom sporulacije bakterije *B. subtilis*, protein RacA je potreban za vezanje regije ishodišta kromosoma na stanični pol (Ben-Yehuda i sur., 2003). Protein RacA se veže na 25 lokacija u velikom području oko ishodišta replikacije i djeluje izravno s proteinom DivIVA (Ben-Yehuda i sur., 2005), koji se veže za zakrivljene dijelove stanične membrane poput onih na citoplazmatskoj strani staničnih

polova (Lenarcic i sur., 2009). Dakle, polarna lokalizacija regije ishodišta replikacije u *B. subtilis* proizlazi iz veze pol-DivIVA-RacA-DNA (slika 2D). Međutim, protein RacA nije prisutan tijekom vegetativnog rasta *B. subtilis* i tada ishodište replikacije nije usidreno na staničnom polu (slika 2C).

Dvije skupine istraživača su pokazale da je kromosom u *C. crescentus* usidren na staničnom polu posredstvom proteina PopZ (Bowman i sur., 2008; Ebersbach i sur., 2008). Prolinom bogat protein PopZ samostalno oblikuje mrežu na polu stanice bakterije *C. crescentus*. Tako stvorena mreža djeluje izravno s veznim proteinom ParB, koji se veže na *parS*, sprecifičnu sekvencu DNA, koja je udaljena samo 8 kb od ishodišta replikacije *Cori*. Dakle, u *C. crescentus* veza je kompleks pol-PopZ-ParB-DNA s lokusom *parS* (slika 2A).

Dakle, polarna lokalizacija ishodišta replikacije ne proizlazi iz toga da ishodište replikacije *Cori* samo sebe usidrava na pol. Na primjer, kad je ishodište replikacije *Cori* premješteno 100 kb od sekvence *parS*, njegov položaj u stanici se udalji od pola (Toro i sur., 2008). S druge strane, polarni položaj sekvence *parS* je ostao nepromijenjen. Dakle odrednice orijentacije kromosoma se ne nalaze u ishodištu replikacije.



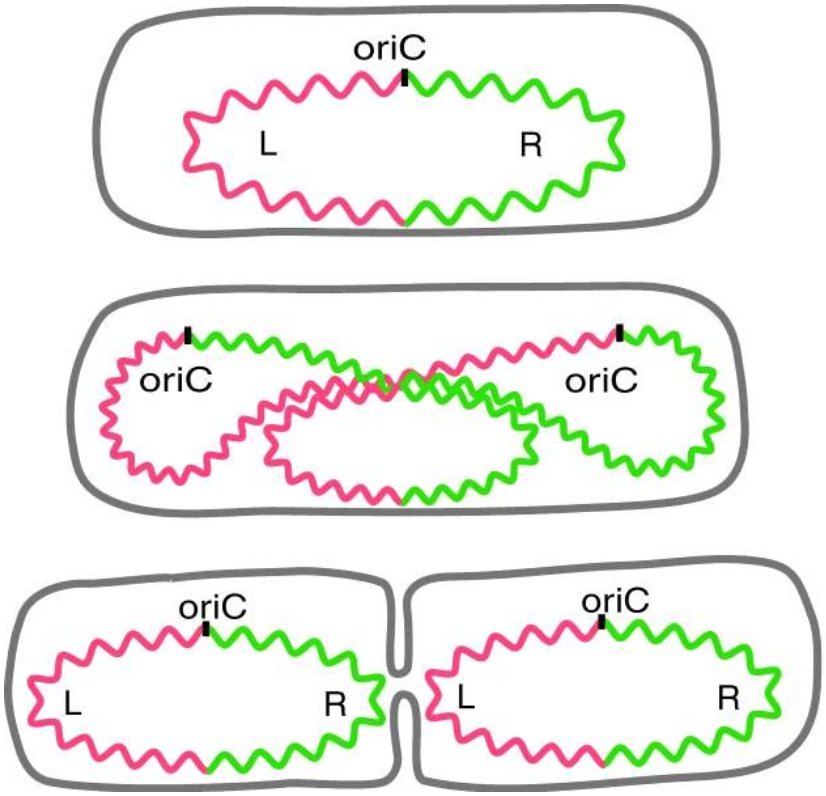
Slika 2. Organizacija kromosma u bakterijskih modelnih sustava. (A) *Caulobacter crescentus* kromosomi su linearno organizirani i usidreni na pol gdje se nalazi bič preko *parS* / ParB /

PopZ. (B) U *Vibrio cholerae*, regija ishodišta većeg kromosoma (kromosoma I) je lokalizirana na stanični pol, dok je regija ishodišta manjeg kromosoma (kromosoma II) lokalizirana na stanični centar. (C) Četiri lokusa su smještena u vegetativnim stanicama *Bacillus subtilis*, a njihova organizacija podsjeća na linearni poredak viđen u *C. crescentus*. Iako je područje ishodišta smješteno u blizini jednog pola, nije usidreno u staničnu membranu. (D) Međutim, sporulacijske stanice *B. Subtilis* usidravaju regiju ishodišta, preko RacA / DivIVA, na negativno zakrivljenu membranu na polu. Protein RacA se također veže duž kromosoma, zbijajući ga u dugi "aksijalni filament" prije sporulacije. (E) U *E. coli* ishodište replikacije smješteno je na sredini stanice i dvije ruke kromosoma su podijeljene u suprotne stanične polovice. Terminus regija je široko lokalizirana (strelice) i može se naći na obje strane od staničnog centra. Prilagođeno prema Toro i Shapiro (2010).

2.2.3. Lokalizacija kromosoma u *Escherichia coli*

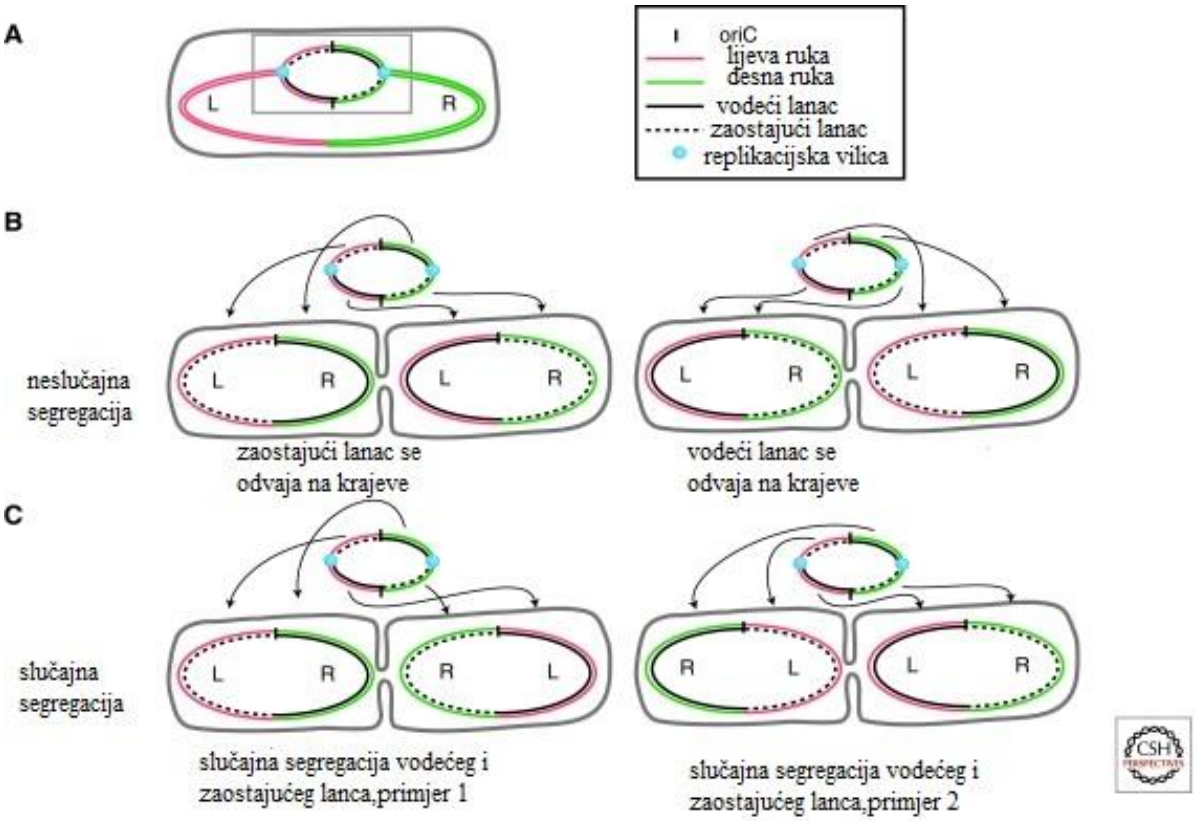
Organizacija kromosoma u *E. coli* se činila sličnom onoj u *B. subtilis* i *C. crescentus*, s lokusom *oriC* na jednom polu stanice i lokusom *ter* na drugom (Gordon i sur., 1997). Kasniji radovi su pokazali drugačiju, složeniju sliku. Na početku staničnog ciklusa, polako rastuće stanice *E. coli* stavljaju *oriC* na sredinu stanice (slika 2E) (Wang i sur., 2006). Analiza FISH je ukazala da je kromosom u *E. coli* linearno organiziran, kao i u stanici *C. crescentus*, ali ne i uzduž osi *ori-ter* (Niki i sur., 2000). Pokusi s dvostrukim obilježavanjem su pokazali da se svaka kromosomska ruka lokalizira na zasebnoj polovici stanice (Wang i sur., 2006). Područje terminus je široko rasprostranjeno, pojavljujući se zajedno s lijevom i desnom rukom kromosoma u jednakom omjeru (slika 2E, strelice) (Wang i sur., 2006).

Nakon binarne diobe u *E. coli* dva ishodišta replikacije *oriC* se kreću na mjesto četvrtine stanice i većina kromosoma ima konfiguraciju lijevi i desni te lijevi i desni replikor (*engl*. Left - Right - Left - Right replichores, <L-R-L-R>; slika 3) (Wang i sur., 2006).



Slika 3. Organizacija kromosoma u *E. coli.* Ishodište replikacije *oriC* kromosoma *E. coli* se nalazi na sredini stanice, a svaka ruka kromosoma u posebnoj polovini stanice (vrh slike). Terminus područje je široko raspoređeno po uzdužnoj osi stanice (nije prikazano). Kada krene replikacija (sredina slike) u svaku stanicu kći *oriC* je odvojen u četvrtinu stanice i kad je replikacija završena kromosomi kćeri dobivaju translacijski simetrični oblik kromosoma <L-R-L-R> (dno slike). Prilagođeno prema Toro i Shapiro (2010).

Translacijski simetrična organizacija ruku kromosoma predviđa zrcalnu simetriju s obzirom na segregaciju vodećih, odnosno zaostajućih lanaca replikacije (Wang i sur., 2006). Da bi se postigla konfiguracija <L-R-L-R>, oba vodeća lanca moraju biti odvojena dalje od centra stanice, dok zaostajući lanci ostaju bliže centru ili obratno (White i sur., 2008). White i suradnici (2008) su pokazali da su vodeći lanci odvojeni na rubovima stanice. Korištenjem specijalne metode, inducirali su specifičnu *in vivo* razgradnju kopije zaostajućeg lanca replikacije, jednog lokusa u kromosomu *E. coli*. Ispitujući lokalizaciju preostalog, kopije vodećeg lanca replikacije, pokazali su da je u otprilike 90 % stanica, vodeći lanac odvojen na vanjskim rubovima stanice (slika 4B, desno) (White i sur., 2008).

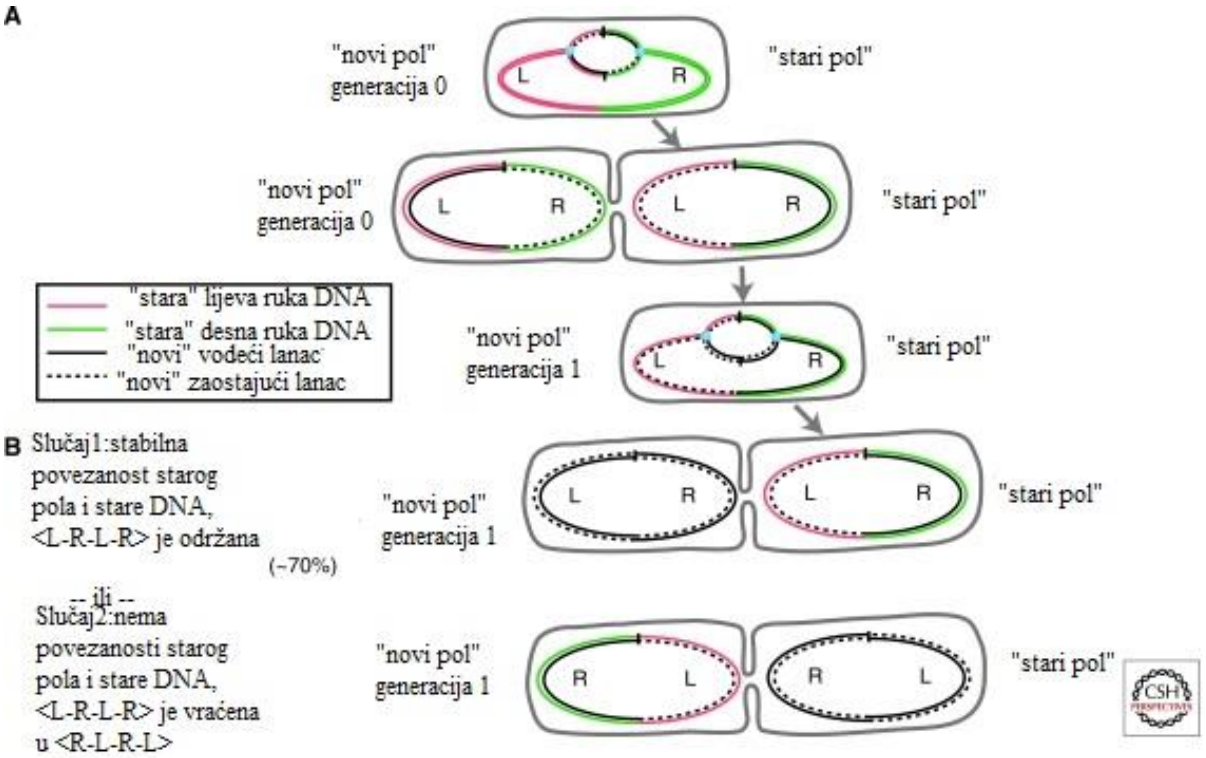


Slika 4. Neslučajna segregacija u *E. coli.* (A) Prikazana je stanica majka i replikacija kromosoma, naglašavajući lijevu i desnu ruku kromosoma kao i razliku između vodećih repliciranih lanaca (pune crne linije) te zaostajućih repliciranih lanaca DNA (isprekidane crne linije). Replikacijski mjehurić (sivi pravokutnik) je također prikazan i ponovljen iznad svakog primjera u B i C za ilustraciju ishodišta svake konfiguracije. (B) Za postizanje konfiguracije <L-R-L-R>, potrebno je da se oba zaostajuća lanca ili oba vodeća lanca odvoje u stanici dalje od centra. U otprilike 90 % slučajeva uočena je segregacija vodećih lanaca dalje od centra (desno). (C) Ako je nametnuta slučajna segregacija vodećih i zaostajućih lanaca, onda se konfiguracija <L-R-L-R> ne može postići te se pojavljuje zrcalna simetrija (npr., <L-R-R-L>). Prilagođeno prema Toro i Shapiro (2010).

Ova sklonost vodećeg lanca za vanjskim rubovima stanice ne mora nužno voditi do segregacije besmrtnih lanaca, što postulira neslučajna segregacija starih i novih lanaca DNA (Lansdorp, 2007). Zbog semikonzervativne prirode replikacije DNA, svaki krug sinteze proizvode se dva kromosoma od kojih se svaki sastoji od novo sintetiziranog lanca i starog

lanca. Isto tako, svaki krug diobe stanica proizvodi dvije stanice od kojih svaka ima novo sintetizirani stanični pol, kao i stari pol. Hipoteza besmrtnog lanca postulira da će stara DNA biti sigurno odijeljena na stari pol, prema tome stvarajući stabilnu i potencijalno beskonačnu povezanost jednog određenog pola s jednim određenim lancem DNA. Dakle, podrijetlo fraze – „besmrtni lanac“ segregacija.

Segregaciju vodećeg odnosno zaostajućeg lanca otkrili su White i suradnici (2008), a ona je malo drugačija od segregacije besmrtnog lanca (slika 5). Pod segregacijom vodećeg lanca, moguć je prelazak starog pola u kromosom stanice kćeri. Sve dok se vodeći lanac tog kromosoma nalazi bliže starom polu, hipoteza White i suradnici (2008) vrijedi. Ova hipoteza će promijeniti kromosomsku konfiguraciju sljedeće generacije iz <L-R-L-R> u <R-L-R-L> (slika 5). Dakle, slijedeći dva markera u uzastopnim generacijama, moguće je izmjeriti stupanj do kojeg *E. coli* prolazi kroz segregaciju besmrtnog lanca. Wang i suradnici (2006) su izmjerili da od 17 diobi, 12 ih je zadržalo < L-R-L-R> konfiguracija, četiri se promijenilo na zrcalnu simetriju (<L-R-R-L> ili <R-L-L-R>), a jedan je vraćen u <R-L-R-L>. Dakle, iako je otprilike 90 % stanica pokazalo neslučajnu segregaciju vodećeg lanca, segregacija besmrtnog lanca se dogodila u samo otprilike 70 % (12/17) staničnih dioba.



Slika 5. Segregacija uz nasljeđivanje besmrtnog lanca u odnosu na segregaciju vodećeg lanaca. Prikazane su dvije generacije replikacije DNA i segregacije, koje ilustriraju povezanost stare DNA sa starim polom stanice. Treba imati na umu da u svim slučajevima, segregacija vodećeg lanca se održava u stanici dalje od centra. (A) Nakon prve generacije, obje stanice kćeri nose jedan "novi" i jedan "stari" lanac DNA (crna i obojena). (B) U drugom krugu segregacije, moguća su dva ishoda : (1) segregacija besmrtnog lanca je zadržana i "stari" pol ostaje povezan sa "starim" lancem DNA (vrh slike). Taj slučaj je primijećen u stanicama *E. coli* u otprilike 70 % slučajeva; (2) segregacija besmrtnog lanca nije zadržana, a "stari" pol je primio dva "nova" lanca DNA. U tom slučaju, konfiguracija kromosoma se mijena iz <L-R-L-R> u <R-L-R-L>. Prilagođeno prema Toro i Shapiro (2010).

Hipoteza besmrtnog lanca je također bila testirana u *C. crescentus* (Osley i Newtona 1974) i *B. subtilis* (Errington i Wake, 1991) te je u oba slučaja utvrđeno da će se kromosomi odvojiti nasumično u stanice kćeri. Budući da ni jednu od tih vrsta ne odlikuje lijeva i desna ruka kromosoma, neslučajna segregacija može se odnositi na orijentaciju kromosoma u stanici.

2.3. Segregacija DNA

2.3.1. Model replikona

Do sada, najutjecajnija hipoteza o bakterijskoj segregaciji bila je model replikona koji su predložili Jacob i suradnici (1963). Jacob i suradnici (1963) utvrdili su elektronskom mikrografijom tankog presjeka usidrenje određenih, specifičnih dijelova DNA u staničnoj membrani. Ako su sestrinski kromosomi vezani na staničnu membranu, a rast se odvija između dva vezna mjesta, segregacija DNA se može postići pasivno kao tvorevina istezanja stanica. Da bi Jacobov model bio moguć, dvije stvari moraju biti istinite: prvo, kromosom mora biti fizički vezan na staničnu stjenku na specifičnom mjestu i drugo, stanična stjenka mora rasti na nejednake načine. Ta predviđanja su dovela istraživače do traženja specifične povezanosti ishodišta replikacije s membranom, a što je i pronađeno u nekoliko vrsta bakterija (Bowman i sur., 2008), kao i zonalni rast stanične stjenke, što je utvrđeno da je prisutno ili odsutno, ovisno o organizmu (Cole i Hahn, 1962).

Mnoge ispitivane interakcije kromosomske DNA i stanične membrane osjetljive su na rifampicin (antibiotik), inhibitor transkripcije (Dworsky i Schaechter, 1973), ukazujući da su posredovane velikom raznolikošću u bakterijskim membranama povezanih s transkripcijom, translacijom i umetanjem nascentnog polipeptida u i kroz membranu tzv. transerciom. Međutim, neke od DNA-membrana interakcija bile su otporne na rifampicin, što ukazuje da

su barem neka mjesta na kromosomu, uključujući i *oriC*, bila posebno usidrena u staničnu membranu pomoću DNA vezujućih proteina (Jacq i Kohiyama, 1980).

Druga dva zapažanja podržavaju model replikona: prvo, bakterijski nukleoidi obojeni s nespecifičnim bojama za DNA djeljeni su postepeno, za razliku od eukariota (Van Helvoort i Woldringh, 1994) i drugo, rane genetske analize za razdvajanje mutanata u *E. coli* su dali uspjehe, koji su uključeni u rješavanje topoloških problema povezanih s segregacijom (Hiraga i sur., 1989), ali ne i proteine koji bi učestvovali u pokretanju (Wheeler i Shapiro, 1997). U *E. coli* protein MukB, identificiran u genetičkim analizama mutanata, bio je kratko spominjan kao nedostajući molekulski motor, temeljen na činjenici da je postojao kao DNA vezajući homodimer koji može vezati ATP / GTP i imao je zavojitu domenu, karakterističnu molekularnim pokretačnima kao što su miozin i kinezin (Niki i sur., 1992). Međutim ispostavilo se da protein MukB nije pokretač. U odsutnosti proteina koji generiraju pokretačku silu, pasivna segregacija se činila kao logičan izbor.

2.3.2. Segregacija putem nenamjenskog modela

Unatoč popularnosti modela replikona, došlo je do pojave dokaza protiv njega. Ne samo da se zonalni rast pojavljuje u ograničenom podskupu vrsta, uskoro je postignuto i neposredno obilježavanje specifičnih DNA lokusa u živim stanicama te je postalo jasno da je njihova brzina kretanja bila prebrza da se odnosi na stanični rast (Gordon i sur., 1997). Uživo praćeni eksperimenti su također pokazali da je segregacija kromosoma progresivna, tj. lokusi DNA su odvojeni, dok je replikacija bila još uvijek u tijeku (Viollier i sur., 2004), ali to nije apsolutno pravilo; npr., u *E. coli*, postoje dokazi da regija ishodišta prolazi kratko razdoblje "kohezija sestrinskih kromatida", nakon čega je cijela regija segregirana kao pojedinačna jedinica (Bates i Kleckner, 2005). Ostale regije *E. coli* kromosoma, međutim, segregiraju se progresivno (Nielsen i sur., 2006a).

Isprekidano odvajanje DNA, zajedno s činjenicom da nisu pronađeni proteini koji stvaraju silu za razdvajanje, dalo je povoda za novi nenamjenski model, čiji je cilj bio objasniti brzu segregaciju u nedostatku diobenog sustava. Postavljena je hipoteza da bi sila u produkciji DNA polimeraze (Lemon i Grossman, 2001) ili RNA polimeraze (Dworkin i Losick, 2002) mogla pomoći odvojiti kromosome kćeri. Zanimljivo, također je predloženo da DNA segregacija može biti samoorganizirajući proces, vođena od strane odvajanja transercijskih domena (Woldringh, 2002) ili od entropijski isključenja sestrinskih kromosoma (Jun i Mulder, 2006). Svaki od tih modela je podržan nizom eksperimenata, a moguće je i da ti

mehanizmi doprinose glavnini segregacije DNA (Toro i sur., 2008). Međutim, nijedan ne može u potpunosti objasniti različita ponašanja uočena *in vivo*.

2.3.3. Segregacija putem namjenskog modela

Otprilike u isto vrijeme kada su nenamjenski modeli bili predloženi, nova zapažanja ukazala su da sustav nalik mitozi možda postoji i u bakteriji. Već je spomenut prolazni prijedlog da bi protein MukB mogao biti molekularni pokretač zadužen za segregaciju kromosoma. Drugi kandidat za stvaranje pokretačke sile bio je sustav ParABS.

Mali broj kopija plazmida poput P1 profaga u *E.coli* su nasljeđeni s visokom učinkovitošću, unatoč činjenici da manje kopija plazmida, kao npr. dvije mogu biti prisutne prije podjele (Prentki i sur., 1977). Ova opažanja su ukazivala da takvi plazmidi sadržavaju pregradni sustav, a izbacivanje P1 fragmenata su pokazala da je lokus ParABS bio neophodan i dovoljan za stabilnost niskom broju kopija replikona (Abeles i sur., 1985). Ovaj lokus sadrži tri komponente: specifični DNA vezujući protein ParB- veže se na sekvencu *parS* i ParA, vrsta ATPaze koja polimerizira i / ili oscilira iznad nukleoida u nekoliko odjeljenih sustava (Surtees i Funnell, 2003).

Do početka 2000. bilo je jasno da je odjeljivanje plazmida aktivno posredovano sustavom ParABS, kao i da kromosomi većine bakterija, ali ne i *E. coli* sadrže homologe lokusa *par*. Na temelju usporedbe sekvenci njegovih sastavnica kao što je ParA, ATPaza, kromosomski ParABS sustav pojedinog plazmida se razlikuje (Gerdes i sur., 2000). Ipak, pretpostavka da sustavi ParABS mogu zaista pokretati segregaciju bakterijskih kromosoma je bila podržana eksperimentima koji su pokazali da: (1) brisanje / iscrpljivanje komponenata sustava ParABS rezultira višim udjelima stanica bez jezgre (Ireton i sur., 1994) i (2) dodatak raznih kromosomskih sustava ParABS na nestabilni plazmid povećava njegovu učinkovitost prijenosa tijekom dijeljenja stanice (Godfrin-Estevenon i sur., 2002).

2.3.3.1. Sustav ParABS u *Vibrio cholerae* i *C. crescentus*

Rad u *Vibrio cholerae* je bio osnovni u dokazivanju važnosti sustava ParABS za segregaciju. *V. cholerae* nosi dva kromosoma (slika 2B), svaki sa svojom vlastitom posebnom segregacijskom dinamikom i sustavom ParABS, te veći od njih (kromosom I) pokazuje segregacijski obrazac koji podsjeća na onaj koji je uočen u *C. crescentus* (Fogel i Waldor, 2005). Rad Fogel i Waldor (2006) je pokazao da $parS_1$ segregira ispred $oriC_1$, sugerirajući da on može djelovati kao kromosomska centromera, tj. na mjestu sile naprezanja tijekom

segregacije. Toro i suradnici (2008) su proširili ovo opažanje u *C. crescentus* i utvrdili da *parS* uvijek segregira ispred svih ostalih lokusa, bez obzira na redoslijed replikacije. Nadalje, segregacija je odgođena kad je *parS* premješten na mjesto dalje od ishodišta replikacije, što ukazuje da segregacija ne može početi prije nego je lokus *parS* udvostručen. To je pokazalo da, barem u *C. crescentus*, nenamjenski modeli segregacije nisu u stanju pokrenuti segregaciju.

Zanimljivo je i kako sustav ParABS vrši svoju segregacijsku funkciju. Na temelju sustava fotografija (engl. time-lapse photography), promatranja dinamike proteina $ParA_1$ i $ParB_1$, Fogel i Waldor (2006) su predložili mehanizam potezanja. U *V. cholerae*, $ParA_1$ formira fluorescencijski "oblak" koji raste s pola nasuprot $parS_1$. Kada dosegne $parS_1$, oblak se prebaci iz rasta do kontrakcije, a jedan od novih dupliciranih primjeraka $ParB_1$ slijedi opadajući rub oblaka dok ne dosegne suprotni pol (Fogel i Waldor, 2006). Iako je zanimljiv, ovaj mehanizam još nije dokazan.

2.3.3.2. Odsutnost sustava ParABS – ostali mehanizmi

Složen problem, nekoliko vrsta (s izuzetkom *C.crescentus* i *V. cholerae* kromosoma II) i dalje odvajaju svoj kromosom normalno u većini stanica, čak i kad je sustav ParABS inaktiviran (Fogel i Waldor, 2006). To upućuje da postoje i drugi mehanizmi koji osiguravaju segregaciju kromosoma u odsutnosti sustava ParABS. Predloženo je da aktin kao protein MreB doprinosi segregaciji DNA (Gitai i sur., 2005). Drugi kandidat je sekvenca *migS* pronađena u *E. coli* (prisjetimo se da *E. coli* ne sadrži sustav ParABS na svom kromosomu).

Sekvencu *migS* su pronašli Yamaichi i Niki (2004), u eksperimentima s prekidima u kromosomima i stvaranju malih kromosoma . Tako genom u stanici ostaje nepromijenjen, osim činjenice da je sada mali komad kromosoma zasebna molekula. Koristeći ovu strategiju, Yamaichi i Niki (2004) su otkrili da je potrebna prisutnost, u cis položaju, od 25 pb sekvenca (*migS*) za pravilno razdvajanje *oriC*-proksimalne DNA, što je izmjereno FISH analizom. Lokus *migS* nije stabilizirao plazmide, niti je izazvo da se lokaliziraju na određenom substaničnom mjestu (Yamaichi i Niki, 2004). Unatoč tome, postoje čvrsti dokazi da lokus *migS* igra važnu ulogu u segregaciji kromosoma *E. coli* (Fekete i Chattoraj, 2005).

2.4. Metilacija DNA

Metilirana DNA se nalazi u genomima bakterija i arheja u obliku 6-metiladenozina (m6A), 4-metilcitozina (m4C) i 5-metilcitozina (m5C) (Korlach i Turner, 2012) te je produkt enzima DNA metiltransferaze (MTase) (Roberts i sur., 2015). Metiltransferaze su uglavnom sastavni dio restrikcijsko-modifikacijskog (RM) sustava (Loenen i sur., 2014), ali su također uključene i u popravak krivo sparenih baza u kromosomskoj DNA (Modrich i Lahue, 1996) i druge epigenetske regulatorne fenomene (Casadesús i Low, 2006). MTase kodirajući geni su prisutni u većini bakterijskih i arhejskih genoma, što sugerira da metilacija DNA može biti obilna. Iako su geni MTase prisutni u genomima mnogih prokariota, ukupna brojnost i obrasci prokariotske metilacije DNA te funkcionalna raznolikost metiltransferaza ostaju u velikoj mjeri nepoznanica.

2.4.1. Restrikcijsko-modifikacijski sustavi

Restrikcijsko-modifikacijski (RM) sustavi imaju središnju ulogu u obrani prokariotskih stanica, a njihovi konstitutivni enzimi su temeljni alat u modernoj molekularnoj biologiji (Loenen i sur., 2014).

RM sustavi obuhvaćaju restrikcijske endonukleaze (REase) i metiltransferaze (MTase) sa specifičnosti vezanja na istu DNA. Restrikcijska endonukleaza degradira DNA virusa i drugih egzogenih izvora, dok odgovarajuća metiltransferaza metilira potencijalna ciljna mjesta restrikcijskih endonukleza u genomu domaćina i tako ih štiti od cijepanja. RM sustavi su podijeljeni u četiri glavna tipa (Roberts i sur., 2015).

Tip I RM sustavi su složeni od više podjedinica; sustavi se sastoje od odvojenih REase i MTase podjedinica i zajedničke podjedinice (S) za prepoznavanje specifične DNA (Loenen i sur., 2014). S podjedinica u kombinaciji s dvije MTase podjedinice metilira DNA, dok S podjedinica u kombinaciji s dvije MTase podjedinice i dvije REase podjedinice rezultira restrikcijom. Tip I RM sustavi prepoznaju bipartitne motive (npr. CAGNNNNNTCA) i režu na velikim udaljenostima (do nekoliko kb) od njihovog veznog mjesta.

Tip II RM sustavi sadrže odvojene REase i MTase enzime, od kojih se očekuje da će pokazati specifičnost vezanja za identičnu DNA (Pingoud i sur., 2014). Oni se vežu na kratke, uglavnom palindromske motive (npr.GATC) i cijepaju DNA unutar ili u neposrednoj blizini mjesta prepoznavanja. Iznimke su tip IIG RM sustavi, jednolančani polipeptidi, koji sadrže oboje i DNA restrikcijsku i metilacijsku aktivnost. Oni se vežu na kratke nepalindromske sekvence (npr. GCCCAG) i cijepaju DNA izvan mjesta vezanja DNA (Pingoud i sur., 2014).

Kod tipa III RM sustava, metiltransferaza sadrži DNA specifičnu veznu domenu i tvori kompleks s restrikcijskim enzimom u cilju restrikcije (Rao i sur., 2014). Oni se vežu na kratke nepalindromske motive (npr., CGAAT) i režu izvan veznog mjesta DNA.
Na kraju, tip IV RM sustavi režu modificirane DNA i nemaju MTase komponentu (Loenen i Raleigh, 2014).
Poznavanje specifičnosti vezanja RM sustava je ključno za razumijevanje njihovih bioloških funkcija. Tradicionalni pristupi za određivanje specifičnosti RM sustava oslanjaju se na obrasce cijepanja DNA restrikcijskim enzimima, strategiju koja u velikoj mjeri ograničava otkriće Tip II RM sustavi, gdje REase veže i cijepa DNA na istom mjestu. Zbog tog ograničenja, poznato je nekoliko tisuća DNA specifičnih vezanja za tip II RM sustavi, obično manje za 100 od broja koji je poznat za svaki drugi tip RM sustava (Roberts i sur., 2015). Za tip I, IIG i III sustavi, koji režu izvan RM mjesta vezanja, noviji alternativni pristup iskorištava prednost identičnosti specifičnog motiva za metilaciju i restrikciju. U tim slučajevima, određivanje sekvenci metiliranih od MTase izravno može otkriti slijed prepoznavanja pratećeg REase, kao što je nedavno pokazano za pojedine RM sustave (Krebes i sur., 2014).

2.4.2. Orfan metiltransferaze

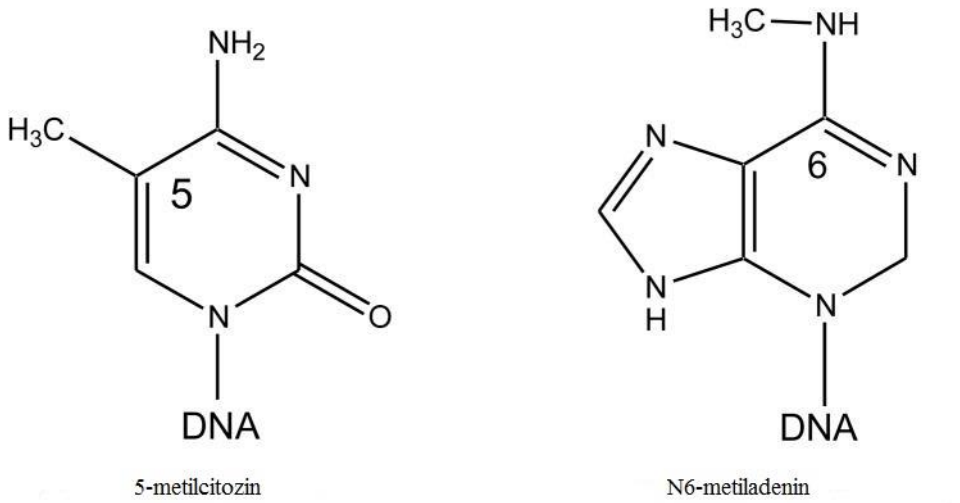
Osim RM-sustava, metiltransferaze također mogu biti uključene u regulaciju genoma prokariota (Casadesús i Low, 2006). Ovi enzimi obično se promatraju kao orfan (*engl*. orphan) metiltransferaze, a kodirani su u prokariotskim genomima u odsutnosti gena, koji kodiraju za srodni restrikcijski enzim (Seshasayee i sur., 2012).

Primjeri uključuju Dam metiltransferaze koje reguliraju vrijeme replikacije DNA i ekspresiju gena Gammaproteobacteria (Marinus i Casadesus, 2009) i metiltransferaze CcrM koje reguliraju progresiju staničnog ciklusa Alphaproteobacteria (Collier i sur., 2007).

2.4.2.1. DNA metiltransferaze u *E. coli*

DNA *E. coli* K-12 sadrži dvije modificirane baze: 6-metil-adenin (6-meAde) i 5-metilcitozin (5-meCyt) (slika 6). Oko 1,5 % svih adenina (19,120 u GATC) i 0,75 % svih citozina (12,045 u CCWGG) u kromosomu su metilirani i modifikacije se događaju na specifičnim sekvencama uslijed djelovanja triju DNA metiltransferaza (tablica 1). EcoK adenin metiltransferaza koja je kodirana od strane gena *hsd* (*engl*. host specifity), dio je klasičnog

EcoK restrikcijsko-modifikacijskog sustava, a gen za četvrtu metiltransferazu YhdJ, ne izražava se u laboratorijskim uvjetima rasta (Broadbent i sur., 2007).



Slika 6. Struktura 5-metilcitozina i N^6-metiladenina. Prilagođeno prema Marinus i Lobner-Olesen (2014).

Tablica 1. DNA metiltransferaze u *E. coli* K-12. a) Podebljana baza je izmijenjena. b) Sva M.EcoK mjesta su metilirana. Za Dam i Dcm većina mjesta su metilirana, ali taj broj uključuje i hemimetilirana i nemetilirana mjesta. YhdJ metiliranje je ispod granice detekcije u ovim sljedovima. c) Restrikcijski enzimi prepoznaju isti slijed kao i metiltransferaze.

gen(i)	**modifikacijska metiltransferaza**	**sekvenca prepoznavanja**[a]	**broj u genomu**[b]	**restrikcijske endonukleaze**[c]
hsdSM	M.EcoK	-A**A**C(N^6)GTCG-	595	*Eco*KI
dam	Dam	-G**A**TC-	19,120	*Dpn*I, *Dpn*II, *Sau*3A
dcm	Dcm	-C**C**WGG-	12,045	*Eco*RII, *Bst*NI
yhdJ	YhdJ	-ATGC**A**T-	839	*Nsi*I

Enzim *Eco*KI reže samo ako je slijed nemetiliran; *Dpn*I cijepa samo ako je slijed metiliran; *Dpn*II cijepa samo na nemetiliranih mjestima; *Sau*3A reže bez obzira na stanje metilacije; *Eco*RII cijepa samo na nemetiliranih mjestima i na *Bst*NI rezanje ne utječe metilacija.

Enzim Dam (*engl*. DNA adenin metiltransferaza) modificira sekvence GATC, formira preko 99% 6-meAde DNA u *E. coli*, jer sojevi koji nemaju taj enzim sadrže samo doprinos koji se očekuje od enzima *Eco*K (Marinus i Morris, 1974).

Enzim Dcm (*engl*. DNA citozin metiltransferaza) je enzim, koji metilira mjesta CC (A / T)GG, odgovoran je za sve 5-meCyt u DNA, jer nijedna od ovih modificiranih baza ne može se otkriti u stanicama u kojima je uklonjen gen *dcm*.

Mutant *dam dcm hsdS* ne sadrži detektabilne modificirane baze u DNA, što znači da takve baze nisu esencijalne za vijabilnost *E. coli* (Russell i Hirata, 1989). No, iako funkcija gena *dam* nije bitna za vijabilnost *E. coli* (divlji tip), neophodna je u rekombinacijskim deficijentnim mutantima, kao što su npr., *recA, ruvABC* (Marinus, 2000), jer sudjeluje u *dam*-usmjerenom popravaku nesparenih baza. S druge strane, u nekim drugim bakterijskim vrstama kao što je *V. cholerae*, *C. crescentus*, Dam metilacija je esencijalna funkcija (Julio i sur., 2001); u *C. crescentus* je važna za privremenu ekspresiju gena koja je zauzvrat potrebna za koordinaciju inicijacije kromosoma, replikaciju i diobu. U praktičnom smislu, Dam i Dcm metilacije mogu spriječiti rezanje restriktivnog enzima, smanjiti učestalost transformacije u određenim bakterijama, smanjiti stabilnost kratkih izravnih ponavljanja ili su potrebne za usmjerenom mutagenezom i ispitivanje eukariotske strukture i funkcije.

2.4.2.2. Raspodjela sekvenci GATC u kromosomskoj DNA

Analize DNA sekvenci *E. coli* (Barras i Marinus, 1998) su pokazale sljedeće podatke o GATC tetranukleotidu:

(a) Zastupljen je u prosjeku svakih 243 nukleotida, što je blizu 1/256, što se očekuje u slučajnom slijedu baza.

(b) Prisutan je u višoj od očekivane frekvencije u brojnim kromosomskim mjestima (npr., *dnaA, rpsP, metL, malP,oriC).* Značaj je poznat za gene *dnaA* i *oriC* za reguliranje inicijacije replikacije kromosoma .

(c) Nalazi se češće u translatiranim regijama nego u ne-kodirajućim ili ne-prevedenim regijama, što je u skladu s češćim nadzorom popravka nesparenih baza. Od svih ispitanih gena, rRNA i tRNA-kodirajući geni su pokazali najmanju količinu GATC mjesta. Taj manjak može biti u korelaciji sa neželjenom sekundarnom palindromskom strukturom.

(d) Na kraju, GATC tetranukleotidi nikada nisu odvojeni od drugog GATC slijeda više od 2 kb. To dopušta *dam*-usmjerenom popravku nesparenih baza da se pojavljuje dužinom cijelog genoma, budući da je manje učinkovit na udaljenosti većoj od 2 kb (Modrich, 1991).

Prethodno opisani statistički podaci daju frekvenciju GATC mjesta u kromosomskoj DNA. Ova mjesta, međutim, mogu biti postojana u nemetiliranim, hemimetiliranim ili potpuno metiliranim konfiguracijama. Sva GATC mjesta u kromosomskoj i plazmidnoj DNA, izoliranoj iz *E. coli* konvencionalnim standardnim postupcima, se pojavljuju metilirana, a koristeći restrikcijske enzime kao što su *Dpn*I i *Dpn*II prati se stanje metilacije. *Dpn*I cijepa samo na metiliranim mjestima, dok *Dpn*II cijepa samo na nemetiliranih mjestima, a *Sau*3AI (ili *Bfu*CI) će cijepati bez obzira na status metilacije. Ni *Dpn*I, niti *Dpn*II ne razgrađuju hemimetilirane sekvence (Russell i Zinder, 1987).

Tehnike kao što su gel elektroforeza pulsirajućeg polja razgrađene DNA i specifične procedure obilježavanja završetaka (Ringquist i Smith, 1992) pokazuju da *E. coli* kromosom sadrži oko 36 specifičnih, nemetiliranih *dam* mjesta. Broj i jakost nemetiliranih mjesta u kromosomu se mijenja ovisno o fazi rasta te razini rasta, što ukazuje da proteini koji se vežu na njih mogu biti uključeni u ekspresiju gena ili održavanje kromosomske strukture. Nemetilirana mjesta pojavljuju se uglavnom (Ringquist i Smith, 1992) ili u cijelosti (Palmer i Marinus, 1994) modificirana u sojevima koji prekomjerno proizvode Dam, sugerirajući da se enzim natječe s drugim DNA veznim proteinima na tim određenim mjestima. Alternativno, na pojedinim GATC mjestima povećana koncentracija Dam može omogućiti modifikaciju DNA struktura, kao npr., non-B-oblik DNA, kao što je H-DNA (Parniewski i sur., 1990), koja su relativno otporna na metilacije na normalnoj staničnoj razini enzima. Metilacija mjesta GATC može utjecati na strukturu DNA jer vezana metil grupa strši u veliki utor, vodeći duplex do destabilizacije (Bae, 2003). Promjena u stabilnosti zavojnice zbog metilacije DNA, Dam metiliranje povećava zakrivljenost DNA, može se otkriti abnormalnom migracijom DNA fragmenata u denaturirajućim gelovima (Collins i Myers, 1987). Palindromske strukture koje sadrže GATC su također relativno otporne na Dam metilacije (Allers i Leach, 1995).

Osim gore spomenutih nemetiliranih mjesta GATC, otkrivene su hemimetilirane sekvence u kromosomu (Campbell i Kleckner, 1990). Ta mjesta su različita od hemimetiliranih GATC mjesta koja se javljaju kratkotrajno, odmah iza replikacijske viljuške zbog vremenskog odmaka u modificiranju novih Dam metilacijskih mjesta.

2.4.2.3. Raspodjela sekvenci CC (A / T) GG u kromosomskoj DNA

Analize Dcm sekvenci prepoznavanja, CCTGG i njegov komplement CCAGG, ukazuju da se pojavljuju više od očekivane frekvencije: svakih 385 bp umjesto svaki 512 bp što je predviđeno za slučajni redoslijed baza (Gómez-Eichelmann i Ramírez-Santos, 1993). Dcm metiltransferaza ima vrlo važnu ulogu u popravku vrlo kratkih dijelova (engl. Very Short Patch Repair, VSP). U stacionarnoj fazi stanica, Dcm sekvence su konstantno podvrgnute ciklusima deaminacije 5-meCyt, praćene popravkom nastale T-G neusklađenosti i naknadne remetilacije Dcm metilaze. Taj ciklus sprječava nakupljanje C umjesto T, mutacijske promjene u kromosomu, iako statistički podaci pokazuju da se takav pomak pojavljuje u niskoj frekvenciji (Bhagwat i McClelland, 1992).

Stanje metilacije na *dcm* mjestima može se pratiti pomoću razgradnje s *EcoR*II**,** koji reže samo ako je sekvenca nemetilirana i *BstN*I, koji cijepa bez obzira na stanje metilacije (tablica 1). Kao što je slučaj s *dam* mjestima, mali, ali neodređen broj nemetiliranih *dcm* mjesta je otkriven u kromosomskoj DNA *E. coli* (Ringquist i Smith, 1992). Pretpostavlja se da također moraju postojati hemimetilirana *dcm* mjesta u kromosomskoj DNA, ali njihovo postojanje još nije dokazano.

Istraga nemetiliranih i hemimetiliranih *dam* i *dcm* mjesta u kromosomima je pokazala korisnost ovog pristupa za otkrivanje područja kromosoma sa zanimljivim biološkim značajkama kao što su sekvence koje su vezane proteinima koji imaju regulatorne funkcije.

3. ZAKLJUČAK

Danas znamo da je bakterijski nukleoid orijentiran i vrlo organiziran unutar stanice, a neki od prvih uvida u visoko organizirane strukture bakterijskog kromosoma dao je model rozete, koji pokazuje da se kromosom sastoji od središnje jezgre održane zajedno RNA-DNA interakcijama i topološki neovisni petlji ili područja superzavijenosti. Prvi pokazatelj da bakterijski kromosom ima specifičnu orijentaciju unutar stanice došao je iz genetskih istraživanja u *Bacillus subtilis,* a nekoliko godina kasnije kada je postignuta direktna vizualizacija položaja kromosomskog lokusa, specifična orijentacija vidjela se i u *Caulobacte*r *crescentus*, gdje su geni *oriC* i *ter* lokalizirani na suprotnim staničnim polovima. Nakon što je utvrđeno da i *Cori* i *ter* strogo definiraju lokalizaciju ovisno o staničnom ciklusu, otkrivena je i organizacija ostatka kromosoma. Pronađen je linearni odnos između položaja bilo kojeg

DNA lokusa na kromosomskoj karti i njegovog položaja unutar stanice. Dakle, lokus koji je na 1/3 udaljenosti između *Cori* i *ter* na kromosomskoj karti, naći će se na 1/3 puta između starih i novih polova. Npr., u *C. crescentus* kromosomi su linearno organizirani i usidreni na pol preko *parS*/ParB/PopZ, a stanice u sporulaciji *B. subtilis* usidravaju regiju ishodišta na pol preko RacA/DivIVA. S druge strane u vegetativnim stanicama *B. subtilis,* organizacija kromosoma podsjeća na linearni niz viđen u *C. crescentus*, ali područje ishodišta iako je lokalizirano u blizini jednog pola, nije usidreno u staničnu membranu. Iz ove upečatljive organizacije možemo zaključiti da postoji mjesto/a privrženosti između DNA i stanične ovojnice koja osiguravaju pravilnu lokalizaciju odnosno pomoću kojih se kromosom zadrži na nekom određenom mjestu.

Takva organizacija se prenosi s jedne generacije na drugu progresivnom segregacijom kromosoma kćeri te sidrenjem DNA u staničnoj ovojnici. Za bakterijsku segregaciju kromosoma najprije se pojavio model replikona, koji je u skladu s usidravanjem određenih (specifičnih) dijelova DNA u staničnu ovojnicu zastupao da se DNA segregacija može postići pasivno kao produkt istezanja stanica, ali pronađeni su dokazi protiv takvog modela. Ne samo da se zonalni rast pojavljuje u ograničenom podskupu vrsta nego je i brzina kretanja određenih lokusa DNA bila prebrza da se odnosi na stanični rast. Eksperimenti su pokazali da je segregacija kromosoma progresivna, tj. lokusi DNA su odvojeni, dok je replikacija još uvijek bila u toku. Na kraju je dokazano da se segregacija u bakterija odvija preko sustava nalik mitozi, a način segregacije kromosoma se značajno mijenja od vrste do vrste.

Osim što je kromosom u bakteriji visoko organiziran i orijentiran, također podliježe kemijskim modifikacijama kao što je npr., DNA metilacija. Metilirana DNA je produkt enzima metiltransferaza, koji su uglavnom sastavni dio restrikcijsko-modifikacijskog sustava. Međutim, metiltransferaze također mogu biti uključene u regulaciju genoma prokariota, a ovi enzimi se promatraju kao orfan metiltransferaze jer su kodirani u odsutnosti gena, koji kodiraju za srodni restrikcijski enzim. Pomoću znanja o raspodjeli sekvenci, koje metiliraju takvi enzimi, mogu se identificirati područja kromosoma sa zanimljivim biološkim značajkama kao što je npr. popravak krivo sparenih baza i drugi epigenetski regulatorni fenomeni.

4. LITERATURA

Abeles, A. L., Friedman, S. A., Austin, S. J. (1985) Partition of unit-copy miniplasmids to daughter cells. III. The DNA sequence and functional organization of the P1 partition region. *J Mol. Biol*. **185**, 261–272.

Allers, T., Leach, D. R. (1995) DNA palindromes adopt a methylation-resistant conformation that is consistent with DNA cruciform or hairpin formation in vivo. *J Mol. Biol*. **252**, 70–85.

Bae, S. H., Cheong, H. K., Cheong, C., Kang, S., Hwang, D. S., Choi, B. S. (2003) Structure and dynamics of hemimethylated GATC sites: implications for DNA-SeqA recognition. *J Biol. Chem*. **278**, 45987–45993.

Barák, I., Wilkinson, A. J. (2005) Where asymmetry in gene expression originates. *Mol. Microbiol*. **57**, 611–620.

Barras, F., Marinus, M. G. (1988) Arrangement of Dam methylation sites (GATC) in the Escherichia coli chromosome. *Nucleic Acids Res*. **16**, 9821–9838.

Bates, D., Kleckner, N. (2005) Chromosome and replisome dynamics in *E. coli*: Loss of sister cohesion triggers global chromosome movement and mediates chromosome segregation. *Cell* **121**, 899–911.

Ben-Yehuda, S., Fujita, M., Liu, X. S., Gorbatyuk, B., Skoko, D., Yan, J., Marko, J. F., Liu, J.S., Eichenberger, P., Rudner, D. Z. et al. (2005) Defining a centromere-like element in *Bacillus subtilis* by identifying the binding sites for the chromosome-anchoring protein RacA. *Mol. Cell* **17**, 773–782.

Ben-Yehuda, S., Rudner, D. Z., Losick, R. (2003) RacA, a bacterial protein that anchors chromosomes to the cell poles. *Science* **299**, 532–536.

Bhagwat, A. S., McClelland, M. (1992) DNA mismatch correction by Very Short Patch repair may have altered the abundance of oligonucleotides in the *E. coli* genome. *Nucleic Acids Res*. **20**, 1663–1668.

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

Breier, A. M., Cozzarelli, N. R. (2004) Linear ordering and dynamic segregation of the bacterial chromosome. *Proc Natl Acad Sci. U S A* **101**, 9175–9176.

Broadbent, S. E., Balbontin, R., Casadesus, J., Marinus, M. G., van der W. M. (2007) YhdJ, a nonessential CcrM-like DNA methyltransferase of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*. **189**, 4325–4327.

Burton, B. M., Marquis, K. A., Sullivan, N. L., Rapoport, T. A., Rudner, D. Z. (2007) The ATPase SpoIIIE transports DNA across fused septal membranes during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Cell* **131**, 1301–131.

Campbell, J. L., Kleckner, N. (1990) *E. coli oriC* and the *dnaA* gene promoter are sequestered from *dam* methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork. *Cell* **62**, 967–979.

Casadesus, J., Low, D. (2006) Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **70**, 830–56.

Cole, R. M., Hahn, J. J. (1962) Cell wall replication in *Streptococcus pyogenes*. *Science* **135**, 722–724.

Collier, J., McAdams, H. H., Shapiro, L. (2007) A DNA methylation ratchet governs progression through a bacterial cell cycle. *Proc Natl Acad Sci. U S A* **104**, 17111–17116.

Collins, M., Myers, R. M. (1987) Alterations in DNA helix stability due to base modifications can be evaluated using denaturing gradient gel electrophoresis. *J Mol. Biol*. **198**, 737–744.

Delius, H., Worcel, A. (1974) Electron microscopic studies on the folded chromosome of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **38,** 53–58.

Dworkin, J., Losick, R. (2002) Does RNA polymerase help drive chromosome segregation in bacteria? *Proc Natl Acad Sci. U S A* **99**, 14089–14094.

Dworsky, P., Schaechter, M. (1973) Effect of rifampin on the structure and membrane attachment of the nucleoid of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **116**, 1364–1374.

Ebersbach, G., Briegel, A., Jensen, G. J., Jacobs-Wagner, C. (2008) A self-associating protein critical for chromosome attachment, division, and polar organization in *Caulobacter*. *Cell* **134**, 956–968.

Toro, E., Shapiro, L. (2010) Bacterial Chromosome Organization and Segregation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2**, 349. doi:10.1101/cshperspect.a000349

Errington, J., Wake, R. G. (1991) Chromosome strand segregation during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol*. **5**, 1145–1149.

Fekete, R. A., Chattoraj, D. K. (2005) A cis-acting sequence involved in chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*. **55,** 175–183.

Fogel, M. A., Waldor, M. K. (2005) Distinct segregation dynamics of the two *Vibrio cholerae* chromosomes. *Mol. Microbiol* . **55**, 125–136.

Fogel, M. A., Waldor, M. K. (2006) A dynamic, mitotic-like mechanism for bacterial chromosome segregation. *Genes Dev*. **20**, 3269–3282.

Gerdes, K., Møller-Jensen, J., Bugge Jensen, R. (2000) Plasmid and chromosome partitioning: Surprises from phylogeny. *Mol. Microbiol*. **37**, 455–466.

Gitai, Z., Dye, N. A., Reisenauer, A., Wachi, M., Shapiro, L. (2005) MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. *Cell* **120**, 329–341.

Godfrin-Estevenon, A. M., Pasta, F., Lane, D. (2002) The parAB gene products of *Pseudomonas putida* exhibit partition activity in both *P. putida* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*. **43**, 39–49.

Gordon, G. S., Sitnikov, D., Webb, C. D., Teleman, A., Straight, A., Losick, R., Murray, A.W., Wright, A. (1997) Chromosome and low copy plasmid segregation in *E. coli*: Visual evidence for distinct mechanisms. *Cell* **90**, 1113–1121.

Gomez-Eichelmann, M. C., Ramirez-Santos, J. (1993) Methylated cytosine at Dcm (CCATGG) sites in *Escherichia coli*: possible function and evolutionary implications. *J Mol. Evol.* **37**, 11–24.

Hiraga, S., Niki, H., Ogura, T., Ichinose, C., Mori, H., Ezaki, B., Jaffé, A. (1989) Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: Novel mutants producing anucleate cells. *J Bacteriol*. **171**, 1496–1505.

Ireton, K., Gunther, N. W., Grossman, A. D. (1994) spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. **176**, 5320–5329.

Jacob, F., Brenner, S., Cuzin, F. (1963) On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*. **28**, 329–348.

Jacq, A., Kohiyama, M. (1980) A DNA-binding protein specific for the early replicated region of the chromosome obtained from *Escherichia coli* membrane fractions. *Eur J Biochem*. **105**, 25–31.

Jensen, R. B., Shapiro, L. (1999) The *Caulobacter crescentus* smc gene is required for cell cycle progression and chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci*. *U S A* **96**, 10661–10666.

Jensen, R. B., Wang, S. C., Shapiro, L. (2001) A moving DNA replication factory in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J*. **20**, 4952–4963.

Julio, S. M., Heithoff, D. M., Provenzano, D., Klose, K. E., Sinsheimer, R. L., Low, D. A., Mahan, M. J. (2001) DNA adenine methylase is essential for viability and plays a role in the pathogenesis of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*. **69**, 7610–7615.

Jun, S., Mulder, B. (2006) Entropy-driven spatial organization of highly confined polymers: Lessons for the bacterial chromosome. *Proc Natl Acad Sci*. *U S A* **103**, 12388–12393.

Kavenoff, R., Bowen, B. C. (1976) Electron microscopy of membrane-free folded chromosomes from *Escherichia coli*. *Chromosoma.*. **59**, 89–101.

Korlach, J., Turner, S. W. (2012) Going beyond five bases in DNA sequencing. *Curr Opin Struct Biol.* **22**, 61-251. doi:10.1016/j.sbi.2012.04.002

Krebes, J., Morgan, R. D., Bunk, B., Sproer, C., Luong, K., Parusel, R. et al. (2014) The complex methylome of the human gastric pathogen Helicobacter pylori. *Nucleic Acids Res.* **42**, 2415–2432. doi: 10.1093/nar/gkt1201

Lansdorp, P. M. (2007) Immortal strands? Give me a break. *Cell* **129**, 1244–1247.

Lemon, K. P., Grossman, A. D. (2001) The extrusion-capture model for chromosome partitioning in bacteria. *Genes Dev*. **15**, 2031–2041.

Lenarcic, R., Halbedel, S., Visser, L., Shaw, M., Wu, L. J., Errington, J., Marenduzzo, D., Hamoen, L. W. (2009) Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. *EMBO J*. **28**, 2272–2282.

Loenen, W. A., Dryden, D. T., Raleigh, E. A., Wilson, G. G., Murray, N. E. (2014) Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* **42**, 3–19. doi: 10.1093/nar/gkt990

Loenen, W. A., Dryden, D. T., Raleigh, E. A., Wilson, G. G. (2014) Type I restriction enzymes and their relatives. *Nucleic Acids Res.* **42,** 20–44. doi: 10.1093/nar/gkt847

Loenen, W. A., Raleigh, E. A. (2014) The other face of restriction: modification-dependent enzymes. *Nucleic Acids Res*. **42**, 56–69. doi: 10.1093/nar/gkt747

Marinus, M. G., Casadesus, J. (2009) Roles of DNA adenine methylation in host-pathogen interactions: mismatch repair, transcriptional regulation, and more. *FEMS microbiology reviews.* **33,** 488–503. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00159.x

Marinus, M. G., Morris, N. R. (1974) Biological function for 6-methyladenine residues in the DNA of *Escherichia coli* K12. *J Mol. Biol.* **85**, 309–322.

Marinus, M. G. (2000) Recombination is essential for viability of an *Escherichia coli dam* (DNA adenine methyltransferase) mutant. *J Bacteriol*. **182**, 463–468.

Modrich, P. (1991) Mechanisms and Biological Effects of Mismatch Repair. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 229–253.

Modrich, P., Lahue, R. (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annual review of biochemistry*. **65**, 101–133.

Mohl, D. A., Gober, J. W. (1997) Cell cycle-dependent polar localization of chromosome partitioning proteins in *Caulobacter crescentus*. *Cell* **88**, 675–684.

Nielsen, H. J., Li, Y., Youngren, B., Hansen, F. G., Austin, S. (2006a) Progressive segregation of the *Escherichia coli* chromosome. *Mol. Microbiol*. **61**, 383–393.

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.

Niki, H., Yamaichi, Y., Hiraga, S. (2000) Dynamic organization of chromosomal DNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev*. **14**, 212–223.

Osley, M. A., Newton, A. (1974) Chromosomes segregration and development in *Caulobacter crescentus*. *J Mol. Biol*. **90**, 359–370.

Palmer, B. R., Marinus, M. G. (1994) The *dam* and *dcm* strains of *Escherichia coli*--a review. *Gene* **143**, 1–12.

Parniewski, P., Kwinkowski, M., Wilk, A., Klysik, J. (1990) Dam methyltransferase sites located within the loop region of the oligopurine-oligopyrimidine sequences capable of forming H-DNA are undermethylated in vivo. *Nucleic Acids Res.* **18**, 605–611.

Pingoud, A., Wilson, G. G., Wende, W. (2014) Type II restriction endonucleases—a historical perspective and more. *NucleicAcids Res*. **42**, 7489–527. doi: 10.1093/nar/gku447

Prentki, P., Chandler, M., Caro, L. (1977) Replication of prophage P1 during the cell cycle of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* **152**, 71–76.

Rao, D. N., Dryden, D. T., Bheemanaik, S. (2014) Type III restriction-modification enzymes: a historical perspective. *Nucleic Acids Res*. **42**, 45–55. doi: 10.1093/nar/gkt616

Ringquist, S., Smith, C.L. (1992) The *Escherichia coli* chromosome contains specific, unmethylated *dam* and *dcm* sites. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* **89**, 4539–4543.

Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J., Macelis, D. (2015) REBASE-a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. **43**, 298–299. doi: 10.1093/nar/gku1046

Robinow, C., Kellenberger, E. (1994) The bacterial nucleoid revisited. *Microbiol. Rev*. **58**, 211–232.

Robinow, C. F. (1956) The chromatin bodies of bacteria. *Bacteriol. Rev.* **20**, 207–242.

Robinett, C. C., Straight, A., Li, G., Willhelm, C., Sudlow, G., Murray, A., Belmont, A. S. (1996) In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. *J Cell Biol*. **135**, 1685–1700.

Russell, D. W., Hirata, R. K. (1989) The detection of extremely rare DNA modifications. Methylation in *dam*$^{-}$ and *hsd*$^{-}$ *Escherichia coli* strains. *J Biol. Chem.* **264**, 10787–10794.

Russell, D. W., Zinder, N. D. (1987) Hemimethylation prevents DNA replication in *E. coli*. *Cell* **50**, 1071–1079.

Ringquist, S., Smith, C. L. (1992) The *Escherichia coli* chromosome contains specific, unmethylated *dam* and *dcm* sites. *Proc Natl Acad Sci. U S A* **89**, 4539–4543.

Seshasayee, A. S., Singh, P., Krishna, S. (2012) Context-dependent conservation of DNA methyltransferases in bacteria. *Nucleic Acids Res*. **40**, 7066–7073. doi: 10.1093/nar/gks390

Sinden, R. R., Pettijohn, D. E. (1981) Chromosomes in living *Escherichia coli* cells are segregated into domains of supercoiling. *Proc Natl Acad Sci. U S A* **78**, 224–228.

Stonington, O. G., Pettijohn, D. E. (1971) The folded genome of *Escherichia coli* isolated in a protein-DNA-RNA complex. *Proc Natl Acad Sci. U S A* **68**, 6–9.

Surtees, J. A., Funnell, B. E. (2003) Plasmid and chromosome traffic control: How ParA and ParB drive partition. *Curr Top Dev Biol.* **56**, 145–180.

Teleman, A. A., Graumann, P. L., Lin, D. C., Grossman, A. D., Losick, R. (1998) Chromosome arrangement within a bacterium. *Curr Biol.* **8**, 1102–1109.

Toro, E., Hong, S. H., McAdams, H. H., Shapiro, L. (2008) *Caulobacter* requires a dedicated mechanism to initiate chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci. U S A* **105**, 15435–15440.

Viollier, P. H., Thanbichler, M., McGrath, P. T., West, L., Meewan, M., McAdams, H. H., Shapiro, L. (2004) Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication. *Proc Natl Acad Sci. U S A* **101**, 9257–9262.

Van Helvoort, J. M., Woldringh, C. L. (1994) Nucleoid partitioning in *Escherichia coli* during steady-state growth and upon recovery from chloramphenicol treatment. *Mol. Microbiol*. **13**, 577–583.

Wang, X., Liu, X., Possoz, C., Sherratt, D. J. (2006) The two *Escherichia coli* chromosome arms locate to separate cell halves. *Genes Dev*. **20**, 1727–1731.

Webb, C.D., Teleman, A., Gordon, S., Straight, A., Belmont, A., Lin, D. C., Grossman, A. D., Wright, A., Losick, R. (1997) Bipolar localization of the replication origin regions of chromosomes in vegetative and sporulating cells of *B. subtilis*. *Cell* **88**, 667–674.

White, M. A., Eykelenboom, J. K., Lopez-Vernaza, M. A., Wilson, E., Leach, D. R. (2008) Non-random segregation of sister chromosomes in *Escherichia coli*. *Nature* **455**, 1248–1250.

Wheeler, R. T., Shapiro, L. (1997) Bacterial chromosome segregation: Is there a mitotic apparatus? *Cell* **88**, 577–579.

Woldringh, C. L. (2002) The role of co-transcriptional translation and protein translocation (transertion) in bacterial chromosome segregation. *Mol. Microbiol*. **45**, 17–29.

Worcel, A., Burgi, E. (1972) On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *J Mol. Biol*. **71**, 127–147.

Wu, L. J., Errington, J. (1994) *Bacillus subtilis* spoIIIE protein required for DNA segregation during asymmetric cell division. *Science* **264**, 572–575.

Yamaichi, Y., Niki, H. (2004) migS, a cis-acting site that affects bipolar positioning of oriC on the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J*. **23**, 221–233.