

## Zellzyklus

# Präzise räumliche und zeitliche Organisation in Bakterien

CHRISTINE KAIMER, TOBIAS KNUST, PETER L. GRAUMANN\*  
 MIKROBIOLOGIE, FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE, UNIVERSITÄT FREIBURG  
 \*VAAM-FORSCHUNGSPREIS 2008

Der bakterielle Zellzyklus wird durch die Assemblierung und Disassemblierung von Proteinen zu bestimmten Zeitpunkten und an spezifischen Stellen in der Zelle angetrieben. Daran beteiligt sind das universelle Replikations-Initiatorprotein DnaA, der SMC-Chromosomen-Segregationskomplex und Filament-bildende Zytoskelettelemente wie das Tubulin-orthologe FtsZ, das die Zellteilung einleitet.

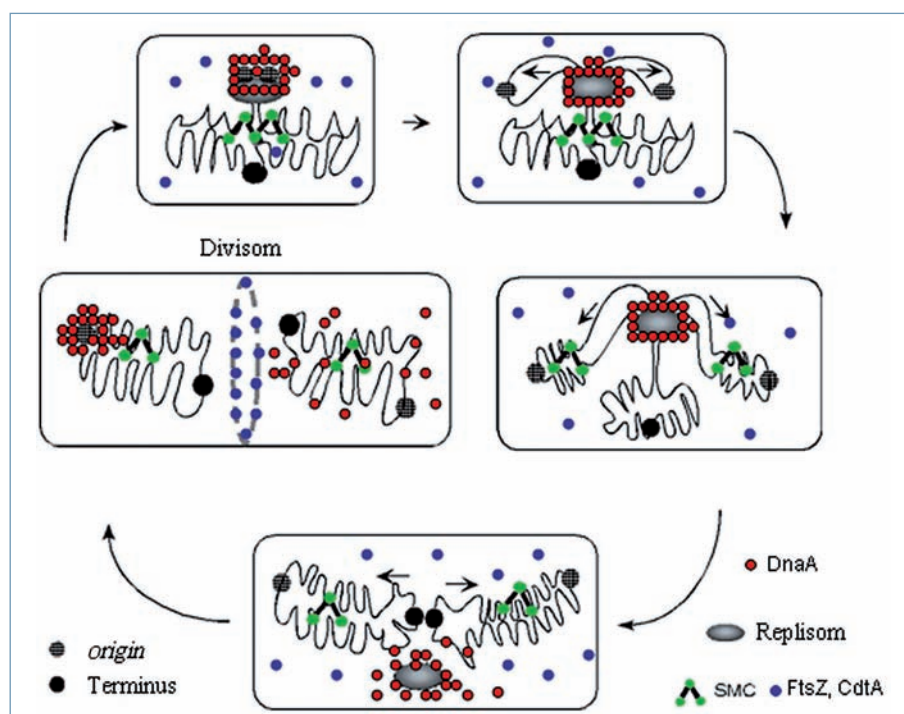
The bacterial cell cycle is largely driven through assembly and disassembly of proteins at certain time points and at specific sites within the cell. Key players are the replication initiator protein DnaA, the SMC chromosome segregation complex and filament forming cytoskeletal elements, such as FtsZ, which instigates cell division.

■ In bisher untersuchten Bakterien sind – mit Ausnahme von *Caulobacter crescentus* – nur sehr wenige Beispiele für die Steuerung von Zellzyklusprozessen durch Transkriptionsregulation bekannt. Viele Vorgänge müssen also posttranskriptionell reguliert sein, und in der Tat scheint ein Großteil der Zellzyklussteuerung über eine spezifische Steuerung der Lokalisation von Proteinen abzu-  
 laufen.

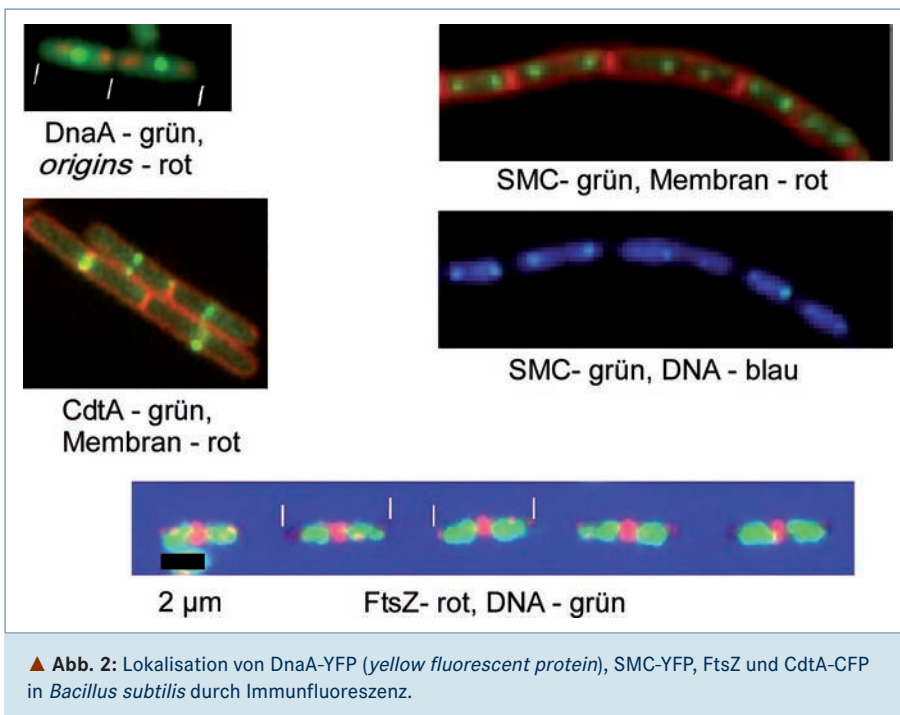
### Replikation

Alle Zellen müssen sicherstellen, dass die Replikation nur einmal pro Zellzyklus gestartet wird, egal wie schnell die Zelle sich verdoppelt. Bei niedriger Wachstumsrate besitzen Bakterien wie *Escherichia coli* zwei Replikationsgabeln, die etwa 50 Minuten benötigen, um das Chromosom zu verdoppeln. Bei hohen Wachstumsraten sind viele Replikationsgabeln in der Zelle vorhanden, sodass die Zelle sich in nur 20 Minuten teilen kann – zwei Replikationsgabeln sind schon so weit vorangekommen, dass wenige Minuten nach Beginn des neuen Zellzyklus zwei Chromosomen komplett verdoppelt sind, auf denen schon weitere Replikationskomplexe aktiv sind. Nur während des Übergangs von langsamem zu schnellem Wachstum darf die Zelle mehrfach initiieren; im exponentiellen

Wachstum ist eine Überinitiation letal. Die Steuerung erfolgt über das DnaA-Protein, das in ATP-gebundener Form an den Replikationsursprung (*origin*) bindet – vermutlich bei einem bestimmten Verhältnis von Protein zu Zellvolumen – und die Assemblierung der Replikationsmaschinerie startet. In *E. coli* wird eine erneute Initiation im Zellzyklus durch drei Vorgänge vermieden: Direkt nach der Verdopplung ist nur ein Strang der DNA (der alte Strang) am GATC-Motiv methyliert, DnaA benötigt jedoch eine Methylierung an beiden Strängen zur Bindung an die *origins*. Das SeqA-Protein wiederum bindet mit hoher Affinität an teilmethylierte GATC-Sequenzen und verhindert für eine Weile die Methylierung durch die Dam-Methylase. Zweitens bindet das Hda-Protein an die DnaN-Unterein-



▲ **Abb. 1:** Modell des bakteriellen Zellzyklus für langsam wachsende Bakterien. Schwarze Linien: Chromosom, Pfeile: Richtung der Segregation von verdoppelten Chromosomen-Abschnitten. DnaA initiiert die Replikation am Ursprung (*origin*) und wird dann an die Polymerase-Maschinerie (Replisom) quantitativ assoziiert, sodass nach der nachfolgenden Bewegung der neuen Origins eine erneute Bindung von DnaA verhindert wird. Der SMC-Komplex bildet ein Kondensationszentrum in jeder Zelhälfte aus und organisiert dort die Anordnung der Chromosomen, während das das Tubulin-orthologe FtsZ-Protein nach erfolgter Segregation als Ringstruktur (Divisom, enthält mindestens acht weitere Proteine) die Zellteilung induziert.



heit der aktiven DNA-Replikationsmaschinerie und induziert daraufhin die ATPase-Aktivität von DnaA, das dadurch inaktiviert wird. Drittens liegt in der Nähe des *origin* der *dat*-Genort, an dem sich viele DnaA-Bindemotive befinden. Durch die Verdopplung von *dat* werden viele DnaA-Moleküle gebunden und aus dem Pool an freiem DnaA titriert. Je mehr diese Mechanismen ausgeschaltet werden, desto dramatischer ist die Überinitiation und desto weniger lebensfähig sind die Zellen<sup>[1]</sup>. Da die *Dam*-, *SepA*-, *Hda*- und *dat*-Systeme nur in Enterobakterien vorhanden sind, müssen gänzlich andere Mechanismen der Steuerung der Replikation in allen anderen Bakterien operieren.

Ein Mechanismus, der über räumliche Absonderung von DnaA zu funktionieren scheint, existiert in *Bacillus subtilis*. Zu dessen Verständnis muss ein wichtiges Konzept des bakteriellen Zellzyklus eingeführt werden, das von Alan Grossman (MIT) gefunden wurde. In allen bisher untersuchten Bakterien befindet sich die Replikationsmaschinerie in der Zellmitte, und beide Replikationsgabeln liegen räumlich beieinander<sup>[2]</sup>. Dies bedeutet, dass sich nicht die Polymerasen über das Chromosom bewegen, sondern das Chromosom während seiner Verdopplung durch die Zellmitte wandert (**Abb. 1**). Die verdoppelten Abschnitte des Chromosoms werden dann von der Zellmitte aus in entgegengesetzter Richtung in beide Zellhälften bewegt (**Abb. 1**), sodass schon während der Replikation die

Segregation der Schwesterchromosomen erfolgt (anders als im Zellzyklus der eukaryotischen Zellen). Besitzt die Zelle bei schnellem Wachstum mehrere (vier oder acht) Replikationsgabeln, sind diese in Paaren in beiden Zellhälften vorhanden, sodass sich das Schema in **Abbildung 1** multipliziert, die räumliche Organisation aber erhalten bleibt. In *B. subtilis* ist DnaA zu Beginn des Zellzyklus mit den Replikationsursprüngen assoziiert und kann dort die Replikation starten. Ist jedoch die Replikationsmaschinerie etabliert, wird DnaA über das YabA-Protein quantitativ an die DnaN-Untereinheit der Replikationsgabeln geheftet, wohingegen die *origins* in Richtung der Pole bewegt werden (**Abb. 1**). DnaA hat damit keine Möglichkeit, erneut an die Ursprünge zu binden; damit ist die Initiation räumlich unterbunden, bis die Replikation beendet ist (**Abb. 1**, unten), nach der sich die Zelle rasch teilt. Die nächste Initiation erfolgt damit erst im nächsten Zellzyklus.

### Segregation

Die Wanderung der duplizierten Ursprünge und aller anderen Regionen des Chromosoms in Richtung der Zellpole (**Abb. 1**) läuft nach einem bisher nicht aufgeklärten Mechanismus ab, an dem Aktin-ähnliche Proteine beteiligt zu sein scheinen (s. u.). Durch Markierung unterschiedlicher Regionen auf den Chromosomen von *B. subtilis* und *E. coli* zeigte sich, dass alle verdoppelten Regionen des

Chromosoms in einer relativ konservierten räumlichen Position zu liegen kommen, sodass die verdoppelten Chromosomen ein bevorzugtes Arrangement besitzen. An der Bildung dieser definierten tertiären Struktur des Chromosoms ist das *Structural Maintenance of Chromosomes* (SMC)-Protein maßgeblich beteiligt. Dieses ungewöhnliche Protein ist von Bakterien bis hin zum Menschen konserviert und in einer Vielzahl von Chromosomendynamiken sowie in der DNA-Reparatur involviert. Eine Deletion des *smc*-Gens führt in den meisten Prokaryoten zu einer starken Dekondensation der DNA, wohingegen eine Überexpression zu einer starken Verkleinerung des Nukleoids (welches das Chromosom beinhaltet) führt. *In vivo* benötigt SMC noch zwei weitere Proteine, *ScpA* und *ScpB*, denen eine regulative Funktion zukommt. *In vivo*-Experimente mit fluoreszenzmarkierten SMC- und *Scp*-Proteinen zeigten, dass sich SMC am Anfang des Zellzyklus in der Zellmitte befindet. Sind die *origins* in Richtung der Zellpole gewandert, entstehen zwei SMC/*Scp*-Zentren, je eines in jeder Zellhälfte (**Abb. 1**, Mitte rechts, unten und **Abb. 2**)<sup>[3]</sup>. Von diesen Zentren aus wird die Kondensation des gesamten Chromosoms gesteuert, in Kooperation mit zellulären Topoisomerasen. In den Kondensationszentren arbeiten die Proteine des SMC-Komplexes dynamisch zusammen, wobei das SMC als riesige (50 nm) ringförmige Struktur an DNA bindet und vermutlich DNA-Schleifen ausbildet oder miteinander verknüpft<sup>[4]</sup>.

Kürzlich wurde in Einzelmolekül-Experimenten gezeigt, dass MukB, das SMC-Homolog aus *E. coli*, *in vitro* lineare DNA effektiv verkürzt und die DNA dabei in Schleifen stabilisiert<sup>[5]</sup>. Die Aufgabe des Komplexes *in vivo* könnte demnach die chromosomenweite Vernetzung benachbarter Regionen sein, die nach der Replikation aus der Zellmitte in Richtung der Zellpole transportiert worden sind und in den Kondensationszentren als in Schleifen geordnete Bereiche stabilisiert werden.

### Zellteilung

Nach erfolgreicher Replikation und Segregation der Chromosomen ist die Zellteilung der letzte Schritt im bakteriellen Zellzyklus. Die meisten stäbchenförmigen Bakterien wie *E. coli* oder *B. subtilis* teilen sich symmetrisch in der Zellmitte, sodass zwei identische Tochterzellen entstehen, die über dieselbe genetische Information verfügen.

An der Zellteilung sind mehrere Proteine beteiligt, die relativ hierarchisch an die Zell-

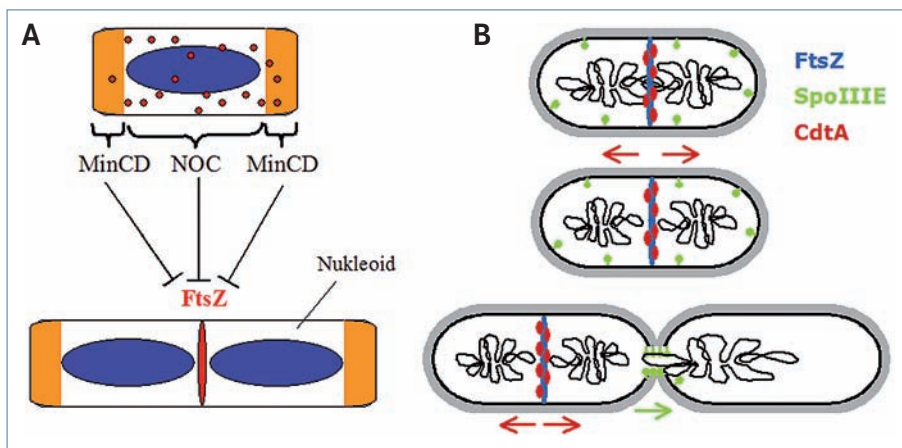
teilungsebene rekrutiert werden<sup>61</sup>. Als Initiator der Zellteilung fungiert in allen bisher untersuchten Bakterien das FtsZ-Protein, das Ähnlichkeit zur eukaryotischen Zytoskelettkomponente Tubulin aufweist. FtsZ bildet GTP-abhängig Filamente, die einen Ring in der Zellmitte formen (**Abb. 1**, Mitte links und **Abb. 2**). Die Ausbildung des Z-Rings wird durch verschiedene Proteine reguliert (FtsA, ZapA), die ebenfalls zur Zellmitte rekrutiert werden und mit FtsZ interagieren. Im nächsten Schritt gelangen mehrere Proteine zur Teilungsebene (DivIB, DivIC, FtsL in *B. subtilis*; FtsB, FtsQ, FtsL in *E. coli*), welche ihrerseits Proteine rekrutieren, die an der Synthese der Zellwand beteiligt sind. PBPs (*penicillin binding proteins*) assemblieren Peptidoglycan aus den Vorläuferverbindungen. Mit der Synthese der Zellwand zwischen den beiden Tochterzellen beginnt sich die Zellhülle einzuschnüren, und die Tochterzellen trennen sich voneinander. Eine bisher ungeklärte Frage betrifft die Einschnürung des Teilungsseptums: Zieht sich hierbei der Z-Ring

aktiv zusammen, oder ist die neu synthetisierte Zellwand die treibende Kraft der Kontraktion?

Die Teilung in zwei identische Tochterzellen setzt voraus, dass sich die Zellteilungsebene genau in der Zellmitte ausbildet und die replizierten Chromosomen komplett aus der Teilungsebene entfernt worden sind. Ersterer Prozess wird bei stäbchenförmigen Bakterien durch zwei Systeme gewährleistet, das Min-System und *nucleoid occlusion*. Am Min-System sind die Proteine MinC, MinD und DivIVA (*B. subtilis*) oder MinE (*E. coli*) beteiligt. Die MinCD-Komponenten bilden einen Komplex am Zellpol, der die Assemblierung des Z-Rings und damit die asymmetrische Teilung an den Polen verhindert (**Abb. 3A**). Während der MinCD-Komplex in *B. subtilis* durch DivIVA statisch am Zellpol lokalisiert ist, oszilliert der Komplex in *E. coli* zwischen den Zellpolen. MinE wandert dem MinCD-Komplex hinterher und löst ihn auf – er „jagt“ somit MinCD zwischen den Polen hin und her. Dadurch entsteht ein Gradient

von MinCD mit der größten Dichte an den Zellpolen und der geringsten in der Zellmitte<sup>71</sup>. Die Zellteilung darf nicht am Zellpol und auch nicht in einem Bereich der Zelle beginnen, in dem sich das Chromosom befindet. Das Noc-Protein (*nucleosid occlusion*, SlmA in *E. coli*) ist mit der DNA in der Zelle assoziiert und schließt die Assemblierung von FtsZ in diesem Bereich aus. Erst wenn die Schwesterchromosomen komplett voneinander getrennt sind, kann FtsZ in der Zellmitte die Ringstruktur ausbilden, wenn dort die Inhibition des Min- und des Noc-Systems nicht mehr greift (**Abb. 3A**).

Durch Stresssituationen (wie DNA-Brüche) kann die Chromosomensegregation verlangsamt sein und noch etwas DNA in der Zellteilungsebene verbleiben, welche aber nicht mehr für die NOC-Aktivität ausreichend ist. DNA-Translokasen sind für die Kopplung von verzögerter Chromosomensegregation mit der Zellteilung verantwortlich. Diese Proteine pumpen aktiv DNA aus dem Bereich der Zellteilungsebene (**Abb. 3B**). DNA-Translokasen



▲ **Abb. 3:** **A**, Modell der Steuerung der Ausbildung des FtsZ-Rings. MinCD inhibiert die Polymerisation von FtsZ an den Polen und Noc über dem Nukleoid, sodass FtsZ nur zwischen segregierten Nukleoiden einen Ring bilden kann. **B**, Modell der Kopplung von verspäteter DNA-Segregation und Zellteilung durch DNA-Translokasen. Das Protein CdtA bewegt DNA aus der Teilungsebene während der Zellteilung, wohingegen SpoIIIE als integrales Membran-Protein einen Kanal bildet, wenn DNA im Septum eingeschlossen wurde.

wie FtsK in *E. coli* und CdtA in *B. subtilis* werden als Komponente der Teilungsmaschinerie in die Zellmitte rekrutiert (**Abb. 2**) und transportieren die Chromosomen gezielt aus der Mitte in Richtung der Zellpole. Dabei können die Translokasen polare Sequenzen erkennen, die im Chromosom überrepräsentiert sind, und ihre Pumprichtung ändern, sodass die DNA stets in die richtige Richtung transloziert wird. In *B. subtilis* besteht noch ein „Back up-System“: Falls trotz aller Vorkehrungen DNA im Teilungsseptum hängen bleibt, assembliert eine zweite DNA-Translokase, SpoIIIE, in der Zellmembran und transportiert die DNA aus dem Septum in die Tochterzellen zurück (**Abb. 3B**). Während der Sporulation teilt sich die *B. subtilis*-Zelle asymmetrisch, und das polare Septum durchtrennt das Chromosom der Vorspore. SpoIIIE pumpt dann den Rest des Chromosoms in die kleinere Vorspore und gewährleistet somit den Fortgang der Differenzierung.

### DNA-Reparatur

Zur Reparatur von Brüchen in der DNA wird eine Maschinerie von über zehn Proteinen verwendet, die an Stellen mit Brüchen defi-

nierte Reparaturzentren (RZs) ausbilden und in diesen in einer annähernd hierarchischen Reihenfolge akkumulieren. Nach dem Entstehen von DNA-Brüchen wird die Zellteilung durch Induktion eines FtsZ-Inhibitors blockiert, und das RecA-Protein bildet von den RZs aus dynamische filamentöse Strukturen, die nach den homologen Bereichen auf den intakten Schwesterchromosomen suchen, um Cross-overs und damit die Reparatur der Brüche zu ermöglichen<sup>[8]</sup>. Auch die DNA-Reparatur ist demnach räumlich hochgradig organisiert, wobei die meisten Reparaturproteine auch schon vor der Induktion von Brüchen vorhanden sind, jedoch in geringerer Kopienzahl.

### Zytoskelett

Bakterien besitzen Aktin-ähnliche Proteine, genannt MreB, welche dynamische Filamente unterhalb der Zellmembran ausbilden<sup>[9]</sup>. MreB-Filamente bewegen sich entlang helikaler Bahnen, was vermutlich durch Polymerisation am Plus-Ende und Depolymerisation am Minus-Ende der Filamente erfolgt. Zum einen könnten diese Strukturen durch Adapterproteine in der Membran die Lokali-

sation von Zellwandsynthese-Enzymen steuern, sodass diese einen helikalen stäbchenförmigen Mureinsacculus synthetisieren. Zum anderen scheint MreB Einfluss auf die Segregation der Chromosomen auszuüben, eventuell über die Positionierung von putativen Proteinen, die die DNA aus der Zellmitte in Richtung Zellpol bewegen.

Die Untersuchung der Lokalisierung von Proteinen in Bakterien hat wichtige Einblicke in die Abläufe im Zellzyklus ergeben und gezeigt, dass in Bakterien viel mehr dynamische und räumlich hochgradig organisierte Prozesse ablaufen, als vorher vermutet. ■

### Literatur

- [1] Mott, M. L., Berger, J. M. (2007): DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 343–354.
- [2] Lemon, K. P., Grossman, A. D. (1998): Localization of bacterial DNA polymerase: evidence for a factory model of replication. *Science* 282: 1516–1519.
- [3] Mascarenhas, J., Soppa, J., Strunnikov, A. V., Graumann, P. L. (2002): Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in *Bacillus subtilis* that interact with SMC protein. *EMBO J.* 21: 3108–3118.
- [4] Volkov, A., Mascarenhas, J., Andrei-Selmer, C., Ulrich, H. D., Graumann, P. L. (2003): A prokaryotic condensin/cohesin-like complex can actively compact chromosomes from a single position on the nucleoid and binds to DNA as a ring-like structure. *Mol. Cell. Biol.* 23: 5638–5650.
- [5] Cui, Y., Petrushenko, Z. M., Rybenkov, V. V. (2008): MukB acts as a macromolecular clamp in DNA condensation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15: 411–418.
- [6] Errington, J., Daniel, R. A., Scheffers, D. J. (2003): Cytokinesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 52–65.
- [7] Lutkenhaus, J. (2002): Dynamic proteins in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 548–552.
- [8] Kidane, D., Graumann, P. L. (2005): Dynamic formation of RecA filaments at DNA double strand break repair centers in live cells. *J. Cell Biol.* 170: 357–366.
- [9] Graumann, P. L. (2007): Cytoskeletal elements in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 589–618.

### Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Peter Graumann  
 Mikrobiologie, Fakultät für Biologie  
 Universität Freiburg  
 Schänzlestraße 1  
 D-79104 Freiburg  
 Tel.: 0761-203 2630  
 Fax: 0761-203 2773  
 peter.graumann@biologie.uni-freiburg.de

### AUTOREN



#### Peter Graumann

1987–1997 Biologie-Studium und Promotion in Marburg. 1997–2000 Postdoktorand an der Harvard Universität. 2000–2004 Emmy-Nöther-Gruppe in Marburg. Seit 2005 Professor für Mikrobiologie in Freiburg. 2008 VAAM-Forschungspreis.



#### Christine Kaimer

1999–2005 Biologie-Studium in München. Seit 2005 Doktorandin in Freiburg.



#### Tobias Knust

2001–2006 Biochemie-Studium in Hannover. Seit 2006 Doktorand in Freiburg.