

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE



Bakalářská práce

Regulace buněčného cyklu u *Bacillus subtilis*

Regulation of cell cycle in *Bacillus subtilis*

Tomáš Zelenka

Školitel: RNDr. Irena Lichá CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.5.2012

Podpis

Děkuji RNDr. Ireně Liché CSc. za odborný dohled a užitečné rady při vypracování této bakalářské práce.

Obsah

1. Úvod	3
2. B fáze – iniciace replikace.....	4
2.1. DnaA – iniciátor replikace	4
2.1.1. Regulace iniciace replikace různými formami DnaA	6
2.1.2. Regulace iniciace replikace kompeticí DnaA o vazbu na oriC	7
2.1.3. Separace DnaA a oriC	7
2.1.4. Protein Soj – regulátor aktivity DnaA.....	8
2.2. Vztah iniciace replikace k velikosti buňky „cell-mass“	9
3. C fáze – vlastní replikace	10
3.1. Regulace průběhu replikace – regulace hladiny dNTPs.....	10
3.2. Segregace chromosomů.....	11
3.2.1. ParB – polarizace <i>Caulobacter crescentus</i>	13
3.2.2. RacA – segregace při sporulaci <i>B. subtilis</i>	13
3.2.3. Spo0J – segregace chromosomů u <i>B. subtilis</i>	14
4. D fáze - Cytokineze	14
4.1. Proteiny FtsZ a FtsA a tvorba Z prstence.....	15
4.2. Proteiny DivIB, FtsL a DivIC (FtsQLB).....	15
4.3. Další Fts proteiny	16
4.4. Min a Noc systém – regulace umístění Z prstence.....	17
4.4.1. Min systém – regulátor polární septace.....	17
4.4.2. Noc systém	19
4.5. Dokončení rozdělení buňky po vytvoření Z prstence	20
5. Závěr.....	21
6. Seznam použité literatury	23

Abstrakt

Vztahy mezi jednotlivými ději probíhajícími v bakteriální buňce během buněčného cyklu byly v posledních letech předmětem mnoha studií. Díky vyspělejšími metodám se ukázalo, že život bakteriální buňky má daleko více proměnlivých faktorů, než jsme se zpočátku domnívali. Relativně nedávné výzkumy dokázaly podhalit funkci, a v některých případech i molekulární podstatu, jednotlivých mechanismů, které v buňce koordinují procesy od průběhu replikace a její iniciace, segregace chromosomů vznikajících při replikaci, až po synchronizaci složité mašinerie samotného dělení buňky a v neposlední řadě také proměnlivost těchto procesů během měnících se životních podmínek buňky.

Klíčová slova: *Buněčný cyklus, replikace, segregace chromosomu, cytokineze, Bacillus subtilis*

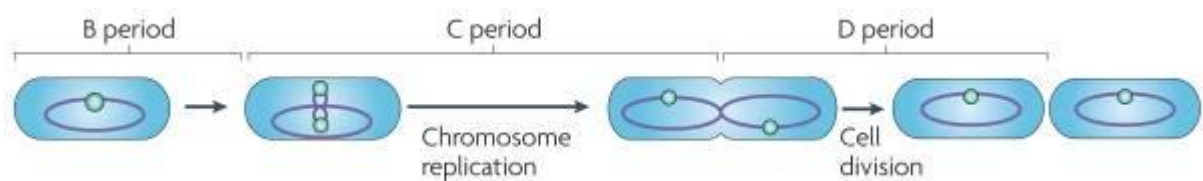
Abstract

Relations between several events running in bacterial cell during cell cycle were the subject of many studies during last years. More advanced techniques showed, that bacterial cell life has much more variable factors, than we supposed before. Relatively recent researches managed to reveal function and in few events molecular principle of several mechanisms coordinating those events such as progression of replication and its initiation, segregation of newly replicated chromosomes and after all synchronization of complex cell division machinery. Furthermore it showed variability of those events during changing living conditions of the cell.

Keywords: *Cell cycle, regulation, initiation, replication, segregation of chromosome, cytokinesis, Bacillus subtilis*

1. Úvod

V každé bakteriální buňce probíhá, od jejího vzniku z buňky mateřské, řada vzájemně propojených biologických dějů, mající za cíl dovést tuto buňku do fáze dalšího dělení. Obecně se toto období předcházející dělení buňky dělí na část mezi vznikem buňky a iniciací replikace (označováno jako B fáze), dále období vlastní replikace (C fáze) a jako poslední je definována část od replikace po kompletní rozdělení buňky (fáze D) (obr.1) (Wang and Levin 2009). Každá tato fáze obsahuje velké množství procesů, zajišťující buňce nakopírování genetické informace a syntézu komponent pro výstavbu buněčných struktur a ve finále jejich distribuci do nově vzniklých identických jedinců.



Obr. 1: *Bakteriální buněčný cyklus je tradičně rozdělen na tři epizody: období od vzniku (předchozího rozdělení) po iniciaci replikace (B fáze); průběh replikace (C fáze); od replikace po rozdělení (D fáze). Chromosomy jsou znázorněny jako fialové ovály, oriC oblasti jako zelené kruhy (Wang and Levin 2009, obr. 1).*

Na rozdíl od eukaryotických buněk, kde je přechod mezi fázemi soustředěn v kontrolních bodech, se celý cyklus buněk bakteriálních jeví spíše jako komplexní soubor simultánně probíhajících a různě se překrývajících procesů. Z tohoto důvodu se u organismů vyvinula řada různých regulačních mechanismů zajišťujících správnou návaznost a plynulý průběh buněčného cyklu. V buňce, jakožto trojrozměrném objektu, je však potřeba vedle správné časové návaznosti těchto dějů zajistit i odpovídající prostorové rozložení jednotlivých procesů. Tuto složitou mašinerii navíc dále doplňují další mechanismy regulující děje, které buňce pomáhají přežít v nepříznivých podmínkách.

Studie buněčného cyklu má velice obsáhlou historii, během které se názory několikrát měnily a upřesňovaly, především díky čím dál dokonalejším a přesnějším technikám. Díky tomu došlo v několika posledních letech k objasnění funkce mnoha významných proteinů a upřesnění názoru na funkci a hlavně koordinaci dříve známých proteinů, jakými jsou například multifunkční DnaA zodpovědný za iniciaci replikace, nebo hlavní složka divisomu protein FtsZ.

Tato práce má za cíl shrnutí nejnovějších poznatků týkajících se těchto mechanismů napříč buněčným cyklem u nejlépe prozkoumané Gram-pozitivní bakterie *Bacillus subtilis* a v některých případech zmínit odlišnosti od jiných druhů bakterií. Vzhledem k obsáhlosti tématu jsou hlavním cílem této práce mechanismy regulující buněčný cyklus za ideálních podmínek.

2. B fáze – iniciace replikace

Pro správné načasování dělení buňky je potřeba, aby byl zajištěn konstantní poměr mezi DNA a buněčnou hmotou, a to nezávisle na rychlosti růstu. Tento poměr je udržován během syntézy DNA, na úrovni iniciace replikace a poté změnami během elongace. Aby tyto dva mechanismy správně fungovaly, musejí být vzájemně propojeny. Iniciace replikace je obecně ovlivněna regulací syntézy a aktivity iniciačního proteinu DnaA. V případě pomalu rostoucích buněk je iniciace replikace regulována tak, aby v jeden okamžik v buňce probíhal jen jeden replikační proces. Naopak je tomu u buněk rychle rostoucích, kdy je doba zdvojení kratší než doba potřebná pro zreplikování celého chromosomu. V takových případech dochází k několikanásobné iniciaci replikace a v jeden okamžik probíhá v buňce zároveň několik replikačních procesů. Tento způsob replikace byl poprvé pozorován v roce 1964 (Yoshikawa et al. 1964).

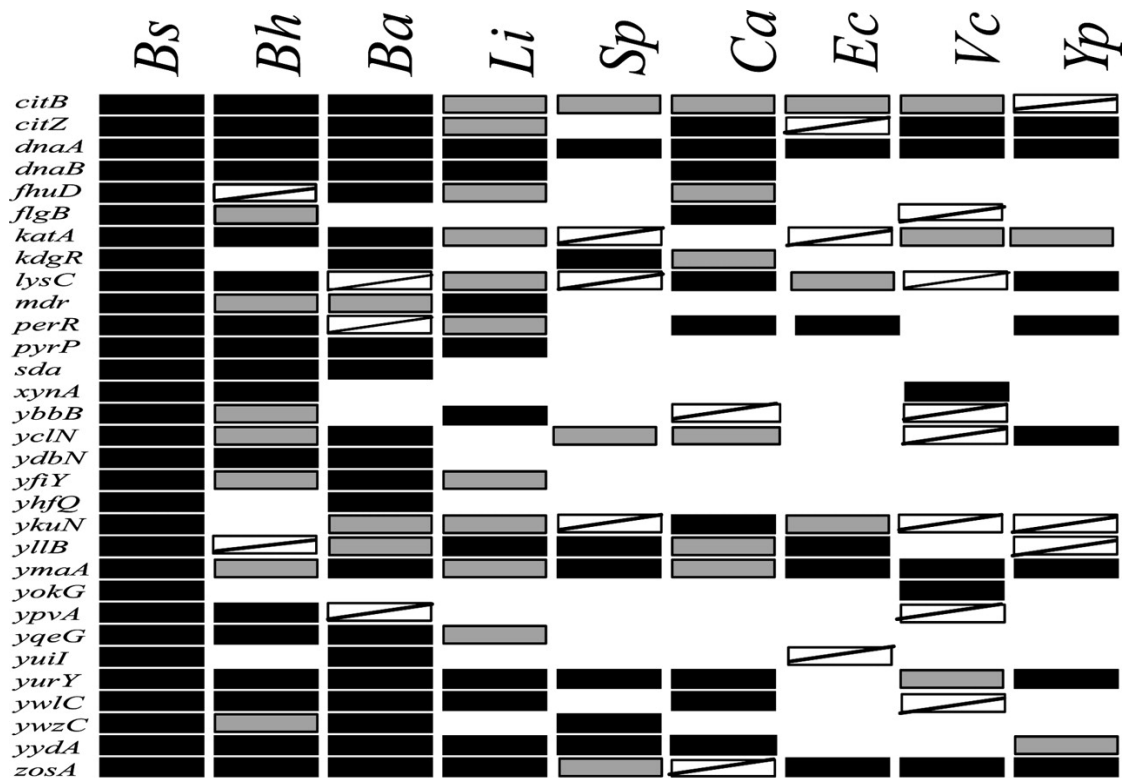
2.1. DnaA – iniciátor replikace

Jedná se o protein mající dvě hlavní funkce. Nejprve je zodpovědný za rozvolnění DNA v oblasti rozplétacího elementu, jež je součástí *oriC* oblasti. Po rozvolnění DNA dojde k nasednutí replisomu a k iniciaci replikace (Merrikh and Grossman 2009). Zadruhé má funkci transkripčního faktoru několika přilehlých genů, včetně sebe samého (Messer and Weigel 1997; Goranov et al. 2005). Díky této vlastnosti má regulační funkci pro celou řadu dalších procesů buněčného cyklu. Výčet takto regulovaných genů je v rámci rodu *Bacillus* značně konzervovaný a některé z nich jsou společné i mimo tento rod (obr. 2). Mezi hlavní, takto regulované geny, patří mimo jiné *citA* a *citB* (Goranov et al. 2005). Produkty těchto genů jsou složkami dvoukomponentového systému zajišťujícího katabolismus citrátu (Scheu et al. 2012).

Díky regulaci některých esenciálních genů pomocí DnaA je zajištěna provázanost DNA replikace s buněčným dělením. Hlavním regulovaným genem esenciálním pro buněčné dělení je *ftsL*, jež je součástí *yllB* operonu. Jedná se o gen kódující nestabilní protein FtsL, nutný pro

sestavení divisomu v D fázi (Daniel and Errington 2000; Bramkamp et al. 2006) (viz. kapitola 3). Díky jeho nestabilitě je pro udržení jeho hladiny vyžadována vysoká transkripční aktivita *ftsL*. V opačném případě dojde k rychlému poklesu koncentrace FtsL a blokaci dělení buňky.

U některých druhů bakterií jako je *Caulobacter crescentus* bylo pozorováno, že má DnaA navíc funkci pozitivní regulace *ftsZ*, genu kódujícího protein esenciální pro dělení (Scholefield et al. 2011) (viz kapitola 4.1.).



Obr. 2: Konzervovanost DnaA vazebných oblastí napříč různými bakteriálními druhy. Ukázány jsou první geny z 31 operonů *B. subtilis* (Bs), které jsou regulovány DnaA a mají své homology u jiných bakterií. V sedmi různých genomech byly vyhledány homologní geny, jejichž transkripce byla ovlivněna inhibicí DNA replikace. *Bacillus halodurans* (Bh), *Bacillus anthracis* (Ba), *Listeria innocua* (Li), *Streptococcus pneumoniae* (Sp), *Clostridium acetobutylicum*(Ca), *E. coli* (Ec), *Vibrio cholerae* (Vc) a *Yersinia pestis* (Yp). **Černé pole** – více DnaA vazebných míst s možností jedné neodpovídající báze, nebo alespoň jedno přesně odpovídající vazebné místo. **Šedé pole** – jedno vazebné místo s nepřesností v jedné bázi. **Přeškrtnuté pole** – žádné, více či méně, odpovídající vazebné místo. Chybějící pole znamená, že nebyl nalezen žádný homologní gen (odpovídající alespoň z 30%) (Goranov et al. 2005, obr. 4).

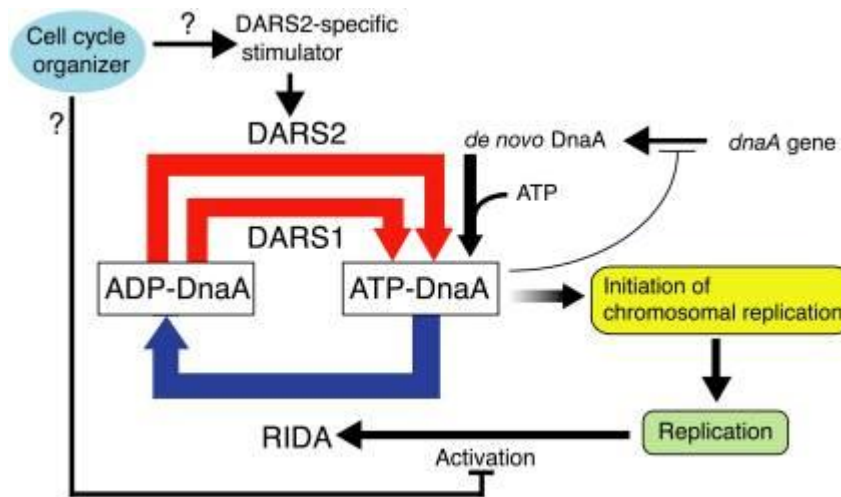
2.1.1. Regulace iniciace replikace různými formami DnaA

Způsobem, který se zdá být primárním při regulaci iniciace replikace je enzymová regulace aktivity proteinu DnaA. DnaA patří do skupiny AAA⁺ ATPáz, přičemž ATP-DnaA je jeho aktivní forma, která se přechodem na ADP-DnaA stává neaktivní. Důležitým faktem je, že nově vytvořená DnaA váže díky vyšší afinitě preferenčně ATP a tvoří tak ve větším množství aktivní formu (Sekimizu et al. 1987; Leonard and Grimwade 2011). Pro správné načasování iniciace replikace je nutné zajistit přesnou regulaci poměru aktivní a neaktivní formy DnaA a její dostupnost v buňce. Za tímto účelem fungují v buňce *E. coli* dva hlavní systémy, jejichž funkce musejí být vzájemně propojeny (obr.3). Mimo to je funkce DnaA proteinu ovlivňována také dalšími proteiny kompetujícími o DnaA vazebné místo.

Prvním systémem umožňujícím přechod mezi formami DnaA, který byl popsán u *E. coli*, je RIDA (Regulatory inactivation of DnaA). Tento systém je založen na proteinu Hda, který tvoří komplex se svorkou (DNA-loaded clamp) a ATP-DnaA. Vazba aktivní ATP-DnaA na Hda-clamp, aktivovaný navázáním ADP, vede ke stimulaci hydrolýzy ATP navázaného na DnaA, za vzniku neaktivního ADP-DnaA. Závislost tohoto mechanismu na svorce vázané u replikační vidlice zajišťuje jeho aktivaci pouze v případě probíhající replikace (Kato and Katayama 2001; Katayama et al. 2010).

Opětovnou reaktivaci DnaA zajišťuje systém DARS (DnaA reactivation sequences). Tento systém je založen na specifické sekvenci DARS, na které dochází k tvorbě DnaA homomultimerní struktury a specifickým interakcím mezi AAA⁺ doménami jednotlivých DnaA proteinů. Tyto interakce mají za následek disociaci ADP z DnaA-ADP komplexu. Po disociaci zůstává DnaA v apo-DnaA formě, jejíž interakce s DARS sekvencemi je značně nestabilní. Následuje uvolnění apo-DnaA z DNA a díky vyšší afinitě k ATP dojde k reaktivaci na DnaA-ATP formu (Fujimitsu et al. 2009).

U *B. subtilis* je DnaA v buňce majoritně ve své aktivní formě s navázaným ATP. Je to způsobeno absencí těchto mechanismů pro hydrolýzu navázaného ATP (Hill et al. 2012).



Obr. 3: Model DnaA regulačního a regulace iniciace replikace. Množství DnaA-ATP je regenerováno z DnaA-ADP systémem DARS koordinovaně s průběhem buněčného cyklu a vedoucím k iniciaci replikace. Poté je DnaA-ATP znovu inaktivována na DnaA-ADP systémem RIDA (Fujimitsu et al. 2009, obr. 8).

2.1.2. Regulace iniciace replikace kompeticí DnaA o vazbu na *oriC*

Tento způsob regulace iniciace replikace probíhá u *B. subtilis* jen v případě sporulace. Hlavní roli při tom hrají proteiny Spo0A a SirA. Spo0A se během sporulace váže na oblasti *incA* a *incB* v *oriC* oblasti a tím brání jeho rozvolnění a následné iniciaci replikace. Funkce SirA spočívá mimo jiné v rozrušení DnaA nacházející se na *oriC* (Moriya et al. 1988 obr. 1B; Castilla-Llorente et al. 2006; Wagner et al. 2009).

U *Escherichia coli* se oproti *Bacillus subtilis* vyvinul jiný způsob regulace vazby DnaA na *oriC*. Jedná se o protein SeqA, který se váže na specifické sekvence v oblasti *oriC*. Důležitý z hlediska funkce je fakt, že se do hemimethylované *oriC* váže s vyšší afinitou než aktivní ATP-DnaA, přičemž se oblasti pro vazbu SeqA a DnaA vzájemně překrývají. Je tedy zřejmé, že tímto způsobem je protein schopen neutralizovat aktivitu DnaA a tak znemožnit iniciaci replikace. Správná regulace je zajištěna průběhem semikonzervativní replikace, respektive produkcí hemimethylované DNA se kterou SeqA interaguje, tím brání vazbě DnaA a tím i iniciaci dalšího kola replikace v buňce (Katayama et al. 2010).

2.1.3. Separace DnaA a *oriC*

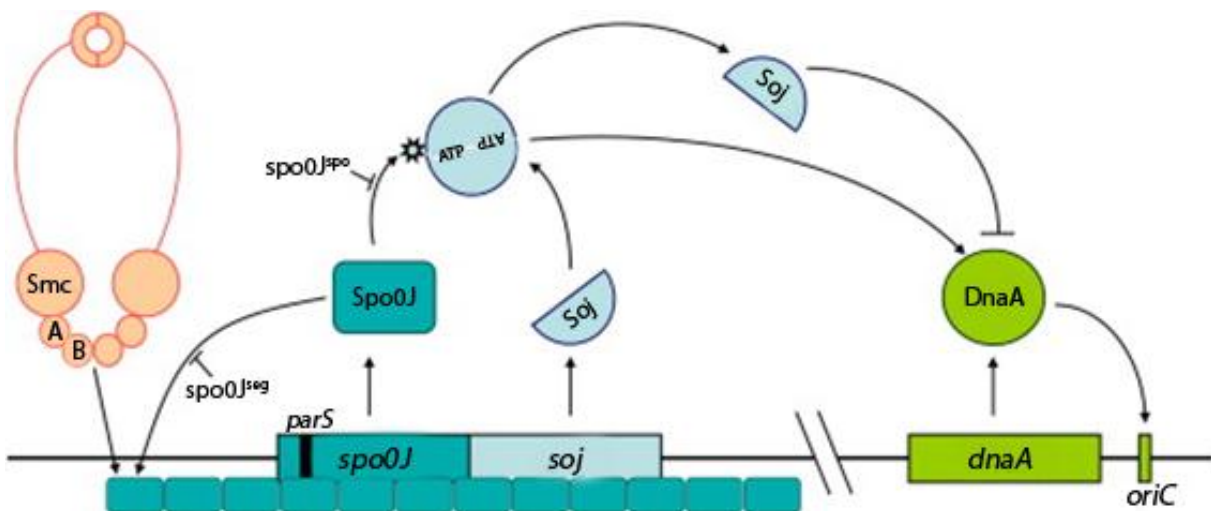
Dalším způsobem, jak probíhá regulace iniciaci replikace, je lokální snížení dostupnosti aktivního DnaA v *oriC* oblasti. U *Bacillus subtilis* tuto funkci zajišťuje protein YabA. Tento

protein je zachován zejména u Gram-pozitivních bakterií s nízkým poměrem GC párů. YabA je protein tvořící komplex spolu s DnaA a svorkou, který je lokalizován u replikační vidlice. To způsobuje, že replikační vidlice, posunující se v průběhu replikace směrem od *oriC*, spolu odnáší i značné množství proteinu DnaA, navázaného v komplexu s YabA a svorkou, a tím separuje protein DnaA od *oriC* (Katayama et al. 2010; Noirot-Gros et al. 2006).

2.1.4. Protein *Soj* – regulátor aktivity *DnaA*

Jednoduchým způsobem regulace iniciace replikace, který probíhá u *Bacillus subtilis*, je přímo změna aktivity iniciačního proteinu DnaA zajištěná proteinem *Soj*, který je kromě negativní regulace aktivity DnaA schopen také jeho stimulace (obr. 4). Tento protein s navázaným ATP tvoří dimer, což je forma vázající se na DNA a v této formě stimuluje iniciaci replikace asistencí DnaA při rozplétání DNA (Katayama et al. 2010). Kontaktem s proteinem *Spo0J*, navázaným na sekvencích *parS* (viz kapitola 3.2.3.) však dochází k hydrolýze ATP a rozpadu dimeru na dva monomery, které jsou jeho inhibující formou.

Tímto způsobem je pravděpodobně zajištěna inhibice iniciace replikace při probíhající segregaci aktivním *Spo0J* proteinem. Tento protein interaguje také s proteinem *MinD*, jedním z proteinů regulujícím lokalizaci septace, nacházejícím se na pólech buňky, díky tomu je na pólech vysoká koncentrace inhibující monomerní formy proteinu *Soj*. Tímto je u malých buněk, které mají vysoký obsah DNA v poměru k velikosti, zajištěn odklad iniciace replikace. V takovém případě je totiž oblast *ori* příliš blízko pólu, čímž dojde k inhibici iniciace přítomnou inhibující formou proteinu *Soj* (Murray and Errington 2008).



Obr. 4: Schematický náhled funkce *Soj-Spo0J* systému při kontrole replikace a segregace chromosomu (Gruber and Errington 2009, obr. 7)

2.2. Vztah iniciace replikace k velikosti buňky „cell-mass“

Iniciace replikace musí být pro životaschopnost buňky propojena s růstem. Tato vazba je u bakterií zajištěna již zmiňovaným proteinem DnaA a jeho akumulací v buňce během růstu. Dlouhou dobu se věřilo, že obecně je spouštěcím mechanismem pro iniciaci replikace dosažení určitého hraničního množství DnaA v buňce (Løbner-Olesen et al. 1989). Nedávné výzkumy však prokázaly, že princip jakým je tato hranice charakterizována se u různých druhů liší (Hill et al. 2012).

Bylo pozorováno, že například u *E. coli* může iniciace replikace nastat až po dosažení určité velikosti buňky, tedy po dosažení hraniční hladiny proteinu DnaA. Naproti tomu u malých buněk *B. subtilis* nastala iniciace již při množství DnaA přibližně o 30% menším než u divokého kmene. Tyto výsledky naznačují, že u *B. subtilis* je iniciační hranice určena koncentrací proteinu DnaA v buňce a ne jeho celkovou hladinou, jako je tomu u *E. coli* (Hill et al. 2012).

Hladina proteinu DnaA, konkrétně jeho aktivní formy DnaA-ATP (viz kapitola 2.1.1.) je regulována několika mechanismy (viz předchozí kapitoly). Kromě již zmíněných funguje u *E. coli* ještě další způsob regulace hladiny dostupného DnaA-ATP. Tím je vázání volného DnaA proteinu na jeho vazebné sekvence rozložené napříč celým chromosomem. V tomto mechanismu se zdá být nejvýznamnějším lokus *datA*, který vykazuje neobyčejně vysokou vazebnou aktivitu (Katayama et al. 2010). Tímto způsobem je udržována relativně nízká hladina volného DnaA v buňce.

Odlišnost mezi regulací iniciace u *E. coli* a *B. subtilis* je zapříčiněna hlavně jejich různými způsoby regulace množství DnaA-ATP. U *E. coli* fungují všechny mechanismy popsané v předchozích kapitolách, od inaktivace DnaA-ATP systémem RIDA, jeho vyvázání *datA* sekvencemi, až po blokadu exprese genu *dnaA* proteinem SeqA (Hill et al. 2012). Stěžejním při regulaci iniciace ve vztahu k růstu buňky se zdá být systém založený na vyvazování volného DnaA. Veškeré DnaA vazebné oblasti na chromosomu (kromě *oriC*) mají totiž možnost navázat pouze limitované množství tohoto proteinu. Toto množství je právě tím limitujícím množstvím, po jehož překročení se váže nově vznikající DnaA protein na *oriC* zahajuje replikaci (Katayama et al. 2010).

Naproti této bohaté mašinérii u *E. coli* funguje při regulaci množství DnaA u *B. subtilis* primárně jen systém separující DnaA od *oriC*, založený na funkci proteinu YabA. Díky tomu, že DnaA váže ATP s vyšší afinitou než ADP a *B. subtilis* nevyužívá mechanismy pro aktivní inaktivaci DnaA-ATP, tak je v naprosté většině v buňkách *B. subtilis* DnaA ve své aktivní formě DnaA-ATP (Hill et al. 2012).

Přesné mechanismy, jakými je dán vztah velikosti buněk k iniciaci replikace a důvody odlišností u těchto dvou druhů bakterií však ještě nebyly přesně popsány.

3. C fáze – vlastní replikace

Obecně se dá říci, že replikace je proces, který je energeticky velice náročný a stojí bakterii velkou část buněčných zásob. I v této fázi buňka udržuje poměr mezi DNA a buněčnou hmotou, a pokud buňka nemá zcela příznivé podmínky, může v této fázi dojít k zablokování buněčného cyklu zastavením průběhu replikace. Hlavní složkou, která je při elongaci DNA potřeba jsou deoxynukleosid trifosfáty (dNTP). Změny v jejich inkorporaci do vznikající DNA mají proto významný vliv na průběh elongace a na množství vzniklé DNA, a tím ovlivňují i poměr DNA a buněčné hmoty. Změny v dostupnosti dNTP jsou většinou způsobeny v důsledku nutričního stresu. Mezi stresové mechanismy regulace elongace se řadí například mechanismus založený na sledu reakcí spuštěných (p)ppGpp. Jedná se o malé nukleotidy, produkované enzymem RelA při nedostatku aminokyselin. Ukázalo se, že tyto nukleotidy přímo inhibují primázu, čímž dojde k zastavení replikace (Wang et al. 2007).

Kromě dvou mechanismů, zmíněných v předchozím odstavci, existují ještě jiné velice důležité procesy, které však neovlivňují přímo vlastní syntézu DNA během elongace. Jedná se o mechanismy zajišťující segregaci vzniklých chromosomů. Přestože je na toto téma vypracované velké množství prací, názory se v některých případech značně liší, mimo jiné i proto, že tyto procesy mohou v buňce probíhat různě v závislosti na podmínkách, jako je tomu například při vícenásobné replikaci u rychle rostoucích buněk, kde je generační doba kratší než doba potřebná pro replikaci. V takovém případě dochází k vícenásobné iniciaci replikace a v buňce bude zároveň probíhat více replikačních procesů (Ghosh et al. 2006).

3.1. Regulace průběhu replikace – regulace hladiny dNTPs

Za regulaci syntézy potřebných dNTP je zodpovědný enzym ribonukleotid reduktáza (RNR). Tento enzym je katalyzátorem pro syntézu dNTPs (Herrick and Sclavi 2006). RNR je regulována na dvou úrovních. První variantou je alosterická regulace pomocí nukleosid trifosfátů, které mohou měnit jeho aktivitu a specifitu (Nordlund and Reichard 2006). Druhou je změna množství tohoto enzymu regulací transkripce operonu *nrdAB*, jehož součástí jsou geny, které RNR kódují (Sun and Fuchs 1992). Na regulaci transkripce jeho genů se mimo jiné podílí i protein DnaA a díky tomu je zajištěna provázanost s iniciací replikace (Gon et al. 2006).

Syntéza enzymu RNR začíná přibližně v době iniciace replikace, čímž je zajištěn dostatek dNTPs při vzniku každé nové replikační vidlice. Přesný mechanismus byl zatím popsán jen v případě *Escherichia coli*, kde *nrdAB* promotor má v těsném sousedství ATP-DnaA vazebný box, přičemž navázaný ATP-DnaA blokuje transkripci *nrd* genů. Po iniciaci transkripce dojde pomocí Hda komplexu, zmiňovaného v první kapitole, k hydrolyze na ADP-DnaA, který transkripci z promotoru *nrdAB* neblokuje. Tímto způsobem je u *E. coli* zajištěna provázanost mezi iniciací replikace a zvýšením hladiny dostupných dNTPs (Gon et al. 2006). Augustin a jeho tým ale již dříve dospěli k závěru, že má DnaA za některých podmínek schopnost *nrd* stimulovat (Augustin et al. 1994) díky DnaA vazebnému místu v *nrd* operonu (Goranov et al. 2005).

3.2. Segregace chromosomů

Běžná replikace probíhá obousměrně od *oriC*, přes celý chromosom až po terminační sekvenci *Ter*, nacházející se na opačné straně chromosomu oproti *oriC*. Obě vlákna vznikající při replikaci je potřeba oddělit k opačným pólům buňky, aby došlo ke správné distribuci genetického materiálu. S tímto faktem úzce souvisí regulace dělení buňky, k jehož počátku dochází již během replikace (viz další kapitoly). Mechanismus segregace není zatím zcela jednoznačně objasněn, a proto existuje několik odlišných názorů.

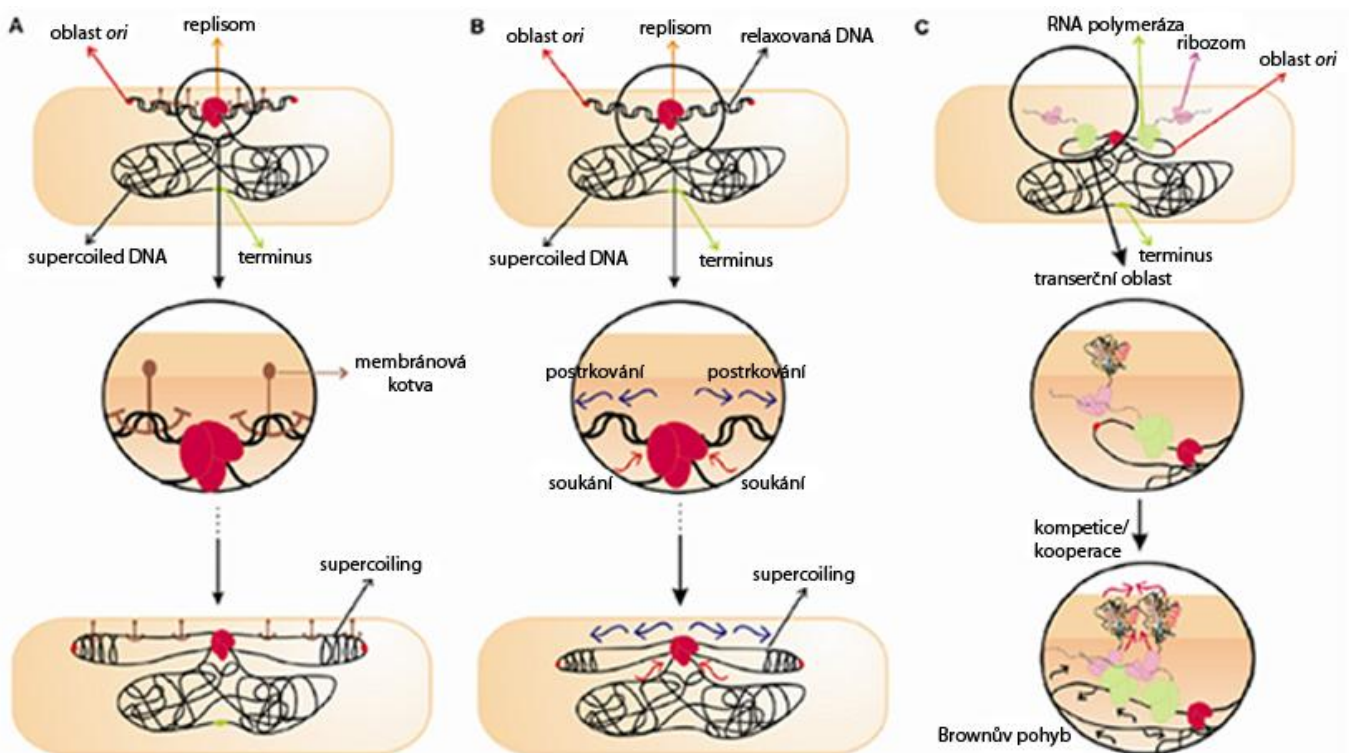
Kvůli studii segregace bylo nejprve potřeba porozumět tomu, jak je v buňce chromosom orientován. *B. subtilis* tvoří podlouhlé buňky, což je výsledkem aktivity bakteriálních aktinových homologů, konkrétně proteinů MreB, MreBH a Mbl, tvořících bakteriální alternativu cytoskeletu (Carballido-López 2006; Schirner and Errington 2009). U *B. subtilis* je *oriC* orientován na jednom pólu buňky a *Ter* je na pólu opačném (Webb et al. 1997). Naopak u *E. coli* leží obě části chromosomu na proti sobě na středu buňky a ramena chromosomu vyplňují každé jednu polovinu buňky (Wang et al. 2006).

První názory na segregaci chromosomů počítaly s vazbou některých oblastí *oriC* na buněčnou membránu, přičemž by k separaci těchto zreplikovaných *oriC* docházelo jen díky růstu membrány mezi nimi (Jacob et al. 1963) (obr. 5A). Později se ale ukázalo, že pohyb chromosomu je rychlejší než rychlost růstu buňky (membrány) a proto se od tohoto modelu upustilo (Webb et al. 1998).

Další model předpokládá existenci mechanismu, který v replisomu zajišťuje kromě replikace také navíjení zreplikované DNA a následně její posun do opačné části buňky (Lemon and Grossman 1998; Lemon and Grossman 2000) (obr. 5B). Nicméně tato síla je pro

segregaci příliš slabá, a tak se zdá, že tomuto procesu napomáhá také brzká transkripce, kdy se RNA polymeráza chová při pohybu podél templátu jako motor. Tuto myšlenku potvrzuje také fakt, že při inhibici transkripce dochází k chybné segregaci chromosomů (Dworkin and Losick 2002).

Třetí model počítá se segregací chromosomů zprostředkovanou transercí (Woldringh 2002). Tento model předpokládá, že některé chromosomální oblasti jsou propojeny s membránou díky kotranskripční translaci a translokaci membránových proteinů (transerce). Transerční komplexy jsou lokalizovány na v obou polovinách buňky. Postupné přibývání dalších transerčních komplexů od středu buňky tlačí zreplikovanou DNA k opačným pólům buňky (obr. 5C). Avšak stejně jako v prvním modelu i v tomto by byla segregace chromosomů pomalejší, než bylo pozorováno *in vivo* a proto zde musí fungovat ještě jiný aktivní mechanismus pro posun DNA od středu buňky.



Obr. 5: Modely segregace bakteriálních chromosomů. **A:** Replikovaná DNA je oddělována růstem membrány mezi dvěma body DNA navázanými na membránu. **B:** po zreplikování počátku jsou dva nově vzniklé počátky tlačeny směrem od centrálně umístěného replisomu a směřovány k opačným pólům buňky. **C:** část DNA, obsahující geny kódující membránové proteiny je dočasně ukotvena k transerční oblasti na membráně. Po replikaci,

transkripci a translaci dalších genů dochází ke kompetici o transerční místo na membráně a k posunu DNA (Pavlendová et al. 2007, obr. 1).

Navrhovaným modelem tohoto posunu je spřažení segregace chromosomu s funkcí proteinů MreB a Mbl, které jsou sice primárně proteiny regulujícími tvar buňky, avšak jejich nedostatek vede k chybnému rozchodu chromosomů (Defeu Soufo and Graumann 2003, 2004). Dalšími takovými proteiny jsou u *B. subtilis* Spo0J a Soj, které se kromě regulace aktivity iniciačního proteinu DnaA (viz kapitola 2.1.4.) také účastní segregace chromosomů nejen během vegetativního růstu, ale také během sporulace (Wu and Errington 2003).

3.2.1. ParB – polarizace *Caulobacter crescentus*

Protein, podílející se na segregaci a polárním ukotvení chromosomů byl pozorován u *Caulobacter crescentus* je ParB. Jedná se o významný protein, který je schopen specifické sekvence *parS*, ležící na chromosomu poblíž *oriC*. Tyto sekvence jsou součástí skupiny genů *par*, které se podílejí na segregaci chromosomů u bakterií (Gerdes et al. 2000). Vazbu ParB na *parS* zajišťuje poslední protein z této skupiny ParA. Zreplikovaný *oriC* s navázaným ParB se pohybuje buňkou na opačný pól, kde je tímto proteinem ukotven. Dalším regulačním mechanismem v tomto procesu je systém, jehož součástí je protein MipZ, jež brání uspořádání proteinu FtsZ. Protein FtsZ je normálně schopen polymerizovat do FtsZ prstence, který je nezbytný pro tvorbu dělicího septa (viz kapitola 4.1.). MipZ se váže na ParB a putuje tak spolu se zreplikovanými *oriC* na póly buňky, kde je jeho koncentrace mnohonásobně vyšší než na středu (Thanbichler and Shapiro 2006). Toto je významný proces ovlivňující správnou lokalizaci a načasování tvorby septa (viz kapitola 4.4.1.). Molekulou zajišťující pohyb *oriC* k opačným pólům buňky je u *C. crescentus* actin-like protein MreB, vázající se na DNA nedaleko od *oriC* sekvence (Gitai et al. 2005). Dalším proteinem, který se ukázal být klíčový při ukotvení *oriC*/ParB na pólu je PopZ, jehož akumulace zde je zajištěna mimo jiné proteinem MreB (Bowman et al. 2008)

3.2.2. RacA – segregace při sporulaci *B. subtilis*

U *Bacillus subtilis* je většina procesů spojených se segregací chromosomu popsána pouze u sporulujících buněk. Funkci proteinu ParB, tedy proteinu vázajícího DNA k pólu, na sebe u tohoto organismu přebírá protein RacA. Při replikaci zde byly popsány axiální filameny, tedy struktury tvořené dvěma kondenzovanými chromosomy, na jejichž okrajích jsou *oriC*

směřující směrem k pólům buňky (Ben-Yehuda et al. 2003). Lokalizace RacA na pólu je zajištěna prostřednictvím proteinu DivIVA. Protein DivIVA je kromě toho schopen na pólech ukotvit proteiny MinCD (Lenarcic et al. 2009; Edwards and Errington 1997; Cha and Stewart 1997). Tyto proteiny jsou u dělících se buněk klíčové při prostorové regulaci tvorby FtsZ prstence (viz kapitola 4.4.1.). Díky tomuto faktu a výsledkům Edwardse a Erringtona je pravděpodobné, že inaktivní DivIVA u sporulujících buněk zapříčiňuje delokalizaci MinCD proteinů z pólu, čímž je umožněna polární septace (Edwards and Errington 1997). Studie také prokázaly že DivIVA je během klasického dělení přítomen i ve střední části buňky, což poukazuje na koncentraci tohoto proteinu v místech budoucího dělení.

3.2.3. *Spo0J* – segregace chromosomů u *B. subtilis*

Protein Spo0J byl původně popsán jako regulátor přechodu mezi sporulací a vegetativním růstem (Hranueli et al. 1974). Později bylo prokázáno, že je funkčním homologem proteinu ParB a že se také podílí na segregaci chromosomů u *Bacillus subtilis* (Ireton et al. 1994). Spo0J je DNA vazebný protein, který je schopen rozpoznat několik *parS* sekvencí ležících poblíž *oriC*. Po navázání několika jednotek Spo0J na sekvence *parS* je tento protein schopen se od tohoto místa dále šířit podél DNA a utváří tak rozsáhlejší nukleoproteinový komplex tvořený oblastí *oriC* (Lee and Grossman 2006; Murray et al. 2006). Na tuto strukturu se poté váže komplex zvaný kondenzin, který je zodpovědný za segregaci chromosomů. Tento komplex je tvořený dimerní formou bakteriálního SMC (Structural maintenance of chromosomes) proteinu (funkčním homologem u *E. coli* je MukB) a podjednotek ScpA a ScpB (resp. MukE a MukF u *E. coli*). Dimery SMC jsou schopny interakce prostřednictvím ScpAB a tvorby prstencovité struktury objímající DNA. (obr.4) (Gruber and Errington 2009; Woo et al. 2009). Přesný mechanismus funkce tohoto komplexu při segregaci chromosomů však není zatím přesně popsán.

4. D fáze - Cytokineze

Důležitým faktem je, že přechod mezi C a D fází není zcela jednoznačně vymezen. Důvodem je překrývající se část replikace a segregace chromosomů se začínající tvorbou septa. Cytokineze, dělení buňky, je jedním ze stěžejních procesů během rozmnožování. U bakterií dochází k tvorbě septa dostředivým způsobem, kdy nejprve dojde k vytvoření prstencovité struktury podél okraje buňky a na jejím základě k dotvoření kompletního septa. Abychom porozuměli, jak jsou v buňce propojeny jednotlivé pochody během samotného

dělení, je nutné nejprve zmínit, jaké mechanismy jsou v tomto případě využívány pro samotné dělení a jeho prostorovou specifikaci a popsat jak fungují. Poté je možné specifikovat jejich provázanost s předcházejícími procesy v buňce, respektive jejich časovou regulaci.

4.1. Proteiny FtsZ a FtsA a tvorba Z prstence

Takto byla u bakterií pojmenována velká část proteinů nutných pro výstavbu divisomu. Tyto proteiny můžeme nalézt u řady bakterií, buď přímo shodné či v homologické podobě. Prvním aktivním, a nejlépe prostudovaným, proteinem z této řady je protein FtsZ. Jedná se o vysoce konzervovaný protein nutný při regulaci tvorby divisomu (Margolin 2000). Jeho funkce spočívá v polymerizaci na vnitřní straně cytoplasmatické membrány ve střední části buňky, v místě budoucího septa, kde tvoří prstencovitý útvar (Bi and Lutkenhaus 1991). Přítomnost tohoto útvaru určuje místo, kde buňka za pomoci dalších proteinů začne tvořit samotný divisom a kde se ve finále rozdělí.

Dalším proteinem, účastnícím se při tvorbě divisomu je FtsA. Jeho přítomnost je vyžadována v brzké fázi dělení (Feucht et al. 2001). Ačkoliv není jeho přesná funkce zcela objasněna, bylo pozorováno, že přímo interaguje s FtsZ (Di Lallo et al. 2003). Tato interakce se zdá být potřebná ke správné formaci Z prstence (Jensen et al. 2005). Ukázalo se, že FtsA má i doménu zajišťující vazbu na membránu, což naznačuje, že je tento protein prostředníkem poskytujícím interakci mezi FtsZ a membránou (Pichoff and Lutkenhaus 2005). U většiny bakteriálních rodů byly nalezeny různé funkční homology schopné FtsA zastoupit. U *E. coli* se jedná o protein ZipA (Geissler et al. 2003), který však *B. subtilis* postrádá. Zde byl pozorován jiný protein schopný zastoupit disfunkci FtsA. Byl to protein YlmF (přejmenován na SepF – Hamoen et al. 2006), jehož nadprodukce byla zaznamenána u buněk postrádajících FtsA (Ishikawa et al. 2006). K zajímavým závěrům dospěli Kemp et al., kteří pozorovali buňky s bodovou mutací v genu pro FtsA, jež byly schopny normálního dělení během vegetativního růstu, ale nebyly schopny sporulačního dělení. Tyto výsledky vedly k předpokladu, že má protein FtsA během těchto dvou dějů rozdílnou funkci (Kemp et al. 2002).

4.2. Proteiny DivIB, FtsL a DivIC (FtsQLB)

Dalšími proteiny, jež se podílejí na tvorbě divisomu, jsou u *E. coli* membránové proteiny FtsQ, FtsL a FtsB. Homology těchto proteinů u *B. subtilis* se nazývají DivIB, FtsL a DivIC.

Tyto proteiny mají kromě cytoplasmatické a transmembránové domény i vnější doménu, která je v přímém kontaktu s buněčnou stěnou.

Funkce DivIB při dělení odpovídá chaperonu zajišťujícímu stabilizaci proteinů při vysokých teplotách (Harry et al. 1993; Rowland et al. 1997; Daniel and Errington 2000). DivIB byl však pozorován i v procesu segregace chromosomů (Real et al. 2005), zdá se tedy, že by mohl hrát roli i při synchronizaci segregace chromosomů a dělení buňky.

FtsL je protein, který se spolu s proteinem EzrA podílí na regulaci stažení Z prstence. Tento protein omezuje výstavbu pozdních proteinových komplexů na Z prstenci, čímž umožňuje jeho stažení (Kawai and Ogasawa 2006). Jedná se o značně nestabilní protein (Robson et al. 2002), jehož nedostatek však nemá přímo vliv na tvorbu FtsZ prstence. Absence FtsL však znemožňuje uspořádání proteinů DivIB a DivIC v místě dělení. Nedostatek FtsL také zapříčiňuje pokles hladiny DivIC, což naznačuje že FtsL stabilizuje DivIC. Nestabilita těchto proteinů by mohla hrát významnou roli při střídající se výstavbě a rozpadu dělicího aparátu (Daniel et al. 1998). Důležitým faktem je, že *ftsL* je jedním z genů regulovaných proteinem DnaA, díky čemuž je zajištěna dokonalá koordinace mezi průběhem replikace a vlastním dělením (Goranov et al. 2005).

Funkce DivIC zatím nebyla přesně objasněna, ačkoliv bylo prokázáno, že je nezbytný pro přežití buňky (Buddelmeijer et al. 2002). Studie prokázaly vazbu mezi proteiny FtsL a DivIC (Buddelmeijer and Beckwith 2004; Sievers and Errington 2000), přičemž později byla pozorována také interakce mezi DivIB, FtsL a DivIC a mezi dalšími součástmi divisomu (Karimova et al. 2005; Di Lallo et al. 2003).

4.3. Další Fts proteiny

Dalším proteinem, u kterého byla prokázána funkce při segregaci chromosomů a během samotného dělení buňky, je protein FtsK. U *E. coli* dochází k překryvu průběhu replikace a počátku dělení buňky a protein FtsK je zde zodpovědný za odklizení terminálních úseků DNA z oblasti dělení (Sherry et al. 2006). Naproti tomu byl u *B. subtilis* pozorován protein SpoIIIE, který je zodpovědný za transport chromosomu při asymetrické septaci probíhající během sporulace. SpoIIIE funguje při tomto procesu DNA translokáza, zajišťující přenos zbývajících částí chromosomu, která zůstala při vzniku polárního septa v mateřské buňce, do spory (Sharp and Pogliano 2002).

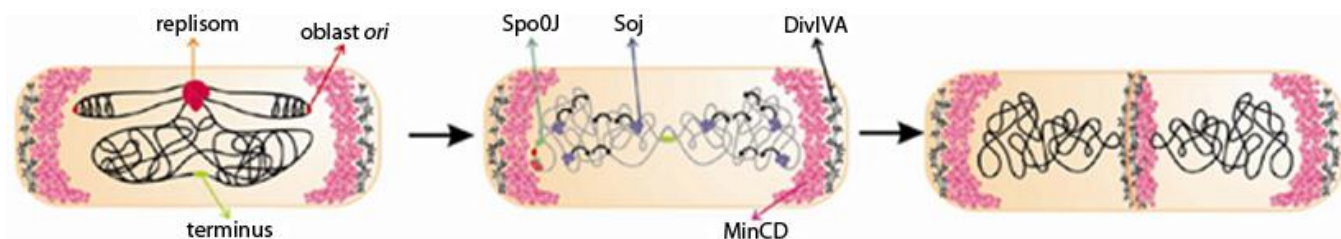
4.4. Min a Noc systém – regulace umístění Z prstence

Pro správné rozdělení jedné buňky na dvě rovnocenné dceřiné buňky je zapotřebí, aby k polymeraci FtsZ proteinu docházelo pouze ve střední části buňky a nikoliv na pólech. Výjimkou je dělení během sporulace, kdy je polární polymerace žádoucí. Toto prostorové omezení polymerace FtsZ je zabezpečeno pomocí několika proteinů Min systému, který zabraňuje tvorbě prstence na pólech buňky a dále pomocí systému Noc, který omezuje stavbu Z prstence v místech, kde se nacházejí segregované dceřiné chromosomy. Kombinací působení těchto dvou systémů je polymerace FtsZ umožněna pouze ve středu buňky.

4.4.1. Min systém – regulátor polární septace

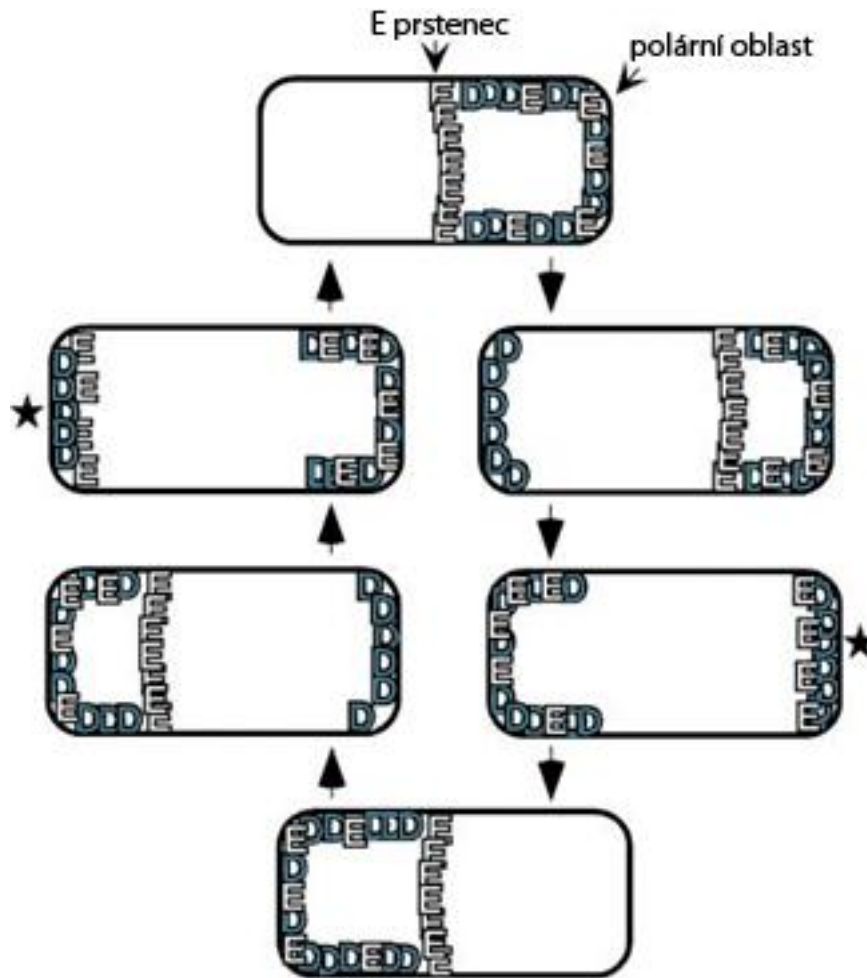
Tento systém je tvořen třemi hlavními proteiny MinCDE u *E. coli*. Vlastní funkční jednotkou je u tohoto systému vždy protein MinC, který narušuje interakce FtsZ proteinů a zamezuje jejich polymeraci (Dajkovic et al. 2008). MinD hraje roli prostředníka mezi MinC a membránou a protein MinE zajišťuje správnou lokalizaci těchto proteinů v buňce (Hu and Lutkenhaus 2002). Zmíněné proteiny a mechanismy jakými tento systém funguje, mohou být u různých organismů odlišné.

U *B. subtilis* nebyl gen pro protein MinE nalezen, avšak místo MinE mají gram-pozitivní bakterie protein označený DivIVA (Edwards et al. 2000), který za určitých podmínek během sporulace umožňuje polární septaci (viz dříve). V nedávné době byl v tomto systému objeven ještě další významný protein MinJ. Mutacemi v jednotlivých komponentech bylo zjištěno, že MinJ pro svou lokalizaci na pólech vyžaduje DivIVA a funguje jako zprostředkovatel interakce mezi DivIVA a MinD (Bramkamp et al. 2008). U *B. subtilis* dochází k tomu, že protein DivIVA interaguje se specifickými strukturami na již vytvořeném divisomu a na něj se postupně připojí další proteiny tohoto systému MinJ, MinD a nakonec MinC. Tato formace však nemá vliv na již vytvořený divisom, na kterém se utvořila, blokuje však formaci dalšího Z prstence ve své blízkosti. Jelikož se z místa divisomu po kompletním rozdělení stane jeden z pólů nově vzniklé buňky, je tímto způsobem u *B. subtilis* omezena polární septace u buněk vznikajících v dalších generacích (obr. 6).



Obr. 6: Rozchod chromosomů během vegetativního růstu (Pavlendová et al. 2007, obr. 2A)

E. coli má funkci tohoto systému zajištěnou poněkud odlišným mechanismem. U tohoto organismu je vazba MinC k pólu zprostředkována přímo proteinem MinD, který je schopen vazby k membráně a interaguje s MinC. Zásadní odlišností je přítomnost proteinu MinE, který zapříčiňuje rozpad tohoto komplexu. Takto rozvolněné proteiny MinC a MinD poté oscilují mezi oběma póly buňky, kde spolu znovu interagují, dokud znovu nedojde ke kontaktu s MinE. Oscilující MinC zamezuje polymeraci FtsZ na pólech, zatímco střední část zůstává volná (Rothfield et al. 2005; Lutkenhaus 2007). Ovšem aby bylo zajištěno, že střed buňky zůstane volný pro FtsZ není oscilace těchto proteinů zcela náhodná. MinE vytváří prstenec podél membrány uprostřed buňky a putuje v této podobě k jednomu z pólů. Během tohoto procesu dochází k redukci rozrůstající se MinD polární zóny. Poté se MinE znovu přeskupí do formy prstence na středu a stejným způsobem putuje na opačný pól (obr. 7) (Fu et al. 2001; Shin et al. 2002).



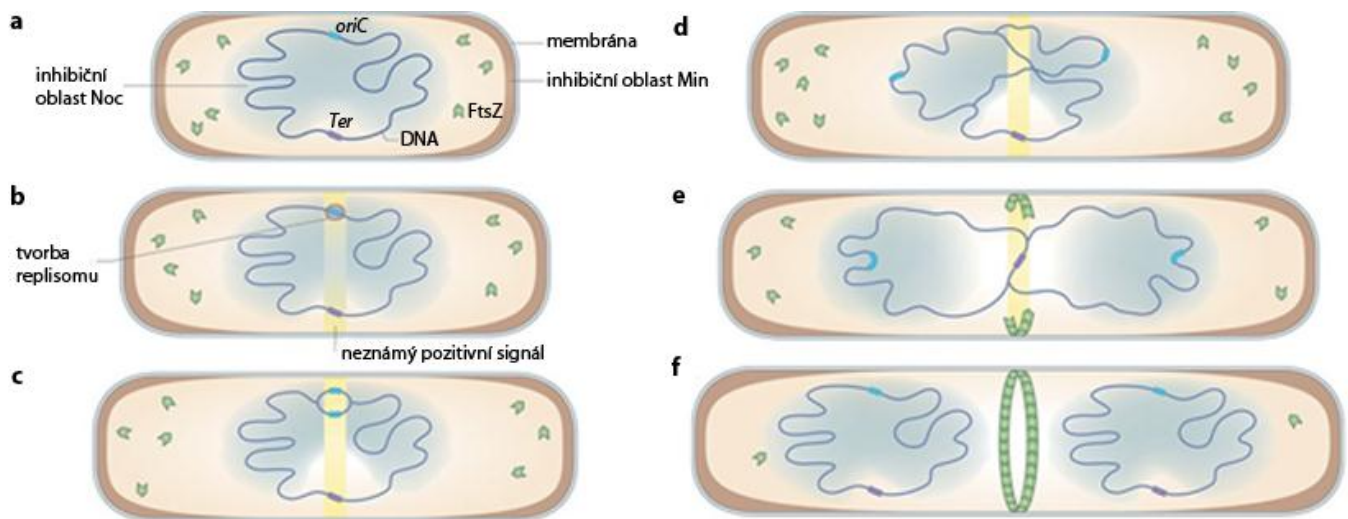
Obr. 7: Dynamický charakter MinD polární oblasti a MinE prstence. MinE prstenec vytlačuje MinD ze středu a zmenšuje MinD oblast (modře). Hvězda zobrazuje nárůst nové MinD polární zóny směrem do středu buňky. MinC není zobrazen, avšak putuje buňkou spolu s MinD (Shin et al. 2002, obr. 1)

4.4.2. Noc systém

Jak již bylo zmíněno výše, jedná se o druhý hlavní prostorový regulátor septace. Na rozdíl od Min systému se Noc neuplatňuje v polárních oblastech (obr. 8). Noc systém je založen na negativním regulačním efektu centrálně umístěného chromosomu, který po zreplikování a správné segregaci opouští střed buňky a obsazuje prostor mezi pólem buňky a středem (Woldringh et al 1991).

Hlavním proteinem fungujícím v tomto systému je u *B. subtilis* protein Noc (Wu and Errington 2003), respektive protein SlmA u *E. coli* (Bernhardt and de Boer 2005). Tyto proteiny nespecificky interagují s chromosomem a inhibují polymeraci FtsZ. Díky těmto proteinům je zamezeno septaci v místech kde se nachází velké množství DNA (Bernhardt and

de Boer 2005). Tyto proteiny však nemusí pokrývat chromosom rovnoměrně po celé jeho délce, a proto může docházet k poklesu koncentrace těchto proteinů ve středu buňky ještě před dokončením replikace chromosomů a jejich úplnou segregací. V tomto případě dojde k tvorbě FtsZ prstence dříve, než chromosomy opustí střed buňky (Lau et al 2003; X. Wang et al 2005).



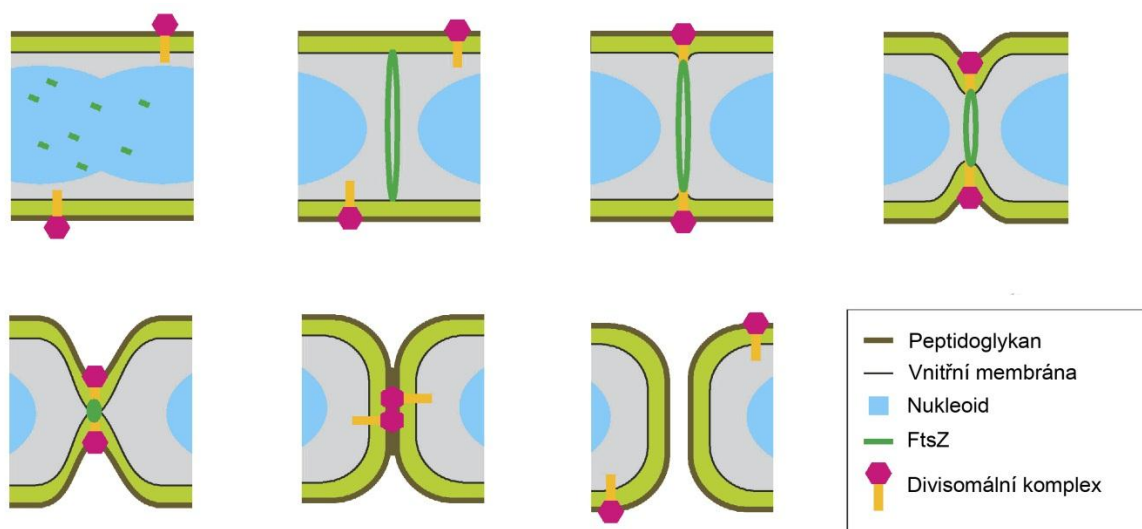
Obr. 8: *a–d* – v nových dceřiných buňkách (část a) a v těch, které zatím nedosáhly pozdní fáze DNA replikace (části b–d), Noc inhibiční efekt nukleoidu na středu buňky spolu s inhibičním efektem Min proteinů fungujících směrem od pólů buňky brání sestavení FtsZ prstence kdekoliv v buňce. Iniciací DNA replikace (část b) v chromosomální oblasti oriC dále spouští akumulaci dosud neznámého pozitivního signálu na středu buňky (žlutý pruh), intenzita toho signálu se s postupem replisomu zvyšuje; e – jakmile replikační mašinerie dosáhne poslední třetiny chromosomu, začne se na středu objevovat oblast postrádající Noc, která se postupně rozšiřuje a umožňuje tak začínající sestavení FtsZ na středu buňky; f – po dokončení replikace (v oblasti ter) a segregaci chromosomů, dojde k sestavení zbytku septa. Pro zjednodušení byla vynechána buněčná stěna (Wu and Errington 2012, obr. 1)

4.5. Dokončení rozdělení buňky po vytvoření Z prstence

Tvorba divisomu je velice komplikovaný proces, kterého se účastní značné množství proteinů a v dnešní době zůstává funkce mnoha těchto proteinů dosud neznámá. Po dokončení polymerizace Z prstence dojde během několika minut k navázání dalších proteinů divisomu ZipA, FtsA a ZapA, jejichž funkcí je především tvorba komplexu se zbývajícími proteiny, zodpovědnými za syntézu peptidoglykanu. Mezi tyto proteiny patří například FtsQ, FtsW,

FtsN, PBP3 (Penicilin-binding protein) a AmiC (Aarsman et al. 2005; Pastoret et al. 2004; Yang et al. 2004; Heidrich et al. 2001). Utvořením tohoto komplexu dojde k počátku zaškrcování vnitřní membrány. K celkovému zaškrcování buňky dochází v důsledku zaškrcování Z prstence koordinovaného se syntézou peptidoglykanové vrstvy. Ke konečnému oddělení membrán dojde v důsledku zaškrcování Z prstence. Během septace u *E. coli* dochází k synchronizované syntéze a zaškrvení všech tří vrstev buněčného obalu a po dokončení vzniknou dvě rozdělené buňky. U *B. subtilis* probíhá tvorba divisomu stejným mechanismem jako u *E. coli*, za účasti homologních proteinů, avšak během septace dochází k tvorbě mureinové vrstvy společné pro obě buňky, které zůstanou touto vrstvou spojeny a musí ještě následovat rozštěpení společné části tohoto septa (obr. 9) (Goehring and Beckwith 2005).

V této fázi je aktivní poslední velice důležitý regulační protein, kterým je FtsK. Tento protein je schopen regulace pozdních fází tvorby septa v případě že dosud nedošlo k úplné segregaci chromosomů a v místě dělení se stále nachází DNA. V takovém případě tento protein zajistí odklizení DNA, načež se inaktivuje a umožní dokončení septa. Přesný mechanismus funkce tohoto proteinu však není znám (Grainge 2010).



Obr. 9: Schematický přehled nejdůležitějších procesů, probíhajících během buněčného dělení (Goehring and Beckwith 2005, obr. 6)

5. Závěr

Replikace DNA, segregace chromosomů, růst a dělení buňky jsou v bakteriálních buňkách koordinovány a ve většině případů alespoň částečně propojeny mnoha různými mechanismy. Přesné důvody toho, proč se u prokaryot vyvinul takto složitý komplexní buněčný cyklus,

nejdou jednoznačně známy. Nejpravděpodobnějším z možných vysvětlení je jejich způsob života v rychle se měnícím životním prostředí a s tím související nutnost rychlé adaptace buňky na jiné podmínky. Ačkoliv došlo v posledních letech k popsání mnoha těchto mechanismů, stále zde zůstává značné množství mechanismů regulace buněčného cyklu, které nejsou vysvětleny zcela jednoznačně a názory na jejich funkci se mohou lišit, nebo se o jejich molekulární podstatě téměř nic neví.

Budoucí výzkumy, doprovázené zdokonalujícími se postupy a technikou, nepochybně povedou dříve či později k objasnění mnoha témat zmiňovaných v této práci. Tato aktuální témata na jednu stranu zahrnují již dobře prozkoumané systémy a zabývají se popisem opravdu již detailních mechanismů. Mezi taková témata patří například regulace proteinem Soj, jehož vliv na aktivitu proteinu DnaA byl již v mnoha pracích dobře pozorován, avšak názory na přesnou molekulární podstatu tohoto mechanismu a jeho interakci s proteinem Spo0J nejsou zcela jednotné. Na stranu druhou existují stále neobjasněná témata týkající se relativně základních procesů buněčného cyklu, jakými jsou bezpochyby ta, která se zabývají vztahem mezi iniciací replikace a velikostí, respektive rychlostí růstu buňky. Dalším relativně základním procesem, na jehož průběh a regulaci nejsou zcela jasné a podložené názory je mechanismus segregace zreplikovaných chromosomů. V důsledku nepřehledného množství prací, které na toto téma vznikly, bylo vyřčeno několik názorů na průběh tohoto procesu, z nichž některé nejsou zatím zcela kompatibilní pro průběh v živých buňkách. Jiné názory počítají se spoluprací s dalšími proteiny z jiných systémů, jakým je například již zmiňovaný protein Spo0J. V neposlední řadě je třeba zmínit složitý proces výstavby Z prstence spojený s velkým počtem doplňujících proteinů, jejichž účast v tomto procesu byla v mnoha pracích prokázána, avšak stále mnoho z nich oplývá otázkami ohledně jejich konkrétního významu.

Celou problematiku pochopení buněčného cyklu dále komplikují odlišnosti mezi různými bakteriálními druhy vznikající hlavně v důsledku adaptačních mechanismů na podmínky, ve kterých se během evoluce tyto organismy vyvíjely. Obecně se zdá že *Bacillus subtilis*, jako zástupce Gram-pozitivních bakterií, má průběh mnoha procesů značně zjednodušený oproti *Escherichia coli*, jakožto zástupci Gram-negativních bakterií. V současné době se zdá, že u *B. subtilis* je jednoduchým regulačním mechanismem mnoha procesů primárně dostupnost ATP. Významné množství prací s *B. subtilis* je zaměřeno výzkum buněk během probíhající sporulace, což je významná vlastnost tohoto organismu poskytující mnoho dalších otázek ohledně rozdílů mezi těmito druhy životního cyklu a jejich přechodu.

6. Seznam použité literatury

- Augustin L.B., Jacobson B.A. and Fuchs J.A. 1994. *Escherichia coli* Fis and DnaA proteins bind specifically to the *nrd* promoter region and affect expression of an *nrd-lac* fusion. J Bacteriol; 176: 378–387.
- Ben-Yehuda S., Rudner D.Z., Losick R. 2003. RacA, a Bacterial Protein That Anchors Chromosomes to the Cell Poles. Science; 299(5606): 532-6
- Bi E., and Lutkenhaus J. 1991. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. Nature; 354: 161–164
- Bowman G. R., Comolli L.R., Zhu J., Eckart M., Koenig M., Downing K.H., Moerner W.E., Earnest T. and Shapiro L. 2008. A Polymeric Protein Anchors the Chromosomal Origin/ParB Complex at a Bacterial Cell Pole. Cell; 134(6): 945-955
- Bramkamp M. et al. 2006. Regulated intramembrane proteolysis of FtsL protein and the control of cell division in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol; 62: 580–591
- Bramkapmp M., Emmins R., Weston L. et al. 2008. A novel component of the division-site selection system of *Bacillus subtilis* and a new mode of action for the division inhibitor MinCD. Mol. Biol; 70: 1556-1569
- Buddelmeijer N. and Beckwith J. 2004. A complex of the *Escherichia coli* cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ forms independently of its localization to the septal region. Mol. Microbiol; 52: 1315-1327
- Buddelmeijer N., Judson N., Boyd D., Mekalanos J. J. and Beckwith J. 2002. YgbQ, a cell division protein in *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*, localizes in codependent fashion with FtsL to the division site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 99: 6316-6321
- Carballido-López R. 2006b. The bacterial actin-like cytoskeleton. Microbiol. Mol. Biol. Rev; 70(4): 888-909
- Castilla-Llorente V., Munoz-Espin D., Villar L., Salas M. and Meijer W. J. 2006. Spo0A, the key transcriptional regulator for entrance into sporulation, is an inhibitor of DNA replication. EMBO J; 25: 3890–3899
- Cha J.H., Stewart G.C. 1997. The divIVA Minicell Locus of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol; 179(5): 1671

- Dajkovic A., Lan G., Sun S. X., Wirtz D. and Lutkenhaus J. 2008. MinC Spatially Controls Bacterial Cytokinesis by Antagonizing the Scaffolding Function of FtsZ. *Current Biology*; 18(4): 235-244
- Daniel R.A. and Errington J. 2000. Intrinsic instability of the essential cell division protein FtsL of *Bacillus subtilis* and a role for DivIB protein in FtsL turnover. *Mol. Microbiol*; 36: 278–289
- Daniel R. A., Harry E. J., Katis V. L., Wake R. G. and Errington J. 1998. Characterization of the essential cell division gene *ftsL* (*YllD*) of *Bacillus subtilis* and its role in the assembly of the division apparatus. *Mol. Microbiol*; 29: 593-604
- Di Lallo G., Fagioli M., Barionovi D., Ghelardini P. and Paolozzi L. 2003. Use of a two-hybrid assay to study the assembly of a complex multicomponent protein machinery: Bacterial septosome differentiation. *Microbiology*; 149: 3353–3359
- Dworkin J., Losick R. 2002. Does RNA polymerase help drive chromosome segregation in bacteria? *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*; 99(22): 14089-14094
- Edwards D. H. and Errington J. 1997. The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. *Mol. Microbiol.* 24: 905-915
- Edwards D., Thomaides H. and Errington, J. 2000. Promiscuous targeting of *Bacillus subtilis* cell division protein DivIVA to division sites in *Escherichia coli* and fission yeast. *EMBO J*; 19: 2719–2727
- Feucht, A., Lucet, I., Yudkin, M. D., and Errington, J. (2001). Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol*; 40: 115–125
- Fu X., Shin Y. L., Zhang Y. and Rothfield L. I. 2001. The MinE ring required for proper placement of the division site is a mobile structure that changes its cellular location during the *Escherichia coli* division cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 98(3): 980-5
- Fujimitsu K., Senriuchi T. and Katayama T. 2009. Specific genomic sequences of *E. coli* promote replicational initiation by directly reactivating ADP-DnaA. *Genes Dev*; 23(10):1221-1233

- Geissler B., Elraheb D. and Margolin W. 2003. A gain-of-function mutation in *ftsA* bypasses the requirement for the essential cell division gene *zipA* in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 100: 4197-4202
- Gerdes K., Møller-Jensen J. and Jensen R.B. 2000. Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. Mol Microbiol; 37: 455–466
- Ghosh S.K., Hajra S., Paek A. and Jayaram M. 2006. Mechanisms for Chromosome and Plasmid Segregation. Annu. Rev. Biochem.; 75:211-41
- Gitai Z., Dye N.A., Reisenauer A., Wachi M. and Shapiro L. 2005. MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. Cell; 120(3): 329-341
- Grainge Ian. 2010. FtsK--a bacterial cell division checkpoint? Mol. Microbiol; 78(5): 1055-1057
- Gruber S. and Errington J. 2009. Recruitment of Condensin to Replication Origin Regions by ParB/SpoOJ Promotes Chromosome Segregation in *B. subtilis*. Cell; 137(4): 685-696
- Goehring N.W. and Beckwith J. 2005. Diverse Paths to Midcell: Assembly of the Bacterial Cell Division Machinery. Current Biology; 15(13): R514-R526
- Gon S., Camara J.E., Klungsoyr H.K., Crooke E., Skarstad K. and Beckwith J. 2006. A novel regulatory mechanism couples deoxyribonucleotide synthesis and DNA replication in *Escherichia coli*. EMBO; 25(5): 1137-1147
- Goranov A.I., Katz L., Breier A.M., Burge C.B., Grossman A.D. 2005. A transcriptional response to replication status mediated by the conserved bacterial replication protein DnaA. Proc Natl Acad Sci USA; 102:12932-12937.
- Hamoen L. W., Meile J. C., de Jong W., Noirot P. and Errington J. 2006. SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. Mol. Microbiol; 59: 989–999
- Harry E. J., Stewart B. J. and Wake R. G. 1993. Characterization of mutations in *divIB* of *Bacillus subtilis* and cellular localization of the DivIB protein. Mol. Microbiol; 7: 611-621
- Heidrich C., Templin M.F., Ursinus A., Merdanovic M., Berger J., Schwarz H., De Pedro M.A. and Höltje J.V. 2001. Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell

- separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol* 41(1): 167-178
- Herrick John and Sclavi Bianca. 2007. Ribonucleotide reductase and the regulation of DNA replication: an old story and an ancient heritage. *Mol. Microbiol*; 63: 22-34
- Hill N.S., Kadoya R., Chatteraj D.K. and Petra A.L. 2012. Cell Size and the Initiation of DNA Replication in Bacteria. *PLoS Genet*; 8(3): e1002549
- Houra Merrikh and Alan D. Grossman. 2009. Control of the replication initiator DnaA by an anti-cooperativity factor. *Molecular Microbiology*; 82(2): 434-446.
- Hranueli D., Piggot P. J. and Mandelstam J. 1974. Statistical Estimate of the Total Number of Operons Specific for *Bacillus subtilis* Sporulation. *J. Bacteriol*; 119(3):684
- Hu Z and Lutkenhaus J. 2002. Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE. *Molecular Microbiology*; 34(1): 82-90
- Ireton K., Gunther N.W. 4th and Grossman A.D. 1994. Spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol*; 176(17): 5320-5329
- Ishikawa S., Kawai Y., Hiramatsu K., Kuwano M. and Ogasawara N. 2006. A new FtsZ-interacting protein, YlmF, complements the activity of FtsA during progression of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol*; 46: 997-1009
- Jacob F., Brenner S., Cuzin F. 1963. On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*; 28:329–348
- Jensen S. O., Thompson L. S. and Harry E. J. 2005. Cell division in *Bacillus subtilis*: FtsZ and FtsA association is Z-ring independent, and FtsA is required for efficient midcell Z-ring assembly. *J. Bacteriol*; 187: 6536–6544
- Karimova G., Dautin N. and Ladant D. 2005. Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J. Bacteriol*; 187: 2233-2243

- Katayama T., Ozaki S., Keyamura K. and Fujimitsu K. 2010. Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for DnaA and *oriC*. *Nat Rev Microbiol*; 8: 163–170
- Kato J. and Katayama T. 2001. Hda, a novel DnaA-related protein, regulates the replication cycle in *Escherichia coli*. *EMBO J*; 20: 4253–4262
- Kawai Y. and Ogasawa N. 2006. *Bacillus subtilis* EzrA and FtsL synergistically regulate FtsZ ring dynamics during cell division. *Microbiology*; 152: 1129-1141
- Kemp J. T., Driks A. and Losick R. 2002. FtsA mutants of *Bacillus subtilis* impaired in sporulation. *J. Bacteriol*; 184: 3856-3863
- Lee P.S. and Grossman A.D. 2006. The chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB) contribute to accurate chromosome partitioning, separation of replicated sister origins, and regulation of replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol*; 60(4): 853-869
- Lemon K.P., Grossman A.D. 1998. Localization of bacterial DNA polymerase: evidence for a factory model of replication. *Science*; 282:1516-1519
- Lemon K.P., Grossman A.D. 2000. Movement of replicating DNA through a stationary replisome. *Mol.Cell*; 6:1321-1330
- Lenarcic R., Halbedel S., Visser L., Shaw M., Wu L.J., Errington J., Marenduzzo D. and Hamoen L.W. 2009. Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. *EMBO J*; 28(15): 2272-2282
- Leonard A.C. and Grimwade J.E. 2011. Regulation of DnaA Assembly and Activity: Taking Directions from the Genome. *Annu Rev Microbiol*; 65: 19-35
- Løbner-Olesen A., Skarstad K., Hansen F.G., von Meyenburg K., Boye E. 1989. The DnaA protein determines the initiation mass of *Escherichia coli* K-12. *Cell*; 57(5): 881-9
- Margolin W. 2000. Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol. Rev.* 24; 531–548
- Messer W. and Weigel C. 1997. DnaA initiator - also a transcription factor. *Mol Microbiol*; 24(1): 1-6

- Moriya S., Fukuoka T., Ogasawara N., Yoshikawa H. 1988. Regulation of initiation of the chromosomal replication by DnaA-boxes in the origin region of the *Bacillus subtilis* chromosome. *EMBO J*; 7: 2911–2917
- Murray H. and Errington J. 2008. Dynamic control of the DNA replication initiation protein DnaA by Soj/ParA. *Cell*; 135: 74–84
- Murray H., Ferreira H. and Errington J. 2006. The bacterial chromosome segregation protein Spo0J spreads along DNA from *parS* nucleation sites. *Mol. Microbiol*; 61(5): 1352-1361
- Noirot-Gros M. F., Velten M., Yoshimura M., McGovern S., Morimoto T., Ehrlich S.D., Ogasawara N., Polard P. and Noirot P. 2006. Functional dissection of YabA, a negative regulator of DNA replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; 103: 2368–2373
- Nordlund P. and Reichard P. 2006. Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem*; 75: 681-706
- Pastoret S., Fraipont C., Den Blaauwen T., Wolf B., Aarsman M.E.G., Piette A., Thomas A., Brasseur R. and Nguyen-Distèche M. 2004. Functional analysis of the cell division protein FtsW of *Escherchia coli*. *J. Bacteriol*; 186(24): 8370-8379
- Pavlendová N., Muchová K., Barák I. 2007. Chromosome Segregation in *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol*; 52(6): 563–572
- Pichoff S. and Lutkenhaus J. 2005. Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Mol. Microbiol*; 55: 1722–1734
- Real G., Autret S., Harry E. J., Errington J. and Henriques A. O. 2005. Cell division protein DivIB influences the SpoOJ/Soj system of chromosome segregation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol*; 55: 349-367
- Robson S. A., Michie K. A., Mackay J. P., Harry E. and King G. F. 2002. The *Bacillus subtilis* cell division proteins FtsL and DivIC are intrinsically unstable and do not interact with one another in the absence of other septosomal components. *Mol. Microbiol*; 44: 663–674
- Rowland S. L., Katis V. L., Partridge S. R. and Wake R. G. 1997. DivIB, FtsZ and cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol*; 23: 295-302

- Sekimizu K., Bramhill D., Kornberg A. 1987. ATP activates DnaA protein in initiating replication of plasmids bearing the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell*; 50:259–65
- Sharp M. D. and K. Pogliano. 2002. Role of cell-specific SpoIIIE assembly in polarity of DNA transfer. *Science*; 295:137-139
- Sherry C. E. Wang, West L. and Shapiro L. 2006. The Bifunctional FtsK Protein Mediates Chromosome Partitioning and Cell Division in *Caulobacter*. *J. Bacteriol*; 188:1497-1508
- Shih Y. L., Fu X. L., King G. F., Le T. and Rothfield L. 2002. Division site placement in *E. coli*: Mutations that prevent formation of the MinE ring lead to loss of the normal midcell arrest of growth of polar MinD membrane domains. *EMBO J*; 21: 3347–3357
- Scheu P. D., Witan J., Rauschmeier M., Graf S., Liao Y. F., Ebert-Jung A., Basché T., Erker W. and Uden G. 2012. CitA/CitB two-component system regulating citrate fermentation in *Escherichia coli* and its relation to the DcuS/DcuR system in vivo. *J. Bacteriol*; 194(3):636-45
- Schirner K. and Errington J. 2009. Influence of heterologous MreB proteins on cell morphology of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*; 155: 3611-3621
- Scholefield G., Veening J.W. and Murray H. 2011a. DnaA and ORC: more than DNA replication initiators. *Trends Cell Biol*; 21: 188–194.
- Sievers J. and Errington J. 2000. Analysis of the essential cell division gene *ftsL* of *Bacillus subtilis* by mutagenesis and heterologous complementation. *J. Bacteriol*; 182: 5572-5579
- Sun L. and Fuchs J.A. 1992. *Escherichia coli* ribonucleotide reductase expression is cell cycle regulated. *Mol Biol Cell*; 3: 1095–1105
- Thanbichler M. and Shapiro L. 2006. MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. *Cell*; 126(1): 147-62
- Wagner J. K., Marquis K. A. and Rudner D. Z. 2009. SirA enforces diploidy by inhibiting the replication initiator DnaA during spore formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol*; 73: 963–974
- Wang J. D. and Levin P. A. 2009. Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. *Nat. Rev. Microbiol*; 7(11): 822-827

- Wang J. D., Sanders G.M. and Grossman A.D. 2007. Nutritional control of elongation of dna replication by (p)ppGpp. *Cell*; 128(5): 865-875
- Wang X., Liu X., Possoz Ch. and Sherratt D.J. 2006. The two *Escherichia coli* chromosome arms locate to separate cell halves. *Genes Dev*; 20(13): 1727-1731
- Webb Ch.D., Graumann P.L., Kahana J.A., Teleman A., Silver P.A., Losick R. 1998. Use of time-lapse microscopy to visualize rapid movement of the replication origin region of the chromosome during the cell cycle in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol*; 28:883-892
- Webb Ch.D., Teleman A., Gordon S., Straight A., Belmont A., Lin D.Ch., Grossman A.D, Wright A. and Losick R. 1997. Bipolar localization of the replication origin regions of chromosomes in vegetative and sporulating cells of *B. subtilis*. *Cell*; 88(5): 667-674
- Woo J.S., Lim J.H., Shin H.C., Suh M.K., Ku B., Lee K.H., Joo K., Robinson H., Lee J., Park S.Y., Ha N.C. and Oh B.H. 2009. Structural Studies of a Bacterial Condensin Complex Reveal ATP-Dependent Disruption of Intersubunit Interactions. *Cell*; 136(1): 85-96
- Woldringh C.L. 2002. The role of co-transcriptional translation and protein translocation (transertion) in bacterial chromosome segregation. *Mol. Microbiol*; 45: 17-29
- Wu L.J. and Errington J. 2003. RacA and the Soj–Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol*; 49: 1463-1475
- Wu L.J. and Errington J. 2012. Nucleoid occlusion and bacterial cell division. *Nat. Rev. Microbiology*; 10: 8-12
- Yang J.C., Van Den Ent F., Neuhaus D., Brevier J. and Lowe J. 2004. Solution structure and domain architecture of the divisome protein FtsN. *Mol. Microbiol*; 52(3): 651-660
- Yoshikawa H., O’Sullivan A., Sueoka N. 1964. Sequential replication of the *Bacillus subtilis* chromosome, III. regulation of initiation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 52: 973-980