

## МОРФОЛОГИЯ ХРОМАТИНА И ЦИТОКИНЕЗ ПЛЕВРОКАПСОВЫХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

© А. В. Пиневи́ч,<sup>1</sup> О. В. Гаврилова, С. Г. Аверина

Биологический НИИ С.-Петербургского государственного университета;

<sup>1</sup>электронный адрес: Pinevich.A@mail.ru

С помощью оптики Номарского (дифференционно-интерференционного контраста, DIC) и флуоресцентной микроскопии описаны морфология хроматина и цитокинез цианобактерии *Pleurocapsa* sp. CALU 1126, способный к дроблению (множественному размножению материнской клетки-макроцита с образованием уникальных мелких репродуктивных клеток-беоцитов). Выявлены две формы поведения хроматина в жизненном цикле: 1) образование множественных хроматиновых областей, предшествующее их компартиментализации путем дробления; 2) конденсация хроматина в фазе бинарного деления и деконденсация хроматина в период роста. Установлено, что цитокинетическая основа дробления состоит в последовательных бинарных делениях макроцита, тогда как в промежутке между ними материнские клетки (пребеоциты) не растут.

Ключевые слова: цианобактерии, дробление, беоцит, хроматин, эпифлуоресценция ДНК.

Клеточный цикл любого организма складывается из трех важнейших стадий — репликации хромосом(ы), сегрегации геномных эквивалентов и деления. У бактерий клеточный цикл связан с размножением, которое обычно происходит путем равного или неравного бинарного деления (Errington et al., 2003). Исключения — это крайне редко встречающееся тройственное деление (англ. ternary fission), которое наблюдается у глубоководной квазифототрофной бактерии *Citromicrobium bathyomarimum* (Yurkov et al., 1999) и у одноклеточных зеленых бактерий *Pelodictyon* spp. (Pfennig, Overmann, 2001), а также уникальное четвертное деление (англ. tetrary fission), свойственное радиоустойчивой бактерии *Deinococcus radiodurans* (Battista, Rainey, 2001).

Грифы высших (спорогенных) актиномицетов, или актинобактерий (Locci, 1989), могут образовывать серию поперечных, а иногда еще и продольных септ. В данном случае репликация, за которой следует компартиментализация дочерних хромосом, разделена во времени с ростом дочерних клеток. Это «измельчающее» деление называется дроблением (англ. multiple fission). Биологическая стратегия дробления очевидна — таким путем достигается интенсивное размножение и экстенсивное расселение (Rippka, Herdman, 1985).

Кроме высших актинобактерий способностью к дроблению обладают цианобактерии порядка *Pleurocapsales* (Rippka et al., 2001). Большинство из них способно реализовать две контрастные программы развития: в первом случае путем бинарного размножения, сопряженного с ростом, образуются макроциты (крупные очехленные материнские клетки); во втором случае в результате не сопряженного с ростом множественного размножения макроцита возникает спорангий — рудиментарный чехол, наполненный беоцитами (мелкими дочерними клетками, каждая с собственным чехлом или без чехла). Покинув спорангий, беоциты вырастают в макроциты.

Цитологический механизм дробления у цианобактерий неясен. С одной стороны, это может быть серия последовательных бинарных делений макроцита внутри материнского чехла (Rippka et al., 2001). Альтернативой является множественное деление посредством закладки системы септ сначала в центрипетальном, а затем в тангенциальном направлении. Единственное свидетельство в пользу данного способа дробления, полученное на примере *Dermocarpa* sp. (Kunkel, 1984), ни подтверждено, ни опровергнуто.

Дробление сочетает в себе множественное копирование хромосом(ы) с упорядоченным распределением геномных эквивалентов между дочерними клетками. Для реконструкции этого процесса необходимы наблюдения за динамикой хроматиновых структур в клеточном цикле, включающем в себя фазу цитокинеза.

Результаты просвечивающей электронной микроскопии цианобактерий трудно интерпретировать, а окрашивание ДНК-тропными красителями зафиксированных клеток с экстрагированными из них пигментами часто дает артефакты (Coleman, 1985; Serák, 1996). Поэтому наиболее адекватный метод изучения компартиментализации хроматиновых структур — это регистрация эпифлуоресценции комплексов ДНК с витальными красителями (Pinevich, Grigoryeva, 1994) или регистрация автофлуоресценции гибридного «белка деления» FtsZ-GFP (Mazouni et al., 2004).

В настоящем сообщении анализируются морфология хроматина и цитокинез *Pleurocapsa* sp. CALU 1126 с целью реконструкции механизма дробления.

## Материал и методика

Штамм *Pleurocapsa* sp. CALU 1126, входящий в коллекцию культур микроорганизмов СПбГУ (Pinevich et al., 2004), был выделен авторами в 1999 г. из воды

эуфотической зоны оз. Ладожское. Посевной материал поддерживали в колбах или пробирках на жидкой или плотной (0.8%-ный Бакто-агар Difco) минеральной среде BG11<sup>M</sup> (Pinevich et al., 1997) при комнатной температуре и непрерывном освещении белым люминесцентным светом интенсивностью  $0.5 \cdot 10^3$  лк. Культуру выращивали в цилиндрических сосудах эрлифтного типа объемом 500 мл, содержащих 300 мл среды BG11<sup>M</sup>, при 23 °C с непрерывным освещением белым люминесцентным светом интенсивностью  $1.5 \cdot 10^3$  лк и барботированием стерильным воздухом со скоростью 100 мл/мин<sup>-1</sup>.

Условия эксперимента. Морфологию хроматиновых структур регистрировали на основе эпифлуоресценции комплекса ДНК с 4', 6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI), пользуясь ранее разработанной методикой (Pinevich, Grigoryeva, 1994). Для этого материал отделяли от культуральной среды центрифугированием при 500 g, осторожно ресуспендировали в 50 mM Na-фосфатном буфере (pH 7.0) и инкубировали 20—40 мин при комнатной температуре в этом же буфере с добавлением DAPI (конечная концентрация 1—3 мкг/мл<sup>-1</sup>). С целью облегченного проникновения флуорохрома клетки мягко пермеабилizировали диметилсульфоксидом (конечная концентрация 1 мг/мл<sup>-1</sup>).

Микроскопия. Наблюдения проводили в полифункциональном микроскопе Leica DMRXA ( $\times 1.5 \cdot 10^3$ ). Парные изображения методами дифференциально-интерференционного контраста (DIC, оптика Номарского) и флуоресцентной микроскопии получали с помощью программного обеспечения Leica Image 5.0 и дополнительно оборудования ЦКП «ХРОМАС» БиНИИ СПбГУ.

Реактивы. Использовали отечественные химические реактивы квалификации не ниже «чда», а также DAPI и диметилсульфоксид квалификации «reagent grade» (Serva, Германия).

## Результаты и обсуждение

Цианобактерии, относящиеся к порядку *Pleurocapsales*, или «Субсекции» II филы VX *Cyanobacteria*, размножаются исключительно или только на определенной стадии жизненного цикла путем дробления с образованием уникальных репродуктивных клеток-беоцитов (Rippka et al., 2001). Они бедно представлены в мировых коллекциях микроорганизмов и слабо изучены, поскольку характеризуются медленным ростом на фоне совместно происходящих актов бинарного размножения и дробления.

Эндогенные или экзогенные факторы, инициирующие процесс дробления, еще не установлены. Известно только, что в лабораторных условиях после переноса стационарной культуры на свежую среду асинхронное дробление начинается через 12—24 ч (Herdman, Rippka, 1988) и что режим культивирования влияет на соотношение между частотой актов бинарного размножения и дробления (Rippka et al., 2001).

В использованных нами условиях интенсивного выращивания *Pleurocapsa* sp. CALU 1126 в культуре одновременно присутствовали макроциты, спорангии и свободные беоциты (см. рисунок, А). Пик выхода беоцитов ( $\sim 3.5 \cdot 10^6$  клеток/мл<sup>-1</sup>) наблюдался на 14—16-е сут. В результате множественного размножения отдельного макроцита образуются 2<sup>5</sup>—2<sup>6</sup> беоцитов. Ювенильные беоциты, находящиеся в спорангии, в 5 раз меньше макроцитов

по диаметру (соответственно  $\sim 1$  и  $\sim 5$  мкм), т. е. на два порядка уступают им в объеме (см. рисунок, А).

В случае *Pleurocapsa* sp. CALU 1126 мы не обнаружили псевдофиламентозных структур, типичных для плеврокапсовых цианобактерий со сложной морфологией (Rippka et al., 2001). В результате нерегулярного бинарного деления макроцитов в разных плоскостях образуются простые клеточные агрегаты (см. рисунок, А). Чехол в делении не участвует, дочерние макроциты одеваются собственными чехлами, поэтому из двух вложенных друг в друга чехлов (см. рисунок, Б) внешний — это чехол материнской клетки.

При флуоресцентном микроскопировании комплекс ДНК—DAPI испускал интенсивную бело-голубую флуоресценцию, что дало возможность определить общую конфигурацию хроматиновых областей. Красное фоновое свечение за счет неспецифического связывания флуорохрома с фотосинтетическими пигментами и их автофлуоресценция были незначительными.

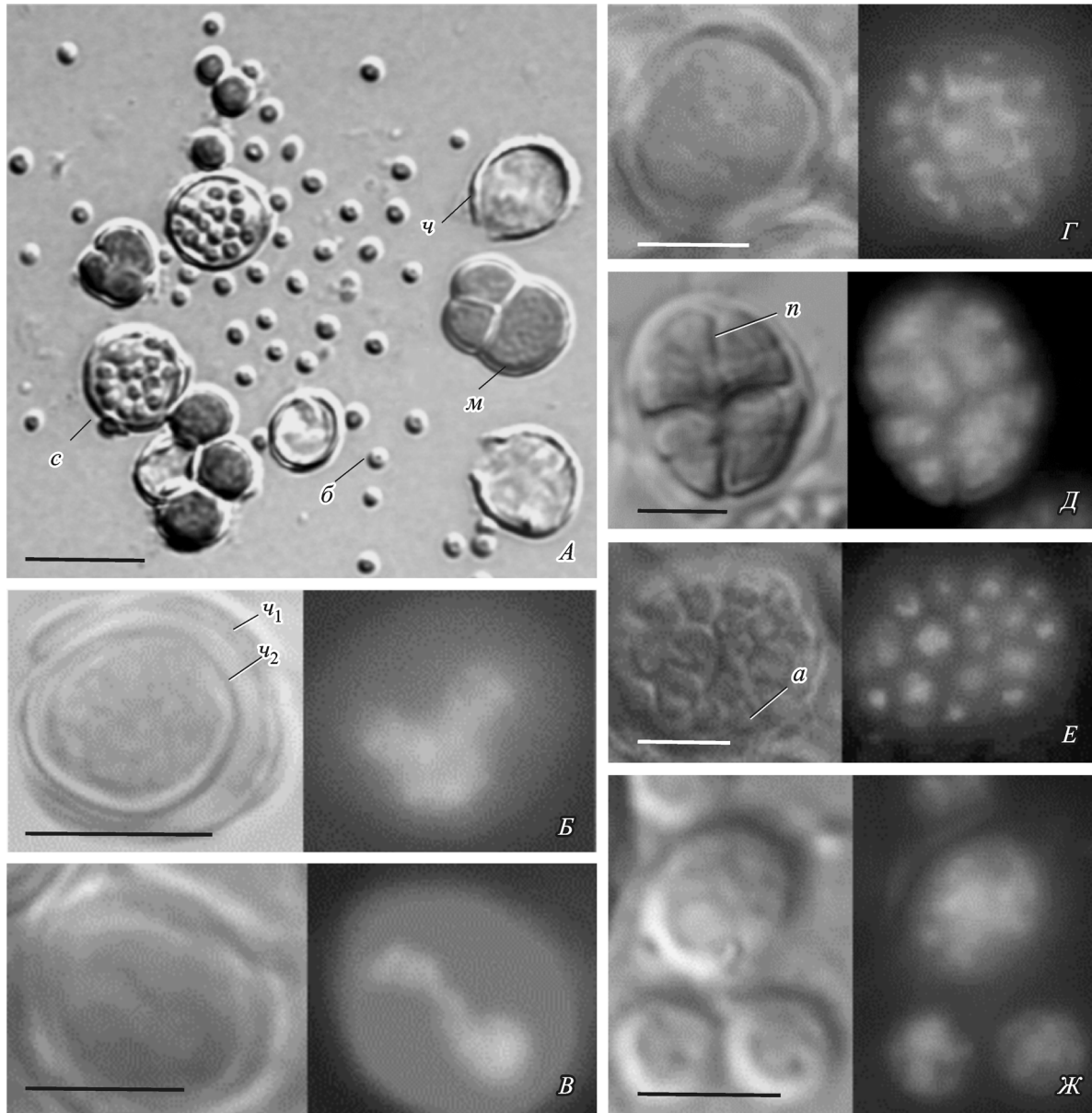
Как показало микроскопирование клеток, инкубированных с DAPI, в неразмножающихся макроцитах хроматин занимает центральную часть клетки, имеет лопастную форму и не расчленен на изолированные локусы (см. рисунок, Б). Тем не менее он соответствует более чем одному геномному эквиваленту, поскольку клетки цианобактерий обычно содержат несколько идентичных хромосом (Labarge et al., 1989; Binder, Chisholm, 1990).

Перед бинарным размножением хроматин конденсируется, принимает гантелевидную форму и занимает осевое положение (см. рисунок, В).

Детерминация процесса дробления связана с изменением организации хроматина — он расчленяется на автономные или взаимосвязанные анастомозами области, которые распределены по всему объему клетки (см. рисунок, Г). Ранее (Herdman, Rippka, 1988) было высказано предположение о том, что цитокинетической стадии дробления предшествует множественная репликация хромосомы макроцита. По-видимому, мы наблюдаем морфологическое отражение этого процесса, хотя вопрос о копийности хромосомы, т. е. плоидности дочерних хроматиновых зон (см. ниже), остается открытым.

Изучая дробление *Pleurocapsa* sp. CALU 1126, мы не нашли признаков множественного деления путем образования серии радиальных и тангенциальных септ, что предполагается для других плеврокапсовых цианобактерий — *Dermocarpa* spp. (Kunkel, 1984). Напротив, отчетливо видно, что компартиментализация дочерних хроматиновых областей осуществляется в результате последовательных бинарных делений (см. рисунок, Д).

Местоположение хроматиновых областей определяется взаимодействием точек начала репликации с избранными локусами цитоплазматической мембраны (Errington et al., 2003). Поэтому при дроблении должна существовать зависимость между числом образующихся септ и количеством дочерних хроматиновых областей. Тем не менее надежность компартиментализации ограничена — в отдельных случаях наблюдаются abortивные беоциты, не содержащие хроматина (см. рисунок, Е). Причина этого не вполне ясна. Известно, что в случае *E. coli* и *B. subtilis* септальное Z-кольцо образуется из мономеров тубулиноподобной ГТФазы FtsZ и его локализация контролируется осциллирующей системой MinCDE (Errington et al., 2003). Сборка Z-кольца зависит от правильного расхождения хроматиновых структур, однако у цианобактерий они изолированы от периферии тилакоидными мембранами.



Прижизненные микрофотографии цианобактерии *Pleurocapsa* sp. CALU 1126, полученные методами дифференциально-интерференционного контраста (светлый фон) и флуоресцентной микроскопии (темный фон).

А — аликвота культуры с клетками на разных стадиях жизненного цикла (м — макроцит, б — беоцит, с — спорангий, ч — пустой чехол спорангия); Б — неразмножающийся макроцит (ч<sub>1</sub> — чехол материнской клетки, ч<sub>2</sub> — чехол макроцита); В — бинарно размножающийся макроцит; Г — макроцит с многокопийными нуклеотидами; Д — дробящийся макроцит (п — формирующаяся перегородка); Е — спорангий с беоцитами (а — abortивный беоцит); Ж — ювенильные беоциты. Масштабные отрезки: А — 10, Б–Е — 5, Ж — 1 мкм.

Видимо, это и снижает точность их таргетинга. Хотя у цианобактерий обнаружены ортологи генов *ftsZ* и *minCDE*, изучение молекулярного механизма цитокинеза только начинается и пока ограничивается примером бинарного размножения (Mazouni et al., 2004; Miyagishima et al., 2005).

Ювенильные беоциты, находящиеся в спорангии, содержат конденсированный хроматин со слабо выраженными лопастями, локализованный в центральной части клетки (см. рисунок, Е). Выход ювенильных беоцитов из спорангия осуществляется путем механического разрыва чехла (см. рисунок, А). В свободных беоцитах хроматин реорганизуется и приобретает такую же морфологию, как в макроцитах (см. рисунок, Ж), т. е. цикл морфологических превращений хроматина замыкается.

Таким образом, с помощью прижизненного окрашивания DAPI мы обнаружили две формы поведения хроматина в жизненном цикле *Pleurocapsa* sp. CALU 1126: 1) образование множественных хроматиновых областей, предшествующее их компартиментализации в результате дробления; 2) конденсация хроматина в фазе бинарного деления и деконденсация хроматина в период роста.

Цитокинетическая основа дробления состоит в последовательных бинарных делениях макроцита, и в промежутке между ними материнские клетки (пребеоциты) не растут. В отличие от множественного размножения бинарное размножение предваряется ростом материнской клетки. По-видимому, как и в других вариантах дифференциации у цианобактерий (Brahamsha, Haselkorn, 1991),

блокирование программы роста при дроблении происходит на транскрипционном уровне и связано с адаптивной заменой  $\sigma$ -субъединиц РНК-полимеразы (сигма-факторов).

Авторы приносят благодарность проф. Е. Р. Гагинской и сотрудникам ЦКП «ХРОМАС» БиНИИ СПбГУ за оказанное содействие.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49621).

### Список литературы

- Battista J. R., Rainey F. A.* 2001. Genus I. *Deinococcus* Brooks and Murray 1981, 354<sup>VP</sup>, emend. Rainey et al. 1997. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. New York etc.: Springer-Verlag. 396—403.
- Binder B. J., Chisholm S. W.* 1990. Relationship between DNA cycle and growth rate in *Synechococcus* sp. strain PCC 6301. *J. Bacteriol.* 172: 2313—2319.
- Brahamsha B., Haselkorn R.* 1991. Isolation and characterization of the gene encoding the principal sigma factor of the vegetative cell RNA polymerase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 173: 2442—2450.
- Cepák V.* 1996. Nucleoid morphology in the coccal cyanophyte *Cyanothece halobia* (Chroococcales, Cyanophyta) — a DAPI fluorescence study. *Phycologia*. 35: 523—527.
- Coleman A.* 1985. Cyanophyte and cyanelle DNA: a search for the origins of plastids. *J. Phycol.* 21: 371—379.
- Errington J., Daniel R. A., Scheffers D.-J.* 2003. Cytokinesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 52—65.
- Herdman M., Rippka R.* 1988. Cellular differentiation: hormonia and baecocytes. *Meth. Enzymol.* 167: 232—242.
- Kunkel D. D.* 1984. Cell division in baecocyte producing cyanobacteria. *Protoplasma*. 123: 104—115.
- Labarre J., Chauvat F., Thuriaux P.* 1989. Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *J. Bacteriol.* 171: 3449—3457.
- Locci R.* 1989. Section 29. Streptomycetes and related genera. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore etc.: Williams and Wilkins. 2451—2508.
- Mazouni K., Domain F., Cassier-Chauvat C., Chauvat F.* 2004. Molecular analysis of the key cytokinetic components of cyanobacteria: FtsZ, ZipN and MinCDE. *Mol. Microbiol.* 52: 1145—1158.
- Miyagishima S., Wolk C. P., Osteryoung K. W.* 2005. Identification of cyanobacterial cell division genes by comparative and mutational analysis. *Mol. Microbiol.* 56: 126—143.
- Pfennig N., Overmann J.* 2001. Genus IV. *Pelodictyon* Lauterborn 1913, 98<sup>AL</sup>. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. New York etc.: Springer-Verlag. 614—617.
- Pinevich A., Grigoryeva I.* 1994. Epifluorescence microscopy of *Anabaena* sp.: nucleoid configurations and evidence for inclusion-associated DNA. *Experientia*. 50: 44—48.
- Pinevich A. V., Mamkaeva K. A., Titova N. N., Gavrilova O. V., Ermilova E. V., Kvitko K. V., Pljusheva A. V., Voloshko L. N., Averina S. G.* 2004. St. Petersburg Culture Collection (CALU): four decades of storage and research with microscopic algae, cyanobacteria and other microorganisms. *Nova Hedwigia*. 79: 115—126.
- Pinevich A. V., Matthijs H. C. P., Averina S. G., Gavrilova O. V.* 1997. Picocyanophyte (cyanobacterium) from the boreal inland water accumulates phycoerythrin as a major biliprotein. *Algol. Studies*. 87: 99—108.
- Rippka R., Herdman M.* 1985. Division patterns and cellular differentiation in cyanobacteria. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*. 136 A: 33—39.
- Rippka R., Waterbury J. B., Herdman M., Castenholz R. W.* 2001. Subsection II (Formerly *Pleurocapsales* Geitler 1925, emend. Waterbury and Stanier 1987). In: Bergey's manual of systematic bacteriology. New York etc.: Springer-Verlag. 514—519.
- Yurkov V. V., Krieger S., Stackebrandt E., Beatty J. T.* 1999. *Citromicrobium bathyomarimum*, a novel aerobic bacterium isolated from deep-sea hydrothermal vent plume waters that contains photosynthetic pigment-protein complexes. *J. Bacteriol.* 181: 4517—4525.

Поступила 25 XII 2006

### CHROMATIN MORPHOLOGY AND CYTOKINESIS IN PLEUROCAPSALEAN CYANOBACTERIA

A. V. Pinevich,<sup>1</sup> O. V. Gavrilova, S. G. Averina

Research Institute of Biology of St. Petersburg University;

<sup>1</sup> e-mail: Pinevich.A@mail.ru

By means of differential interference contrast (DIC) and fluorescence microscopy, chromatin morphology and cytokinesis have been described in the cyanobacterium *Pleurocapsa* sp. CALU 1126 capable of multiple fission (multiple reproduction of the mother cell, the macrocyte, with formation of unique reproductive cells, the baecocytes). Two kinds of chromatin behavior have been revealed in the cell cycle: 1) the formation of numerous chromatin areas before their compartmentalization by multiple fission; 2) chromatin condensation in the phase of binary fission, and chromatin decondensation in growth period. The cytokinetic essence of multiple fission has been shown to consist of successive binary fissions of the macrocyte, while in between the mother cells (pre-baecocytes) do not grow.

**Key words:** cyanobacteria, fission, baecocytes, chromatin, fluorescence microscopy, DNA.