

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

На правах рукописи

ВЕДЯЙКИН Алексей Дмитриевич

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ FtsZ

*Escherichia coli* И МИКОПЛАЗМ

03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.ф.-м.н. Ходорковский Михаил Алексеевич

Санкт-Петербург

2018 год

## Оглавление

1. Введение.....	5
1.1. Актуальность работы.....	5
1.2. Методы исследования.....	7
1.3. Цель и задачи работы.....	8
1.4. Научная новизна и практическая ценность работы.....	8
1.5. Положения, выносимые на защиту .....	9
1.6. Апробация работы и публикации.....	10
1.7. Личный вклад автора .....	10
1.8. Структура и объем работы .....	10
1.9. Финансовая поддержка работы .....	10
2. Литературный обзор .....	11
2.1. Механизмы деления бактерий .....	11
2.1.1. Гены деления в бактериальном геноме .....	11
2.1.2. Структура и состав бактериальной дивисомы <i>E. coli</i> . .....	13
2.1.3. Структура и состав дивисомы других видов бактерий.....	19
2.1.3. Свойства белка FtsZ в условиях <i>in vitro</i> .....	25
2.1.3. Механизмы регуляции бактериального деления .....	28
2.1.4. FtsZ как мишень для новых антибактериальных препаратов .....	35
2.1.5. Механизмы деления микоплазм .....	38
2.2. Методы микроскопии сверхвысокого разрешения. ....	43
2.2.1. Детерминистские методы визуализации .....	46
2.2.2. Стохастические методы визуализации .....	51
3. Материалы и методы .....	56

3.1. Подготовка фиксированных клеток <i>E. coli</i> для микроскопии сверхвысокого разрешения .....	56
3.2. Подготовка живых клеток <i>E. coli</i> для микроскопии сверхвысокого разрешения.....	57
3.3. Подготовка фиксированных клеток <i>M. gallisepticum</i> и <i>A. laidlawii</i> для микроскопии сверхвысокого разрешения .....	58
3.4. Подготовка фиксированных клеток <i>M. gallisepticum</i> и <i>A. laidlawii</i> для иммуноэлектронной микроскопии .....	59
3.5. Микроскопия сверхвысокого разрешения (методы SMLM и SRRF) ...	59
3.5.1. Двухмерная и трехмерная микроскопия SMLM, SRRF, а также стандартная флуоресцентная микроскопия фиксированных клеток <i>E. coli</i> , <i>M. gallisepticum</i> и <i>A. laidlawii</i> .....	59
3.5.2. Локализационная микроскопия и микроскопия SRRF с использованием живых клеток <i>E. coli</i> .....	61
3.5.3. Анализ размеров кластеров FtsZ .....	62
3.6. Электронная микроскопия .....	63
3.7. Ко-иммунопреципитация белков, взаимодействующих с белками FtsZ <i>M. gallisepticum</i> и <i>A. laidlawii</i> .....	63
3.8. Со-осаждение белков, взаимодействующих с белками FtsZ <i>M. gallisepticum</i> и <i>A. laidlawii</i> в клетках <i>E. coli</i> .....	64
3.9. Получение поликлональных антител к белкам FtsZ <i>M. gallisepticum</i> и <i>A. laidlawii</i> .....	65
3.9.1. Очистка рекомбинантных белков FtsZ .....	65
3.9.2. Иммунизация животных.....	67
3.9.3. Очистка и тестирование антител.....	67
3.9.4. Оценка концентрации белков FtsZ в клетках микоплазм.....	68

3.10. Визуализация FtsZ в живых клетках <i>M. gallisepticum</i> при помощи эндогенно-экспрессируемой флуоресцентной метки.....	69
4. Результаты и обсуждение.....	70
4.1. Визуализация структур, формируемых белком FtsZ в клетках <i>E. coli</i> .	70
4.1.1. Метод локализационной микроскопии позволяет визуализировать белок FtsZ и другие структуры внутри клетки <i>E. coli</i> с разрешением до 20 нм.....	70
4.1.2. Z-кольцо – неоднородная структура.....	79
4.1.3. Анализ структур, формируемых белком FtsZ в ходе восстановления деления после филаментации клеток.....	83
4.3. Тестирование антител к белкам FtsZ <i>M. gallisepticum</i> и <i>A. laidlawii</i> , оценка концентрации FtsZ в клетках микоплазм.....	86
4.4. Структуры, формируемые белками FtsZ в клетках <i>M. gallisepticum</i> и <i>A. laidlawii</i> .....	87
4.5. Белки, взаимодействующие с белками FtsZ в клетках <i>M. gallisepticum</i> и <i>A. laidlawii</i> .....	91
4.6. Структуры, формируемые белками FtsZ <i>M. gallisepticum</i> и <i>A. laidlawii</i> в клетках <i>E. coli</i> .....	93
4.7. Белки, взаимодействующие с белками FtsZ микоплазм в клетках <i>E. coli</i> .....	98
4.8. Локализация белка FtsZ в живых клетках <i>M. gallisepticum</i> .....	101
5. Заключение.....	104
6. Выводы.....	105
7. Список сокращений и условных обозначений.....	106
8. Список литературы.....	108
Благодарности.....	118

## 1. Введение

### 1.1. Актуальность работы

В данной работе были исследованы некоторые свойства белков FtsZ трёх видов бактерий — *Escherichia coli*, *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma gallisepticum*. FtsZ относится к белкам цитоскелета — структурным элементам клеток, которые участвуют в осуществлении жизненно важных функций, таких как поддержание формы клетки, внутриклеточный транспорт, деление, движение клетки. FtsZ является одним из наиболее консервативных белков цитоскелета: он обнаружен у большинства бактерий, у многих архей, а также в хлоропластах и митохондриях некоторых видов эукариот. Кроме того, FtsZ считается эволюционным предшественником тубулина: оба белка содержат консервативный мотив, связанный с гидролизом ГТФ, имеют похожую трехмерную структуру и участвуют (следует отметить, по-разному) в процессе деления, формируя динамичные полимерные структуры, служащие каркасом для аппарата деления клетки. FtsZ и тубулин полимеризуются с образованием одонитевых полимеров, которые затем могут ассоциироваться в более сложные структуры: микротрубочки в случае тубулина и пучки в случае FtsZ. Для большинства хорошо изученных видов бактерий, включая *E. coli*, FtsZ является жизненно необходимым белком, поэтому он рассматривается как перспективная мишень для новых антибактериальных препаратов. В настоящее время описано множество антибактериальных веществ естественного и искусственного происхождения, ингибирующих активность белка FtsZ, причём некоторые из этих веществ демонстрируют ингибирующие концентрации на уровне хороших антибиотиков.

В большинстве изученных видов бактерий белок FtsZ формирует Z-кольцо, которое выступает как каркас для дивисомы – комплекса белков, участвующих в делении бактерий. Несмотря на интенсивное изучение, на настоящий момент

существует достаточно много вопросов, касающихся механизмов работы данного белка, на которые только предстоит ответить. Даже в таком хорошо изученном модельном организме, как *E. coli*, до сих пор неизвестна точная структура Z-кольца: большинство работ свидетельствует в пользу слабо упорядоченного массива протофиламентов, из которых состоит Z-кольцо, в то же время часть работ говорит о том, что протофиламенты в Z-кольце хорошо упорядочены и формируют замкнутое кольцо или спираль. Информация о точной структуре Z-кольца имеет принципиальное значение для понимания как механизмов цитокинеза в целом, так и роли белка FtsZ в этом процессе. Например, продолжительное время обсуждается вопрос, вносит ли существенный вклад в цитокинез так называемая сократительная сила, которую Z-кольцо может генерировать в условиях *in vitro*, или Z-кольцо является лишь каркасом для белков, которые отвечают за синтез клеточной стенки в области деления. Для ответа на этот вопрос важно понять, как организованы однонитевые филаменты в составе Z-кольца. В данной работе была осуществлена субдифракционная визуализация Z-кольца в *E. coli* при помощи методов флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения, что позволило охарактеризовать структуру Z-кольца с высокой точностью.

У представителей класса *Mollicutes*, часто также собирательно называемых микоплазмами, роль белка FtsZ плохо изучена и может существенным образом отличаться от таковой в *E. coli*. Микоплазмы лишены клеточной стенки, с синтезом которой связана основная роль белка FtsZ в *E. coli*, кроме того, в редуцированном геноме этих бактерий отсутствует большинство гомологов известных белков деления. Это делает представителей данного класса интересными с точки зрения концепта минимальной клетки, а именно выявления минимального набора белков, обеспечивающих деление клетки. Многие микоплазмы являются важными патогенами (например, *A. laidlawii* является возбудителем фитоплазмозов – воспалительных заболеваний растений, а *M. gallisepticum* — респираторных заболеваний птиц), борьба с которыми затруднена, потому что арсенал антибиотиков ограничен (например, большая

группа антибиотиков, ингибирующих синтез клеточной стенки, по понятным причинам не действует на микоплазмы). Кроме того, вследствие высокой изменчивости микоплазмы довольно быстро вырабатывают устойчивость к используемым препаратам. Поэтому изучение их организации, в том числе механизмов деления, является важной задачей с практической точки зрения.

## 1.2. Методы исследования

В НИК «Нанобиотехнологии» СПбПУ [1] были внедрены (в том числе в ходе выполнения данной работы) и успешно используются методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения (локализационной микроскопии), которые позволяют осуществлять визуализацию с разрешением до 20 нм в различных режимах (двухмерная, трехмерная, многоцветная микроскопия; визуализация в фиксированных и живых клетках). Эти методы были успешно использованы в данной работе для изучения структур, формируемых белками FtsZ видов *E. coli*, *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*.

В дополнение к флуоресцентной визуализации белков FtsZ в клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*, в работе был использован также классический метод иммуноэлектронной микроскопии, что позволило более надежно интерпретировать данные, полученные двумя независимыми методами.

Так как в данной работе было показано, что структуры, формируемые белками FtsZ видов *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*, существенно отличаются от таковых для белка FtsZ *E. coli*, следует предположить, что механизмы деления микоплазм (и роль FtsZ в этом процессе) довольно сильно отличаются от механизмов деления *E. coli*. По-видимому, гомологи белка FtsZ микоплазм имеют другой набор белков-партнеров, однако литературных данных на этот счёт практически нет. Для того, чтобы более точно интерпретировать структуры, формируемые белками FtsZ указанных видов микоплазм в клетках *E. coli*, *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*, в данной работе наряду с методами микроскопии сверхвысокого разрешения были

использованы методы анализа белок-белковых взаимодействий. Методы ко-иммунопреципитации и со-осаждения позволили впервые идентифицировать белки – партнеры белков FtsZ видов *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*, что вносит существенный вклад в понимание роли белка FtsZ указанных видов бактерий, в том числе в делении.

### 1.3. Цель и задачи работы

**Цель работы** — выявление свойств белков FtsZ *Escherichia coli*, *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma gallisepticum*.

**Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:**

1. Анализ структур, формируемых белком FtsZ в фиксированных и живых клетках *E. coli*, при помощи методов флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения.

2. Получение и тестирование поликлональных антител к белкам FtsZ бактерий *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*.

3. Анализ структур, формируемых белками FtsZ видов *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* в фиксированных клетках *E. coli*, *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*.

4. Получение штамма *M. gallisepticum* с эндогенно-экспрессируемым флуоресцентно-меченым белком FtsZ и визуализация структур, формируемых этим белком, в живых клетках.

5. Идентификация белков – партнеров FtsZ *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* в клетках *E. coli*, *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*.

### 1.4. Научная новизна и практическая ценность работы

Результаты, изложенные в данной работе, получены впервые и носят фундаментальный характер. Впервые выявлено утолщение Z-кольца в ходе его сокращения в *E. coli*, что поддерживает гипотезу о том, что Z-кольцо сокращается за счёт перераспределения протофиламентов FtsZ в его составе, а не за счёт их

укорочения или исключения из Z-кольца. Оценены размеры кластеров на изображениях структур FtsZ в норме и при нарушении деления под действием белка SulA. Впервые визуализированы структуры, формируемые белками FtsZ в клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*. Эти структуры существенно отличаются от классического Z-кольца, что может говорить о вовлечении белков FtsZ в отличные от цитокинеза процессы. Впервые были идентифицированы белки - партнеры FtsZ в клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*; среди них не было выявлено гомологов известных белков деления, однако было установлено, что FtsZ микоплазм взаимодействует с белками, участвующими в различных метаболических путях, в фолдинге и деградации белков, трансляции.

В большинстве хорошо изученных видов бактерий, включая *E. coli*, FtsZ является жизненно необходимым белком для большинства изученных бактерий, поэтому он рассматривается как перспективная мишень для новых антибактериальных препаратов [2]. В настоящее время описано значительное количество антибактериальных веществ естественного и искусственного происхождения, ингибирующих активность белка FtsZ, причём некоторые из этих веществ демонстрируют ингибирующие концентрации на уровне хороших антибиотиков. В будущем результаты работы могут способствовать созданию новых антибактериальных препаратов.

### 1.5. Положения, выносимые на защиту

1. Z-кольцо, формируемое белком FtsZ в *Escherichia coli*, представляет собой неоднородную структуру и утолщается в процессе цитокинеза.
2. Гомологи FtsZ в клетках *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma gallisepticum* не формируют Z-колец и локализуются иначе, чем FtsZ в клетках *E. coli*.
3. Гомологи FtsZ в клетках *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* взаимодействуют с наборами белков, состав которых значительно отличается от набора белков-партнеров FtsZ *E. coli*.

## **1.6. Апробация работы и публикации**

Промежуточные результаты работы докладывались на ряде международных и всероссийских конференций. В ходе выполнения работы опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах, а также 12 тезисов конференций.

## **1.7. Личный вклад автора**

Автором самостоятельно выполнен основной объем работы. Анализ образцов при помощи масс-спектрометрии осуществляла Артамонова Т.О. в НИК «Нанобиотехнологии» СПбПУ. Эксперименты с использованием электронной микроскопии выполнены Вишняковым И.Е. в Институте Цитологии РАН. Иммунизацию животных осуществлял Иванов В.А. в Институте Цитологии РАН.

## **1.8. Структура и объем работы**

Диссертационная работа изложена на 118 страницах машинописного текста и включает: введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы (141 источник) и благодарности. Работа содержит 39 иллюстраций и 7 таблиц.

## **1.9. Финансовая поддержка работы**

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 15-04-07472, № 18-04-01074), Российского научного фонда (проекты № 17-74-20065, № 14-34-00023) и государственного задания № 3.8742.2017/8.9.

## 2. Литературный обзор

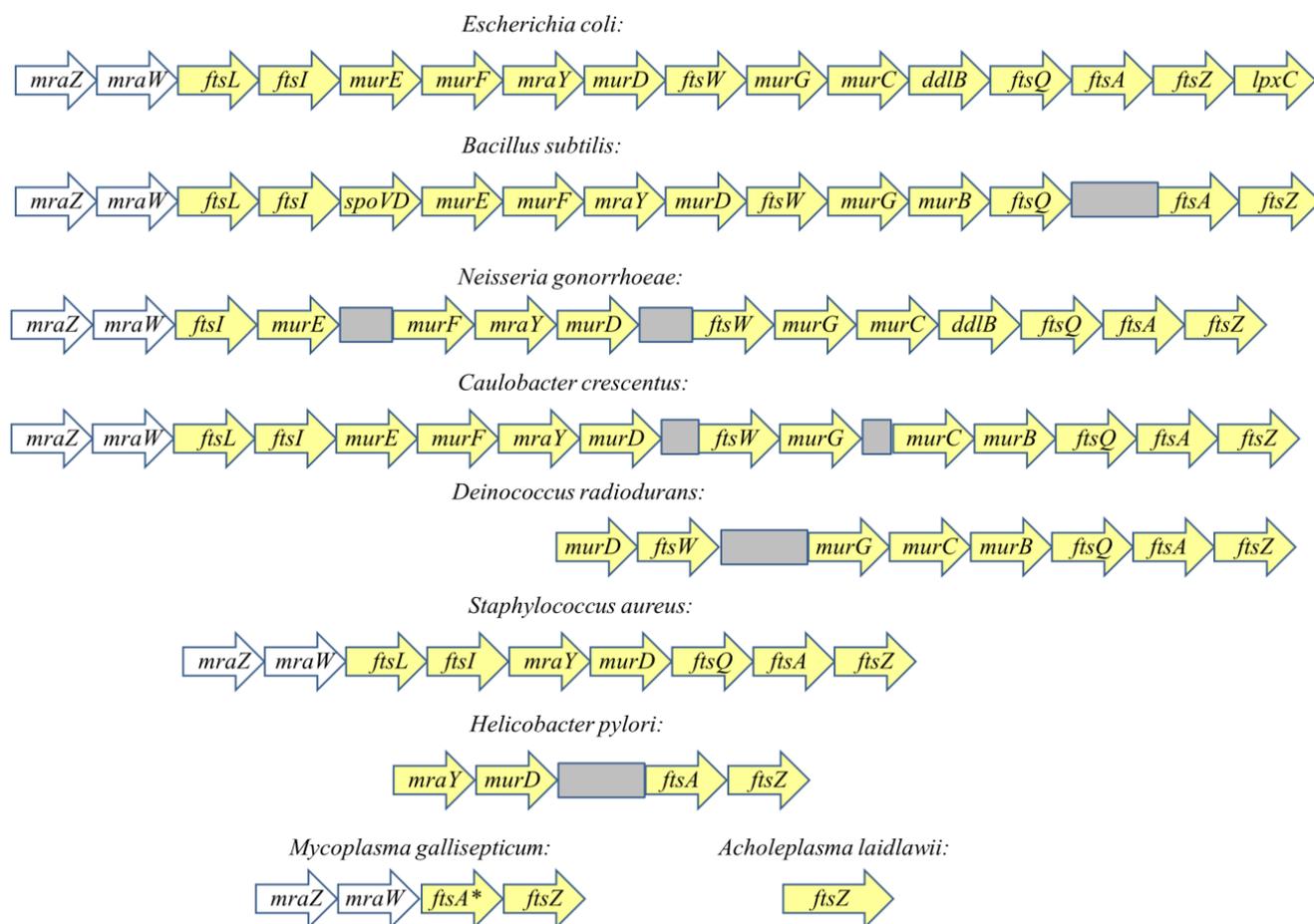
### 2.1. Механизмы деления бактерий

В данной главе рассматриваются основы бактериального деления. Основное внимание уделено нескольким модельным организмам, главным образом *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*.

#### 2.1.1. Гены деления в бактериальном геноме

В середине XX века генетические исследования позволили открыть в геноме *E. coli* локусы, которые содержат гены, ответственные за процесс деления, в том числе за септообразование (септа - перегородка между дочерними клетками, образующаяся в ходе деления бактерий) [3]. Ключевой вклад в открытие этих генов внесла методология, предполагающая использование температурно-чувствительных мутантов в сочетании с фаговой трансдукцией: бактерии с определёнными мутациями в указанных генах оказывались не способными к делению при повышении температуры окружающей среды выше критической и образовывали вытянутые клетки-филаменты. Эти мутанты, а затем и сами гены, в которых были картированы мутации, стали обозначать с использованием аббревиатуры *fts* (от англ. «filamentous temperature-sensitive mutants» - температурно-чувствительные мутанты, образующие филаменты). Важно отметить, что в некоторых мутантах процессы репликации и сегрегации (распределения между будущими дочерними клетками) ДНК нарушены не были, что позволило связать соответствующие этим мутациям гены именно с цитокinesisом, а не с репликацией или сегрегацией ДНК. Среди этих генов были идентифицированы такие гены, как *ftsA*, *ftsQ*, *ftsL*, *ftsZ* и другие. Последний ген кодирует соответствующий белок FtsZ — первый обнаруженный бактериальный белок цитоскелета. Использование указанной выше методологии позволило показать, что большинство генов, отвечающих за процесс деления, расположено

компактно в составе так называемого кластера *dcw* (англ. division and cell wall — деление и клеточная стенка) в районе 2 минуты на хромосоме *E. coli*, что было существенным прорывом в понимании устройства аппарата деления бактериальной клетки [4]. Схематически кластер *dcw* на примере нескольких модельных видов представлен ниже (см. **Рисунок 1**).



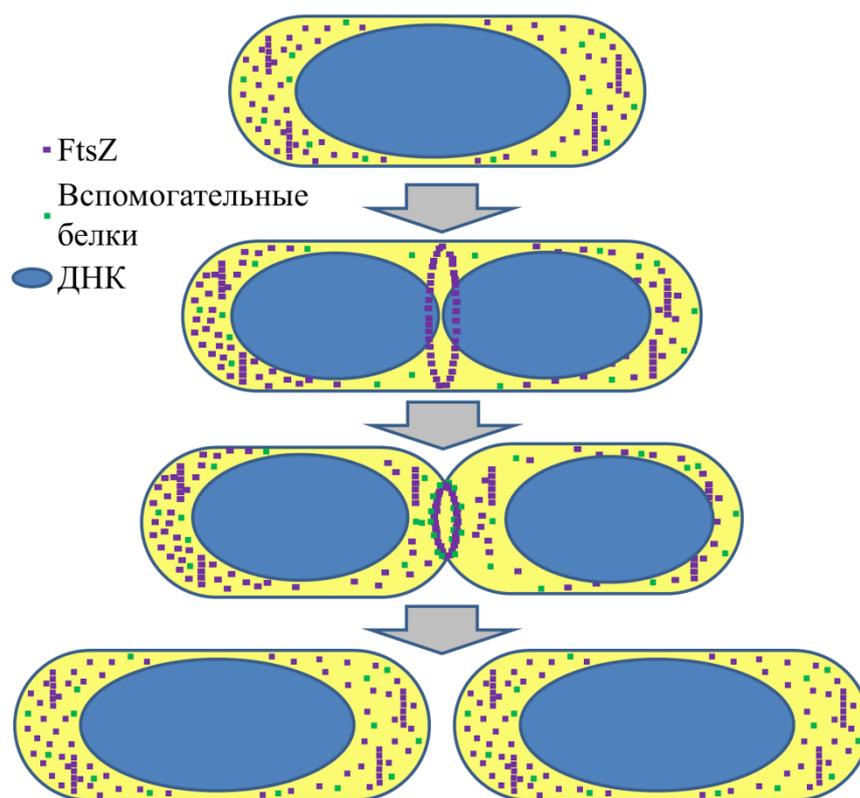
**Рисунок 1.** Схематическое расположение генов, связанных с процессом деления, в кластере *dcw* на примере нескольких видов бактерий. Жёлтыми стрелками обозначены гены деления и синтеза клеточной стенки, белыми — гены транскрипционных регуляторов кластера *dcw*, серыми прямоугольниками — области генома в составе кластера, не содержащие генов деления

Среди указанных на **Рисунок 1** генов, *ftsL*, *ftsW*, *ftsQ*, *ftsA*, *ftsZ*, как известно на настоящий момент, относятся к генам деления, играющих структурную и регуляторную роль, *ftsI*, *mraY*, *murC*, *murD*, *murE*, *murG*, *ddlB* отвечают за синтез клеточной стенки [5, 6], *lpxC* связан с синтезом липида А, *mraZ* и *mraW* относятся к регуляторам транскрипции данного кластера [7].

Кластер *dcw* в том или ином виде присутствует в геноме большинства видов бактерий, что говорит о его высокой консервативности, что очевидным образом связано с критической ролью генов, входящих в него. Одним из наиболее консервативных генов является *ftsZ*, кодирующий ключевой белок деления FtsZ, он обычно присутствует даже в видах, потерявших большинство генов кластера *dcw*, например, в таких видах, как *Helicobacter pylori*, *Mycoplasma gallisepticum* и *Acholeplasma laidlawii* (см. **Рисунок 1**). В то же время часть генов, также связанных с процессом деления, обычно расположена вне кластера *dcw*, например, гены *ftsK*, *ftsN* и некоторые другие.

### **2.1.2. Структура и состав бактериальной дивисомы *E. coli*.**

Процесс деления бактерий предполагает формирование особого комплекса белков – дивисомы, которая обычно представляет из себя кольцеобразную структуру и обеспечивает рост септы – перегородки между будущими дочерними клетками. Среди белков, имеющих отношение к процессу деления, порядка двадцати входит в состав дивисомы. Ниже (Рисунок 2) представлена схема, иллюстрирующая процесс бинарного деления бактерий. После репликации ДНК и её разделения на 2 нуклеоида, сначала происходит формирование Z-кольца (или прото-кольца), состоящего из филаментов — линейных полимеров (и, возможно, пучков из филаментов) ключевого белка деления FtsZ, а также якорных белков FtsA и ZipA, обеспечивающих прикрепление филаментов FtsZ к внутренней мембране. Затем Z-кольцо обрастает множеством дополнительных белков, в результате чего формируется зрелая дивисома, которая обеспечивает формирование септы и в конечном счёте разделение клетки надвое.



**Рисунок 2.** Схематическое изображение бинарного деления бактерий. В процессе деления происходит репликация и сегрегация (разделение по дочерним клеткам) генетического материала, после чего происходит образование Z-кольца, состоящего в основном из полимеров белка FtsZ, затем Z-кольцо обрастает вспомогательными белками, которые обеспечивают формирование септы

FtsZ считается ключевым белком деления, так как первым привлекается в сайт деления и выступает (в комплексе с якорными белками) в качестве своеобразного каркаса для других белков дивисомы. Ген *ftsZ* впервые был идентифицирован в ходе изучения температурно-чувствительных мутантов штамма K-12 *E. coli* (*Escherichia coli*) [8]. Ранее мутации, связанные с геном *ftsZ*, ошибочно относились к гену *ftsA*. Кроме более точного картирования *ftsZ* на бактериальной дивисоме, в указанной работе было выявлено морфологическое различие между мутантами *ftsA* и *ftsZ*: если первые образовывали клетки-филаменты с незавершенными септами (перегородками между дочерними клетками), то во вторых септы полностью отсутствовали. Это позволило авторам предположить, что продукт гена *ftsZ* вовлекается в процесс образования септы на более ранней стадии, чем *ftsA*, однако реальная ситуация оказалась несколько сложнее. Действительно, в работе 1985 года было показано, что FtsZ первым

среди нескольких белков (рассматривались FtsA, FtsI, FtsQ и FtsZ) вовлекается в процесс деления и таким образом инициирует процесс образования септы [9]. Однако на сегодняшний день известно, что FtsZ, FtsA и ZipA начинают включаться в Z-кольцо примерно в одинаковое время, т.к. формирование Z-кольца невозможно как без полимеров FtsZ, так и без якорных белков FtsA и ZipA, прикрепляющих Z-кольцо к мембране, функции которых, впрочем, частично перекрываются [10]. Например, в работе 2002 года было показано, что для сборки и стабилизации Z-кольца в бактерии *E. coli* необходим хотя бы один из двух белков, ZipA или FtsA, тогда как для дальнейших этапов септообразования и, соответственно, вовлечения в этот процесс других белков (в частности, в работе обсуждается FtsK) требуется наличие обоих белков [11].

Позже было показано, что во многих видах, в том числе *E. coli*, FtsZ является жизненно необходимым, иными словами, удаление *ftsZ* из генома является летальным [12, 13]. В настоящее время известно, что гомологи FtsZ присутствуют как среди грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, а также в некоторых видах архей и пластидах эукариот [14, 15]. Интересно, впрочем, отметить, что у некоторых бактерий (например, хламидий и у некоторых микоплазм) *ftsZ* отсутствует [16, 17].

В конце 1991 года впервые методом иммуноэлектронной микроскопии было показано, что белок FtsZ в делящихся бактериях *E. coli* концентрируется посередине клетки и образует так называемое Z-кольцо [18]. Следует отметить, что FtsZ стал первым элементом цитоскелета, обнаруженным у бактерий. В дальнейшем формирование Z-кольца было подтверждено с использованием флуоресцентной микроскопии, как при помощи иммунофлуоресценции в фиксированных клетках, так и с использованием экспрессируемых в живых клетках флуоресцентных белков слияния [19, 20].

В настоящее время известно, что линейные полимеры FtsZ каким-то образом собираются в кольцевую структуру на цитоплазматической поверхности внутренней мембраны в месте будущей септы. В ходе формирования септы Z-кольцо сокращается, образуя более плотную структуру. Сборка кольца является

первым этапом и одновременно лимитирующей стадией всего процесса септообразования [14].

Значительный интерес представляет организация протофиламентов FtsZ в составе Z-кольца. Для её изучения в последние годы были использованы несколько методов, в том числе флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения и криоэлектронная томография. Разработка методов микроскопии сверхвысокого разрешения (англ. *super-resolution microscopy*) стала одним из наиболее важных достижений последнего десятилетия в области флуоресцентной микроскопии. Эти методы активно применяются в настоящее время для исследования внутренней организации бактериальной клетки. Возлагаются надежды на то, что эти методы позволят понять, каким именно образом протофиламенты FtsZ формируют Z-кольцо, а также прояснить роль FtsZ в процессе деления (две конкурирующие модели рассматриваются ниже). Среди этих методов наиболее привлекательными представляются метод локализационной микроскопии SMLM (англ. *Single-Molecule Localization Microscopy* – одномолекулярная локализационная микроскопия) [21], а также метод микроскопии структурированной засветки (SIM). Такие методы были использованы для визуализации FtsZ и других белков дивисомы в клетках *E. coli*, *B. subtilis*, *C. crescentus*, *S. pneumoniae* и других видов [22-28]. Это позволило в значительной степени уточнить организацию дивисомы в частности и процесс деления в целом. Следует отметить, что данные, полученные с использованием методов флуоресцентной микроскопии, говорят о том, что Z-кольцо представляет собой неоднородную и относительно слабоупорядоченную структуру. Этот результат находится в противоречии с данными, полученными с использованием другого современного метода — криоэлектронной томографии [29], которые свидетельствуют о том, что Z-кольцо состоит из выровненных друг относительно друга протофиламентов FtsZ, которые образуют существенно более однородную структуру, чем это было показано методами флуоресцентной микроскопии. В целом, ультраструктура Z-кольца по-прежнему вызывает ряд вопросов, поэтому одной из задач данной работы была его визуализация в клетках *E. coli* с

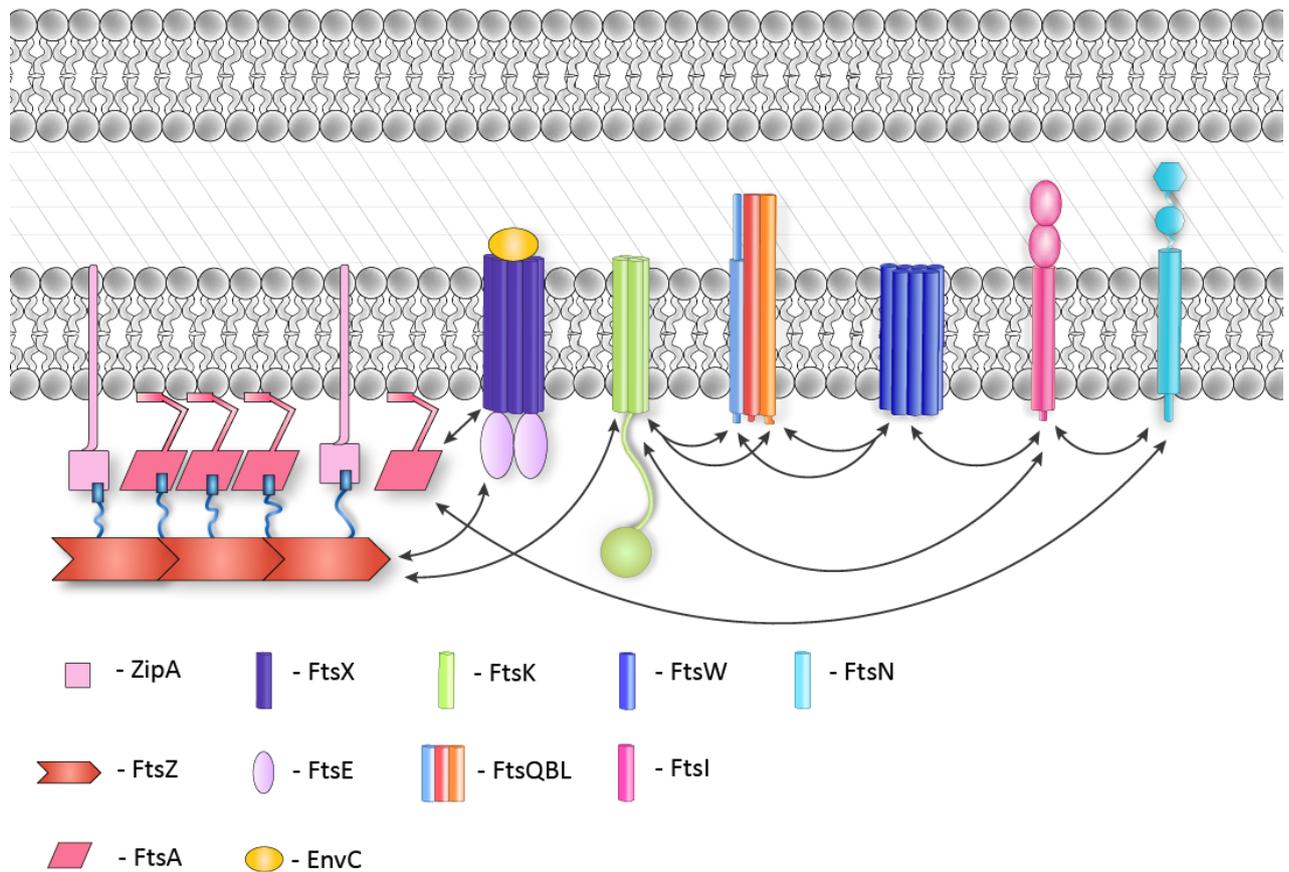
субдифракционным разрешением при помощи локализационной микроскопии. Ультраструктура Z-кольца имеет большое значение для описания функций FtsZ в составе дивисомы, в том числе в рамках обсуждаемых ниже моделей.

В настоящее время рассматриваются две основные модели, описывающие роль Z-кольца в бактериальном делении. Первая модель рассматривает Z-кольцо как каркас для вспомогательных белков, в особенности тех, которые вовлечены в синтез клеточной стенки. В рамки этой модели хорошо укладывается довольно неоднородная структура Z-кольца, визуализированная с использованием современных методов микроскопии сверхвысокого разрешения [25, 27]. Другая модель предполагает существование так называемой сократительной роли Z-кольца, что хорошо подтверждается результатами *in vitro* исследований. Было показано, что FtsZ в искусственных мембранных пузырьках, имитирующих клетку — липосомах — способен формировать Z-кольцо и обеспечивать сжатие мембраны липосомы вплоть до полного разделения «клетки» [30]. Также эта модель косвенно подтверждается данными визуализации, осуществленной криоэлектронной томографией: было показано, что Z-кольцо состоит из выровненных друг относительно друга филаментов FtsZ и представляет собой практически непрерывную структуру [29]. В рамках этой непрерывной структуры возможно проскальзывание филаментов FtsZ друг относительно друга, при этом, как предполагается, сокращение Z-кольца оказывается энергетически выгодным, что приводит к формированию сократительной силы, распределенной по окружности септы [31]. С другой стороны, в случае неоднородной структуры Z-кольца также возможно формирование сократительной силы, например, за счёт изменения кривизны филаментов FtsZ [32]. Следует отметить, что в настоящее время наиболее важной ролью Z-кольца считается именно привлечение в сайт деления вспомогательных белков, а не сократительная роль [33]. Одним из аргументов против сократительной роли Z-кольца является величина возможной сократительной силы, оценки которой (обычно не более 100 пН) оказались намного меньше, чем требуется для сжатия относительно жесткой оболочки бактериальной клетки [33]. Другой аргумент, ставящий под сомнение роль

сократительной силы, связан с наблюдением того, что FtsZ покидает сайт деления до полного формирования септы [34]. Наконец, ещё один аргумент против сократительной силы основан на том, что в бактериях, искусственно лишенных клеточной стенки (так называемая L-форма), FtsZ перестает быть жизненно необходимым [35]. С другой стороны, отмеченные выше результаты, полученные на липосомах, убедительно свидетельствуют в пользу сократительной роли FtsZ в составе Z-кольца, поэтому обе модели могут сосуществовать в бактериальной клетке. Интересным объектом для изучения в данном контексте представляются микоплазмы, сохранившие белок FtsZ, но потерявшие не только клеточную стенку, но и большинство партнеров FtsZ. Возможно, в микоплазмах сократительная роль FtsZ существенно в большей степени выражена, чем, например, в *E. coli*.

Среди вспомогательных белков в *E. coli* после сборки Z-кольца в дивисому вовлекается около 20 белков, в том числе FtsB, FtsL и FtsQ, каждый из которых имеет короткий N-концевой цитоплазматический домен, один трансмембранный домен и большой периплазматический домен (см. **Рисунок 3**). Точная функция этих белков на настоящий момент до конца неясна, однако предполагается, что эти белки функционируют как связующее звено между Z-кольцом и комплексом белков, синтезирующих пептидогликан в составе клеточной стенки [10, 5]. FtsI и FtsW являются частью этого комплекса. FtsK представляет собой ДНК-транслоказу с трансмембранным доменом, содержащим 4 трансмембранных сегмента, слитых с доменом ДНК-транслоказы длинным линкером. Основная роль FtsK связана с процессом сегрегации ДНК, в том числе разрешением так называемых димеров хромосом, образующихся при гомологической рекомбинации между растущими дочерними цепями ДНК [36]. FtsK вместе с комплексом белков ZapA, ZapB и MatP, а также системой нуклеоидной окклюзии помогает координировать деление с процессом сегрегации дочерних хромосом [37]. FtsK взаимодействует с несколькими белками дивисомы, в том числе FtsZ, FtsB, FtsL и FtsQ. Одна из других возможных ролей FtsK в процессе деления может быть связана с его трансмембранным доменом, который, как считается,

может участвовать в разрешении мембраны на финальном этапе деления [5]. FtsN является последним белком деления, вовлекаемым в дивисому, его вовлечение в этот комплекс, по-видимому, является своеобразным сигналом окончания формирования зрелой дивисомы, после чего осуществляется процесс септообразования и разделение дочерних клеток [5].

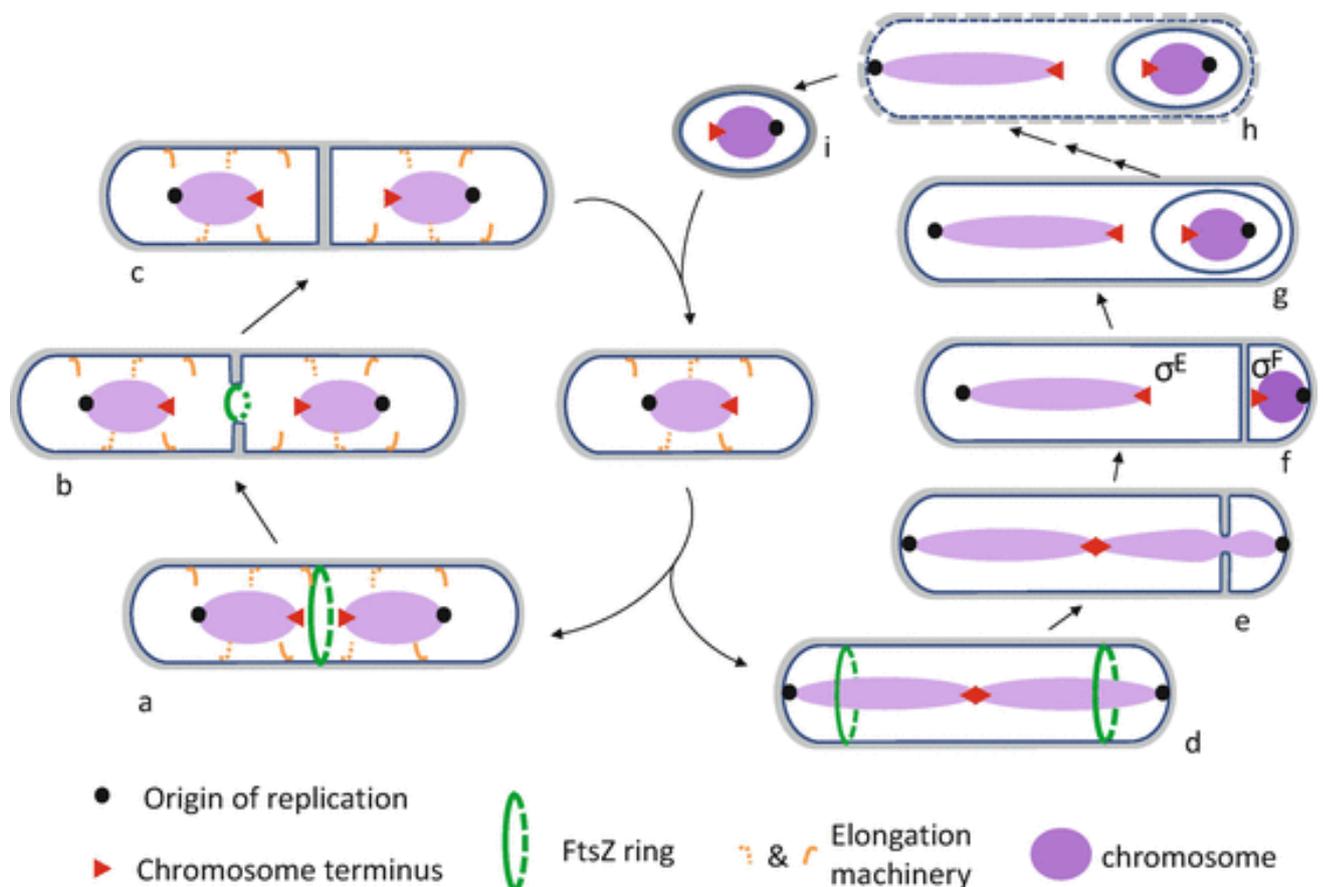


**Рисунок 3.** Состав бактериальной дивисомы на примере *E. coli*. Межбелковые взаимодействия отражены контактом белков, а также стрелками

### 2.1.3. Структура и состав дивисомы других видов бактерий

FtsZ демонстрирует высокую консервативность среди различных видов бактерий, однако другие элементы дивисомы отличаются в большей степени. Интересным представляется отметить, в частности, отличия от *E. coli* дивисомы другого модельного организма – *B. subtilis*, который относится к грамположительным видам бактерий. Особенности механизмов деления,

характерные для грамположительных бактерий, важны для понимания механизмов деления микоплазм, потому что эта ветвь бактерий считается эволюционно близкой к микоплазмам (в особенности фирмикуты, к которым относятся в том числе представители *Bacillus spp.* и *Clostridia spp.*, от которых, по-видимому, и произошли микоплазмы). Одно из важных отличий *B. subtilis* от *E. coli* — способность формировать эндоспores, которые переживают даже очень неблагоприятные условия среды. В нормальных условиях *B. subtilis* осуществляет нормальное бинарное деление, тогда как в стрессовых условиях (например, недостаток нутриентов) демонстрирует споруляцию (см. **Рисунок 4**), при этом оба процесса вовлечен белок FtsZ [38]. Интересно отметить, что в ходе споруляции FtsZ формирует на раннем этапе два Z-кольца, одно из которых в дальнейшем разбирается, а другое участвует в образовании эндоспores.

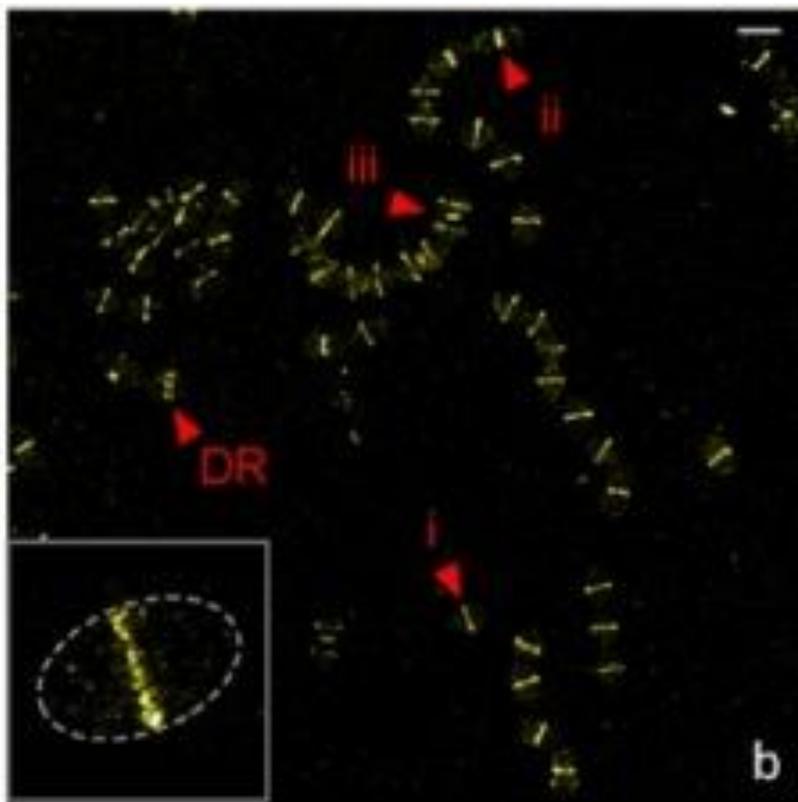


**Рисунок 4.** Жизненный цикл *B. subtilis*. Левая половина описывает вегетативный цикл, аналогичный бинарному делению *E. coli*, а правая половина - процесс споруляции [38]

Как и в случае дивисомы *E. coli*, в *B. subtilis* FtsZ прикрепляется к мембране посредством двух якорных белков, один из которых – FtsA – гомологичен соответствующему белку *E. coli*, тогда как другой – SepF – отсутствует в *E. coli* и по-видимому является функциональным аналогом белка ZipA. Функция FtsA не исчерпывается только прикреплением Z-кольца к мембране и заключается также в передаче сигналов между различными компонентами дивисомы, а также, возможно, связана со способностью данного белка *in vitro* самостоятельно формировать полимерные структуры. В отличие от *E. coli*, в *B. subtilis* мутации гена *ftsA* не являются летальными, хотя и приводят к существенному нарушению деления. SepF, в отличие от белка ZipA *E. coli*, не имеет трансмембранного домена, вместо него присутствует амфипатическая спираль, более того, *in vitro* SepF способен формировать полимеры, в том числе кольца с диаметром около 50 нм. В дополнение к прикреплению к мембране, SepF стимулирует сборку Z-кольца посредством пучкования протофиламентов FtsZ. Предполагается, что дополнительная связь Z-кольца с мембраной может также осуществляться через белок EzrA, трехмерная структура которого позволяет говорить о его родстве с другим эукариотическим белком цитоскелета – спектрином [38]. ZapA является небольшим белком, который стимулирует сборку олигомеров FtsZ. Белок GpsB участвует как в удлинении клеток, так и в клеточном делении. GpsB взаимодействует с основным ферментом, синтезирующим пептидогликан — PBP1, считается, что он участвует в перемещении этого белка между комплексами удлинения и деления. FtsL — битопический мембранный белок с коротким экстрацитоплазматическим спиралевидным доменом, данный белок таргетируется несколькими механизмами регулирования клеточного деления. FtsW — интегральный белок, предполагается, что он является гликозилтрансферазой, и таким образом вовлечен в синтез клеточной стенки. Pbp2B является пенициллинсвязывающим белком, монофункциональной (класс B) транспептидазой, используемой для синтеза пептидогликана в септальной области. В целом можно говорить о высокой степени сходства дивисом *E. coli* и *B. subtilis*, однако следует отметить, что бактерии *B. subtilis* способны чрезвычайно

легко образовывать так называемую L-форму, в которой клетки лишены клеточной стенки. Для переключения *B. subtilis* в L-форму требуется всего одна или две мутации [39]. Бактерии в L-форме требуют осмопротекторной среды, чтобы предотвратить их осмотический лизис; из-за отсутствия жесткой клеточной стенки они имеют плеоморфную форму. Примечательно, что L-форма может переносить полное удаление многих генов, которые в норме необходимы для роста и деления, включая *ftsZ*, а также полный набор гомологов *mreB*. Бактерии в L-форме делятся за счёт формирования мембранных выпячиваний, для образования которых требуется только усиленный синтез мембраны. Механизмы деления, характерные для L-формы бактерий, могут быть применимы и для микоплазм (этот вопрос рассматривается ниже, см. п. 2.1.5. Механизмы деления микоплазм), хотя в этом контексте выглядит удивительным тот факт, что большинство микоплазм сохранили ген *ftsZ*.

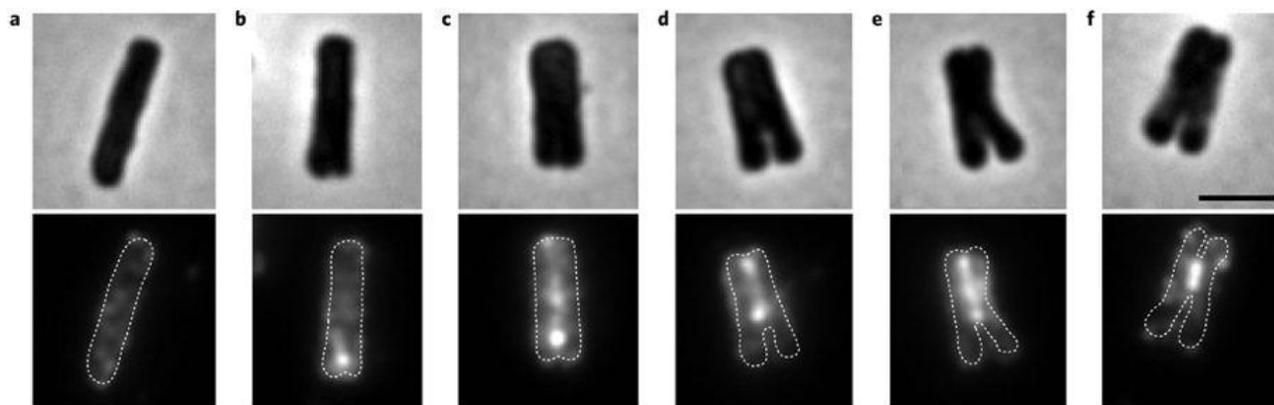
В большинстве кокковидных бактерий FtsZ также формирует сократительное кольцо. Интересным представляется отметить, что как минимум в некоторых видах, например, в *Streptococcus pneumoniae* [25], FtsZ направляет не только за септообразование, но и постоянный рост клеточной стенки (в отличие от палочковидных бактерий, где последнюю функцию выполняет белок MreB или его гомологи [40]). Это выражается, в частности, в том, что Z-кольца присутствуют в течение всего жизненного цикла бактерии, более того, иногда встречаются двойные Z-кольца (см. **Рисунок 5**). В отмеченной работе использование микроскопии сверхвысокого разрешения позволило впервые продемонстрировать утолщение Z-кольца в процессе цитокинеза.



**Рисунок 5.** Деление *Streptococcus pneumoniae*. Желтый цвет соответствует белку FtsZ, во всех клетках видны Z-кольца. DR обозначено двойное Z-кольцо [25]

Другой интересный пример организации деления наблюдается в актиномицетах — бактериях, формирующих мицелий, подобно грибам. В отличие от большинства бактерий, у актиномицетов (например, род *Streptomyces*) деление не является жизненно важным процессом, так как оно не требуется во время вегетативного роста в форме гиф [41]. Однако деление, основанное на формировании Z-кольца, является совершенно необходимым для споруляции актиномицетов, и механизм образования септы является очень похожим на палочковидные и кокковидные бактерии.

Совершенно уникальный механизм деления — вдоль клетки — демонстрирует один из симбионтов *Candidatus Thiosymbion hypermnestrae* червей (см. Рисунок 6) [42]. Данный симбионт живёт на поверхности эпителия нематод, прикрепляясь к эпителию одним из полюсов, и является зависимым от организма хозяина. Организация деления вдоль длинной оси клетки является выгодной для данной бактерии, потому что позволяет обеим дочерним клеткам оставаться прикрепленными к хозяину.



**Рисунок 6.** Деление *Candidatus Thiosymbion hypermnestrae*. Верхний ряд изображений – общая морфология клеток (режим фазового контраста), нижний ряд — флуоресценция меченого белка FtsZ [42]

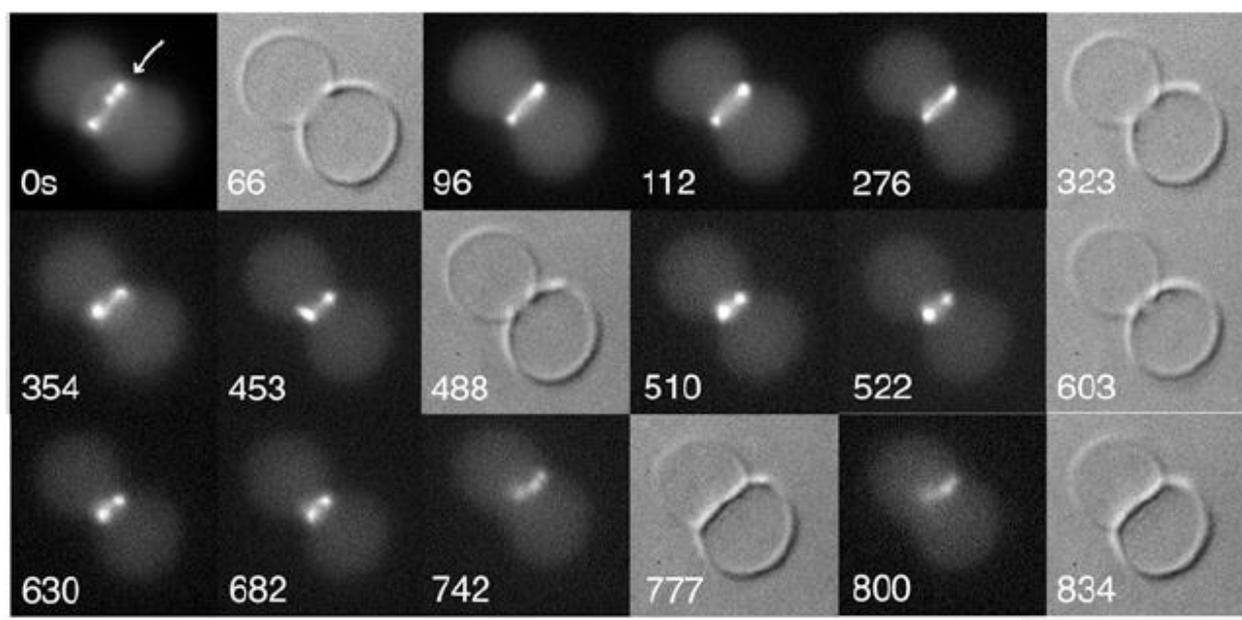
Кроме бактерий, демонстрирующих полноценную дивисому с белком FtsZ в ключевой роли, как в видах *E. coli* и *B. subtilis*, существуют виды, лишенные гена *ftsZ*. Чрезвычайно интересный механизм деления демонстрируют, например, хламидии. Хламидии являются грамотрицательными облигатными внутриклеточными паразитами, практически лишенными клеточной стенки. Они включают некоторые важные патогены, вызывающие среди прочих трахому, инфекции половых путей и пневмонию. Хламидии демонстрируют бинарное деление, однако имеют механизм атипичного деления, который не зависит от гомологов FtsZ. Долгое время считалось удивительным, что процесс деления хламидий ингибируется производными пенициллина, вызывая образование aberrантной формы бактерий, которая способна выжить в присутствии антибиотика [43]. Парадокс чувствительности хламидий к пенициллину в отсутствие детектируемого пептидогликана (клеточной стенки) был назван хламидийной аномалией. Недавние исследования показали, что пептидогликан всё же экстрагируется по крайней мере из одного члена *Chlamydiales*, а также что типичные компоненты пептидогликана накапливаются в области сайта деления хламидий, как и в других бактериях, что, по-видимому, говорит о том, что хламидии синтезируют клеточную стенку только во время деления [44]. В настоящее время обсуждается возможность участия в формировании дивисомы таких белков хламидий, как MreB (в *E. coli* и *B. subtilis* данный белок направляет

синтез клеточной стенки в ходе роста клетки) и RodZ (также участвует в поддержании формы клетки и напрямую взаимодействует с MreB). Тем не менее, механизмы деления хламидий на настоящий момент остаются загадочными и требуют дальнейшего изучения.

### 2.1.3. Свойства белка FtsZ в условиях *in vitro*

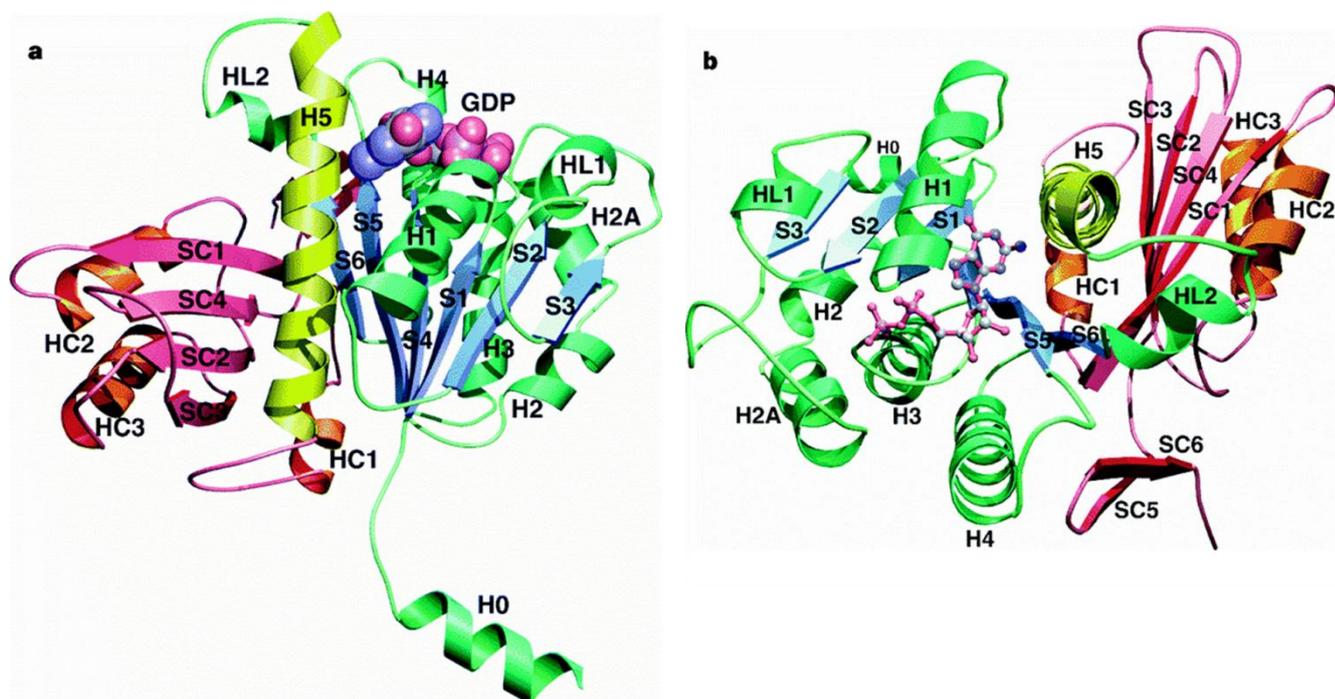
В основе формирования Z-кольца лежит способность FtsZ полимеризоваться, подобно другим белкам цитоскелета. Установлено, что FtsZ проявляет ГТФазную активность, сопряженную с полимеризацией, и, по-видимому, является эволюционным предшественником тубулина, имея с ним довольно высокую гомологию [45, 46]. Многие свойства FtsZ стали известны благодаря исследованиям *in vitro*. В частности, было показано образование филаментов (полимеризация) белка FtsZ *E. coli in vitro* [47]. В работе было продемонстрировано, что в присутствии ГТФ FtsZ способен формировать протяженные филаменты. Кроме того, аналогичным образом были исследованы мутантные белки FtsZ. Важно отметить, что концентрация FtsZ, использованная в этой работе *in vitro* (6 мкМ) была ниже оценочной концентрации FtsZ *in vivo* (10 мкМ), что позволило авторам предположить, что в клетке FtsZ также способен к самостоятельной полимеризации. Другой значительный шаг в понимании механизмов работы FtsZ связан с экспериментами, указывающими на способность полимеров данного белка генерировать силу, которая может использоваться для сокращения септы. В работе 2008 года удалось создать FtsZ, способный самостоятельно связываться с мембраной (то есть без таких посредников, как ZipA и FtsA): к С-концу молекулы FtsZ была добавлена амфипатическая спираль, которая и взаимодействует с мембраной [48]. Кроме того, молекулы данного белка также были слиты с флуоресцентным белком – для возможности его визуализировать. Затем с использованием суспензии из липосом (искусственных мембранных пузырьков), данного белка и ГТФ были сформированы вытянутые везикулы, моделирующие мембрану бактерий. В некоторых везикулах FtsZ

образовывал кольца на наружной стороне. Кроме того, молекулы FtsZ проникали внутрь везикул в количестве, достаточном для самостоятельного формирования множественных колец с их внутренней стороны. Эти кольца затем спонтанно сливались в более плотные кольца – аналог Z-колец в делящихся клетках бактерий. Самое удивительное, что сформированные кольца демонстрировали способность к сжатию, что приводило к образованию на везикулах сайтов, напоминающих формирующиеся септы бактерий, хотя продемонстрировать полное сокращение, приводящее к делению, не удалось. Таким образом, было показано, что FtsZ в составе Z-кольца без каких-либо дополнительных белков способен развивать сократительную силу, достаточную для сжатия мембраны. Позже этой же группе исследователей удалось продемонстрировать, что FtsZ, содержащий участок, взаимодействующий с мембраной, в одиночку не способен закончить деление везикул, а FtsZ без указанного участка, но в присутствии FtsA\* (гиперфункционального мутантного FtsA, способного компенсировать отсутствие белка ZipA), способен обеспечить образование законченной перегородки между дочерними везикулами (см. **Рисунок 7**) [30]. Хорошие обзоры, посвященные исследованию свойств белка FtsZ *in vitro*, представлены в работах [49, 32].



**Рисунок 7.** Успешное деление искусственного мембранного пузырька под действием белков FtsZ и FtsA\*. Представлены флуоресцентные изображения в канале FtsZ (более темные) и изображения в проходящем свете (более светлые). Шкала – 10 мкм [30]

В 1998 году была опубликована статья, в которой была описана кристаллическая структура FtsZ одного из прокариотических организмов – археи *Methanococcus jannaschii* (см. **Рисунок 8**) [50]. Эти данные позволили дополнительно подтвердить гипотезу о родстве FtsZ и тубулина: оказалось, что несмотря на незначительную гомологию первичной структуры (аминокислотной последовательности), эти два белка имеют похожую вторичную и третичную структуры (трёхмерную конформацию). В настоящее время известна кристаллическая структура FtsZ нескольких видов бактерий, включая *E. coli*, во всех видах FtsZ демонстрирует высокое сходство третичной структуры: N-концевой ГТФазный домен и С-концевой домен соединены спиралью H5, кроме того, непосредственно на С-конце белка присутствует неструктурированный домен, основная функция которого, по-видимому, заключается в связывании FtsZ с многочисленными белками-партнерами [51].



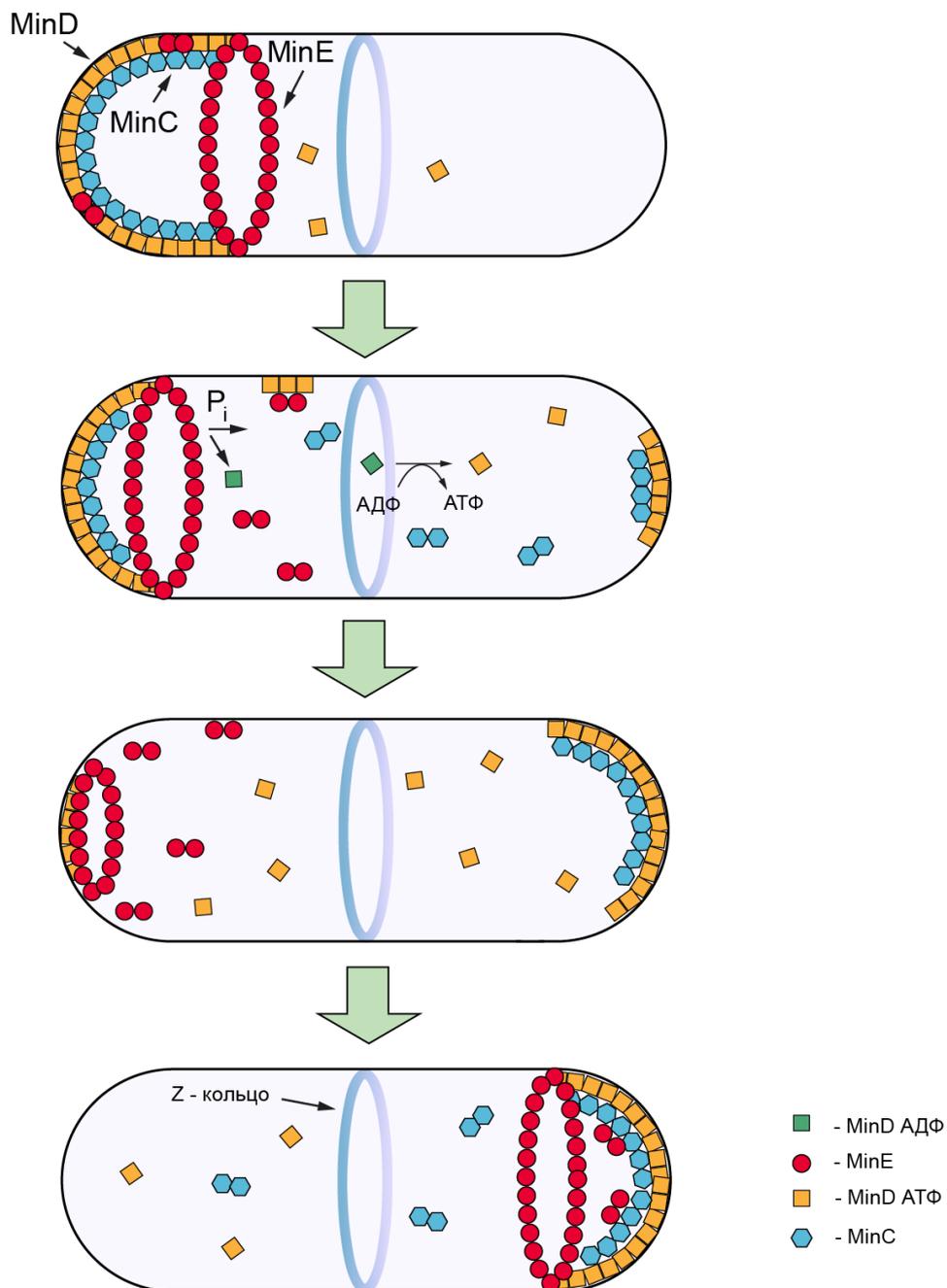
**Рисунок 8.** Кристаллическая структура белка FtsZ *M.jannaschii*. (а). Вид, показывающий ГТФазный домен (синий и зеленый цвета), С-концевой домен (красный и оранжевый) и соединительную спираль H5 (желтый цвет). (б). Вид FtsZ, повернутый на 90 ° относительно рисунка (а) [50]

### 2.1.3. Механизмы регуляции бактериального деления

Существует несколько механизмов регуляции деления бактерий, связанных с белком FtsZ. Часть из этих механизмов используют отрицательную регуляцию (иными словами, ингибирование полимеризации) FtsZ, другая часть – положительную. Среди них в данной работе рассмотрены хорошо известные механизмы регуляции пространственного положения дивисомы (Min-система, нуклеоидная окклюзия, связь с Ter-регионом и некоторые другие), обеспечивающие согласование цитокинеза с другими процессами, например, с репликацией и сегрегацией ДНК, а также механизм, блокирующий деление при SOS-ответе.

Достаточно давно были открыты мутации, приводящие к формированию так называемых мини-клеток в популяции *E. coli* (отсюда название - Min-система), тогда как в норме некоторый механизм (в генах которого и происходили мутации), который был позже назван Min-системой, препятствует образованию септы вблизи полюсов клетки *E. coli* [52]. Min-система является механизмом отрицательной регуляции и напрямую ингибирует полимеризацию FtsZ. Следует отметить, что кроме пространственной регуляции деления, имеет место также временная: Min-система согласует цитокинез с размером клетки, иными словами, деление не происходит до достижения клеткой определенной длины. В 1999 году метод ФМ в сочетании с белками слияния позволил совершить прорыв в понимании молекулярного механизма работы Min-системы [53]. Было показано, что регуляция положения Z-кольца в клетке *E. coli* основана на периодической осцилляции белка MinC (ингибитора сборки Z-кольца) между полюсами клетки под влиянием двух других белков – MinD и MinE, в результате чего эффективная концентрация MinC оказывается минимальной посередине бактериальной клетки, где и формируется Z-кольцо (см. **Рисунок 9**). Следует отметить, что именно возможность использования данного метода в экспериментах *in vivo* позволила наблюдать данные осцилляции. Расшифровка механизма работы Min-системы сделала её главным кандидатом на роль регулятора, определяющего положение Z-

кольца посередине клетки, каким она в настоящее время и считается в нормально делящихся клетках; другие системы пространственной (и временной) регуляции цитокинеза начинают играть существенную роль в основном в стрессовых условиях [54]. Кроме регуляции пространственного положения Z-кольца, имеются данные о том, что Min-система влияет на сегрегацию ДНК. Показано, что в популяции клеток с инактивированной Min-системой имеются дефекты в разрешении димеров хромосом [54].



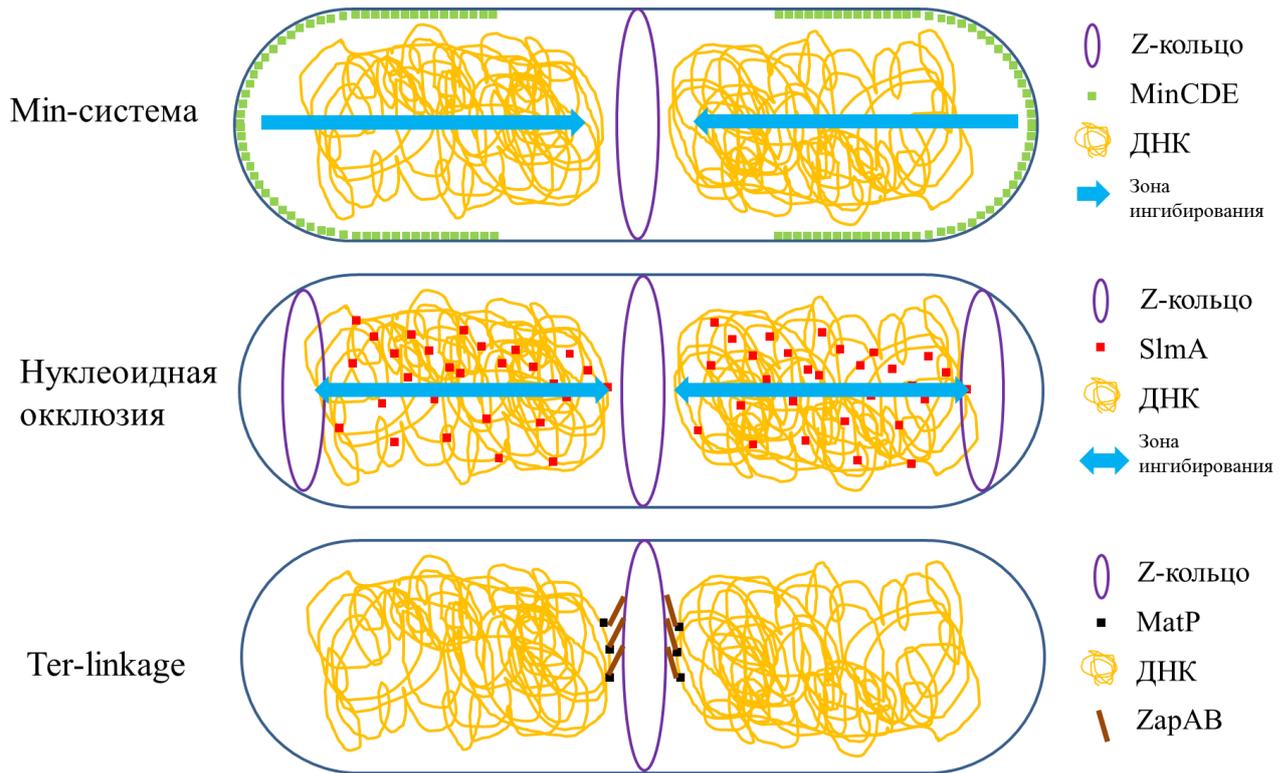
**Рисунок 9.** Схема Min-системы *E. coli*, отражающая динамическое поведение (осцилляции от одного полюса к другому) белков MinC, MinD и MinE. При связывании АТФ конформация

белка MinD меняется таким образом, что он связывается с цитоплазматической мембраной (вблизи одного из полюсов клетки), дополнительно привлекая и связываясь с белком MinC – ингибитором белка FtsZ. Кроме того, MinD связывается с белком MinE, стимулируя сборку этим белком кольца вблизи полюса. MinE стимулирует АТФазную активность MinD, что приводит к разборке полярной структуры, формируемой MinC и MinD

В *B. subtilis* Min-система образована двумя белками MinC и MinD, при этом они статично локализируются на полюсах, а не осциллируют, как в случае *E. coli* [55], эффект работы этой систем тот же, что в случае *E. coli*. Min-системы присутствуют и в других видах палочковидных бактерий (например, *Neisseria spp.*, *Aquifex spp.* и др.). В *Caulobacter crescentus* отсутствуют гомологи известных белков Min-системы, вместо них имеется MipZ — белок, чьи функции напоминают работу MinD, однако в отличие от последнего, MipZ напрямую ингибирует полимеризацию FtsZ вблизи полюсов клетки [56]. Во многих бактериях Min-системы отсутствуют, что обычно приводит к несимметричному делению или требует участия других регуляторов [57].

Нуклеоидная окклюзия (НО) – это явление, заключающееся в отрицательной регуляции септообразования вблизи ДНК (см. **Рисунок 10**). Как и Min-система, НО участвует не только в пространственной, но и во временной регуляции сборки Z-кольца, то есть согласует цитокинез с репликацией и сегрегацией ДНК; эта система начинает оказывать заметное влияние на процесс деления в стрессовых условиях, например, в состоянии SOS-ответа. Само явление нуклеоидной окклюзии (англ. nucleoid occlusion – в норме септообразование, в том числе сборка Z-кольца, не происходит над нуклеоидом, т.е. бактериальной хромосомой) было известно достаточно давно, однако его молекулярный механизм был установлен лишь в 2004 году на примере *B. subtilis* [58]. Авторы статьи предположили, что белок YuaA является ингибитором полимеризации FtsZ (а значит и сборки Z-кольца), а также неспецифично (позже было показано, что всё же существуют сайты связывания этого белка, относительно равномерно распределенные на бактериальной хромосоме) связывается с ДНК, в результате чего формирование Z-кольца оказывается невозможным над нуклеоидом. В 2005 году был сделан большой шаг в понимании механизма НО в *E. coli* [59]. Двойные

мутанты с дефектами в работе Min-системы и окклюзии нуклеоида оказывались неспособными к делению и образовывали вытянутые бактерии с нетипичным распределением FtsZ в клетке. В результате был открыт белок SlmA, который, как и YuaA *B. subtilis*, ассоциирован с ДНК и ингибирует сборку Z-кольца над хромосомой. В отсутствие ДНК SlmA слабо ингибирует полимеризацию FtsZ, но эта активность резко усиливается при связывании с ДНК, содержащей сайт связывания SlmA. В начале цитокинеза хромосомы разделяются и смещаются к полюсам клетки (вместе с ингибитором септообразования SlmA), освобождая таким образом в её центральной области место для сборки Z-кольца. Таким образом, на примере двух видов бактерий был установлен механизм НО – явления, которое сегодня после Min-системы рассматривается как второй по важности регулятор положения Z-кольца в бактериальной клетке. Интересно, что в работе данного механизма в *E. coli* и *B. subtilis* задействованы два неродственных белка, хотя принципы работы систем довольно близки; это говорит, по-видимому, о независимом возникновении данных систем пространственно-временной регуляции. Механизм НО присутствует и в других видах бактерий, причем в кокковидных бактериях, в которых отсутствует Min-система, НО играет основную роль.



**Рисунок 10.** Системы позиционирования сайта деления в клетках *E. coli*. Представлены основные компоненты каждой из систем, а также эффект от систем на позиционировании Z-кольца. Верхний рисунок: Min-система (белки MinC, MinD, MinE, из которых MinC и MinD напрямую взаимодействуют с FtsZ) предотвращает формирование Z-кольца вблизи полюсов, ограничивая его положение серединой клетки. Средний рисунок: нуклеоидная окклюзия ингибирует сборку Z-кольца вблизи нуклеоидов посредством прямого взаимодействия белка SlmA с FtsZ. Нижний рисунок: Ter-linkage стимулирует сборку Z-кольца вблизи региона *ter* бактериальной хромосомы, в этом регионе расположены сайты связывания белка MatP, с которым в свою очередь связываются белки ZapA и ZapB, напрямую взаимодействующие с FtsZ

Было показано, что в *E. coli* при отсутствии двух отрицательных регуляторных систем (Min-системы и нуклеоидной окклюзии) Z-кольцо всё равно позиционируется между нуклеоидов с достаточно хорошей точностью, что косвенно говорит о существовании дополнительного механизма пространственной регуляции деления в [60]. Таким механизмом может быть связь Z-кольца с терминальной областью хромосомы (англ. Ter-linkage) [61]. В отличие от нуклеоидной окклюзии и Min-системы, Ter-linkage является положительным регулятором сборки Z-кольца (см. **Рисунок 10**). В основе данного регулятора лежит топологическая связь Ter-региона хромосомы с дивисомой. Белок MatP связывается с особыми повторяющимися последовательностями ДНК, находящимися только в области Ter-региона. С белком MatP, в свою очередь,

связываются белки ZapA и ZapB, которые стимулируют полимеризацию FtsZ, в том числе пучкование. Нарушение Ter-linkage посредством удаления одного из его компонентов нарушает точность размещения Z-кольца посередине клетки и резко увеличивает частоту, с которой формируются Z-кольца вблизи полюсов в клетках, в которых нарушены рассмотренные выше системы нуклеоидной окклюзии и Min-система. Это наблюдение указывает на то, что Ter-linkage помогает позиционированию Z-кольца, а именно способствует его локализации посередине клетки [54].

Следует отметить, что системы, отвечающие за пространственную регуляцию сборки структур FtsZ, присутствуют, по-видимому, в клетках подавляющего большинства видов бактерий, однако механизмы их работы и, в частности, белки, входящие в них, неодинаковы. В последнее время идентифицировано несколько белков - положительных регуляторов образования Z-кольца у бактериальных видов, которые не имеют системы нуклеоидной окклюзии и/или Min-системы. Эти белки локализуются посередине клетки и/или между нуклеоидами и способствуют образованию Z-колец в этой области. Один из первых примеров положительных регуляторов образования Z-кольца — система из пары белков SsgA-SsgB в *Streptomyces coelicolor* [62]. Данный вид способен расти вегетативно в форме мицелия, что позволило изучать деление данного вида даже в отсутствие FtsZ, в результате было показано, что комплекс SsgA-SsgB локализуется между нуклеоидами независимо от FtsZ, то есть именно этот комплекс является топологическим маркером для сборки Z-кольца. SsgA рекрутирует SsgB в области между нуклеоидами, после чего SsgB, вероятно, способствует полимеризации FtsZ, а также служит в качестве якорного белка для Z-колец, связывая их с мембраной.

Другой пример положительных регуляторов образования Z-кольца — белок PomZ, АТФаза семейства ParA, участвует в позиционировании Z-кольца в одном из представителей  $\delta$ -протеобактерий, известном своей способностью к социальному поведению, в том числе формированию плодовых тел — *Mucosoccus xanthus*. Бактерии *M. xanthus*, у которых отсутствует PomZ, имеют классические

дефекты в делении клеток, которые являются признаками aberrантного позиционирования Z-кольца, включая филаментацию и образование мини-клеток. PomZ локализуется посередине клетки в отсутствие FtsZ, поэтому, как и комплекс SsgA-SsgB, считается пространственным регулятором цитокинеза [62].

В *Streptococcus pneumoniae* трансмембранный белок, называемый LocZ (англ. Localizing at midcell of FtsZ) или MapZ (англ. Mid-cell-anchored protein Z), локализуется и способствует позиционированию Z-кольца в середине клетки [62]. Клетки, лишенные LocZ/MapZ, жизнеспособны, но имеют дефекты формы клеток и образуют мини-клетки. MapZ/LocZ локализуется как кольца на новых участках деления до прибытия туда FtsZ; было показано, что MapZ напрямую взаимодействует с FtsZ. После формирования Z-кольца посередине клетки, MapZ/LocZ постепенно перемещаются в сайты следующего акта деления. В совокупности данные свидетельствуют о том, что этот регулятор может стимулировать сборку FtsZ посередине клетки. Гомологи LocZ/MapZ присутствуют в стрептококках, лактококках и энтерококках, что указывает на то, что эти виды регулируют позиционирование Z-кольца аналогичным механизмом.

В настоящее время установлена роль белка FtsZ при SOS-ответе – стрессовом состоянии бактериальной клетки, при котором она перестает делиться вследствие повреждения ДНК [63]. Явление SOS-ответа было открыто в середине XX века, когда было показано, что после облучения клеток *E. coli* ультрафиолетом происходит активация некоего механизма, который приводит к филаментации (вследствие остановки деления) клеток и увеличению скорости рекомбинации не только бактериальной, но и вирусной ДНК [64, 65]. В настоящее время известно, что при повреждении ДНК белок RecA в комплексе с однонитевой ДНК (появляющейся при возникновении разрывов ДНК) осуществляет протеолиз белка LexA, который в результате покидает операторную область генов SOS-ответа, в результате происходит активация их экспрессии. Как отмечено выше, при наступлении SOS-ответа происходит блокирование процесса деления, что является защитным механизмом клетки и позволяет устранить повреждения ДНК. Было показано, что среди генов, экспрессирующихся при SOS-ответе, имеется ген

белка-ингибитора SulA, блокирующего деление при активации SOS-ответа; мишенью для SulA является непосредственно белок FtsZ [66]. Механизм ингибирования заключается в связывании молекулами белка SulA молекул белка FtsZ, в результате происходит истощение пула свободных мономеров FtsZ, способных участвовать в циклах полимеризации / деполимеризации, что эквивалентно снижению эффективной концентрации FtsZ в клетках и приводит к разборке полимеров FtsZ, в том числе Z-кольца. Следует отметить, что механизмы активации и развития SOS-ответа неплохо изучены, в то время как процесс восстановления деления клеток после окончания этого состояния практически не изучался. Между тем изучение этого процесса представляется важным, так как SOS-ответ в настоящее время рассматривается как один из ключевых механизмов возникновения резистентности [67]. Блокирование активации SOS-ответа, как и восстановления клеток после этого состояния, представляется одним из перспективных направлений для создания новых антибактериальных препаратов.

#### **2.1.4. FtsZ как мишень для новых антибактериальных препаратов**

Быстрое появление клинически-значимых видов бактерий, устойчивых к используемым антибиотикам (например, устойчивый к метициллину золотистый стафилококк, англ. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) и устойчивый к ванкомицину энтерококк, англ. vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF)) делает жизненно необходимым разработку новых антибактериальных препаратов. В последние несколько лет FtsZ, вовлеченный в жизненно-важный процесс деления у бактерий, рассматривается как перспективную мишень для антибиотиков [2]. Известно, что ген *ftsZ* является жизненно необходимым для многих видов бактерий, включая *E. coli*, а также нескольких других клинически значимых видов. Как упоминалось ранее, FtsZ и его эукариотический родственник тубулин, имеют близкую структурную гомологию. Тубулин является молекулярной мишенью для антимиотических лекарственных веществ (например, таксол, винкристин и винбластин), которые

широко используются в противораковой терапии. Такие вещества осуществляют ингибирование посредством связывания с хорошо охарактеризованными участками тубулина. Считается, что подобные вещества могут быть использованы и для ингибирования функции белка FtsZ. В настоящее время описаны как природные, так и синтетические ингибиторы бактериального деления, таргетирующие белок FtsZ.

В частности, было обнаружено несколько природных алкалоидов – ингибиторов FtsZ [68]. Сангвинарин представляет собой полициклический алкалоид, который ингибирует сборку протофиламентов FtsZ посредством блокирования полимеризации FtsZ; он также ингибирует эукариотический тубулин, что усложняет его использование в качестве антибиотика. Берберин является структурно сходным алкалоидом, который ингибирует ГТФазную активность и снижает полимеризацию FtsZ. Предполагается, что он связывается с молекулой FtsZ вблизи кармана связывания GTP. Хотя он предположительно не взаимодействует с тубулином, берберин тем не менее связывается со множеством других белков, что также усложняет его использование.

Другая группа ингибиторов FtsZ – полифенолы [68]. Плюмбагин ингибирует ГТФазную активность FtsZ. Предсказываемый сайт связывания плюмбагина расположен вблизи С-концевого домена FtsZ в области спирали H7, пространственно удаленной от домена связывания ГТФ, что вызывает вопросы по поводу его механизма действия. Ресвератрол также известен своей антимикробной активностью, что объясняется в том числе подавлением синтеза FtsZ на уровне транскрипции. Семейство хризофентинов ингибирует ГТФазную активность FtsZ *E. coli* и *S. aureus*; молекулярное моделирование (докинг), показало, что эти соединения закрывают большую часть сайта связывания ГТФ белка FtsZ.

Ещё одна группа природных ингибиторов FtsZ – фенилпропаноиды и терпеноиды. Предполагается, что почти все фенилпропаноиды, описанные как ингибиторы FtsZ, взаимодействуют по меньшей мере с одним остатком петли T7 молекулы FtsZ [68]. Фенилакриламид обладает антибактериальной активностью

против *S. aureus* и *Streptococcus pyogenes*. Производные ванилина 3a и 4c также показали ингибирующее действие против FtsZ *Mycobacterium tuberculosis*. Скополетин - аналог кумарина - ингибирует ГТФазную активность и полимеризацию FtsZ в протофиламенты. Куркумин напротив увеличивает ГТФазную активность и дестабилизирует полимеризацию FtsZ, тем самым снижая время жизни полимеров.

Другой интересный механизм ингибирования FtsZ демонстрируют антибиотики природного происхождения ацилдепсипептиды [68]. Механизм их действия основан на неконтролируемой активации протеазы ClpP грам-положительных бактерий; в норме ClpP участвует в деградации FtsZ, поддерживая его концентрацию в клетке. Биохимические и структурные данные показывают, что ацилдепсипептиды взаимодействуют с АТФазным доменом ClpP, что в конечном итоге приводит к неконтролируемому протеолизу.

Кателин-подобный антимикробный пептид (CRAMP) [2] играет важную роль как защитный механизм у млекопитающих. Недавно было показано, что часть пептида CRAMP (GEKLLKIGQKIKNFFQKL) ингибирует пролиферацию клеток *B. subtilis* и *E. coli* путем связывания с молекулой FtsZ. CRAMP нарушает вторичную структуру FtsZ; и докинг-анализ показал, что CRAMP связывается в С-концевым доменом FtsZ вблизи петли T7. CRAMP ингибирует ГТФазную активность FtsZ *in vitro*, а также ингибирует образование и локализацию Z-кольца в *B. subtilis*.

Кроме природных ингибиторов, описано несколько синтетических веществ, ингибирующих FtsZ. Например, вещество PC190723 ингибирует пролиферацию *S. aureus in vitro* с минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) около 1 мкг/мл [69]. Биохимические, структурные, генетические данные позволяют заключить, что PC190723 и его аналоги действительно таргетируют FtsZ.

Недавно был открыт довольно мощный ингибитор FtsZ, производный от тиазола оранжевого, изобретательно названный «Вещество 1» [70]. Соединение проявляет широкий спектр антибактериальной активности, включая метициллин-устойчивый золотистый стафилококк, ванкомицин-резистентный энтерококк и

штамм *Escherichia coli* NDM-1. Результаты исследований *in vitro* и *in vivo* показали, что это соединение нарушает динамическую сборку белка FtsZ в филаменты и образование Z-кольца за счет стимулирования полимеризации FtsZ. Более того, это соединение не проявляет активности в отношении полимеризации тубулина млекопитающих и демонстрирует низкую цитотоксичность на клетках млекопитающих. МИК для разных видов бактерий оценивается на уровне 1 мкг/мл. Для сравнения, в отношении золотистого стафилококка ампициллин имеет МИК около 4 мкг/мл, ципрофлоксацин – 0,5 мкг/мл, тетрациклин – 2 мкг/мл [71]. Таким образом, имеющиеся ингибиторы FtsZ демонстрируют антибактериальную активность на уровне широко используемых антибиотиков.

### 2.1.5. Механизмы деления микоплазм

Если механизмы деления *E. coli* и нескольких других видов бактерий довольно хорошо изучены, то у представителей класса молликут (англ. *Mollicutes*), также собирательно называемых микоплазмами, ситуация обстоит значительно сложнее. Информация о механизмах деления микоплазм носит в значительной степени гипотетический характер, именно поэтому данная работа нацелена на прояснение этих механизмов. Высокая гетерогенность микоплазм с одной стороны и сильная редуцированность их клеток с другой стороны делают важным рассмотрение их механизмов деления с оглядкой на особенности организации.

Микоплазмы являются наименьшими бактериями, способными к росту на питательных средах [72, 73]. Они являются патогенами эукариот и вызывают серьезные заболевания, в том числе у человека, животных и растений. Например, такие виды, как *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium* могут вызывать заболевания мочеполовой системы человека; *Mycoplasma pneumoniae* вызывает одну из форм атипичной пневмонии человека; *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma mycoides* вызывают респираторные заболевания птиц; *Acholeplasma laidlawii* и различные виды *Phytoplasma*

вызывают фитоплазмы, заболевания растений. Микоплазмы являются высокоспециализированными факультативными паразитами (комменсалами), в большинстве проявляя высокую видоспецифичность по отношению к хозяину. Тем не менее, описаны инфекции, передающиеся между различными видами животных и даже от животных к человеку. Кроме того, микоплазмы являются одними из главных контаминантов клеточных культур.

По уровню организации микоплазм иногда помещают между бактериями и вирусами. В отличие от вирусов, микоплазмы способны к самостоятельному росту, хотя сильная редуцированность делает их зависимыми от метаболических путей хозяина (в природе), либо требует богатых питательных сред (в случае культивации в лабораторных условиях). С другой стороны, микоплазмы лишены клеточной стенки, которая является характерной чертой большинства бактерий. Впрочем, ряд «классических» бактерий также лишен клеточной стенки, например, хламидии (клеточная стенка которых, как было показано недавно, синтезируется лишь во время цитокинеза [74]), а также L-форма различных видов бактерий (в том числе *E. coli* [35] и *B. subtilis*, см. п. 2.1.3. Структура и состав дивисомы других видов бактерий).

Клетки микоплазм имеют небольшие размеры (обычно около 0,5-1,0 мкм) и большое разнообразие форм (например, клетки *Acholeplasma laidlawii* имеют шарообразную форму, *Mycoplasma gallisepticum* – грушевидную, *Spiroplasma citri* – спиралевидную) [72]. Даже в пределах одного вида наблюдается значительный полиморфизм как по форме, так и по размерам клеток. Многие микоплазмы (например, *Mycoplasma mobile*, *Mycoplasma gallisepticum*) способны к подвижности (направленному скольжению по субстрату, например, по поверхности клетки или стекла), которая основана на активности так называемой терминальной органеллы, состоящей из адгезинов и цитоскелетподобных белков [75].

Упрощенная организация клеток дает возможность рассматривать микоплазмы как организмы, близкие к концепту минимальной клетки. Микоплазмы произошли, по-видимому, от грамположительных бактерий,

наиболее вероятно, от кластридийной ветви [73]. Считается, что микоплазмы, осуществляя паразитический образ жизни, существенно редуцировали набор генов, оставив лишь самые необходимые гены, набор из которых должна иметь минимальная клетка. Лаборатория Крейга Вентера известна несколькими исследованиями, связанными с созданием клетки с минимальным геномом. Хорошо известно, что в 2010 году исследователями лаборатории впервые была получена клетка *Mycoplasma mycoides* с полностью *de novo* синтезированным геномом [76]. Дальнейшая работа привела к тому, что недавно исследователи из данной лаборатории успешно редуцировали геном *Mycoplasma mycoides* примерно в два раза, что позволило им получить клетку с геномом всего в 531000 п.о., что даже меньше, чем наименьший известный геном *Mycoplasma genitalium* (примерно 583000 п.о.) [77]. Это позволило авторам не только получить клетку с наименьшим известным геномом, но и переосмыслить значимость многих генов, считавшихся жизненно необходимыми, в том числе гена белка FtsZ, который также был удален в отмеченной работе.

Как отмечено выше, механизмы деления хорошо изученных видов бактерий, включая *E. coli*, предполагают формирование дивисомы, основной функцией которой является синтез клеточной стенки в области септы. Даже в хламидиях, обычно лишенных клеточной стенки, во время цитокинеза происходит синтез септального пептидогликана [74]. Каркасом для дивисомы в большинстве случаев выступает Z-кольцо, образованное полимерами белка FtsZ. Кроме направления синтеза клеточной стенки, Z-кольцо предположительно также является источником сократительной силы, что показано исследованиями *in vitro*. Так как ген белка FtsZ присутствует в большинстве видов микоплазм, априори лишенных клеточной стенки, единственной возможной ролью FtsZ по-видимому является именно сокращение мембраны в области септы. Действительно, для клеток *Mycoplasma hominis* было показано, что FtsZ может локализоваться в области септы, что может говорить в том числе о сократительной роли FtsZ [78]. Для клеток *Spiroplasma poulsonii* показано, что белок FtsZ локализуется в области сайта деления, и каким-то образом обеспечивает деление вдоль клетки, что редко

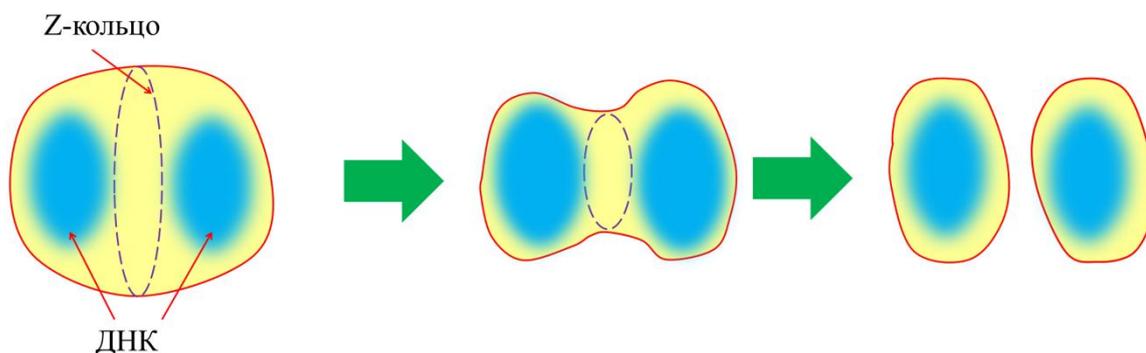
встречается в бактериях [79]. Вовлеченность белка FtsZ в процесс деления в отмеченной работе была дополнительно подтверждено специфичным по отношению к FtsZ антибиотиком, который действительно приводил к замедлению деления. Впрочем, механизм вовлечения FtsZ в процесс деления *Spiroplasma poulsonii* остается неясным. В целом, данных о структурах, формируемых белком FtsZ в клетках микоплазм, явно недостаточно, как впрочем и понимания роли этого белка в процессе деления хорошо изученных бактерий, так как сократительная роль в живых клетках до сих пор является лишь гипотетической.

В некоторых видах микоплазм (например, *Mycoplasma mobile*, *Ureaplasma urealiticum*) ген *ftsZ* отсутствует, более того, показано, что в нескольких видах микоплазм этот ген можно удалить, хотя это может приводить к замедлению деления и/или нарушению морфологии клеток. Изначально предполагали, что не только *ftsZ*, но и другие гены, входящие в состав кластера *dcw* микоплазм, являются жизненно необходимыми, так как не удавалось обнаружить встраивание глобальных транспозонов в этот кластер [80]. Однако в 2010 году из генома *Mycoplasma genitalium* удалось удалить ген *ftsZ*, при этом мутантные клетки оказались не только жизнеспособными, но более того, демонстрировали кинетику роста, аналогичную клеткам дикого типа [81]. Как отмечено выше, в «минимальной клетке», созданной на основе *Mycoplasma mycoides*, также удалось удалить ген *ftsZ*, хотя морфология и, предположительно, процесс деления в этих клетках были серьезно нарушены [77]. Эти наблюдения ставят под сомнение действительную роль FtsZ в процессе деления микоплазм, а также делают необходимым исследование возможных альтернативных механизмов цитокинеза.

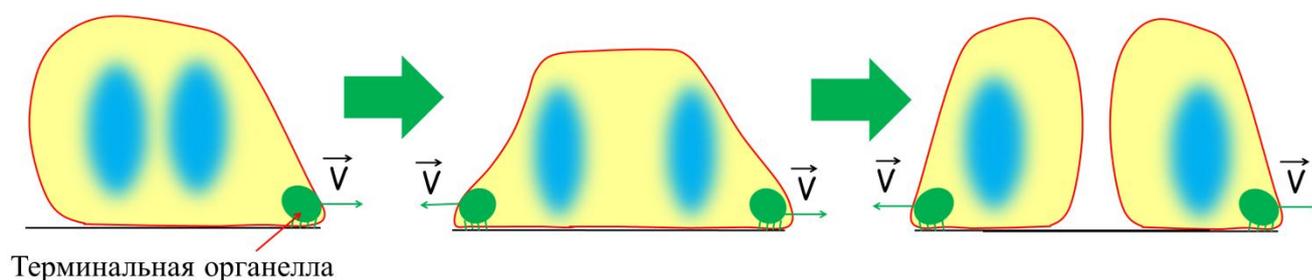
Одним из таких альтернативных механизмов, по всей видимости, является механизм деления, основанный на подвижности некоторых видов микоплазм. Среди аргументов в пользу роли подвижности в цитокинезе микоплазм используется, в частности, синтетическая летальность механизма подвижности в штамме *Mycoplasma genitalium*, лишенном гена *ftsZ*, иными словами, в таком штамме гораздо реже, чем в штамме дикого типа, накапливаются мутации, приводящие к инактивации подвижности [82]. Предполагается, что во время

цитокинеза происходит дупликация терминальной органеллы, после чего две дочерние терминальные органеллы двигаются в противоположных направлениях, в результате чего клетка «разрывается» на две дочерние клетки. Впрочем, такой механизм не может являться единственным, так как существуют микоплазмы, лишенные механизма подвижности (например, *Acholeplasma laidlawii*). Более того, в некоторых микоплазмах (например, в уреоплазмах) отсутствуют как механизмы подвижности, так и белок FtsZ, поэтому должны существовать и другие механизмы, обеспечивающие цитокинез микоплазм. Схематично предполагаемые механизмы деления микоплазм представлены ниже (см. Рисунок 11).

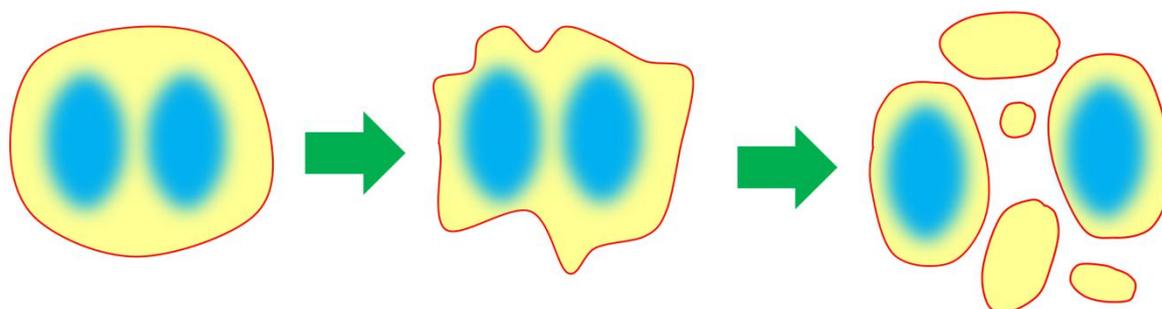
### А. Формирование Z-кольца и дивисомы:



### Б. Активное перемещение клетки по субстрату:



### В. Избыточный синтез мембраны:



**Рисунок 11.** Предполагаемые механизмы деления микоплазм. (А) — механизм, основанный на формировании дивисомы с участием FtsZ (подобно другим бактериям). (Б) — деление, связанное с подвижностью. (В) — деление, связанное с избыточным синтезом мембраны (подобно L-форме бактерий)

## 2.2. Методы микроскопии сверхвысокого разрешения.

За последние 20 лет было разработано большое число методов флуоресцентной микроскопии (ФМ) сверхвысокого разрешения (англ. super-resolution microscopy). Такие методы позволяют преодолеть дифракционный предел разрешения традиционной оптической микроскопии, обусловленный

волновой природой света. Во второй половине XIX века было показано, что изображение точечного источника света в оптическом приборе (например, в микроскопе или телескопе) будет иметь конечные размеры  $d$  (дифракционное пятно, обычно описываемое функцией Эйри), зависящие от длины волны  $\lambda$  и числовой апертуры NA оптического прибора в соответствии с формулой (1), впервые описанной Эрнстом Аббе:

$$d = \frac{\lambda}{2NA} \quad (1)$$

Фундаментальный характер этой формулы, описывающей дифракционный предел, долгое время ограничивал возможности оптической микроскопии и не позволял получать разрешение лучше, чем примерно половина длины волны используемого света; даже лучшие современные микроскопы, построенные по классической схеме, имеют разрешение не лучше 200 нм. Поэтому даже в относительно крупной эукариотической клетке многие структуры и органеллы не могут быть разрешены с помощью традиционной оптической микроскопии. Ещё сильнее ограничены возможности оптической микроскопии в случае бактерий, особенно таких мелких, как микоплазмы.

Из приведенной выше формулы очевидным способом увеличения разрешения представляется уменьшение длины волны. Переход в УФ область затруднен в связи с высокой токсичностью для клетки, что делает невозможным визуализацию живых организмов; также отсутствуют флуоресцентные метки в соответствующей области спектра, что сразу лишает метод известных преимуществ ФМ, таких как избирательность и высокий контраст. Использование электронной микроскопии (особенно методов криоэлектронной томографии) позволяет получить отличное разрешение, сравнимое с размерами молекул, однако исследование живых организмов невозможно; возможности избирательной визуализации этого метода также ограничены (в основном используется метод иммуноэлектронной микроскопии, что даёт возможность специфично метить один из белков; кроме того, активно развивается метод коррелированной световой и электронной микроскопии (англ. CLEM), что

позволяет частично совместить преимущества методов электронной и световой микроскопии [83]).

Увеличение числовой апертуры также позволяет увеличить разрешение, однако возможности такого улучшения ограничены максимальным теоретически достижимым телесным углом, равным  $4\pi$  (практически показано улучшение разрешения до уровня около 100 нм). Такие методы реализованы и достаточно широко используются, например, метод  $4\pi$ -микроскопии [84], однако высокая техническая сложность методов в сочетании с относительно низким разрешением выносит обсуждение подобных методов за пределы данного обзора.

Неудивительно, что долгое время исследователи пытались преодолеть дифракционный предел. Достаточно давно, ещё в 1928 году был предложен метод ближнепольной оптической микроскопии (БОМ), основанный на сканировании объекта при помощи крошечной апертуры (хотя реализован метод БОМ был только в 1986 году [85], примерно в одно время с другими зондовыми методами, например, такими широко известными методами, как атомно-силовая микроскопия и туннельная микроскопия [86]). Так как размеры апертуры, а также расстояние от неё до объекта намного меньше длины световой волны, дифракционный предел практически не сказывается на достигаемом разрешении; метод позволяет достичь разрешения порядка 10 нм. Несмотря на хорошее разрешение, метод БОМ не нашел такого широкого применения в биологии, как методы широкопольной оптической микроскопии, так как его использование ограничивается визуализацией поверхности, а визуализация объемных структур практически невозможна.

Однако за последнее время были разработаны несколько методов ФМ, которые позволяют достичь отличного пространственного разрешения, сохраняя при этом основные достоинства световой микроскопии. Это привело к настоящему прорыву в области биологии клетки; в 2014 году новые методы микроскопии были отмечены Нобелевской премией по химии. Их можно разбить на две основные группы: детерминистские и стохастические методы визуализации. Существует огромное количество разновидностей методов,

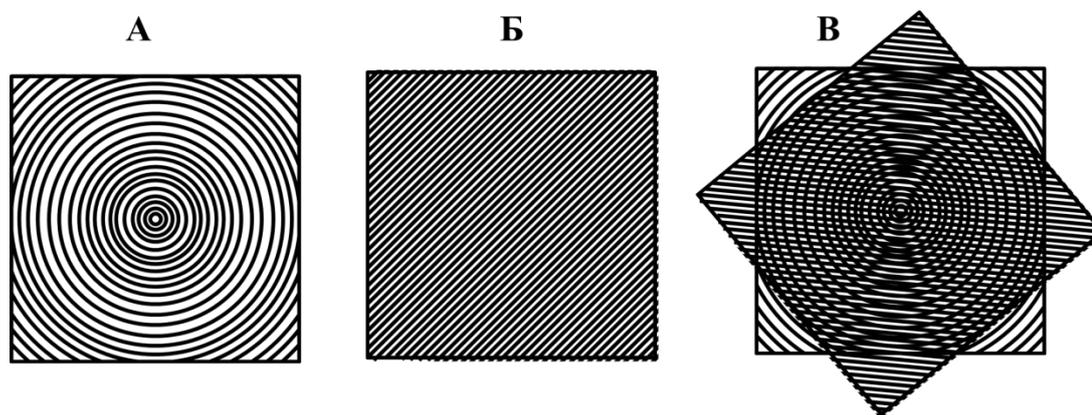
зачастую отличающихся лишь названиями: например, к методу локализационной микроскопии относятся такие аббревиатуры, как SMLM (англ. single-molecule localization microscopy, наиболее общая), PALM (англ. photoactivated localization microscopy [21]), fPALM (fluorescence PALM [87]), BALM (англ. Binding Activated Localization Microscopy [88]), STORM (англ. Stochastic optical reconstruction microscopy [89]), dSTORM (direct STORM [90]), SOFI (англ. Super-resolution optical fluctuation imaging [91]), PAINT (англ. points accumulation for imaging in nanoscale topography [92]) и др.; STED также имеет родственные методы, например, GSD (англ. ground state depletion [93]) и метод, имеющий наиболее общее название, RESOLFT (англ. REversible Saturable Optical Linear Fluorescence Transitions [94]); SIM родственны методики SMI (англ. spatially modulated illumination) [95], SSIM (англ. saturated structured-illumination microscopy, является комбинацией методов SIM и STED) [96] и др. Так как в рамках данной работы невозможно привести описание всех разновидностей методов, здесь на примере методов SIM, STED и SMLM описаны только основы методов, которые, тем не менее, в большей или меньшей степени применимы ко всем разновидностям методов субдифракционной микроскопии. Хороший обзор по основным методам микроскопии сверхвысокого разрешения приведен в работе [97].

### **2.2.1. Детерминистские методы визуализации**

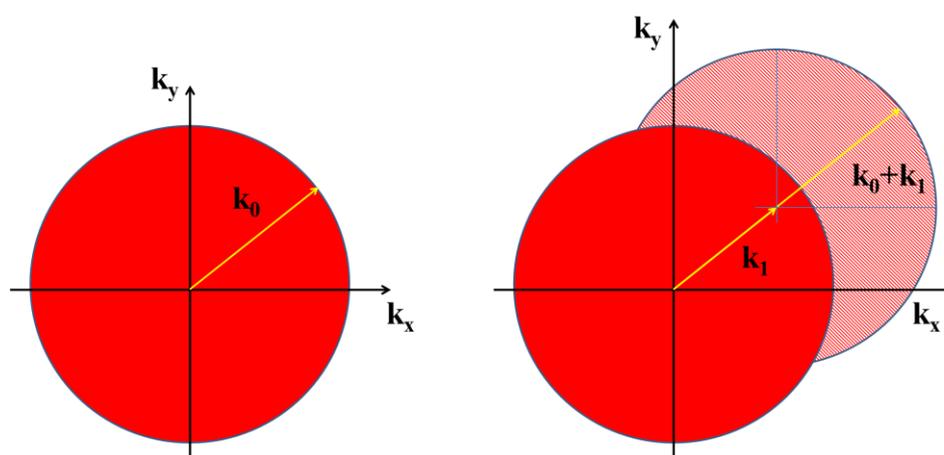
В основе детерминистских методов микроскопии сверхвысокого разрешения обычно лежит априорная информация о пространственном распределении возбуждающего и/или испускаемого света. Так, в случае рассматриваемого ниже метода SIM – это информация, заложенная в паттерн освещения, а в случае STED – информация о размере области, испускающей свет.

Одним из наиболее удобных и широко используемых в биологии методов микроскопии сверхвысокого разрешения является метод микроскопии структурированного освещения (англ. Structured illumination microscopy — SIM), принцип этого метода обстоятельно рассмотрен в работе [98]. В основе метода

лежит последовательное освещение образца паттерном в виде стоячей волны (см. **Рисунок 12**); несколько ориентаций паттерна освещения позволяют через так называемый муаровый эффект записать в полученные изображения дополнительную информацию о структуре объекта; компьютерная обработка полученных изображений (на основании известного распределения света в паттерне освещения) с использованием обратного преобразования Фурье обеспечивает реконструкцию изображения с улучшенным разрешением. С математической точки зрения метод SIM использует расширение области наблюдаемых частот в частотном пространстве, что эквивалентно увеличению разрешения (см. **Рисунок 13**). При этом наложение паттерна освещения с частотой  $\mathbf{k}_1$  на исходное изображение с максимальной частотой  $\mathbf{k}_0$  увеличивает наивысшую наблюдаемую пространственную частоту (разрешение) с  $\mathbf{k}_0$  до  $\mathbf{k}_0 + \mathbf{k}_1$ . Таким образом, чтобы максимизировать разрешение, необходимо, чтобы освещение содержало как можно более высокие пространственные частоты  $\mathbf{k}_1$ . Разумеется, значение  $|\mathbf{k}_1|$  ограничено дифракцией на уровне  $2NA/\lambda \approx \mathbf{k}_0$ , поэтому новый предел разрешения  $\mathbf{k}_0 + \mathbf{k}_1$  может быть не более  $\approx 2|\mathbf{k}_0|$ . Таким образом, SIM позволяет достичь разрешения около 100 нм, что примерно в 2 раза лучше, чем позволяет получить традиционная флуоресцентная микроскопия, но существенно хуже других методов субдифракционной визуализации, рассматриваемых ниже. С другой стороны, важным достоинством метода SIM является то, что он не требует каких-либо особенностей пробоподготовки по сравнению с методом традиционной ФМ, в отличие от других методов микроскопии сверхвысокого разрешения (которые могут требовать использования, в частности, особых красителей). Кроме того, SIM обеспечивает быструю визуализацию (позволяет исследовать динамические процессы в клетке с частотой до нескольких Гц) и использует достаточно низкие интенсивности освещения и поэтому хорошо совместим с живыми клетками.



**Рисунок 12.** Увеличение разрешения в методе SIM через эффект муара. Если неизвестная структура образца (А) будет наложена на известный шаблон освещения с регулярным паттерном (Б), появится муаровый узор (муаровые полосы, явление, хорошо известное фотографам) (В). Вычислительная обработка (обратное преобразование Фурье) на основе известного распределения на изображении (b) позволяет увеличить разрешение примерно в 2 раза



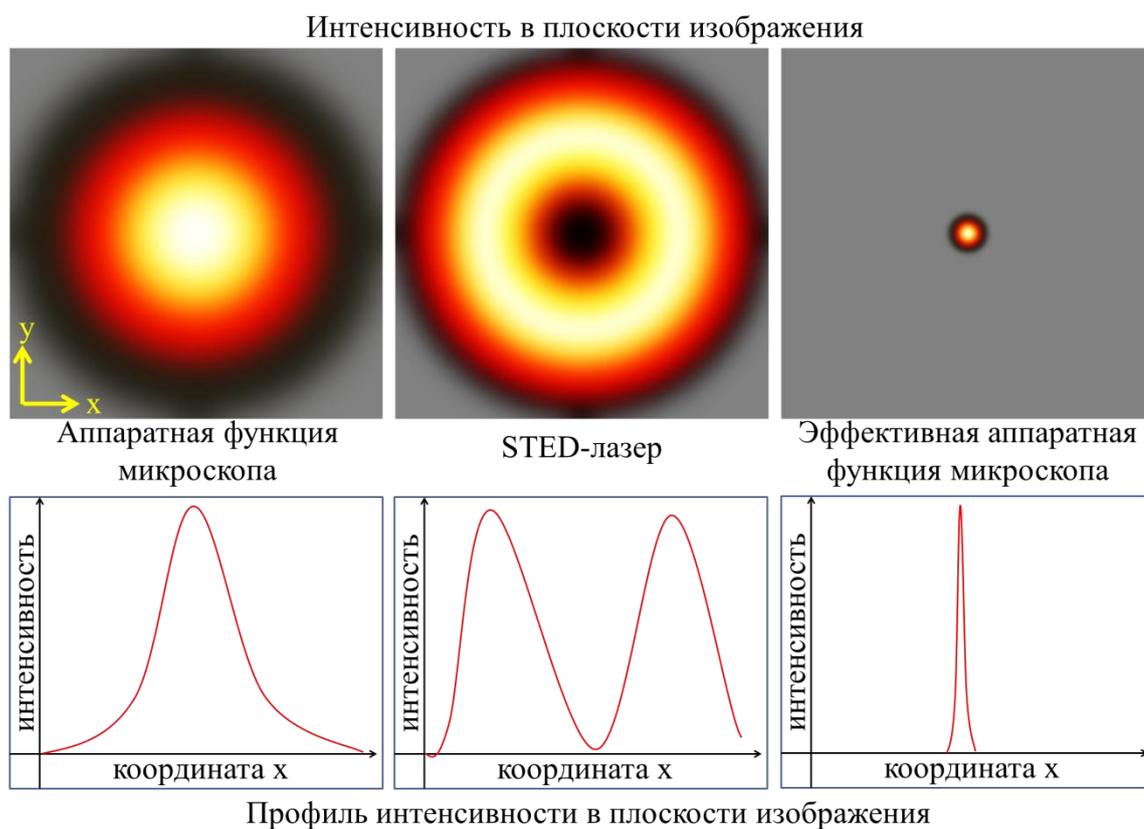
**Рисунок 13.** Слева: Область пространственных частот, которые могут наблюдаться обычным микроскопом, ограничена окружностью с радиусом  $k_0$  в частотном пространстве. Справа: Если свет возбуждения содержит пространственную частоту  $k_1$  (структурированная засветка), новый набор информации становится видимым в виде муаровых полос (заштрихованный круг). Эта область имеет ту же форму, что и область, наблюдаемая в обычный микроскоп, но смещена на  $k_1$ . Максимальная пространственная частота, которая может наблюдаться (в этом направлении), равна  $k_0 + k_1$

SIM широко используется для визуализации биологических объектов [99]. Например, при помощи этого метода была успешно осуществлена одновременная визуализация хроматина, ядерных пор и ядерной ламины в миобластах линии C2C12 мыши [100], что позволило авторам работы, в частности, разрешить отдельные ядерные поровые комплексы, которые были ко-локализованы с каналами в ядерной ламине. Ряд исследователей успешно использовал SIM для

изучения структуры Z-кольца. Например, 3D-SIM был использован, чтобы показать, что Z-кольца в бактериях *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus* являются неоднородными группами из кластеров FtsZ, а не непрерывной структурой [101]. Динамическая съемка позволила им показать, что локализация FtsZ в Z-кольце динамична, при этом структура остается неоднородной во время всего процесса деления клеток. SIM также начал использоваться для визуализации вирусных частиц, например, в недавней статье исследовались созревание и морфогенез вируса осповакцины; трехмерный SIM позволил разрешить оболочку, формируемую белком капсида B5 в виде сферической структуры, окружающей ядро вируса, что дало возможность оценивать степень созревания вирусных частиц [102].

Другой детерминистский метод микроскопии – STED (**S**Timulated **E**mission **D**epletion) или микроскопия на основе подавления спонтанного испускания – в отличие от SIM, требует существенно бóльших интенсивностей освещения, что несколько ограничивает его применение по отношению к живым клеткам, но зато позволяет получить существенно большее разрешение (обычно порядка 10 — 50 нм). В основе микроскопии STED лежит нелинейный (по интенсивности) отклик флуоресцентных молекул на воздействие света, вызывающего стимулированное испускание. Обычно используются два лазера, формирующих концентрические дифракционно-ограниченные пятна в плоскости образца (см. **Рисунок 14**). Первый лазер — возбуждающий, с меньшей длиной волны, — имеет профиль интенсивности, близкий к гауссиану, и используется для возбуждения флуоресценции, второй, с большей длиной волны, — индуцирующий (или STED-лазер) — имеет профиль интенсивности в виде бублика и используется для индукции стимулированного испускания. Индуцирующий лазер позволяет подавить спонтанное испускание на периферии освещаемого участка образца, оставив спонтанное испускание лишь в центре участка; при этом стимулированное излучение имеет бóльшую длину волны, чем спонтанное, поэтому их удается отделить друг от друга спектрально. Подбор интенсивностей возбуждающего и индуцирующего лазеров позволяет добиться условий, при

которых испускание происходит лишь из сколь угодно малой (показано до единиц нанометров) области по центру лазерного пятна. STED является сканирующим методом, по принципу реализации он напоминает конфокальный микроскоп. Кроме того, его можно сравнить с зондовыми методами: в рамках такого сравнения совмещенное пятно лазеров представляет собой «зонд», однако в отличие от зондовых методов, STED позволяет осуществлять визуализацию по всему объему, а не только на поверхности образца.



**Рисунок 14.** Преодоление дифракционного предела разрешения в микроскопии STED. Слева направо: пучок возбуждения флуоресценции (соответствует аппаратной функции микроскопа); STED-лазер; эффективная аппаратная функция микроскопа. Верхний ряд — профиль интенсивности в плоскости XY (цветовая кодировка интенсивности от черного к белому); нижний ряд — профиль интенсивности вдоль координаты x. Нелинейная зависимость вероятности стимулированного излучения от интенсивности приводит к тому, что наложение коаксиальных пучков возбуждения и STED-лазера обеспечивает сколь угодно малую область, из которой происходит спонтанное испускание (эффективную аппаратную функцию)

Технически STED является очень сложным методом, достаточно отметить, что с момента описания идеи авторами метода в 1994 году до его практической

реализации прошло целых 5 лет [103, 104]. Интересно отметить, что изначально идея STED была описана ещё в 1986 году в одном из советских патентов [105]. STED не так широко, как SIM, применяется в биологии, прежде всего из-за высокой сложности метода. В одной из работ, например, STED использовался для визуализации мембран живых клеток: анализировалась функция эндосом на примере нейронов гиппокампа, изолированных нервных окончаний и клеток линии PC12 [106].

Ещё одним детерминистским методом микроскопии сверхвысокого разрешения можно назвать микроскопию расширения (англ. Expansion microscopy [107]). Данный метод основан на физическом увеличении образца за счёт расширения матрицы, в которой находится исследуемый объект. Несмотря на полную несовместимость с живыми организмами, этот метод представляется очень интересным и практически важным, так как его использование возможно на любых микроскопах и позволяет достичь изотропного увеличения разрешения примерно в 4 раза.

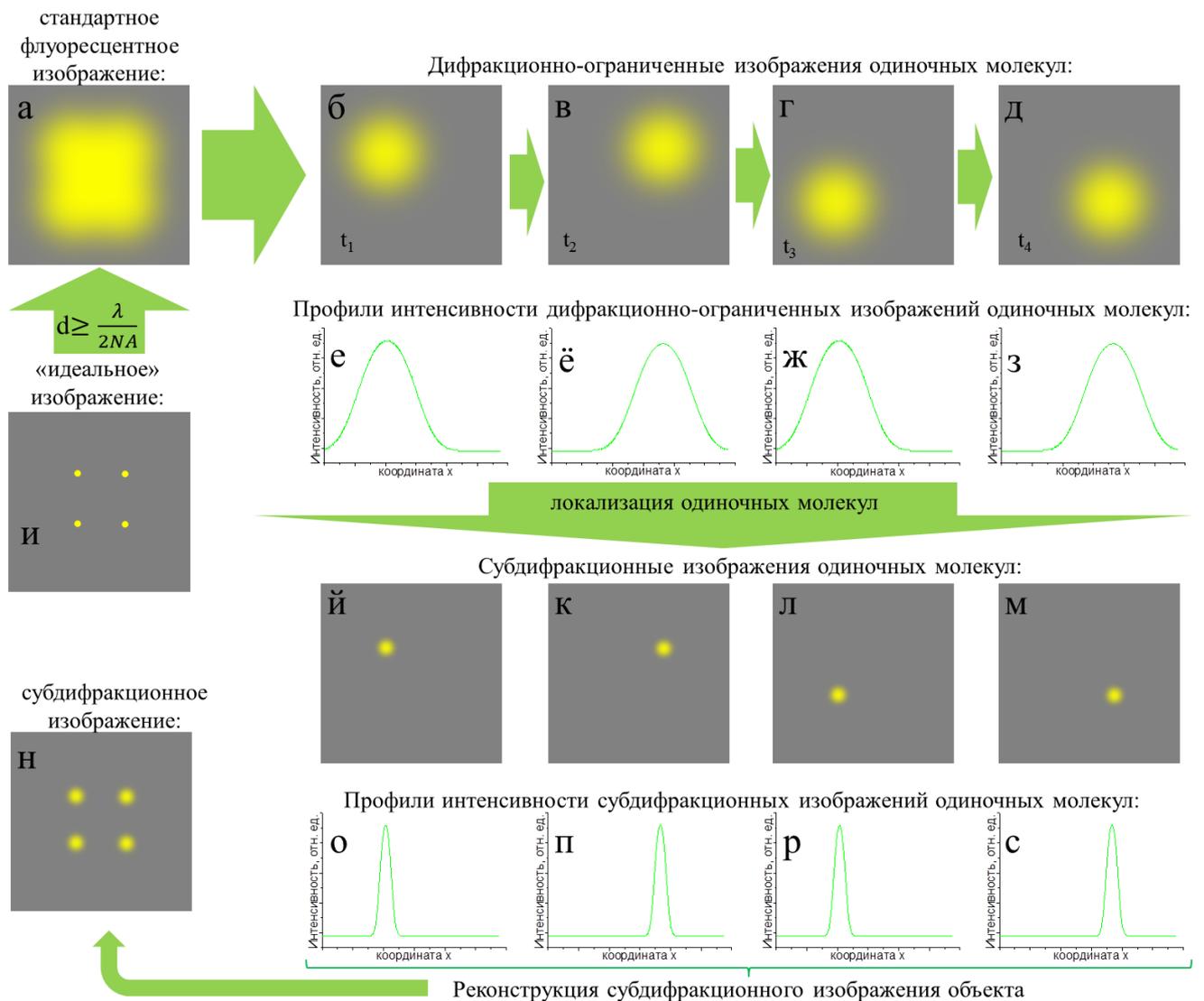
### **2.2.2. Стохастические методы визуализации**

В основе стохастических методов микроскопии сверхвысокого разрешения лежит следующий факт: химическая природа множества источников света (флуорофоров) обеспечивает их сложное динамическое поведение, которое может быть использовано для того, чтобы несколько близко расположенных флуорофоров излучали свет в разные моменты времени и тем самым становились разрешимыми в пространстве в каждый момент времени. Метод локализационной микроскопии (англ. SMLM – Single-Molecule Localization Microscopy) представляет, пожалуй наибольший интерес среди стохастических методов визуализации. В основе метода локализационной микроскопии лежит возможность локализации одиночной молекулы практически с любой точностью, определяемой в основном числом зарегистрированных фотонов. Эта возможность давно используется в таком методе, как отслеживание одиночных частиц, или SPT

(англ. **S**ingle **P**article **T**racking) для исследования движения одиночных флуоресцентно-меченых молекул (например, белков внутри клетки) [108]. Ещё в 1993 году была показана возможность детектирования одиночной флуоресцентной молекулы при помощи ближнеполевой сканирующей микроскопии [109], а уже в 1995 году эта возможность была использована, чтобы в динамике отслеживать движение одиночных флуоресцентно-меченых молекул миозина по актиновому филаменту с субдифракционной точностью [110]. Вообще говоря, метод SPT не обязательно предполагает использование флуоресцентно-меченых частиц (например, в одной из первых работ с использованием метода SPT исследовалось движение наночастиц золота в цитоплазме клеток РТК-2, при этом использовалась визуализация в проходящем свете [111]), однако именно флуоресцентные методы делают метод SPT по-настоящему мощным и удобным. Именно принципиальная возможность определять положение одиночной молекулы с субдифракционной точностью используется в методе локализационной микроскопии (и в других стохастических методах визуализации), но для реализации полноценного метода субдифракционной визуализации требовалось научиться разделять флуоресценцию одиночных молекул, что потребовало использования красителей с особыми свойствами.

Метод локализационной микроскопии был практически одновременно описан тремя научными группами в 2006 году [21, 87, 89]. В указанных работах были использованы различные флуорофоры и методы визуализации, что породило сразу три альтернативных названия метода — PALM (**P**hoto**A**ctivation **L**ocalization **M**icroscopy, использовался фотоактивируемый флуоресцентный белок и метод микроскопии полного внутреннего отражения (TIRF)), fPALM (**f**luorescence PALM, фотоактивируемый флуоресцентный белок + стандартная микроскопия), STORM (**S**Tochastic **O**ptical **R**econstruction **M**icroscopy, фотопереключаемая пара красителей Cy3-Cy5 + TIRF). Однако суть всех трёх методов одинакова: фотофизические и химические свойства флуорофоров позволяют подобрать такие условия эксперимента (свойства среды, интенсивность освещения, плотность флуоресцентного мечения), при которых в

каждый момент времени флуоресцирует настолько малая часть молекул, что их изображения в микроскопе не перекрываются между собой (иными словами, на один дифракционный объем приходится не более одной флуоресцирующей молекулы, см. **Рисунок 15**). Это позволяет определить положение каждой флуоресцентной молекулы (или локализовать её) с высокой точностью, которая зависит главным образом от числа зарегистрированных фотонов [112]. Дальнейшая компьютерная обработка позволяет осуществить реконструкцию изображения из локализованных молекул флуорофора с существенно улучшенным разрешением (типично – около 20 нм).



**Рисунок 15.** Преодоление дифракционного предела разрешения в локализационной микроскопии (SMLM) на примере 4-х флуоресцентных молекул. Явление дифракции приводит к тому, что «идеальное» изображение (и), фактически отражающее распределение флуорофора,

во флуоресцентном микроскопе превращается в дифракционно-ограниченное (а). Метод локализационной микроскопии использует разделение флуоресценции одиночных молекул (б–д) во времени таким образом, что в каждый момент времени ( $t_1$ – $t_4$ ) изображения флуоресцентных молекул не накладываются друг на друга. Это позволяет каждую из молекул локализовать с субдифракционной точностью (й–м). В результате компьютерной обработки серий изображений удастся реконструировать изображение с улучшенным разрешением (н). Для наглядной демонстрации выигрыша в разрешении на рисунках е–з приведены профили интенсивности дифракционно-ограниченных изображений одиночных молекул, а на рисунках о–с — соответствующие профили интенсивности субдифракционных изображений

С момента изобретения метода SMLM было предложено множество флуоресцентных меток, обладающих подходящими для метода свойствами. Использование ярких синтетических красителей (фотоактивируемых либо демонстрирующих обратимый переход в темное состояние) позволяет достичь высочайшего разрешения (вплоть до единиц нанометров [113]), однако использование таких флуоресцентных меток сильно ограничено при изучении живых клеток. Флуоресцентные белки хорошо подходят для *in vivo* визуализации, хотя их фотофизические свойства несколько ограничивают разрешение, достижимое методом SMLM; было предложено множество фотоактивируемых, фотопереключаемых белков, которые позволяют осуществлять визуализацию в основном в зелёном и красном спектральных диапазонах [114]. Кроме того, активно развивается направление так называемых флуорогенных красителей (такие красители становятся флуоресцентными при соединении с субстратом); описано использование с методом SMLM красителей, специфичных по отношению к ДНК [115], мембране [116], белкам цитоскелета [117]. Перспективным также представляется использование флуорогенных белков, которые могут быть полезны, в частности, для визуализации анаэробных организмов, в которых визуализация при помощи флуоресцентных белков затруднена [118].

Множество методик, основанных на методе SMLM или родственных ему, как отмечалось выше, породило сложную номенклатуру, состоящую из нескольких десятков аббревиатур. В целом, можно разделить все методы на два ключевых направления: методы визуализации одиночных молекул («настоящий» метод

SMLM) и методы анализа множества флуорофоров, изображения которых накладываются друг на друга (англ. Multi-Emitter Fitting — MEF). Последние методы позволяют достигать улучшенного разрешения даже в случае чрезмерно высокой плотности флуорофоров, что существенно расширяет область применения стохастических методов микроскопии сверхвысокого разрешения. Среди методов MEF следует отметить недавно разработанный метод микроскопии радиальных флуктуаций (англ. Super-Resolution Radial Fluctuations — SRRF), основанный на продвинутом анализе серий флуоресцентных изображений, съёмка которых ведётся аналогично методу SMLM [119]. Разрешение, получаемое методом SRRF, зависит от плотности флуорофоров на изображении; в случае визуализации одиночных молекул, изображения которых не перекрываются между собой, метод SRRF позволяет получить разрешение, сравнимое с «классическим» методом SMLM.

### 3. Материалы и методы

#### 3.1. Подготовка фиксированных клеток *E. coli* для микроскопии сверхвысокого разрешения

Клетки *E. coli* штаммов Dh5 $\alpha$ , Top10 или Rosetta культивировали в среде LB в термошейкере при температуре 37°C с добавлением необходимых антибиотиков. Непосредственно перед экспериментом, ночную культуру инокулировали в свежую среду LB, после чего осуществляли рост до оптической плотности OD<sub>600</sub> = 0,5. Фиксацию клеток осуществляли непосредственно в среде добавлением формальдегида до конечной концентрации 2,6%, глутаральдегида – 0,04%, натрий-фосфатного буфера (pH=7.5) – 32 мМ; клетки инкубировали 10 мин при комнатной температуре, затем 50 мин на льду. После этого клетки отмывали (последовательным центрифугированием при 6000 г в течение 2 мин и ресуспендированием) 2 раза 1 мл раствора PBS и один раз 200 мкл раствора ГТЭ (глюкоза 50 мМ, Tris-HCl (pH=8.0) 50 мМ, ЭДТА 1 мМ). После этого клетки помещали в промываемую камеру, образованную предметным и покровным стеклом, разделенными двусторонним скотчем толщиной 100 мкм. Для осуществления динамической стабилизации положения образца в микроскопе на покровное стекло предварительно наносили полистироловые микросферы диаметром 2,1 мкм; кроме того, для лучшего закрепления клеток, поверхность покровного стекла дополнительно покрывали поли-L-лизином. Клетки в течение 30 мин оседали на поверхность покровного стекла, после чего осуществляли их пермеабиллизацию. Для этого в промываемую камеру вначале помещали 0,1% раствор тритона в PBS на 5 мин, затем – раствор лизоцима (10 мкг/мл) в ГТЭ, также на 5 мин. Потом для блокирования неспецифического связывания антител клетки инкубировали в 2% растворе бычьего сывороточного альбумина в PBS (BSA-PBS) в течение 1 ч при комнатной температуре. Инкубирование клеток с первичными антителами кролика к FtsZ (Agrisera) в разведении 1:100 в BSA-PBS осуществляли в течение ночи при 4°C. Затем клетки промывали раствором 0,01%

Tween-20 в PBS, 5 раз по 50 мкл. Инкубирование со вторичными антителами, конъюгированными с красителем Alexa 647 или Alexa 555 (Life technologies) в разведении 1:500 осуществляли в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего клетки промывали, как описано выше. Для большей стабильности флуоресцентного мечения производили постфиксацию образцов посредством добавления 2% раствора формальдегида в PBS на 20 мин при комнатной температуре. Для визуализации мембраны добавляли раствор зародышевого агглютинина пшеницы, конъюгированного с красителем Alexa 488, в концентрации 10 мкг/мл в PBS на 10 мин. Для визуализации ДНК – красители YOYO-1 и TOTO-3 (концентрация каждого 100 нМ), аналогично предыдущему.

### **3.2. Подготовка живых клеток *E. coli* для микроскопии сверхвысокого разрешения**

Клетки *E. coli*, несущие ген белка слияния FtsZ с флуоресцентными белками (любезно предоставлены Н.Р. Erickson из Duke University [120]), культивировали в среде LB в термошейкере при температуре 37°C с добавлением необходимых антибиотиков и индукторов. Для штамма JKD7-1, несущего ген белка слияния FtsZ с флуоресцентным белком mMaple2 на плазмиде pJSB2, температуру снижали до 22°C и использовали хлорамфеникол. Штамм BW27783, несущий ген белка слияния FtsZ с флуоресцентным белком mNeonGreen, культивировали без добавления антибиотиков как при 37°C, так и при 22°C. Непосредственно перед экспериментом, ночную культуру инокулировали в среде M9 с добавлением глюкозы в качестве источника углерода, после чего осуществляли рост до оптической плотности  $OD_{600} = 0,5$ . После этого клетки помещали на агарозную подложку с добавлением среды M9 и накрывали покровным стеклом.

### 3.3. Подготовка фиксированных клеток *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* для микроскопии сверхвысокого разрешения

Клетки *Mycoplasma gallisepticum* штаммов S6 или A5969 и *Acholeplasma laidlawii* штамма PG-8a культивировали при 37°C без аэрации в среде, основанной на среде Oxoid Mycoplasma broth base (или аналогичной среде, собранной самостоятельно из составных ингредиентов), с добавлением 10% лошадиной сыворотки, 5% дрожжевого диализата, 1% глюкозы, 100 мкг/мл ампициллина, 1:1000 раствора фенолового красного в качестве индикатора. Культивацию осуществляли до середины экспоненциальной фазы, что определяли по изменению цвета индикатора вследствие закисления среды. Фиксацию клеток осуществляли в среде добавлением формальдегида до конечной концентрации 2 %, глутаральдегида – 0,1% на 1 ч при комнатной температуре. Затем клетки однократно промывали PBS, после чего для их закрепления в промываемых камерах, подготовленных аналогично случаю фиксированных клеток *E. coli*, проводили центрифугирование камер, наполненных суспензией клеток микоплазм, при 1000 g в течение 5 минут, в результате клетки оседали и закреплялись на поверхности покровного стекла. Для пермеабиллизации в промываемую камеру вмывали 0,1% раствор тритона X-100 в PBS на 5 мин. Для блокирования неспецифического связывания антител клетки инкубировали в 3% растворе обезжиренного сухого молока в PBS с добавлением 5% лошадиной сыворотки для блокирования иммуноглобулин-связывающих белков в течение часа при комнатной температуре. Первичные антитела, получение которых описано в отдельном пункте (см. стр. 65), добавляли в разведении 1:100 в растворе молока на ночь при 4°C. Промывку, инкубирование со вторичными антителами и окрашивание ДНК осуществляли аналогично случаю фиксированных клеток *E. coli*. Для окрашивания мембраны клетки инкубировали с раствором красителя CellMask green (Life Technologies) в концентрации от 100 до 1000 нМ в PBS в течение 10 мин.

### **3.4. Подготовка фиксированных клеток *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* для иммуноэлектронной микроскопии**

Культивирование и фиксацию клеток осуществляли аналогично подготовке клеток для микроскопии сверхвысокого разрешения. После фиксации клетки собирали центрифугированием (10000 g в течение 10 минут при 4°C), осадки обезвоживали растворами с повышающимися концентрациями этанола (70% - 15 мин, 96% - 15 мин), после чего осадки последовательно пропитывали растворами акриловой смолы LR-White (Polysciences) в этаноле в соотношении 1:3 (2 ч), 1:1 (2 ч), 3:1 (2 ч), выдерживали ещё 2 ч в чистой смоле LR-White, а затем осадки переносили в желатиновые капсулы для заливки и заливали смолой LR-White. Полимеризацию смолы осуществляли при 50-52°C в течение 2 сут. Далее готовили ультратонкие срезы препаратов на ультратоме LKB-III (LKB, Швеция). Срезы обрабатывали антителами к FtsZ в разведении 1:100 в PBS с добавлением 0,1% БСА; вместо вторичных антител использовали конъюгат белка А с частицами коллоидного золота диаметром 10 нм (EY Laboratories, США). Для контрастирования срезов использовали спиртовой раствор уранил-ацетата и раствор цитрата свинца.

### **3.5. Микроскопия сверхвысокого разрешения (методы SMLM и SRRF)**

#### **3.5.1. Двухмерная и трехмерная микроскопия SMLM, SRRF, а также стандартная флуоресцентная микроскопия фиксированных клеток *E. coli*, *M. gallisepticum* и *A. laidlawii***

В промываемые камеры с образцами клеток *E. coli*, *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* вносили раствор, предложенный в статье [121] основанный на буфере PBS-Tris (10 мМоль, pH 7.5) с добавлением 10% глюкозы, 10 мМ β-меркаптоэтиламина, 50 мМ β-меркаптоэтанола, 2 мМ циклооктатетраена, 2.5 мМ протокатеховой кислоты (Sigma-Aldrich 37580) и 50 нМ протокатехуат-

диоксигеназы (Sigma-Aldrich P8279). После этого образцы заклеивали подходящим герметиком и помещали в микроскоп, укомплектованный необходимым оборудованием для осуществления локализационной микроскопии, которое описано ранее [122]. Для возбуждения флуоресценции красителей Alexa 647 и TOTO-3 в режиме локализационной микроскопии использовали диодный лазер с длиной волны 640 нм, создающий в плоскости образца пятно с плотностью мощности около  $1 \text{ кВт/см}^2$ . В ряде случаев для ускорения переходов красителя Alexa 647 из темного во флуоресцентное состояние использовали дополнительное освещение диодным лазером с длиной волны 405 нм с небольшой плотностью мощности (от 1 до  $100 \text{ Вт/см}^2$ ). В случае красителей Alexa 488 и CellMask Green использовали твердотельный лазер с длиной волны 473 нм; в случае красителя Alexa 555 — твердотельный лазер с длиной волны 532 нм; оба лазера создавали пятно с плотностью мощности, сравнимой с красным лазером. Для визуализации в режиме SRRF использовали те же осветители, но с уменьшенной интенсивностью. Для визуализации в режиме традиционной (дифракционно-ограниченной) микроскопии использовали низкоинтенсивный свет ртутной лампы. Для отделения флуоресценции от возбуждающего света использовали следующие наборы фильтров: Filter set 10 (Carl Zeiss) для красителей Alexa 488, CellMask Green и YOYO-1; LF635/LP-B-000 (Semrock) для красителей Alexa 647 и TOTO-3; mCherry-40LP-A-000 (Semrock) для красителя Alexa 555; DAPI-50LP-A-000 (Semrock) для красителя Hoechst 33342.

В случае красителя Cy3b были следующие особенности пробоподготовки. Для реализации этого метода антитела козы к антителам кролика конъюгировали с красителем Cy3b по протоколу производителя и использовали в качестве вторичных антител, как указано выше. Образцы обрабатывали борогидридом натрия после окрашивания и наблюдали в буфере, минимизирующем «паразитные» процессы флуоресценции (100 мМ Tris-HCl pH 8, 1 мМ аскорбиновая кислота, 1 мМ метил виологен, 5 мМ протокатеховая кислота, 60 нМ протокатехуат 3,4-диоксигеназа). Съёмку осуществляли в канале Filter set 20

(Carl Zeiss) с удаленным входным фильтром с использованием лазеров с длинами волн 532 нм (возбуждение флуоресценции) и 405 нм (активация красителя).

В режиме локализационной микроскопии обычно снимали от 1000 до 20000 последовательных кадров с изображениями одиночных молекул красителя, которые затем обрабатывали при помощи плагина ThunderSTORM [123] для программного пакета ImageJ [124]. При реконструкции изображений использовали следующие параметры фильтрации: Intensity>1000, Uncertainty<10 (Alexa 647, Alexa 555); Intensity>100, Uncertainty<20 (Alexa 488, ТОТО-3).

В режиме стандартной (дифракционно-ограниченной) флуоресцентной микроскопии, а также в канале проходящего света, обычно снимали от 10 до 20 последовательных изображений, которые затем для повышения контрастности усредняли, кроме того, производили вычитание фонового сигнала.

Для осуществления трехмерной локализационной микроскопии в оптический путь между объективом и камерой помещали слабую цилиндрическую линзу (фокусное расстояние 4 м), вносящую искусственный астигматизм. Для калибровки аппаратной функции в зависимости от положения по оси Z использовали зависимость формы изображений флуоресцентных микросфер диаметром 90 нм от координаты Z при перемещении образца с заданным шагом.

### **3.5.2. Локализационная микроскопия и микроскопия SRRF с использованием живых клеток *E. coli***

Для поддержания жизнеспособности клетки помещали в камеру для микрокультурации между агарозной подложкой со средой и покровным стеклом, как описано выше; кроме того, для поддержания температурного режима осуществляли подогрев образца при помощи самодельного воздушного термостата для микроскопа.

Съемку клеток с белком FtsZ, меченым флуоресцентным белком mMaple2, в режиме локализационной микроскопии осуществляли следующим образом. В инкубаторе поддерживали температуру 22°C для уменьшения эффектов,

связанных с негативным влиянием флуоресцентного белка слияния FtsZ на процесс деления. Для переключения флуоресцентного белка mMaple2 из зеленого в красное состояние использовали низкоинтенсивное излучение лазера с длиной волны 405 нм, для возбуждения флуоресценции — излучение лазера с длиной волны 532 нм средней интенсивности (порядка 100 Вт/см<sup>2</sup>). Обычно снимали от 1000 до 4000 последовательных изображений, которые затем обрабатывали аналогично указанному выше, использовали следующие параметры фильтрации: Intensity>100, Uncertainty<20.

Съемку клеток с белком FtsZ, меченых флуоресцентным белком mNeon Green, в режиме микроскопии радиальных флуктуаций осуществляли аналогично белку mMaple2, но в связи с меньшим влиянием флуоресцентного белка обычно поддерживали большую температуру (от 30°C до 37°C). Для возбуждения флуоресценции использовали лазер с длиной волны 473 нм или свет от ртутной лампы. Снимали от 100 до 500 последовательных изображений, которые в дальнейшем обрабатывали плагином NanoJ-SRRF [119] для ImageJ.

### 3.5.3. Анализ размеров кластеров FtsZ

Кластерами считали пятна на субдифракционном изображении, существенно превышающие по размеру размер пикселя в реконструированном изображении. Для оценки размеров кластеров использовали измерение профиля интенсивности изображения (вдоль линии толщиной 2 пикселя) вдоль длинной оси кластера (длина кластера), а также перпендикулярно ей (толщина кластера). Профиль интенсивности аппроксимировали гауссианом, после чего полную ширину на половине высоты (FWHM) считали результатом измерения. Для аппроксимации гауссианом использовали плагин для ImageJ FWHM\_Line.ijm, написанный Soon Yew John. Для каждой клетки осуществляли не менее 5 измерений наиболее выраженных кластеров.

### 3.6. Электронная микроскопия

Электронную микроскопию на микроскопе Libra 120 в ИНЦ РАН выполнял Вишняков И.Е. по протоколу, описанному в статье [125].

### 3.7. Ко-иммунопреципитация белков, взаимодействующих с белками FtsZ *M. gallisepticum* и *A. laidlawii*

Для ко-иммунопреципитации смолу, конъюгированную с белком А (Protein A Sepharose 4 Fast Flow, GE), сшивали с тремя типами антител (отдельно): с поликлональными кроличьими антителами к белку FtsZ *A. laidlawii* (AL FtsZ); или с поликлональными кроличьими антителами к белку FtsZ *M. gallisepticum* (MG FtsZ); или с иммуноглобулинами нормальной сыворотки кролика (в качестве отрицательного контроля). Сшивание антител со смолой выполняли, как описано ранее [126] с незначительными изменениями. 100 мкл смолы (белок-А-сефароза) промывали буфером PBS, pH=8,0, в объёме 1 мл. Смолу инкубировали с 0,5 мг антител в течение ночи при 4°C с осторожным перемешиванием. После промывки смолу обрабатывали 10 мл боратного буфера (pH 9,0, 100 мМ борной кислоты, 25 мМ тетрабората натрия, 75 мМ NaCl). Затем, сефарозу ресуспендировали в 10 мл боратного буфера и добавляли дигидрохлорид диметилпимелимидата до конечной концентрации 20 мМ для ковалентного сшивания антител со смолой. Инкубацию продолжали в течение 30 мин при 24°C и 30 мин при 4°C с осторожным перемешиванием. Смолу дважды промывали 10 мл 0,1 М Tris-HCl (pH 8,0), ресуспендировали в 10 мл Tris-HCl и инкубировали в течение 1 ч при 24°C и 1 ч при 4°C. Для удаления несвязанных антител смолу дважды промывали 10 мл PBS, дважды 10 мл 100 мМ глицина в воде (pH 3,0) и дважды PBS.

Процесс иммунопреципитации осуществляли следующим образом. Выращенные клетки *E. coli* дважды промывали PBS с добавлением 0,3 М сахарозы, лизировали в буфере PBS с добавлением 1 мг / мл лизоцима (Sigma-Aldrich, UK) и 1 мМ PMSF и обрабатывали ультразвуком (соникатор Sartorius

LABSONIC P, параметры: cycle = 0.25, amplitude = 25%). В случае клеток *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* лизоцим не добавляли, а лизис осуществляли только с использованием ультразвука. После центрифугирования (15 000 g, 10 мин, 4°C) для удаления дебрис и неразрушенных клеток осветленный лизат разбавляли содержащим детергент буфером NET I [50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 150 mM NaCl, 0,1% неионного детергента Nonidet P-40, 1 mM ЭДТА] и фильтровали через фильтр 0,22 мкм. Чтобы максимально удалить лошадиную сыворотку, присутствующую в образцах, был включен этап предварительной очистки. Для этого в фильтрованный лизат добавляли 200 мкл суспензии белок-G-сефарозы (Protein G Sepharose 4 Fast Flow, GE Helthcare) и инкубировали в течение 2 ч при 4 ° C с осторожным перемешиванием. После центрифугирования супернатант добавляли к смоле с белок-A-сефарозой с пришитыми антителами. После 4-часовой инкубации при 4°C смолу три раза промывали буфером NET I, дважды с буфером NET II (буфер NET I с 500 mM NaCl) и один раз с буфером IP [10 mM Tris / HCl, pH 7,5, 0,1% Nonidet P-40]. Связанные с антителами белки элюировали со смолы буфером IE (100 mM глицина, pH 2,4), элюаты концентрировали методом диафильтрации и анализировали при помощи электрофореза в денатурирующих условиях с последующим масс-спектрометрическим анализом выделенных белков, как описано в работе [127]. Масс-спектрометрический анализ осуществляла Артамонова Т.О.

Некоторые эксперименты проводили с дополнительной стадией сшивания белковых комплексов перед разрушением клеток путем добавления параформальдегида до конечной концентрации 0,4% в течение 1 ч.

### **3.8. Со-осаждение белков, взаимодействующих с белками FtsZ *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* в клетках *E. coli***

Анализ белок-белковых взаимодействий по методу со-осаждения проводили с использованием N-концевого стреп-тага на полноразмерных белках FtsZ и стрептактин-сефарозной смолы (IBA). Для гетерологической экспрессии белков

FtsZ микоплазм в клетках *E. coli* использовали те же генетические конструкции, что и в случае очистки белка (см. ниже). Клетки *E. coli* выращивали в течение ночи при 37°C в жидкой среде LB (100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл хлорамфеникола), затем переносили в свежую среду и культивировали до OD<sub>600</sub> ~ 0,1, после чего добавляли L-арабинозу до конечной концентрации 25 мМ и продолжали культивирование в течение примерно 2 ч. Затем клетки переносили в буфер Tris-HCl (50 мМ рН = 8,0), содержащий 500 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мг/мл лизоцима, 1 мМ полиметилсульфонилфторида и разрушали ультразвуком. Затем проводили очистку за стреп-таг. Клеточный лизат наносили на колонку со стрептактин-сефарозой с использованием хроматографа Acta FPLC (GE). Конечные элюаты, содержащие FtsZ и белки, со-осажденные с ними, анализировали, как в случае ко-иммунопреципитации.

### **3.9. Получение поликлональных антител к белкам FtsZ *M. gallisepticum* и *A. laidlawii***

#### **3.9.1. Очистка рекомбинантных белков FtsZ**

Для получения поликлональных антител использовали рекомбинантные белки FtsZ *M. gallisepticum* и *A. laidlawii*, аффинно очищенные после их экспрессии в клетках *E. coli*. Для экспрессии белков использовали генетические конструкции, основанные на векторе pBAD/HisB, в который вставляли целевой ген, амплифицированный из генома соответствующего вида. Ген помещали в сайт множественного клонирования при помощи стандартных методов рестрикции и лигирования (с использованием соответствующих ферментов и буферов). Так как оригинальный ген *ftsZ M. gallisepticum* содержит два неканонических кодона триптофана (TGA), которые в *E. coli* являются стоп-кодонами, для осуществления успешной экспрессии полноразмерного гена осуществляли сайт-направленный мутагенез при помощи метода ПЦР, в результате были осуществлены

нуклеотидные замены TGA>TGG в кодонах, соответствующих аминокислотам W322 и W416.

Использовали следующие варианты аффинных тагов: i — гистидиновый таг (НННННН) на N-конце белка (оригинальная конструкция вектора pBad HisB); ii — гистидиновый таг на N-конце белка и стреп-таг (WSHPQFEK) на C-конце белка; iii — стреп-таг на N-конце белка. Вариант i не позволил очистить белок до удовлетворительного состояния, достаточного для иммунизации кролика, тогда как вариант iii позволял получить препараты высокой степени чистоты, но приводил к существенному уменьшению выхода продукта. В итоге для иммунизации был использован вариант ii в сочетании с двухстадийной очисткой рекомбинантных белков: вначале за гис-таг, затем — за стреп-таг.

Выделение за гис-таг осуществляли по следующему протоколу. Культивирование бактерий и наработку белков осуществляли аналогично протоколу со-осаждения, описанному выше, за исключением более длительного времени индукции, обычно от 3 до 4 ч. После осаждения клетки ресуспендировали в буфере L (Трис-НСl 50 мМ, рН = 8,0, содержащий 500 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ имидазола, 1 мг/мл лизоцима, 1 мМ полиметилсульфонилфторида) и разрушали ультразвуком. Грубый лизат осветляли центрифугированием при 12000 g в течение 10 мин и фильтрованием через мембрану с размером пор 0,45 мкм. Осветленный лизат наносили на колонку His-Trap HP объёмом 1 мл (GE Healthcare) при помощи хроматографа Äkta Purifier 10 (GE Healthcare), промывали не менее 30 мл буфера W (Трис-НСl 50 мМ, рН = 8,0, содержащий 500 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ имидазола, 1 мМ полиметилсульфонилфторида), пока поглощение на длине волны 280 нм не снизится до уровня базовой линии. Все этапы производили со скоростью потока через колонку 1 мл/мин. Элюирование осуществляли буфером E (Трис-НСl 50 мМ, рН = 8,0, содержащий 500 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 250 мМ имидазола, 1 мМ полиметилсульфонилфторида), фракции элюата анализировали при помощи ПААГ-электрофореза. Очищенный белок переводили в буфер, подходящий для

следующей стадии очистки, при помощи метода диафильтрации (центрифужные колонки Amicon (Millipore)).

Очистку за стреп-таг производили аналогично очистке за гис-таг со следующими модификациями. Перед нанесением белковые фракции переводили в буфер W1 (100 мМоль Tris/HCl, pH 8.0, 150 мМоль NaCl 1 мМоль EDTA), после чего наносили на колонку Strep-tactin Superflow HC (Iba) объёмом 1 мл со скоростью 0.5 мл/мин, аналогичную скорость использовали на остальных стадиях. Промывку колонки осуществляли буфером W1. Элюирование осуществляли буфером E1 (100 мМоль Tris/HCl, pH 8.0, 150 мМоль NaCl 1 мМоль EDTA, 2.5 мМ D-дестиобиотина). Анализировали и концентрировали очищенный белок, как указано выше. Хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  с добавлением 50% глицерина.

### **3.9.2. Иммунизация животных.**

Очищенный белок использовали для иммунизации кроликов. Иммунизацию осуществлял В.А. Иванов в ИНЦ РАН по методике, разработанной в Институте цитологии РАН [128] в 3 стадии, в каждой из которых было использовано от 100 до 500 мкг белка.

### **3.9.3. Очистка и тестирование антител**

Для выделения из сыворотки иммуноглобулинов G, узнающих целевой белок, использовали аффинную очистку за соответствующий белок. Для этого около 1 мг рекомбинантного белка ковалентно пришивали к циан-бром-активированной сефарозе (GE Healthcare) в соответствии с инструкцией производителя, после чего смолу с целевым антигеном в течение ночи при  $4^{\circ}\text{C}$  инкубировали с сывороткой, затем промывали буфером PBS (3 раза по 10 мл). Антитела элюировали при помощи раствора глицина (100 мМ, pH=2.8), после чего в элюат немедленно добавляли Трис-HCl (pH=8.0) и KCl до конечной концентрации каждого 150 мМ.

Для выделения иммуноглобулинов G из нормальной сыворотки использовали их очистку с использованием Белок-А сефарозы (GE Healthcare) в соответствии с инструкцией изготовителя.

Антитела концентрировали методом диафильтрации и хранили с добавлением 50% глицерина и 0,02% азиды натрия при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Полученные сыворотки тестировали при помощи иммуноблотинга с использованием клеточных экстрактов соответствующих микоплазм.

#### **3.9.4. Оценка концентрации белков FtsZ в клетках микоплазм.**

Для определения концентрации белков FtsZ в клетках *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* использовали метод полуколичественного иммуноблотинга. Количество клеток в среде определяли под микроскопом подсчётом в фиксированном объёме. Лизат от известного количества клеток наносили на одну из дорожек геля, на другие дорожки наносили возрастающие количества очищенного рекомбинантного белка FtsZ в диапазоне от 0,1 до 100 нг белка. В качестве первичных антител использовали антитела к белкам FtsZ микоплазм, полученные в данной работе, в разведении 1:1000, в качестве вторичных — антитела к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена. Хемилюминисценцию наблюдали в растворе, полученном из набора SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate. Измеряли полную интенсивность хемилюминисценции от 1 полосы, соответствующей белку интереса, при этом условия съемки подбирали таким образом, чтобы не допускать насыщения матрицы гель-документирующей системы по интенсивности. Оценку объёма клеток осуществляли, анализируя изображения, полученные методом электронной микроскопии.

### 3.10. Визуализация FtsZ в живых клетках *M. gallisepticum* при помощи эндогенно-экспрессируемой флуоресцентной метки

Для создания штамма *M. gallisepticum* с эндогенно-экспрессируемым FtsZ была использована методология, предполагающая внесение генетической конструкции, содержащей ген белка слияния FtsZ с флуоресцентным белком mMaple2 (подходящего для метода локализационной микроскопии), а также ген устойчивости к тетрациклину непосредственно в геном *M. gallisepticum* посредством глобального транспозона Tn4001. Ген белка FtsZ был амплифицирован из генома *M. gallisepticum* S6. Ген белка mMaple2 был синтезирован de novo (Евроген) с целью оптимизации кодонов. Генетическая конструкция на основе вектора pTn4001mini\_Recipient-MCS-M5 (вектор любезно предоставлен Г.Ю. Фисуновым из ФГБУ ФНКЦ ФХМ) была клонирована в *E. coli*, после наработки и выделения 3 мкг плазмиды использовали для трансформации *M. gallisepticum* S6 методом электропорации; селекцию проводили в полужидкой среде для культивирования микоплазм (стандартная среда, описанная выше, с добавлением 0.4% агара и 5 мкг/мл тетрациклина). Для наблюдения под микроскопом клетки в экспоненциальной фазе роста (выращенные в аэробных условиях для ускорения созревания флуоресцентного белка) помещали в промываемую камеру, состоящую из покровного и предметного стекол, соединённых двухсторонним скотчем.

## 4. Результаты и обсуждение

### 4.1. Визуализация структур, формируемых белком FtsZ в клетках *E. coli*

#### 4.1.1. Метод локализационной микроскопии позволяет визуализировать белок FtsZ и другие структуры внутри клетки *E. coli* с разрешением до 20 нм

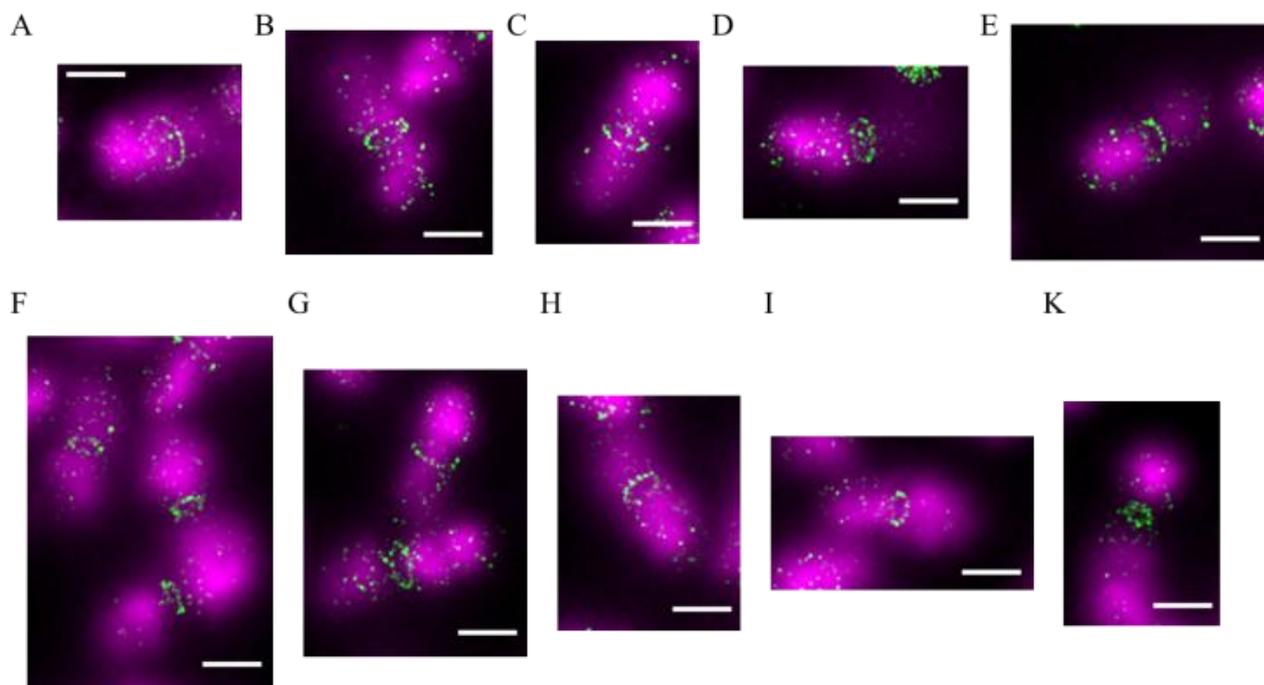
Для визуализации структур, формируемых белками FtsZ в клетках *E. coli*, *M. gallisepticum* и *A. laidlawii*, в данной работе была оптимизирована и протестирована на *E. coli* методика локализационной микроскопии, позволяющая осуществлять двухмерную и трехмерную визуализацию с субдифракционным разрешением. Данная методика предполагает использование как эндогенно экспрессируемых флуоресцентных белков, так и синтетических флуорофоров, которые в большинстве случаев несовместимы с живыми клетками, зато великолепные фотофизические свойства (прежде всего, яркость) таких красителей позволяют добиваться намного более высокого разрешения, чем, например, флуоресцентные белки. Для специфического мечения клеточных структур могут использоваться различные методы, например, иммунофлуоресценция, мечение малыми лигандами, связывающимися с целевыми структурами, гибридизация (например, FISH). Для мечения FtsZ в клетках *E. coli* нами была выбрана иммунофлуоресценция, так как антитела к данному белку являются коммерчески доступными, а использование непрямого иммунного мечения позволило опробовать широкий спектр флуоресцентных меток.

Были протестированы различные красители, обладающие эффектом «мерцания» — обратимого перехода в долгоживущее «темное» состояние, например Alexa 555, Alexa 488, Alexa 647, а также фотактивируемые красители (Abberior Cage 532, Cage 635); среди этих красителей наиболее продуктивным оказалось использование красителя Alexa 647, который позволяет в относительно простом буфере осуществлять съёмку одиночных молекул флуорофора, которые способны испускать до нескольких десятков тысяч фотонов каждая. Присутствие

в буфере тиолов (цистеамин и 2-меркаптоэтанол) и системы ферментативного поглощения кислорода (протокатеховая кислота и протокатехуат-диоксигеназа) позволяет красителю Alexa 647 обратимо переходить в долгоживущее «темное» состояние, а также снижает его фотообесцвечивание. Для непрямого иммунофлуоресцентного мечения были использованы коммерчески доступные F(ab) фрагменты антител, конъюгированные с красителем Alexa 647, что позволило добиться более плотного и при этом точного мечения (за счёт меньшего размера фрагмента по сравнению с целой молекулой иммуноглобулина). На основании точности локализации одиночных молекул можно заключить, что в указанных условиях данный метод позволяет добиться разрешения около 20 нм. Следует отметить, что разработанная методика является достаточно гибкой к различным факторам пробоподготовки. Например, вариации в плотности мечения могут быть компенсированы изменением состава буфера и/или освещением. В частности, повышение концентрации тиолов приводит к повышению вероятности перехода красителя в темное состояние, что позволяет добиться регистрации одиночных молекул даже в случае слишком высокой плотности мечения. Напротив, уменьшение концентрации тиолов и использование низкоинтенсивного коротковолнового излучения (в работе использовался лазер с длиной волны 405 нм) позволяет увеличить вероятность перехода красителя из темного во флуоресцентное состояние, что востребовано в условиях низкой плотности мечения.

Метод локализационной микроскопии позволил получить изображения структур, формируемых белком FtsZ в клетках *E. coli* (см. **Рисунок 16**). Как видно из рисунка, Z-кольцо является неоднородной структурой, которая напоминает бусы на нитке (особенности данной структуры обсуждаются ниже). Для удовлетворительной реконструкции структуры Z-кольца требуется не менее 2000 последовательных изображений одиночных молекул, тем не менее, увеличение числа изображений в серии более 8000 практически не сказывается на качестве изображений, из чего можно сделать вывод об оптимальном количестве в 2000-8000 изображений при использовании красителя Alexa 647, что позволяет

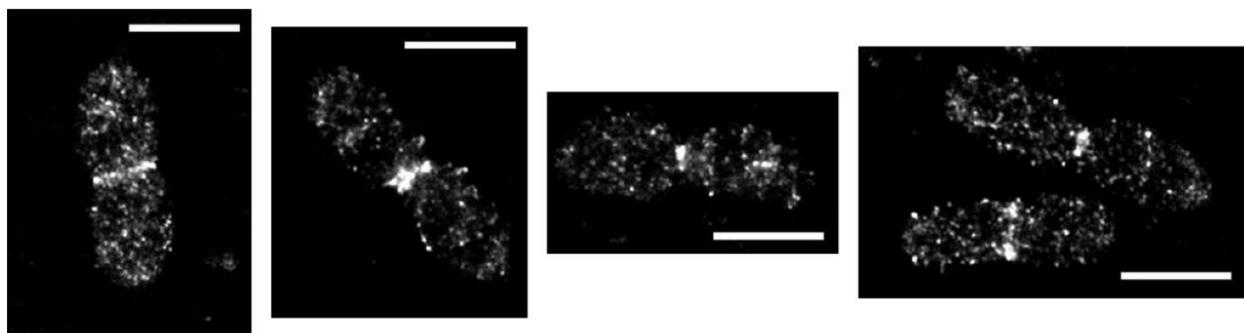
сочетать высокое качество реконструкции и относительно небольшое время съёмки (порядка 10 мин). Использование числа кадров меньше 2000 приводит к повышенной зернистости реконструированного изображения.



**Рисунок 16.** Изображения структур, формируемых белком FtsZ в клетках *E. coli*, полученные при помощи локализационной микроскопии и иммунофлуоресценции (зелёный цвет, краситель Alexa 647) с дополнительной дифракционно-ограниченной визуализацией ДНК (фиолетовый, краситель YOYO-1)

Следует отметить, что при использовании эффекта «мерцания» во многих случаях регистрируется лишь небольшая доля молекул, что ухудшает покрытие структуры и, соответственно, разрешение. Кроме того, условия, обеспечивающие обратимый переход молекул красителя в нефлуоресцентное («тёмное») состояние, приводят к тому, что количество регистрируемых от каждой молекулы фотонов оказывается существенно ниже, чем в условиях, подавляющих «мерцание» молекул. Поэтому на примере визуализации белка FtsZ в фиксированных клетках *E. coli* была протестирована методика локализационной микроскопии, использующая «запирание» красителя Су3b в нефлуоресцентном состоянии посредством его химической модификации (по всей видимости, протонированием), предложенная в работе [129]. Подбор условий эксперимента

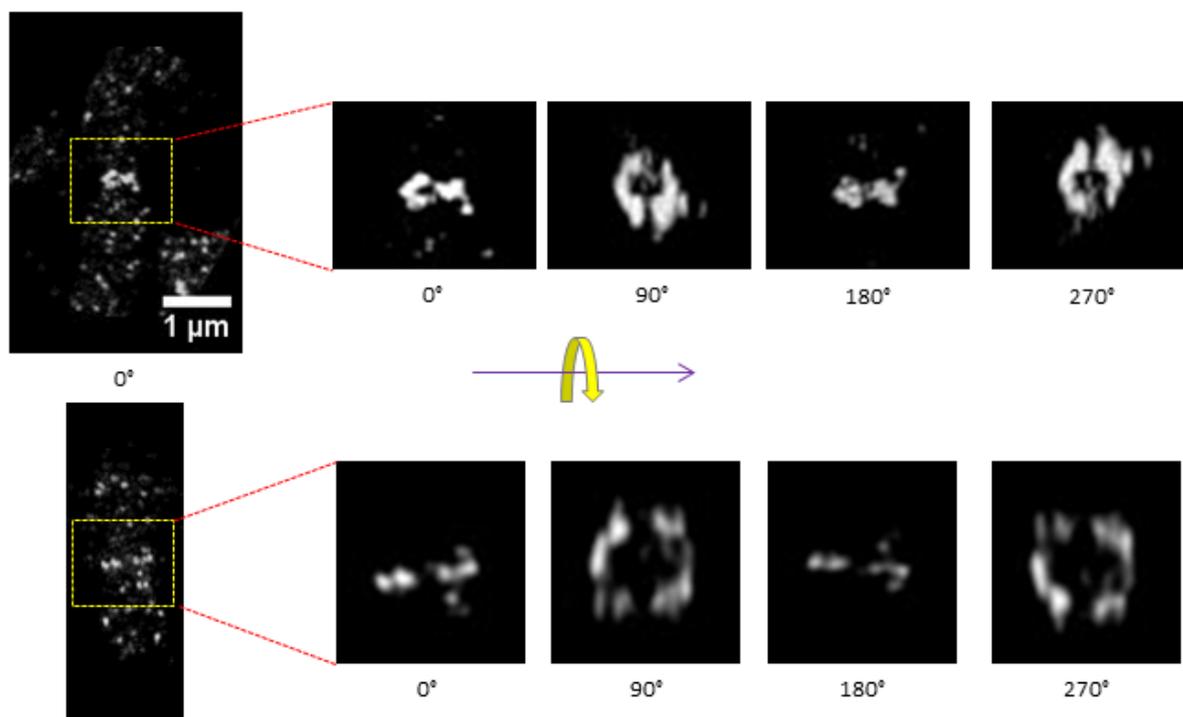
позволил осуществить визуализацию структур на уровне, сравнимом с красителем Alexa 647 (см. **Рисунок 17**). Хотя протокол пробоподготовки при использовании красителя Cy3b оказывается несколько более сложным, чем в случае Alexa 647, потенциально этот метод способен обеспечить лучшее разрешение (за счёт большего количества регистрируемых молекул и их большей яркости), что может быть актуально для многих задач. Одним из важнейших следствий увеличенного разрешения является то, что по всей видимости, при таких условиях возможно визуализировать отдельные протофиламенты FtsZ, что открывает новые возможности для изучения организации аппарата деления бактерий.



**Рисунок 17.** Субдифракционные изображения структур, формируемых белком FtsZ в фиксированных клетках *E. coli*, полученные методом локализационной микроскопии с использованием красителя Cy3b. Шкала — 2 мкм

Использование слабой цилиндрической линзы позволило реализовать также метод трехмерной локализационной микроскопии. Этот метод потребовал некоторых модификаций протокола съемки. В частности, для реализации метода требуется более низкая плотность флуоресцентных молекул во время съёмки, что требует более длительной съёмки, чем в случае двухмерной микроскопии. Кроме того, требуется большее количество кадров (не менее 8000), что также увеличивает время съёмки. Такой метод позволяет осуществлять реконструкцию глубиной около 1 мкм, что в большинстве случаев достаточно для визуализации бактериальных клеток (например, диаметр клетки *E. coli* как раз укладывается в такие пределы). Изображения структур, формируемых белком FtsZ в

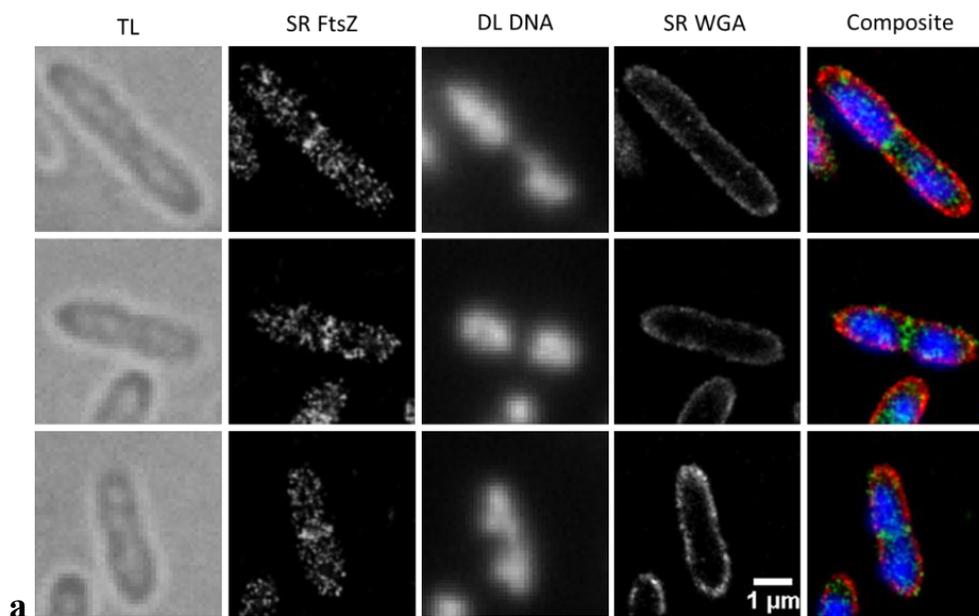
фиксированных клетках *E. coli*, полученные при помощи метода трехмерной локализационной микроскопии, представлены ниже (см. **Рисунок 18**).

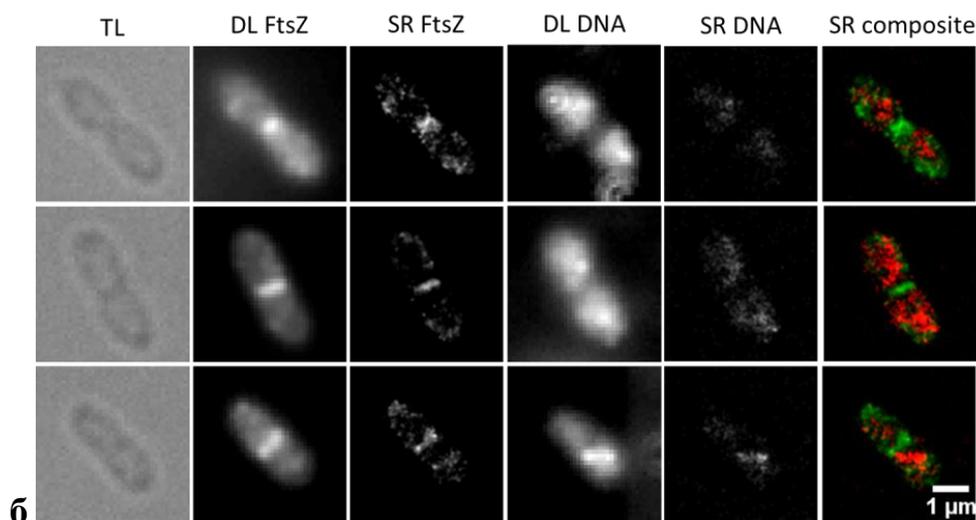


**Рисунок 18.** 3D-реконструкция структур, формируемых белком FtsZ *E. coli* (в особенности Z-кольца). Представлены 2D-изображение клетки (слева) и фрагмент этого же изображения клетки (в желтом прямоугольнике), полученные с использованием рендеринга с четырьмя различными углами поворота (от 0 до 270 градусов) вокруг оси, показанной на рисунке

Так как выполнение белком FtsZ его функции при делении бактериальной клетки тесно связано с оболочкой клетки (в особенности с синтезом клеточной стенки), а также регулируется целым рядом систем, обеспечивающих правильное позиционирование Z-кольца, среди которых система нуклеоидной окклюзии, предотвращающая образование Z-кольца над нуклеоидами, для анализа и интерпретации структур, формируемых FtsZ в клетках, важно иметь также информацию о положении клеточной оболочки и ДНК. В связи с этим были разработаны протоколы одновременной визуализации FtsZ, ДНК и поверхности клетки в различных комбинациях с субдифракционным разрешением. Для осуществления двухцветной локализационной микроскопии важно подобрать комбинации красителей, совместимых по спектральным свойствам и условиям, необходимым для осуществления локализационной микроскопии. Для

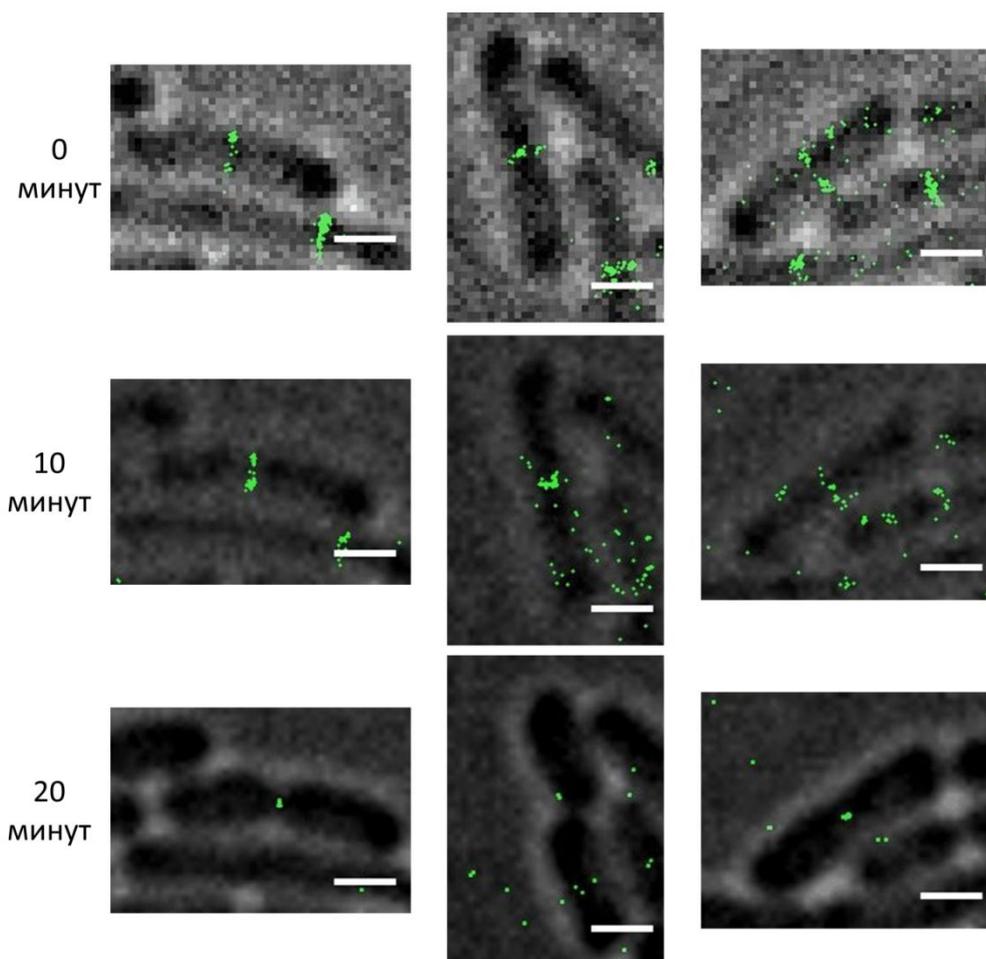
одновременной субдифракционной визуализации ДНК и FtsZ была подобрана пара красителей Alexa 555 (FtsZ) и ТОТО-3 (ДНК), что позволило получить двухцветные субдифракционные изображения FtsZ и ДНК в клетках *E. coli* и более точно проанализировать работу системы нуклеоидной окклюзии (см. **Рисунок 19, б**). Полученные данные позволяют оценить дальность действия системы нуклеоидной окклюзии. Для одновременной визуализации FtsZ и клеточной поверхности были подобраны следующие красители: Alexa 647 (FtsZ) и агглютинин из зародышей пшеницы (англ. wheat germ agglutinin, WGA), конъюгированный с красителем Alexa 488. Это позволило получить изображения FtsZ и клеточной поверхности (**Рисунок 19, а**), позволяющие проанализировать корреляцию между структурами, формируемыми FtsZ, расхождением ДНК и образованием перетяжки между дочерними клетками.





**Рисунок 19.** Многоцветная локализационная микроскопия с одновременной визуализацией FtsZ и ДНК (а) или FtsZ и клеточной оболочки (б). TL – проходящий свет; SR FtsZ – локализационная микроскопия FtsZ; DL FtsZ – ; DL DNA – ; SR DNA – локализационная микроскопия ДНК; Composite – комбинированное изображение; SR WGA – локализационная микроскопия клеточной оболочки

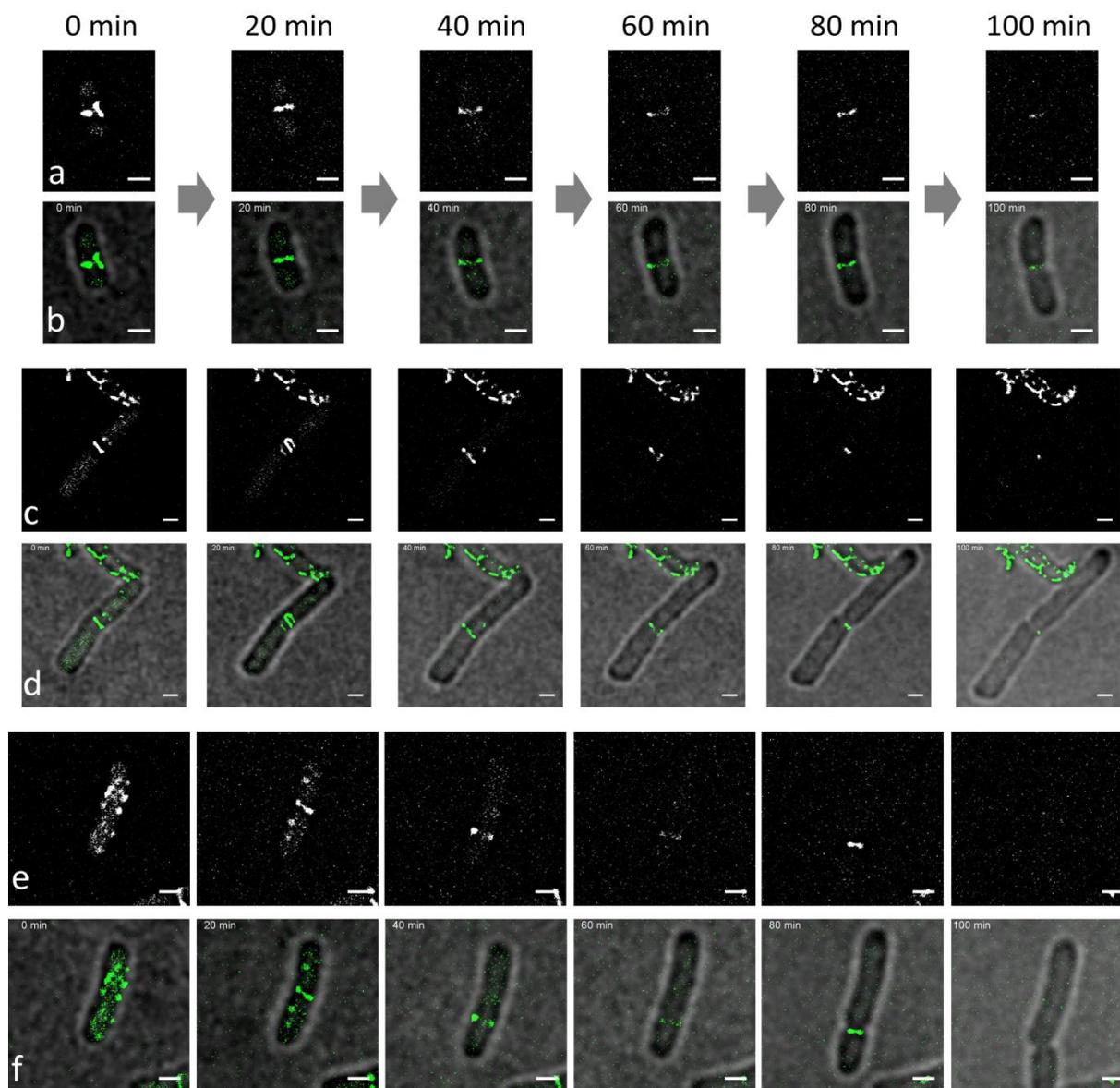
Для более полного и глубокого понимания механизмов бактериального деления, в том числе функционирования FtsZ, в ходе выполнения данной работы была разработана методика локализационной микроскопии в живых клетках *E. coli*. При помощи этой методики была успешно осуществлена динамическая визуализация структур, формируемых белком FtsZ, в живых клетках (см. **Рисунок 20**). Были протестированы различные генетические конструкции (С-концевой белок слияния, а также белок слияния типа «сэндвич») и различные флуоресцентные белки (фотопереключаемые Eos3.1, mMaple2, mMaple3, фотоактивируемый Dreiklang, а также перспективные с точки зрения использования в локализационной микроскопии флуорогенные белки Dib3 и UnaG [118]). Наиболее продуктивные результаты дало использование штамма с белком слияния по типу «сэндвич» FtsZ:mMaple2.



**Рисунок 20.** Кинетические серии субдифракционных изображений нормально делящихся клеток *E. coli*. Представлены комбинированные изображения, состоящие из изображений в проходящем свете (градации серого) и ЛМ-изображения FtsZ (зелёный цвет) для трёх временных точек. Шкала соответствует 1 мкм

Проведение исследований потребовало также разработать методику, позволяющую осуществлять субдифракционную визуализацию структур FtsZ в живых клетках *E. coli* с использованием полностью функционального белка слияния FtsZ с флуоресцентным белком [130]. Для этого, наряду с методом локализационной микроскопии (см. **Рисунок 20**), был использован родственный ему, недавно разработанный [119] метод микроскопии радиальных флуктуаций (SRRF, см. **Рисунок 21**). В основе последнего лежит анализ изображений с большой плотностью флуоресцентных молекул, которые невозможно анализировать при помощи метода локализационной микроскопии, так как изображения флуоресцентных молекул накладываются друг на друга.

Визуализация структур, формируемых белком FtsZ в живых клетках *E. coli*, с помощью метода SRRF позволила добиться разрешения не хуже 100 нм.



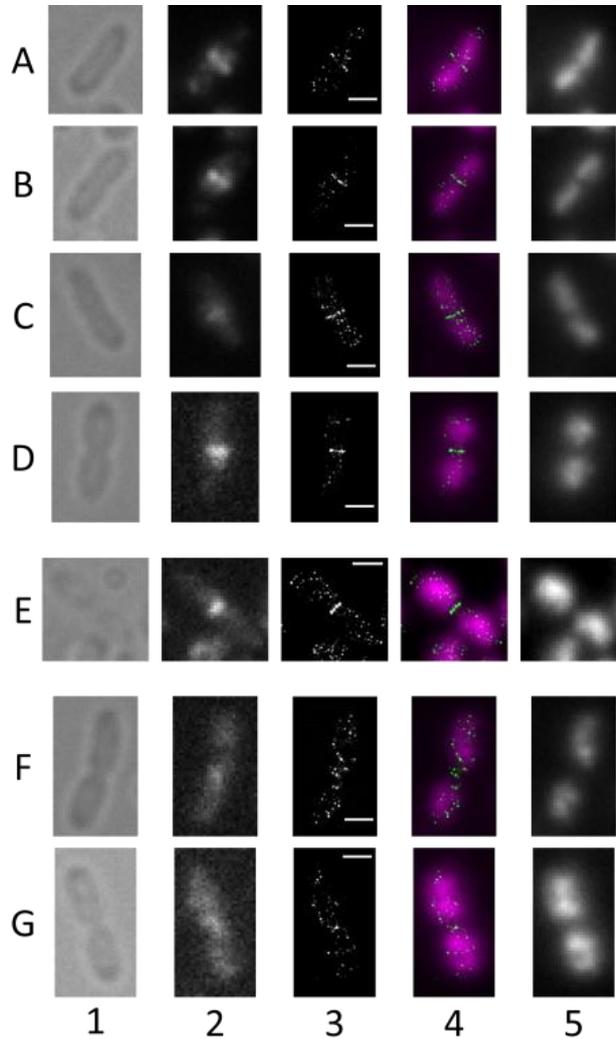
**Рисунок 21.** Микроскопия сверхвысокого разрешения (метод SRRF) белка FtsZ в живых клетках *E. coli*. а, с, е – последовательные изображения с интервалом 20 мин, полученные в канале FtsZ; б, д, ф – то же, но изображения комбинированы с изображениями в проходящем свете для лучшей демонстрации морфологии клетки. Шкала – 1 мкм

#### 4.1.2. Z-кольцо – неоднородная структура

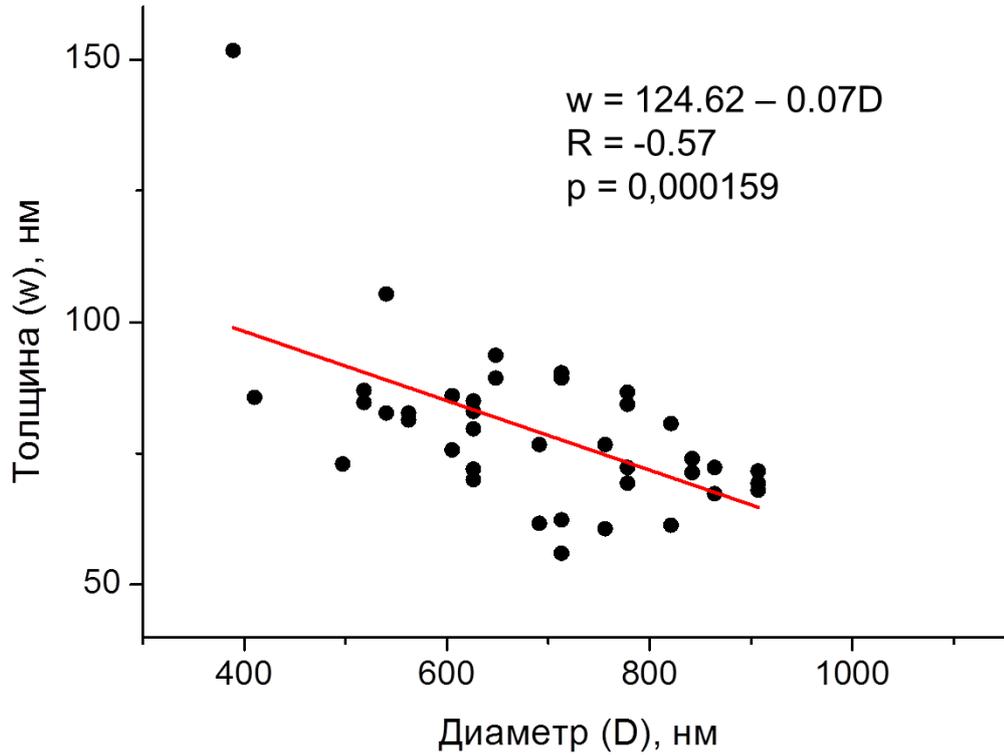
Используя разработанную методику локализационной микроскопии, была визуализирована с субдифракционным разрешением и охарактеризована структура Z-кольца, образованного белком FtsZ в клетках *E. coli*.

Ниже приведены изображения этих колец на разных стадиях деления клетки (Рисунок 22). Анализ этих изображений показывает, что структура колец неоднородна, а толщина их зависит от диаметра кольца. Впервые для бактерии *E. coli* удалось показать утолщение Z-кольца в ходе его сокращения (см. Рисунок 23), что хорошо согласуется с данными, полученными при исследовании бактерии *Streptococcus pneumoniae* [25]. Толщина кольца в среднем оказалась существенно меньше, чем было показано ранее при использовании флуоресцентного белка слияния [23], что, по-видимому, отчасти объясняется более высоким разрешением (оценка на уровне не хуже 20 нм), так как нами был использован более яркий краситель Alexa 647, но также в значительной степени это различие объясняется тем, что использование флуоресцентного белка слияния серьезно влияет на способность белка FtsZ к мультимеризации, что могло приводить в указанной работе к искажению нативных структур FtsZ (что подтверждается в том числе и нашими наблюдениями с использованием флуоресцентного белка, см. ниже). Z-кольца организованы в виде цепочек, состоящих из кластеров белка FtsZ со средним размером кластера порядка 100 нанометров (см. Рисунок 24). Понятие кластера применительно к структурам, формируемым белком FtsZ, было введено в литературе относительно недавно в связи с высокой неоднородностью этих структур. Кластером в данной работе считалось пятно на субдифракционном изображении, по размерам существенно превышающее оценку разрешения (около 20 нм). Полученные впервые данные о структуре Z-кольца со столь высоким пространственным разрешением существенным образом дополняют имеющиеся в литературе сведения о неоднородности Z-кольца и поддерживает гипотезу, что оно является лишь каркасом для других белков деления, в котором протофиламенты FtsZ слабо упорядочены, а их перераспределение в процессе

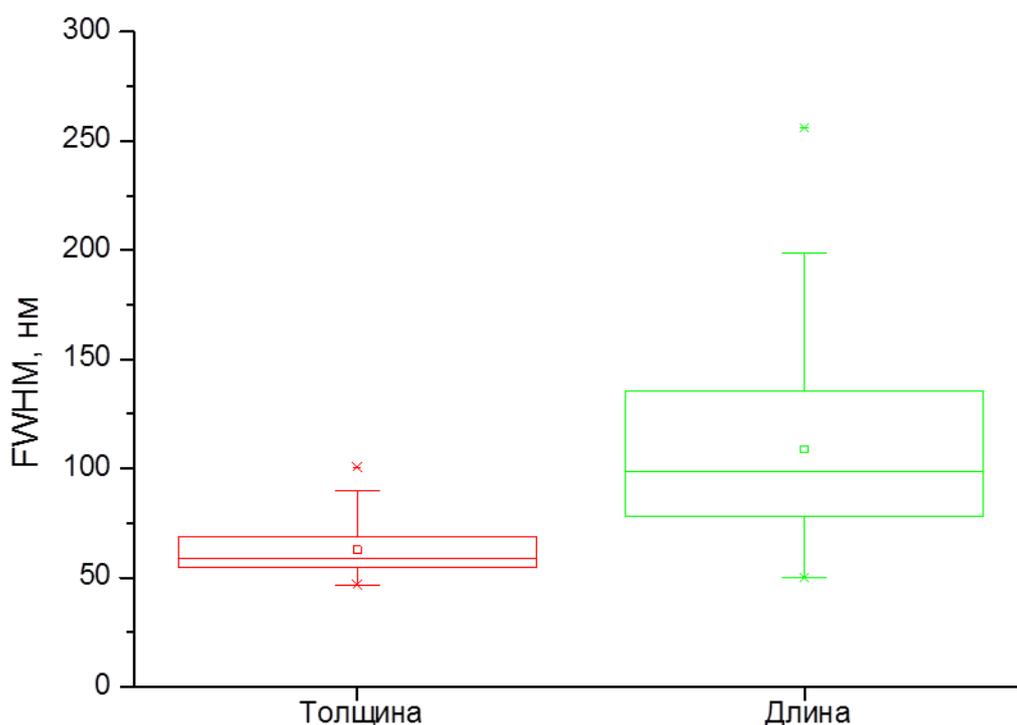
цитокинеза ведет к изменению толщины Z-кольца. По результатам данной части исследования была опубликована работа [131].



**Рисунок 22.** Визуализация белка FtsZ в фиксированных клетках *E.coli* при помощи метода локализационной микроскопии. Строки последовательно демонстрируют изображения клеток, находящихся на разных стадиях цитокинеза: от начала процесса деления (A) до его фактического завершения (G). Столбцы слева направо: (1) изображения в проходящем свете; (2) дифракционно-ограниченные флуоресцентные изображения FtsZ; (3) изображения FtsZ в режиме локализационной микроскопии; (4) изображения Z-колец, полученные при помощи локализационной микроскопии (зелёный цвет) с дополнительной визуализацией ДНК (фиолетовый); (5) дифракционно-ограниченные флуоресцентные изображения ДНК. Шкала – 1 мкм



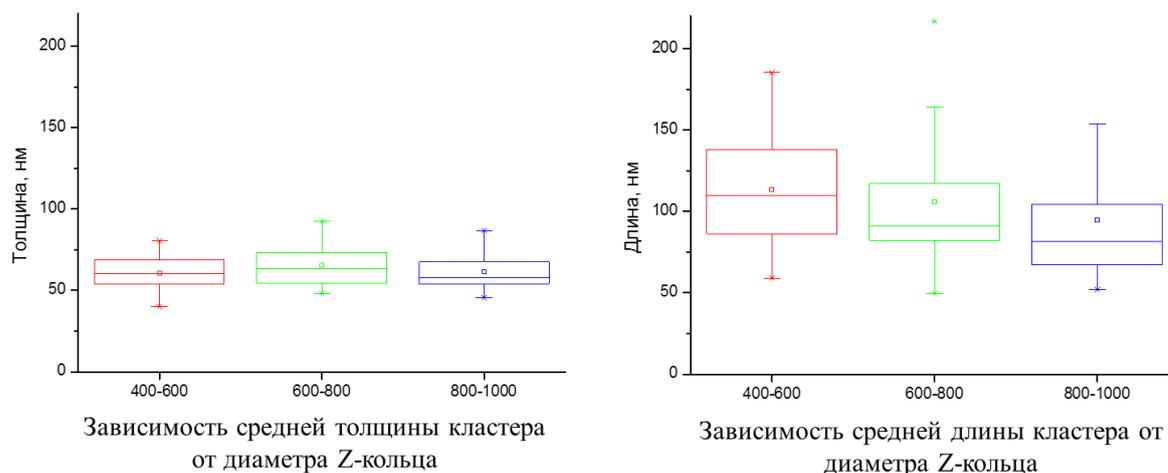
**Рисунок 23.** Зависимость толщины (w) Z-кольца от его диаметра (D) на основании анализа изображений, полученных в режиме локализационной микроскопии. Черные круги – экспериментальные точки, красная линия – линейная аппроксимация экспериментальных данных. Каждая экспериментальная точка соответствует результату измерения диаметра и средней толщины Z-кольца в одной из клеток. Над графиком приведены результаты линейной регрессии: зависимость  $w$  (D), коэффициент корреляции  $R$ , а также  $p$ -значение, характеризующее уровень значимости наблюдаемого эффекта



**Рисунок 24.** Диаграмма, демонстрирующая распределение по размерам кластеров белка FtsZ в составе Z-кольца. Средняя длина кластеров составляет  $(108 \pm 41)$  нм, а средняя толщина -  $(63 \pm 12)$  нм

Было проанализировано влияние диаметра Z-кольца (т.е. стадии цитокинеза) на размер кластеров (см. **Рисунок 25**). Оказалось, что при сокращении Z-кольца средняя толщина кластеров остается постоянной, однако средняя длина кластеров увеличивается. С учетом выявленного среднего утолщения Z-кольца в ходе цитокинеза (см. Рисунок 23), следует предположить, что по крайней мере часть кластеров направлена не вдоль, а поперек Z-кольца, что подчеркивает низкую упорядоченность полимеров FtsZ в Z-кольце, и именно их удлинение (и, возможно, изменение ориентации кластеров относительно оси клетки) приводит к утолщению Z-кольца. Также данное наблюдение в значительной степени ставит под сомнение возможность сократительной роли Z-кольца, по крайней мере, в рамках модели упорядоченных филаментов. В целом размер кластеров находится в хорошем согласии с литературными данными. Например, недавно при помощи

метода STED были оценены размеры кластеров в составе Z-кольца *E. coli*, а также было показано, что эти размеры не изменяются даже при существенном изменении морфологии клетки [132].

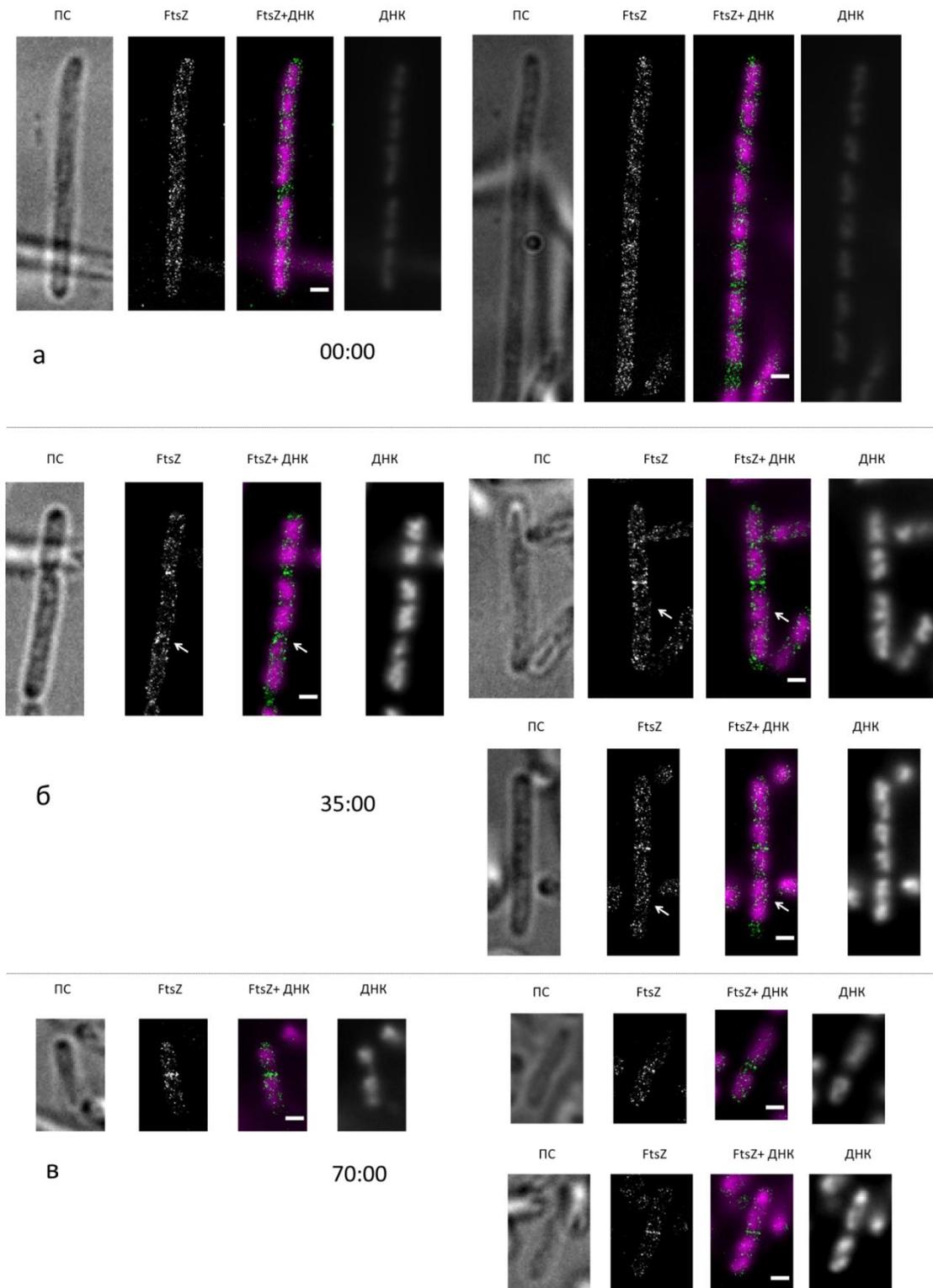


**Рисунок 25.** Влияние толщины Z-кольца на размеры кластеров FtsZ

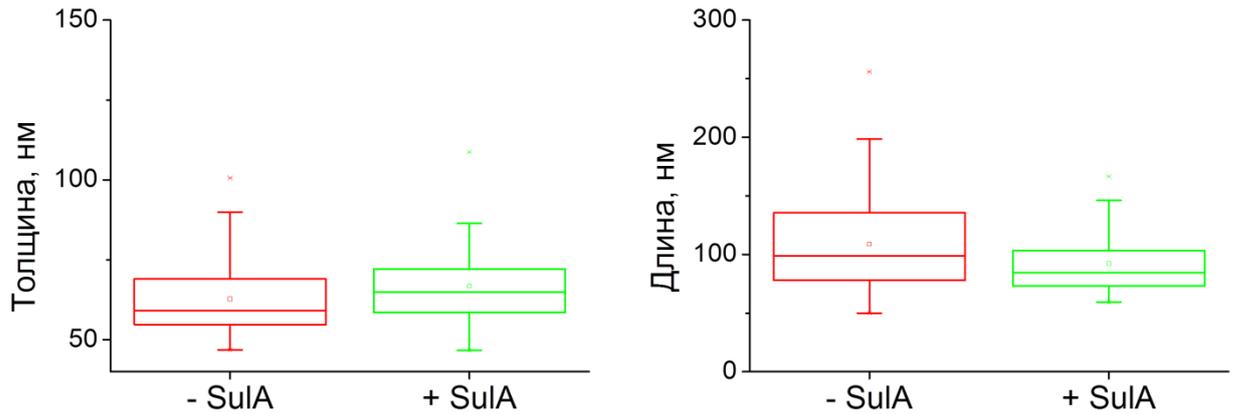
#### 4.1.3. Анализ структур, формируемых белком FtsZ в ходе восстановления деления после филаментации клеток

В целом, метод локализационной микроскопии в сочетании с иммунофлуоресцентным мечением показал себя как мощный и универсальный метод визуализации, позволяющий достичь разрешения порядка 20 нм в горизонтальной плоскости. Этот метод был нами также использован для изучения структур, формируемых белком FtsZ в процессе восстановления деления клеток *E. coli* после его нарушения под действием экспрессии белка SulA – ингибитора FtsZ в ходе SOS-ответа. Это позволило показать, что формирование функциональных Z-колец происходит через промежуточную стадию формирования спиралевидных структур (см. **Рисунок 26**), и что основным механизмом позиционирования Z-кольца при восстановлении деления является нуклеоидная окклюзия, тогда как при нормальном делении основным механизмом считается Min-система [133].

Кроме того, анализ размеров кластеров при экспрессии SulA показал, что в этом состоянии, хотя и происходит некоторое уменьшение средних размеров кластеров, однако эти размеры всё же остаются сопоставимыми с размерами кластеров в нормально делящихся клетках (см. Рисунок 27). Это наблюдение согласуется с нашими прошлыми наблюдениями о том, что в ходе SOS-ответа FtsZ продолжает формировать некоторые структуры, хотя Z-кольца не образуются [122], и находится в противоречии с моделью, согласно которой FtsZ ингибируется белком SulA посредством секвестрации — снижения его эффективной концентрации ниже критического значения [134]. Новые данные требуют дополнительной проверки гипотезы о секвестрации, и возможно, уточнения модели блокирования деления при SOS-ответе.



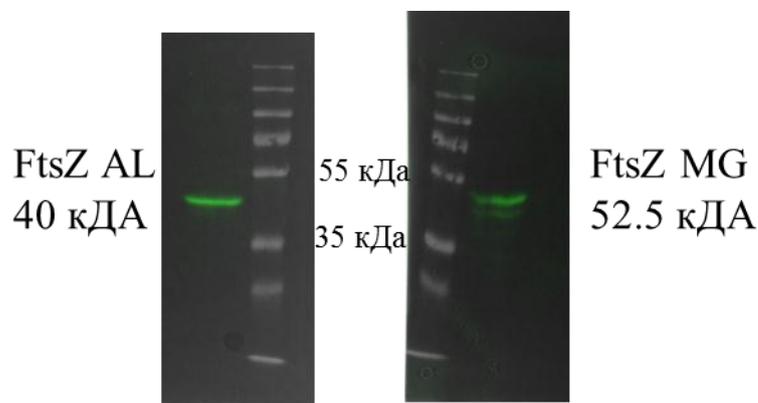
**Рисунок 26.** Изображения структур, формируемых белком FtsZ на разных стадиях восстановления деления после его блокирования белком SulA: а – 0 мин; б – 35 мин; в – 70 мин. Приведены изображения в проходящем свете (ПС), субдифракционные изображения FtsZ (FtsZ), дифракционно-ограниченные изображения ДНК (ДНК), а также их комбинация (FtsZ+ДНК), при этом фиолетовый цвет соответствует ДНК, зелёный – белку FtsZ. Стрелками отмечены спиралевидные структуры. Шкала — 1 мкм



**Рисунок 27.** Размеры кластеров FtsZ при нормальном делении клеток *E. coli* и при нарушении деления в результате накопления белка SulA. «- SulA» – в условиях нормального деления, «+ SulA» – в результате экспрессии белка-ингибитора SulA. Представлены диаграммы «ящик с усами». На диаграммах верхняя и нижняя границы прямоугольника («ящика») соответствуют перцентилям 25% и 75%, концы отрезков, выходящих из прямоугольника («усы») — перцентилям 5% и 75%. Внутри прямоугольника кружок обозначает среднее значение, горизонтальная черта — медиану. Крестиками обозначены экстремальные значения

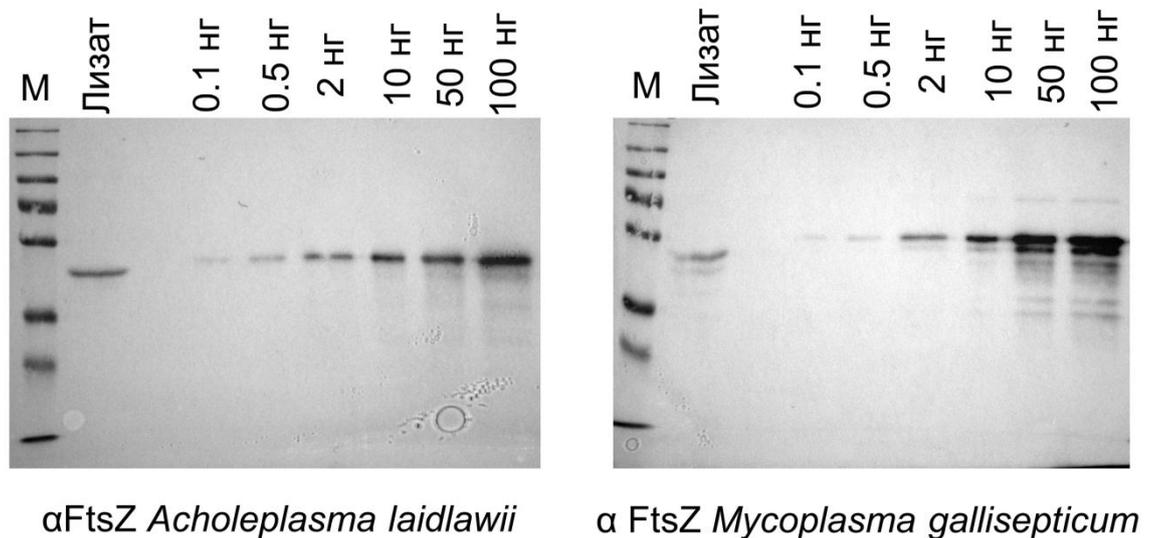
#### 4.3. Тестирование антител к белкам FtsZ *M. gallisepticum* и *A. laidlawii*, оценка концентрации FtsZ в клетках микоплазм

Тестирование антител методом иммуноблотинга показало, что оба вида полученных антител демонстрируют достаточно высокую специфичность по отношению к белку интереса (см. **Рисунок 28**). В обоих случаях на пластинах видна 1 мажорная полоса, по размеру приблизительно соответствующая целевому белку.



**Рисунок 28.** Оценка специфичности антител к белку FtsZ методом иммуноблотинга. **AL** — *A. laidlawii*, **MG** — *M. gallisepticum*

Оценка концентрации (см. **Рисунок 29**) показала, что в клетках *A. laidlawii* находится примерно 300 молекул FtsZ (концентрация 6 мкМоль), а в клетках *M. gallisepticum* — примерно 150 молекул FtsZ (концентрация 3 мкМоль/л). Обе концентрации соотносятся с измеренной концентрацией FtsZ в клетках *E. coli* (3-10 мкМоль/л). Так как критические концентрации для обоих белков неизвестны, то можно сравнить полученные значения только с критической концентрацией для FtsZ *E. coli* (1-2 мкМоль/л). Оценка концентрации поддерживает предположение о том, что эти белки полимеризуются в клетках микоплазм, в случае если их критическая концентрация сравнима с указанным выше значением.

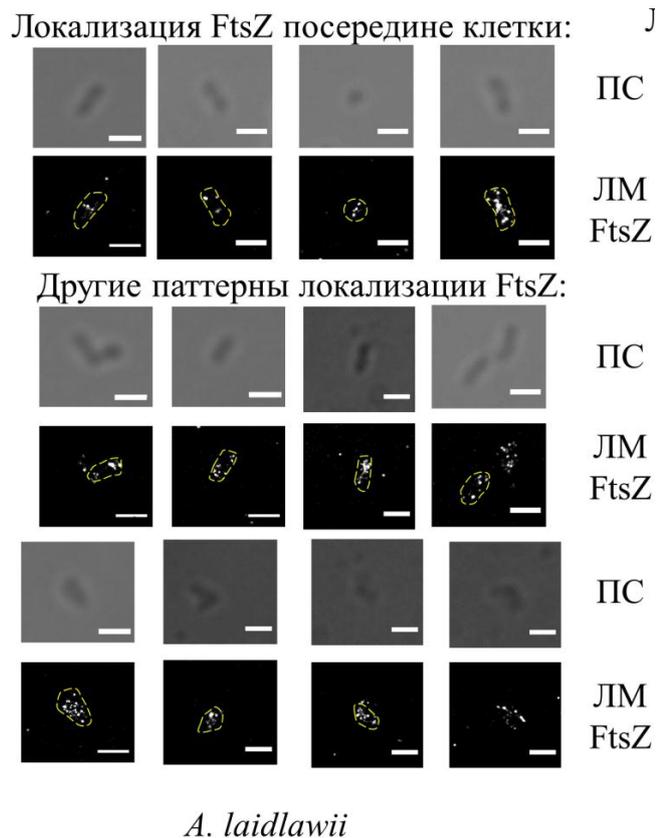


**Рисунок 29.** Оценка концентрации белка FtsZ в клетках видов *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* с помощью полуколичественного иммуноблоттинга. М – маркер молекулярного веса (PageRuler Plus). Слева направо – клеточный лизат от известного количества клеток и возрастающие количества очищенного белка FtsZ

#### 4.4. Структуры, формируемые белками FtsZ в клетках *M. gallisepticum* и *A. laidlawii*

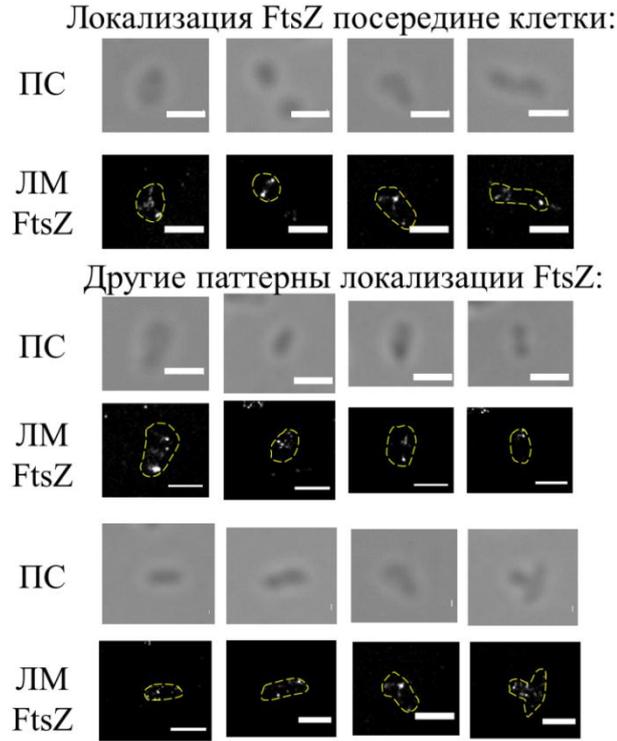
Данные, полученные при помощи метода локализационной микроскопии (см. Рисунок 30 и **Ошибка! Источник ссылки не найден.**), а также при помощи метода иммуноэлектронной микроскопии (см. **Рисунок 32**) для визуализации белка FtsZ в фиксированных клетках микоплазм, свидетельствуют о том, что

поведение белков FtsZ в клетках двух видов микоплазм — *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* — значительно отличается от поведения FtsZ в бактериях, демонстрирующих «классическое» деление с формированием Z-кольца. FtsZ в клетках микоплазм не формирует привычного Z-кольца. На указанных рисунках приведена только часть характерных вариантов локализации FtsZ, что не отражает частоту встречаемости различных вариантов. Лишь в отдельных клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* наблюдается локализация FtsZ посередине клеток, а в подавляющем большинстве клеток – отсутствие выраженной локализации. В большинстве случаев FtsZ распределен по клетке неравномерно, в виде кластеров. Локализация белка FtsZ в септальной области может говорить о вовлечении белков FtsZ микоплазм в процесс цитокинеза, хотя для проверки этой гипотезы требуется дальнейшее изучение.



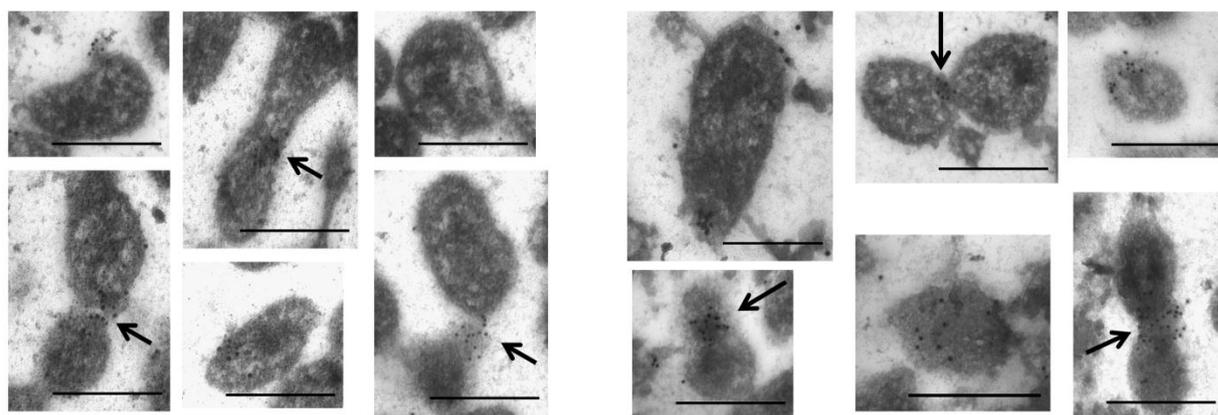
**Рисунок 30.** Изображения структур, формируемых белком FtsZ в клетках *A. laidlawii*, полученные методом локализационной микроскопии в сочетании с иммунофлуоресценцией. Приведены изображения клеток с локализацией FtsZ посередине клетки (сверху), а также с другими вариантами локализации белка

FtsZ (внизу). ЛМ FtsZ — изображение FtsZ, полученное методом локализационной микроскопии; ПС — изображение в проходящем свете. Жёлтыми пунктирными линиями отмечены приблизительные границы клеток. Шкала соответствует 1 мкм



*M. gallisepticum*

**Рисунок 31.** Изображения структур, формируемых белком FtsZ в клетках *M. gallisepticum*, полученные методом локализационной микроскопии в сочетании с иммунофлуоресценцией. Приведены изображения клеток с локализацией FtsZ посередине клетки (сверху), а также с другими вариантами локализации белка FtsZ (внизу). ЛМ FtsZ — изображение FtsZ, полученное методом локализационной микроскопии; ПС — изображение в проходящем свете. Жёлтыми пунктирными линиями отмечены приблизительные границы клеток. Шкала соответствует 1 мкм

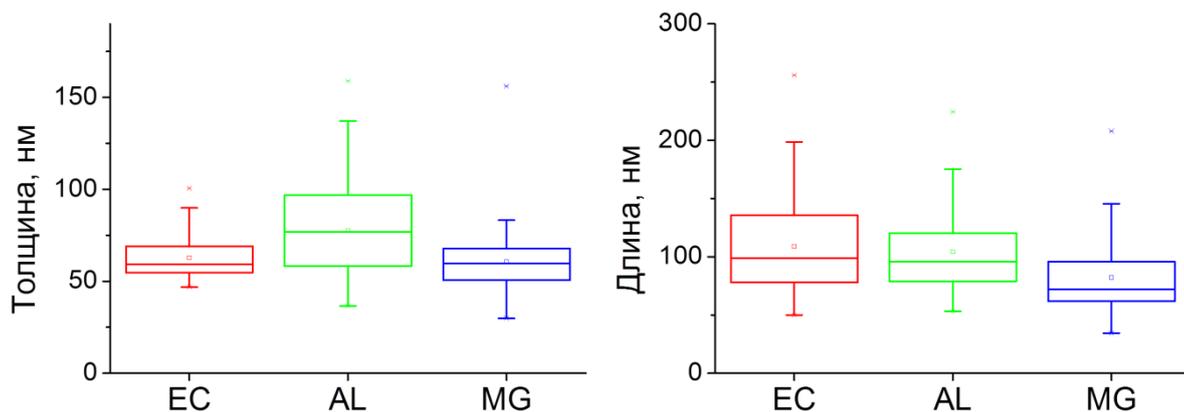


*Acholeplasma laidlawii*

*Mycoplasma gallisepticum*

**Рисунок 32.** Изображения клеток *A. laidlawii* (слева) и *M. gallisepticum* (справа), полученные методом иммуно-электронной микроскопии с использованием антител к белкам FtsZ микоплазм (метка – коллоидное золото). Стрелками отмечены клетки с локализацией белка FtsZ в области перетяжки. Шкала – 500 нм

Анализ размеров кластеров белка FtsZ в клетках *Mycoplasma gallisepticum* и *Acholeplasma laidlawii*, а также сравнение с аналогичными размерами в клетках *E. coli* показывает, что размеры кластеров FtsZ микоплазм сопоставимы с размерами кластеров FtsZ *E. coli* (см. **Рисунок 33**). Это наблюдение может говорить о том, что в клетках микоплазм белки FtsZ действительно находятся в виде полимеров, что согласуется с полученными в данной работе оценками концентраций FtsZ в клетке и поддерживает формирование FtsZ цитоскелет-подобных структур. Несмотря на сопоставимость размеров, всё же имеются довольно значительные отличия размеров, например, средняя длина кластеров FtsZ *M. gallisepticum* оказалась существенно меньше. Поэтому требуется дальнейшее изучение биохимических свойств FtsZ микоплазм, которое, однако, выходит за рамки данной работы.



**Рисунок 33.** Сравнение размеров кластеров FtsZ, наблюдаемых в клетках бактерий *E. coli*, *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*. EC - *E. coli*, AL - *A. laidlawii*, MG - *M. gallisepticum*

#### 4.5. Белки, взаимодействующие с белками FtsZ в клетках *M. gallisepticum* и *A. laidlawii*

Для более надежной интерпретации структур, формируемых белками FtsZ в клетках *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* и более глубокого понимания роли FtsZ микоплазм в ходе данной работы были идентифицированы белки-партнеры FtsZ в указанных видах микоплазм. Анализ белок-белковых взаимодействий (использовались ко-иммунопреципитация через антитела к FtsZ микоплазм и осаждение за рекомбинантный белок FtsZ со стреп-тагом) позволил показать, что белок FtsZ *A. laidlawii* взаимодействует с шаперонами (Hsp20, DnaK), факторами элонгации трансляции (EFTu, EFG), транскрипционным регулятором семейства XRE, участниками метаболических путей (ферменты С-ацетилтрансфераза, фитоен десатураза) (Таблица 1 и

Таблица 2). FtsZ *M. gallisepticum* взаимодействует с фактором элонгации EFTu, липопротеином А, АТФ-синтазой, белком-транспортером OppA, а также РНК-полимеразой (

Таблица 3). Интересно отметить, что среди идентифицированных белков нет известных гомологов белков деления, присутствующих в *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* и взаимодействующих с белками FtsZ в других бактериях (например,

FtsK, FtsA, SepF). Данное наблюдение не подтверждает вовлечение FtsZ в процесс деления, хотя и не опровергает его. В то же время, некоторые взаимодействия, возможно, проливают свет на вовлеченность FtsZ в формирование каркаса микоплазменной клетки. Например, белок EFTu – фактор элонгации трансляции – по литературным данным способен взаимодействовать с другими белками бактериального цитоскелета, включая Mreb [135] и FtsZ [136], а также формировать фибриллярные структуры *in vitro* [137]. Интересно, что в базе данных STRING на основе гомологии предсказано взаимодействие EFTu с белками FtsZ обеих микоплазм [138, 139]. Выявленное взаимодействие может свидетельствовать о совместном формировании EFTu и FtsZ микоплазм структур цитоскелета в клетках микоплазм. Для более глубокого понимания роли указанных белков требуется изучение структур, формируемых данными белками *in vitro* и *in vivo*.

DnaK также способен формировать цитоскелет-подобные структуры. Принадлежность DnaK к белкам цитоскелета подтверждается исследованием, которое позволило выявить этот белок среди других цитоскелет-подобных белков (неопубликованные данные нашей научной группы). Взаимодействие FtsZ с белком DnaK, возможно, также отражает вовлечение FtsZ в многокомпонентный комплекс белков цитоскелета микоплазменной клетки. Связь белка FtsZ микоплазм с другими предполагаемыми белками цитоскелета (например, малым белком теплового шока Hsp20 или IbrA вида *A. laidlawii*), возможно, отражает сложный характер взаимодействий между различными белками цитоскелета микоплазм, а также многообразие функций этих белков.

**Таблица 1.** Белки *A. laidlawii*, взаимодействующие с белком FtsZ *A. laidlawii* по данным со-осаждения за стреп-таг. MW — молекулярная масса

Название	MW, Да	Идентификатор
Bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	95048	WP_012242134.1
Molecular chaperone DnaK	65643	WP_012242499.1
Dihydrolipoyllysine acetyltransferase	57225	WP_012243236.1

**Таблица 2.** Белки *A. laidlawii*, взаимодействующие с белком FtsZ *A. laidlawii* по данным ко-иммунопреципитации. MW — молекулярная масса

Название	MW, Да	Идентификатор
Hsp20/alpha crystallin family protein, IbpA	16054	WP_012242373.1
Formate C-acetyltransferase	84730	WP_012242002.1
Elongation factor Tu	42860	WP_012242145.1
Elongation factor G	76350	WP_012242144.1
XRE family transcriptional regulator	23390	WP_012242530.1
Molecular chaperone DnaK	65690	WP_012242499.1
Endopeptidase La	86710	WP_012242485.1
Phytoene desaturase	56910	WP_012243338.1
ABC transporter ATP-binding protein	25210	WP_012243340.1

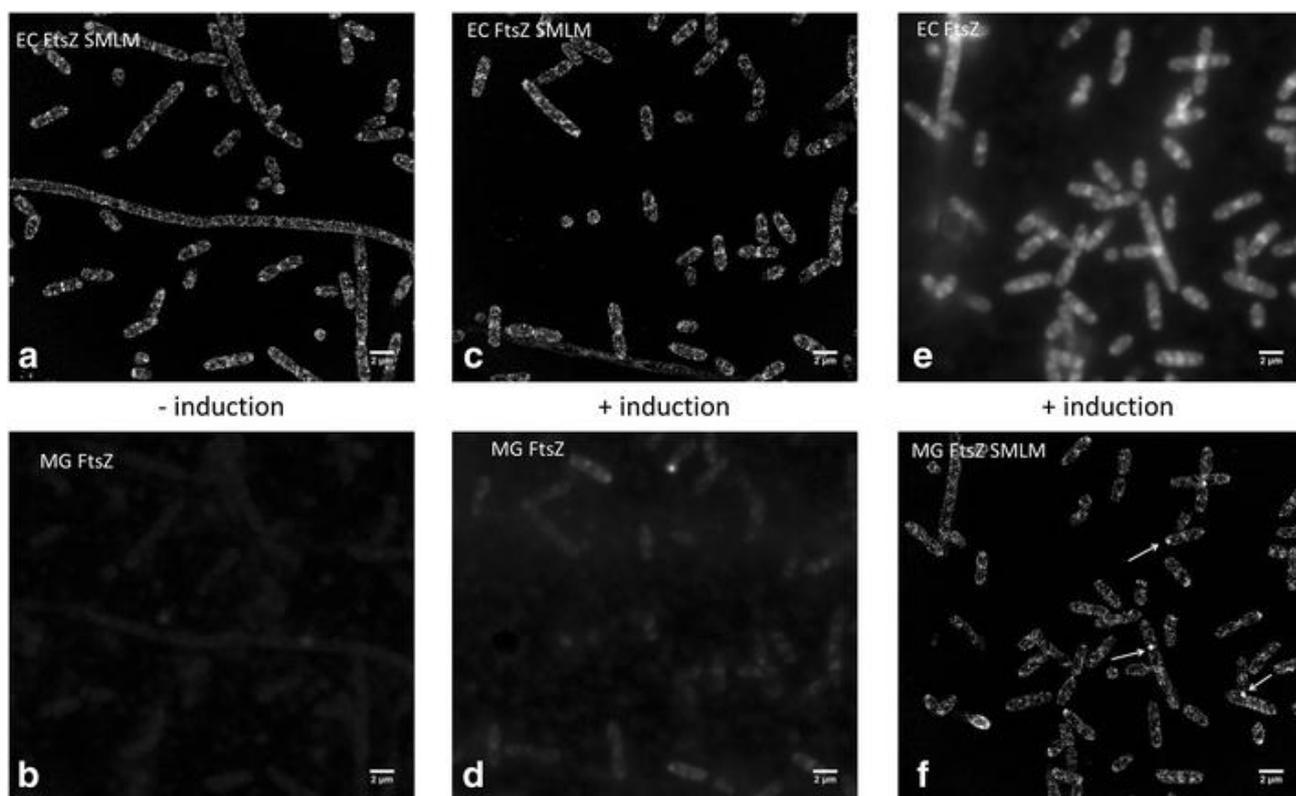
**Таблица 3.** Белки *M. gallisepticum*, взаимодействующие с белком FtsZ *M. gallisepticum* по данным ко-иммунопреципитации. MW — молекулярная масса

Название	MW, Да	Идентификатор
Lipoprotein A	81912	WP_011883657.1
Elongation factor Tu	43130	WP_014885939.1
ATP synthase B/B' CF(0)	52090	WP_023893658.1
DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	145080	WP_011884029.1
ABC-type oligopeptide transport solute binding protein OppA	118770	WP_011884746.1

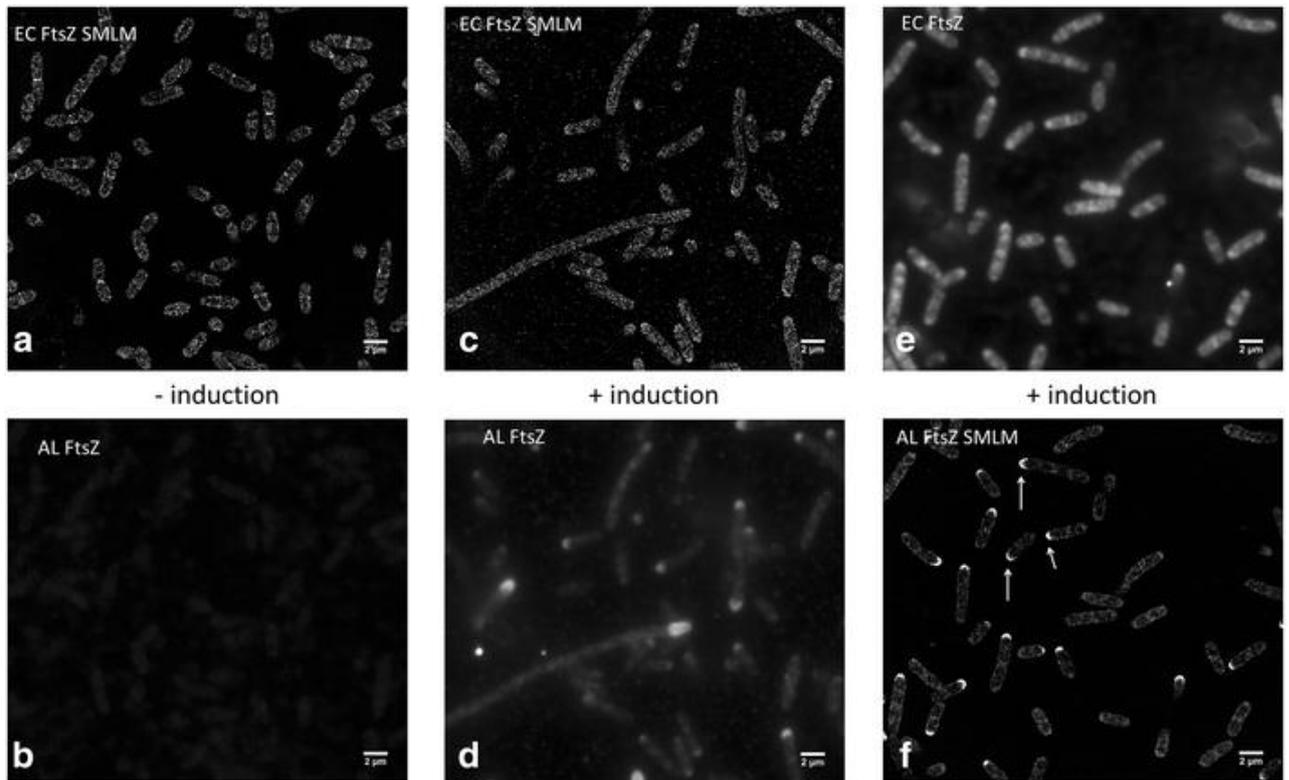
#### **4.6. Структуры, формируемые белками FtsZ *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* в клетках *E. coli***

С целью получения дополнительных данных о свойствах белков FtsZ видов *A. laidlawii* & *M. gallisepticum* и более точной интерпретации их роли в клетках микоплазм были исследованы структуры, формируемые этими белками в клетках *E. coli*. Кроме того, были идентифицированы белки *E. coli*, с которыми

взаимодействуют белки указанных видов микоплазм (см. ниже) в клетках кишечной палочки. Было показано, что белки FtsZ из этих двух видов микоплазм взаимодействуют с аппаратом деления *E. coli*, формируя упорядоченные структуры (см. **Рисунок 34** и **Рисунок 35**).

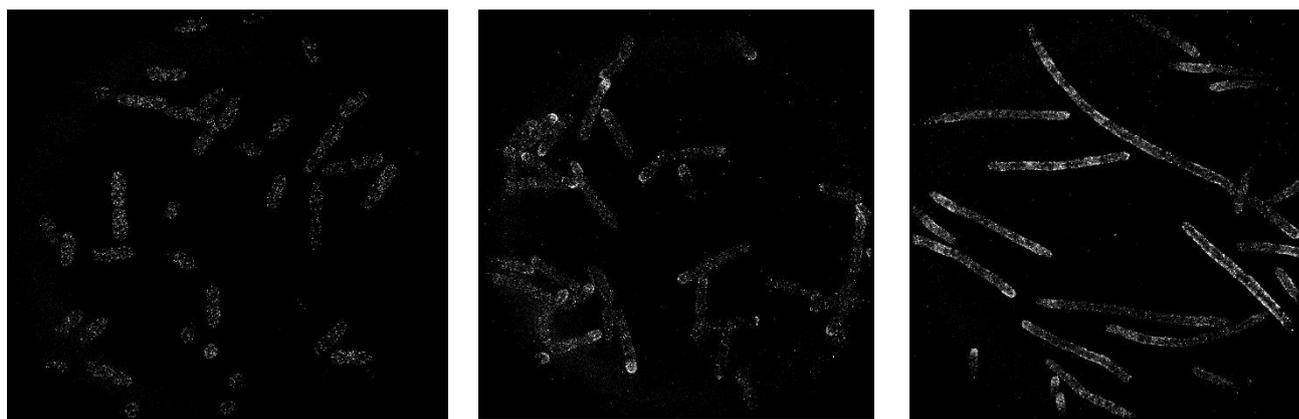


**Рисунок 34.** Экспрессия FtsZ *M. gallisepticum*. Верхний ряд – изображения структур, формируемых белком FtsZ *E. coli*. Нижний ряд - изображения структур, формируемых белком FtsZ *M. gallisepticum* в клетках *E. coli*. Изображения а, с и f получены методом локализационной микроскопии, изображения b, d, e – методом традиционной ФМ. Шкала – 2 мкм



**Рисунок 35.** Экспрессия FtsZ *A. laidlawii*. Верхний ряд – изображения структур, формируемых белком FtsZ *E. coli*. Нижний ряд - изображения структур, формируемых белком *A. laidlawii* в клетках *E. coli*. Изображения a, c и f получены методом локализационной микроскопии, изображения b, d, e – методом традиционной ФМ. Шкала – 2 мкм

Оказалось, что белок FtsZ *A. laidlawii* в клетках *E. coli* на ранней стадии экспрессии (т.е. при небольшой концентрации) ко-локализуется с белком FtsZ *E. coli* и не нарушает нормальное деление (см. **Рисунок 36**). Впоследствии он блокирует деление и локализуется на полюсах клетки вблизи ее оболочки, а потом белок FtsZ *A. laidlawii* накапливается в увеличивающихся по неустановленной пока причине промежутках между нуклеоидами, демонстрируя при этом выраженную мембранную локализацию.



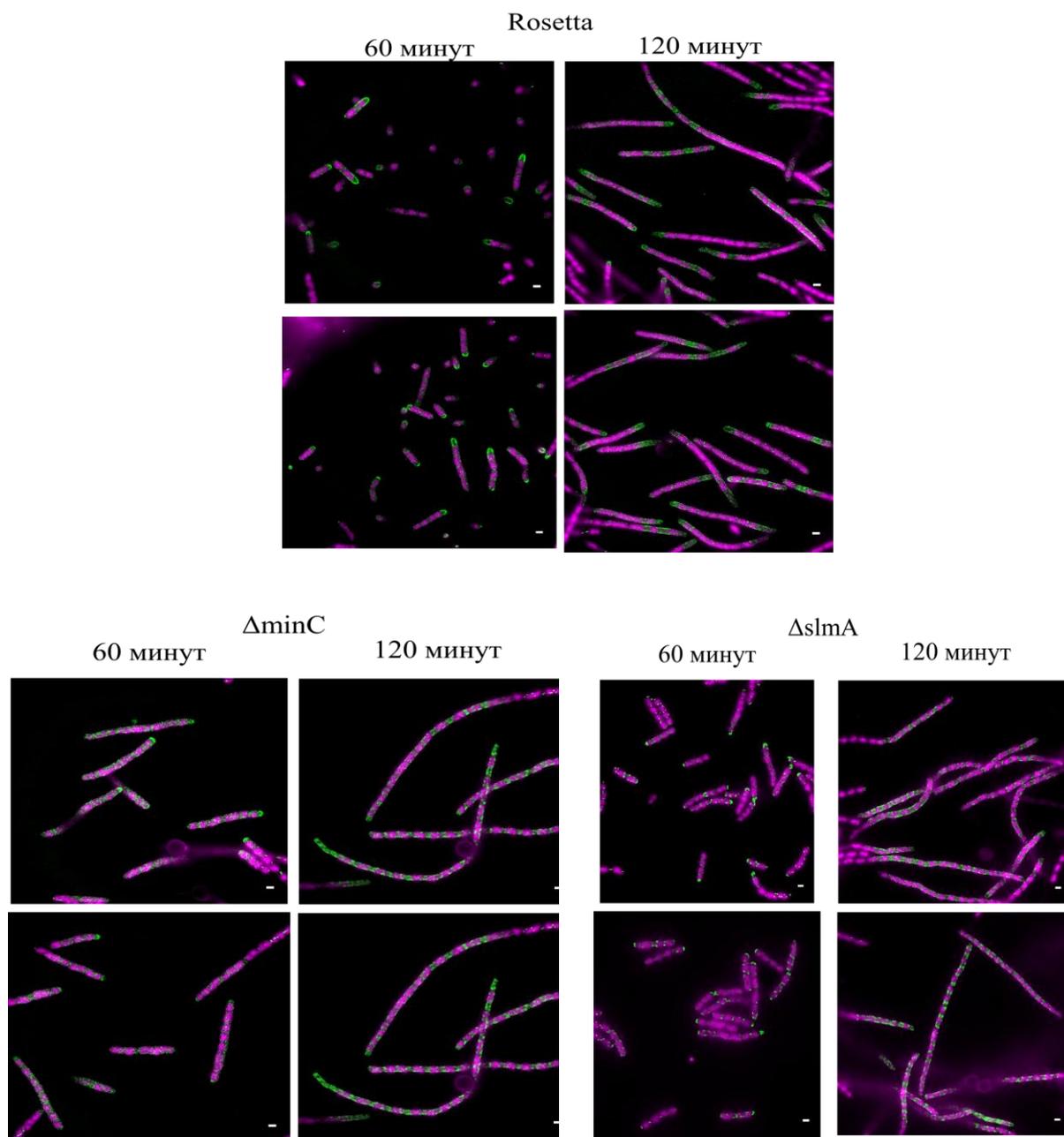
30 мин

60 мин

120 мин

**Рисунок 36.** Изображения структур, формируемых белком FtsZ *A. laidlawii*, полученные методом локализационной микроскопии, на ранней (30 мин), средней (60 мин) и поздней (120 мин) стадии экспрессии белка

Полярная локализация и локализация между нуклеоидами белка FtsZ *A. laidlawii* в принципе могла бы быть объяснена взаимодействием с системами позиционирования Z-кольца: с Min-системой в случае полярной локализации и нуклеоидной окклюзией в случае локализации между нуклеоидами. Однако нам не удалось идентифицировать ни один из белков систем позиционирования Z-кольца, с которым бы взаимодействовал белок FtsZ *A. laidlawii* в клетках *E. coli* (см. ниже). Чтобы дополнительно проверить, взаимодействует ли данный белок с белками нуклеоидной окклюзии и Min-системы *E. coli*, была осуществлена визуализация структур, формируемых FtsZ *A. laidlawii* как в штамме *E. coli*, близком к дикому типу (Rosetta), так и в штаммах с нарушенными системами нуклеоидной окклюзии или Min-системы. Различий в паттернах локализации FtsZ *A. laidlawii* не выявлено (см. **Рисунок 37**), поэтому указанная локализация белка FtsZ *A. laidlawii* не может быть объяснена взаимодействием с данными системами.



**Рисунок 37.** Структуры, формируемые белком FtsZ *A. laidlawii* в клетках *E. coli* штаммов Rosetta, JW1165-1 ( $\Delta minC$ , нарушенная Min-система) и JW5641-1 ( $\Delta slmA$ , нарушенная нуклеоидная окклюзия) на ранней (слева) и поздней (справа) стадиях экспрессии. Зеленый цвет - канал FtsZ (метод локализационной микроскопии), фиолетовый - канал ДНК (дифракционно-ограниченная флуоресценция). Шкала - 1 мкм

В случае экспрессии белка FtsZ *M. gallisepticum* в клетках кишечной палочки блокирования деления не происходит, но также имеет место ко-локализация с белком FtsZ *E. coli*. По результатам данных наблюдений можно предположить, что в клетках *E. coli* белок FtsZ *A. laidlawii* способен полимеризоваться, что похоже на поведение белка FtsZ *E. coli*, что в свою очередь косвенным образом

может говорить о схожей роли этого белка в клетках *A. laidlawii*. Однозначный вывод о способности белка FtsZ *M. gallisepticum* полимеризоваться по результатам этих наблюдений сделать нельзя, хотя способность его взаимодействовать с белком FtsZ *E. coli* косвенно подтверждает эту гипотезу.

#### 4.7. Белки, взаимодействующие с белками FtsZ микоплазм в клетках *E. coli*

Идентификация белков-партнёров FtsZ микоплазм в клетках модельного микроорганизма *E. coli*, процесс деления которого в значительной степени изучен, а состав белков так называемой дивисомы, опосредующей цитокинез, хорошо известен, позволила, с одной стороны, прояснить влияние белков FtsZ данных видов микоплазм на процесс деления *E. coli*, а с другой стороны - предсказать (базируясь на высоком уровне гомологии), с какими белками способны взаимодействовать белки FtsZ в клетках самих микоплазм. Для этого были использованы две основных методики - ко-иммунопреципитация белков из экстракта *E. coli* с антителами к белкам FtsZ микоплазм и со-осаждение за стреп-таг белков из экстракта *E. coli* при экспрессии рекомбинантных белков FtsZ микоплазм в клетках штамма-продуцента. Результаты представлены в таблицах 4 – 7.

**Таблица 4.** Белки *E. coli*, взаимодействующие с белком FtsZ *A. laidlawii* по данным ко-иммунопреципитации

Название	MW, Да	Идентификатор
Chromosome partition protein MukB	170230	WP_000572698.1
Ribonuclease E	118197	WP_000827360.1
Cell division protein FtsZ	40324	WP_000462776.1
Elongation factor Tu, partial	43284	WP_000031783.1

**Таблица 5.** Белки *E. coli*, взаимодействующие с белком FtsZ *M. gallisepticum* по данным ко-иммунопреципитации

Название	MW, Да	Идентификатор
ATP-dependent chaperone ClpB	95585	WP_001235102.1
DNA gyrase subunit B	89950	WP_000072067.1
Molecular chaperone DnaK	69115	WP_000516135.1
Cell division protein FtsZ	40324	WP_000462776.1
Elongation factor Tu, partial	43284	WP_000031783.1

**Таблица 6.** Белки *E. coli*, взаимодействующие с белком FtsZ *A. laidlawii* по данным со-осаждения за стреп-таг

Название	MW, Да	Идентификатор
Molecular chaperone DnaK	69115	WP_000516135.1
Cell division protein FtsZ	40324	WP_000462776.1
Preprotein translocase subunit SecA	102023	WP_001637416.1
Outer membrane porin OmpF	39333	WP_000977920.1

**Таблица 7.** Белки *E. coli*, взаимодействующие с белком FtsZ *M. gallisepticum* по данным со-осаждения за стреп-таг

Название	MW, Да	Идентификатор
Molecular chaperone DnaK	69115	WP_000516135.1

Методами ко-иммунопреципитации и со-осаждения за стреп-таг было показано, что белки FtsZ микоплазм *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* взаимодействуют с белком FtsZ *E. coli*, что, по-видимому, объясняет ингибирование деления *E. coli* при экспрессии этих белков. Метод ко-иммунопреципитации также показал, что FtsZ *A. laidlawii* взаимодействует с белком сегрегации ДНК MukB в *E. coli*. Предыдущие наблюдения предоставили данные о том, что AL FtsZ каким-то образом взаимодействует с системой сегрегации нуклеоидов *E. coli*, поскольку его экспрессия приводила к появлению

необычно больших промежутков между нуклеоидами в клетках-филаментах. MukB играет ключевую роль в сегрегации нуклеоидов в *E. coli*, поэтому такое взаимодействие представляется правдоподобным объяснением появления необычно больших промежутков между нуклеоидами. Также это взаимодействие может отражать существование аналогичного белка-партнера в *A. laidlawii*, хотя таковой еще не был идентифицирован. Мы нашли только один гомолог белка MukB среди известных видов *Mollicutes* – белок MukB в Candidatus *Phytoplasma oryzae* (GenBank KXT29462.1), который показывает самую высокую гомологию с двумя гипотетическими белками в *A. laidlawii* - WP\_012242387.1 (99% -ное покрытие и 41% идентичность в соответствии с выравниванием BLAST) и WP\_094586857.1 (покрытие 83% и идентичность 37%). В будущем планируется проверить, взаимодействует ли FtsZ *A. laidlawii* с этими предполагаемыми гомологами MukB.

Белки FtsZ микоплазм взаимодействуют также с несколькими шаперонами *E. coli*. Один из этих шаперонов – DnaK – взаимодействует как с FtsZ *A. laidlawii*, так и с FtsZ *M. gallisepticum*. Помимо DnaK, FtsZ *M. gallisepticum* взаимодействует с ClpB и GroEL. Возможно, FtsZ *M. gallisepticum* требуется помощь шаперонов для правильного сворачивания при продукции в клетке *E. coli*. Более того, это наблюдение поддерживает существование предполагаемых телец включения, обнаруженных нами ранее. Образование телец включения является распространенной проблемой при экспрессии рекомбинантных белков, однако удивительно, что FtsZ *M. gallisepticum*, который гомологичен цитозольному белку FtsZ *E. coli*, формирует тельца включения. Возможно, этот белок проявляет сходное поведение и в клетках *M. gallisepticum* с точки зрения зависимости от дополнительных шаперонов. Это наблюдение требует дальнейшего изучения.

Кроме того, FtsZ *M. gallisepticum* взаимодействует с ДНК-гиразой *E. coli*. Взаимодействие FtsZ с субъединицей В ДНК-гиразы в *M. gallisepticum* было предсказано в базе данных STRING, и наше наблюдение косвенно подтверждает это взаимодействие. Основываясь на гомологии ДНК-гираз *M. gallisepticum* и *E. coli*, можно заключить, что FtsZ *M. gallisepticum* может участвовать в

предсказанном взаимодействии с ДНК-гиразой *M. gallisepticum*, для надежного доказательства планируется проверить это взаимодействие другими методами, например, двухгибридной системой.

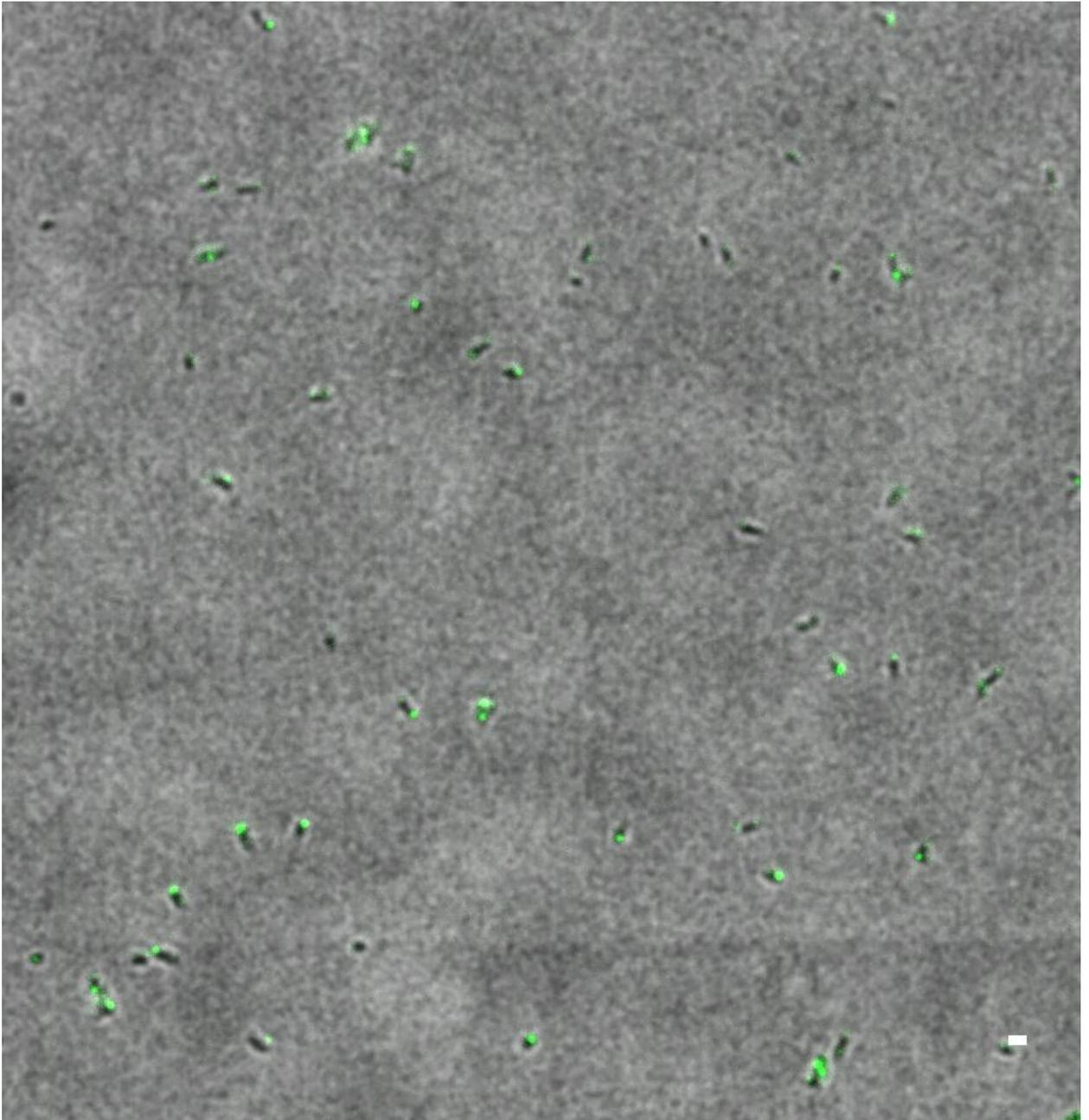
Выявлено взаимодействие FtsZ *A. laidlawii* с белками OmpF (белок наружной мембраны) и SecA (белок-транслоказа полипептидных цепей). На данном этапе сложно объяснить эти взаимодействия, в особенности взаимодействие с OmpF, так как FtsZ является цитоплазматическим белком. Взаимодействие SecA с белком FtsZ *E. coli* по литературным данным показано экспериментально, однако роль и механизмы этого взаимодействия неизвестны. SecA также присутствует в *A. laidlawii*, поэтому в будущем планируется проверить взаимодействие FtsZ и SecA вида *A. laidlawii*.

Таким образом, результаты, полученные в ходе визуализации структур, формируемых рекомбинантными белками FtsZ видов *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* в клетках *E. coli*, а также анализ белок-белковых взаимодействий с участием этих белков предоставили дополнительную информацию о свойствах данных белков, что нашло отражение в двух публикациях [140, 141].

#### **4.8. Локализация белка FtsZ в живых клетках *M. gallisepticum***

В ходе выполнения работы был создан штамм, который позволил осуществить субдифракционную визуализацию белка FtsZ в живых клетках *M. gallisepticum*. Использование эндогенно-экспрессируемой флуоресцентной метки (белок mMaple 2) позволило визуализировать структуры, формируемые белком FtsZ, в живых клетках *M. gallisepticum* (**Рисунок 38**), в том числе с субдифракционным разрешением (**Рисунок 39**). Следует отметить, что изображения структур, полученные данным методом, существенно отличаются от полученных методом иммунофлуоресцентного мечения. Это можно объяснить артефактами, вносимыми одним и другим методами. Например, плотные структуры на указанных рисунках можно интерпретировать как тельца включения вследствие экспрессии белка слияния. В то же время, преимущественная

локализация этих плотных структур на одном из концов клетки выглядит интригующе и позволяет предположить их взаимодействие с терминальной органеллой, хотя известные белки терминальной органеллы не были выявлены методами ко-иммунопреципитации и со-осаждения.



**Рисунок 38.** Изображения структур, формируемых белком FtsZ в живых клетках *M. gallisepticum*, полученные с использованием флуоресцентного белка mMaple 2 (зеленый цвет). Для представления о морфологии клетки дифракционно-ограниченное флуоресцентное изображение FstZ объединено с изображением в проходящем свете (оттенки серого). Шкала - 1 мкм



**Рисунок 39.** Изображения структур, формируемых белком FtsZ в живых клетках *M. gallisepticum*, полученные с использованием флуоресцентного белка mMaple 2. Субдифракционное изображение FtsZ (зеленый цвет) объединено с дифракционно-ограниченным изображением ДНК (фиолетовый цвет). Шкала - 1 мкм

## 5. Заключение

В ходе выполнения данной работы получены новые данные о роли белка FtsZ таких видов, как *E. coli*, *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*. Наибольшее внимание было уделено исследованию структур, формируемых данным белком, так как с ними напрямую связаны известные функции FtsZ. В значительной степени достижение результатов работы стало возможным благодаря разработке методик визуализации клеточных структур при помощи микроскопии сверхвысокого разрешения. Для более глубокого понимания роли белка FtsZ видов *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* также был осуществлен поиск белков-партнеров данного белка с использованием ко-иммунопреципитации.

Было показано, что Z-кольцо, формируемое белком FtsZ *E. coli*, представляет собой неоднородную структуру, состоящую из кластеров размером порядка 100 нм каждый. Впервые для бактерии *E. coli* было показано, что Z-кольцо утолщается в ходе сокращения его диаметра. Несмотря на то, что в микоплазмах не удалось наблюдать структуру, аналогичную Z-кольцу, было показано, что в некоторых клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* белок FtsZ может локализоваться в области перетяжки, хотя в других клетках имеют место другие варианты распределения FtsZ по клетке. Благодаря высокому разрешению метода локализационной микроскопии, удалось охарактеризовать размеры кластеров в составе структур, формируемых белком FtsZ всех трёх видов.

Помимо фундаментального значения, результаты работы весьма полезны с методологической точки зрения. В частности, для визуализации клеток микоплазм был впервые использован метод локализационной микроскопии, который может быть полезен для изучения других структур, например, так называемой терминальной органеллы некоторых видов микоплазм, что открывает большие возможности для будущих исследований этой структуры, играющей значительную роль в патогенезе подвижных микоплазм, в том числе, *M. gallisepticum*. Кроме того, большой интерес представляет изучение структур, формируемых цитоскелет-подобными белками (например, отмеченными выше

белками DnaK, Hsp20, EFTu и GapD), для этого метод локализационной микроскопии также представляется востребованным.

## 6. Выводы

1. Z-кольцо *Escherichia coli* представляет собой неоднородную структуру, наблюдаемую в виде кластеров белка FtsZ, средняя длина и толщина которых составляют  $108 \pm 41$  и  $63 \pm 12$  нм соответственно. Z-кольцо *E. coli* утолщается в ходе его сокращения в процессе цитокинеза, при этом средняя длина кластера FtsZ увеличивается.
2. При нарушении деления в результате экспрессии белка-ингибитора SulA *E. coli* не происходит значительного уменьшения размеров кластеров FtsZ.
3. В клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* белок FtsZ не формирует классическое Z-кольцо. В некоторых клетках FtsZ локализуется посередине клетки, тогда как в других клетках наблюдается относительно равномерное распределение FtsZ по клетке.
4. Кластеры FtsZ, наблюдаемые в клетках *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma gallisepticum*, имеют размеры, сопоставимые с размерами кластеров FtsZ *E. coli*.
5. Концентрация FtsZ в клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* сравнима с таковой в клетках *E. coli*.
6. Белки FtsZ *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* взаимодействуют с белками, участвующими в клеточном метаболизме, фолдинге и деградации белков, но взаимодействие FtsZ микоплазм с гомологами известных белков деления выявить не удалось.

## 7. Список сокращений и условных обозначений

CLEM (англ. **C**orrelated **L**ight and **E**lectron **M**icroscopy) — коррелированная световая и электронная микроскопия

CRAMP (англ. **c**athelin-**r**elated **a**nti**m**icrobial **p**eptide) — подобный кателину антимикробный пептид

*dcw* (англ. **d**ivision and **c**ell **w**all) — деление и клеточная стенка

FtsZ (англ. **f**ilamentous **t**emperature **s**ensitive mutant **Z**) — белок деления, филаментный температурочувствительный мутант Z

FWHM (англ. **F**ull **W**idth at **H**alf of **M**aximum) — полная ширина на половине высоты

GFP (англ. **G**reen **F**luorescent **P**rotein) — зелёный флуоресцентный белок

MEF (англ. **M**ulti-**E**mitter **F**itting) — анализ множества флуорофоров, изображения которых накладываются друг на друга

MRSA (англ. **M**ethicillin-**r**esistant *Staphylococcus aureus*) — устойчивый к метициллину золотистый стафилококк

PALM (англ. **p**hoto**a**ctivated **l**ocalization **m**icroscopy) — фотоактивируемая локализационная микроскопия

PBS (англ. **p**hosphate **b**uffered **s**aline) — фосфатно-солевой буфер

SIM (англ. **S**tructured **i**llumination **m**icroscopy) — микроскопия структурированного освещения

SMLM (англ. **S**ingle-**M**olecule **L**ocalization **M**icroscopy) — локализационная микроскопия

SOS-ответ – стрессовый механизм, активирует механизмы репарации ДНК и повышает частоту мутагенеза

SPT (англ. **S**ingle **P**article **T**racking) — отслеживание одиночных частиц

SRRF (англ. **S**uper-**R**esolution **R**adial **F**luctuations) — микроскопия радиальных флуктуаций

STED (англ. **S**Timulated **E**mission **D**epletion) — микроскопия на основе

подавления спонтанного испускания

STORM (англ. **s**tochastic **o**ptical **r**econstruction **m**icroscopy) — микроскопия на основе стохастической оптической реконструкции

TIRF (англ. **t**otal **i**nternal **r**eflection **f**luorescence) — метод микроскопии полного внутреннего отражения

VREF (англ. **v**ancomycin-**r**esistant ***E**nterococcus **f**aecium*) — устойчивый к ванкомицину энтерококк

ГДФ — гуанозиндифосфат

ГТЭ — глюкоза, трис, ЭДТА

ГТФ — гуанозинтрифосфат

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛМ — локализационная микроскопия

НО — нуклеоидная окклюзия

п.о. — пары оснований

РНК — рибонуклеиновая кислота

ФМ — флуоресцентная микроскопия

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

## 8. Список литературы

1. *Научно-исследовательский комплекс «Нанобиотехнологии» (НИК «НаноБио»)*. 2018 [cited 2018 30.11.2018]; Available from: <http://www.nanobio.spbstu.ru/>.
2. D. Panda, D. Bhattacharya, Q.H. Gao, P.M. Oza, H.Y. Lin, B. Hawkins, D.E. Hibbs, P.W. Groundwater. Identification of agents targeting FtsZ assembly. // *Future Med Chem*, 2016. 8(10): p. 1111-32.
3. Y. Hirota, A. Ryter, F. Jacob. Thermosensitive mutants of *E. coli* affected in the processes of DNA synthesis and cellular division. // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1968. 33: p. 677-93.
4. J. Lutkenhaus. Regulation of cell division in *E. coli*. // *Trends Genet*, 1990. 6(1): p. 22-5.
5. J. Lutkenhaus, S. Pichoff, S. Du. Bacterial cytokinesis: From Z ring to divisome. // *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2012. 69(10): p. 778-90.
6. D.J. Scheffers, M.G. Pinho. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. // *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005. 69(4): p. 585-607.
7. J.M. Eraso, L.M. Markillie, H.D. Mitchell, R.C. Taylor, G. Orr, W. Margolin. The highly conserved MraZ protein is a transcriptional regulator in *Escherichia coli*. // *J Bacteriol*, 2014. 196(11): p. 2053-66.
8. J.F. Lutkenhaus, H. Wolf-Watz, W.D. Donachie. Organization of genes in the *ftsA-envA* region of the *Escherichia coli* genetic map and identification of a new *fts* locus (*ftsZ*). // *J Bacteriol*, 1980. 142(2): p. 615-20.
9. K.J. Begg, W.D. Donachie. Cell shape and division in *Escherichia coli*: experiments with shape and division mutants. // *J Bacteriol*, 1985. 163(2): p. 615-22.
10. D.P. Haeusser, W. Margolin. Splitsville: structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring. // *Nat Rev Microbiol*, 2016. 14(5): p. 305-19.
11. S. Pichoff, J. Lutkenhaus. Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. // *EMBO J*, 2002. 21(4): p. 685-93.
12. B. Beall, J. Lutkenhaus. FtsZ in *Bacillus subtilis* is required for vegetative septation and for asymmetric septation during sporulation. // *Genes Dev*, 1991. 5(3): p. 447-55.
13. K. Dai, J. Lutkenhaus. *ftsZ* is an essential cell division gene in *Escherichia coli*. // *J Bacteriol*, 1991. 173(11): p. 3500-6.
14. H.P. Erickson, D.E. Anderson, M. Osawa. FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. // *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010. 74(4): p. 504-28.
15. A.D. TerBush, Y. Yoshida, K.W. Osteryoung. FtsZ in chloroplast division: structure, function and evolution. // *Curr Opin Cell Biol*, 2013. 25(4): p. 461-70.
16. R. Bernander, T.J. Ettema. FtsZ-less cell division in archaea and bacteria. // *Current Opinion in Microbiology*, 2010. 13(6): p. 747-52.

17. S.Y. Miyagishima, M. Nakamura, A. Uzuka, A. Era. FtsZ-less prokaryotic cell division as well as FtsZ- and dynamin-less chloroplast and non-photosynthetic plastid division. // *Front Plant Sci*, 2014. 5: p. 459.
18. E.F. Bi, J. Lutkenhaus. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. // *Nature*, 1991. 354(6349): p. 161-4.
19. S.G. Addinall, E. Bi, J. Lutkenhaus. FtsZ ring formation in *fts* mutants. // *J Bacteriol*, 1996. 178(13): p. 3877-84.
20. X. Ma, D.W. Ehrhardt, W. Margolin. Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(23): p. 12998-3003.
21. E. Betzig, G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacino, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H.F. Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. // *Science*, 2006. 313(5793): p. 1642-5.
22. J. Buss, C. Coltharp, T. Huang, C. Pohlmeier, S.C. Wang, C. Hatem, J. Xiao. In vivo organization of the FtsZ-ring by ZapA and ZapB revealed by quantitative super-resolution microscopy. // *Mol Microbiol*, 2013. 89(6): p. 1099-120.
23. G. Fu, T. Huang, J. Buss, C. Coltharp, Z. Hensel, J. Xiao. In vivo structure of the *E. coli* FtsZ-ring revealed by photoactivated localization microscopy (PALM). // *PLoS One*, 2010. 5(9): p. e12682.
24. S.J. Holden, T. Pengo, K.L. Meibom, C. Fernandez Fernandez, J. Collier, S. Manley. High throughput 3D super-resolution microscopy reveals *Caulobacter crescentus* in vivo Z-ring organization. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. 111(12): p. 4566-71.
25. M. Jacq, V. Adam, D. Bourgeois, C. Moriscot, A.M. Di Guilmi, T. Vernet, C. Morlot. Remodeling of the Z-Ring Nanostructure during the *Streptococcus pneumoniae* Cell Cycle Revealed by Photoactivated Localization Microscopy. // *MBio*, 2015. 6(4).
26. Z. Lyu, C. Coltharp, X. Yang, J. Xiao. Influence of FtsZ GTPase activity and concentration on nanoscale Z-ring structure in vivo revealed by three-dimensional Superresolution imaging. // *Biopolymers*, 2016. 105(10): p. 725-34.
27. L. Turnbull, M.P. Strauss, A.T.F. Liew, L.G. Monahan, C.B. Whitchurch, E.J. Harry. Super-resolution Imaging of the Cytokinetic Z Ring in Live Bacteria Using Fast 3D-Structured Illumination Microscopy (f3D-SIM). // *J Vis Exp*, 2014(91): p. 51469.
28. A.D. Vedyaykin, I.E. Vishnyakov, V.S. Polinovskaya, M.A. Khodorkovskii, A.V. Sabantsev. New insights into FtsZ rearrangements during the cell division of *Escherichia coli* from single-molecule localization microscopy of fixed cells. // *Microbiologyopen*, 2016. 5(3): p. 378-386.
29. P. Szwedziak, Q. Wang, T.A. Bharat, M. Tsim, J. Lowe. Architecture of the ring formed by the tubulin homologue FtsZ in bacterial cell division. // *Elife*, 2014. 3: p. e04601.

30. M. Osawa, H.P. Erickson. Liposome division by a simple bacterial division machinery. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013. 110(27): p. 11000-11004.
31. I. Horger, E. Velasco, J. Mingorance, G. Rivas, P. Tarazona, M. Velez. Langevin computer simulations of bacterial protein filaments and the force-generating mechanism during cell division. // *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 2008. 77(1 Pt 1): p. 011902.
32. H.P. Erickson, M. Osawa. FtsZ Constriction Force - Curved Protofilaments Bending Membranes. // *Subcell Biochem*, 2017. 84: p. 139-160.
33. C. Coltharp, J. Xiao. Beyond force generation: Why is a dynamic ring of FtsZ polymers essential for bacterial cytokinesis? // *Bioessays*, 2017. 39(1): p. 1-11.
34. B. Soderstrom, K. Skoog, H. Blom, D.S. Weiss, G. von Heijne, D.O. Daley. Disassembly of the divisome in *Escherichia coli*: evidence that FtsZ dissociates before compartmentalization. // *Mol Microbiol*, 2014. 92(1): p. 1-9.
35. J. Errington. Cell wall-deficient, L-form bacteria in the 21st century: a personal perspective. // *Biochem Soc Trans*, 2017. 45(2): p. 287-295.
36. W. Steiner, G. Liu, W.D. Donachie, P. Kuempel. The cytoplasmic domain of FtsK protein is required for resolution of chromosome dimers. // *Mol Microbiol*, 1999. 31(2): p. 579-83.
37. J. Mannik, M.W. Bailey, J.C. O'Neill, J. Mannik. Kinetics of large-scale chromosomal movement during asymmetric cell division in *Escherichia coli*. // *PLoS Genet*, 2017. 13(2): p. e1006638.
38. J. Errington, L.J. Wu, *Cell Cycle Machinery in Bacillus subtilis*, in *Prokaryotic Cytoskeletons: Filamentous Protein Polymers Active in the Cytoplasm of Bacterial and Archaeal Cells*, J. Löwe and L.A. Amos, Editors. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 67-101.
39. R. Mercier, Y. Kawai, J. Errington. General principles for the formation and proliferation of a wall-free (L-form) state in bacteria. // *Elife*, 2014. 3.
40. N. Ouzounov, J.P. Nguyen, B.P. Bratton, D. Jacobowitz, Z. Gitai, J.W. Shaevitz. MreB Orientation Correlates with Cell Diameter in *Escherichia coli*. // *Biophys J*, 2016. 111(5): p. 1035-43.
41. D. Jakimowicz, G.P. van Wezel. Cell division and DNA segregation in *Streptomyces*: how to build a septum in the middle of nowhere? // *Molecular Microbiology*, 2012. 85(3): p. 393-404.
42. N. Leisch, N. Pende, P.M. Weber, H.R. Gruber-Vodicka, J. Verheul, N.O.E. Vischer, S.S. Abby, B. Geier, T. den Blaauwen, S. Bulgheresi. Asynchronous division by non-ring FtsZ in the gammaproteobacterial symbiont of *Robbea hypermnestra*. // *Nat Microbiol*, 2016. 2: p. 16182.
43. N. Jacquier, P.H. Viollier, G. Greub. The role of peptidoglycan in chlamydial cell division: towards resolving the chlamydial anomaly. // *Fems Microbiology Reviews*, 2015. 39(2): p. 262-275.
44. M. Pilhofer, K. Aistleitner, J. Biboy, J. Gray, E. Kuru, E. Hall, Y.V. Brun, M.S. VanNieuwenhze, W. Vollmer, M. Horn, G.J. Jensen. Discovery of chlamydial

- peptidoglycan reveals bacteria with murein sacculi but without FtsZ. // *Nat Commun*, 2013. 4: p. 2856.
45. P. de Boer, R. Crossley, L. Rothfield. The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. // *Nature*, 1992. 359(6392): p. 254-6.
  46. D. RayChaudhuri, J.T. Park. Escherichia coli cell-division gene ftsZ encodes a novel GTP-binding protein. // *Nature*, 1992. 359(6392): p. 251-4.
  47. A. Mukherjee, J. Lutkenhaus. Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. // *J Bacteriol*, 1994. 176(9): p. 2754-8.
  48. M. Osawa, D.E. Anderson, H.P. Erickson. Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes. // *Science*, 2008. 320(5877): p. 792-794.
  49. H.P. Erickson, D.E. Anderson, M. Osawa. FtsZ in Bacterial Cytokinesis: Cytoskeleton and Force Generator All in One. // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010. 74(4): p. 504-528.
  50. J. Lowe. Crystal structure determination of FtsZ from Methanococcus jannaschii. // *J Struct Biol*, 1998. 124(2-3): p. 235-43.
  51. K.A. Gardner, D.A. Moore, H.P. Erickson. The C-terminal linker of Escherichia coli FtsZ functions as an intrinsically disordered peptide. // *Mol Microbiol*, 2013. 89(2): p. 264-75.
  52. H.I. Adler, W.D. Fisher, A. Cohen, A.A. Hardigree. MINIATURE escherichia coli CELLS DEFICIENT IN DNA. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1967. 57(2): p. 321-6.
  53. Z. Hu, J. Lutkenhaus. 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. // *Mol Microbiol*, 1999. 34(1): p. 82-90.
  54. J. Lutkenhaus, S. Du. E. coli Cell Cycle Machinery. // *Subcell Biochem*, 2017. 84: p. 27-65.
  55. A.L. Marston, H.B. Thomaides, D.H. Edwards, M.E. Sharpe, J. Errington. Polar localization of the MinD protein of Bacillus subtilis and its role in selection of the mid-cell division site. // *Genes Dev*, 1998. 12(21): p. 3419-30.
  56. M. Thanbichler, L. Shapiro. MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in Caulobacter. // *Cell*, 2006. 126(1): p. 147-162.
  57. V.W. Rowlett, W. Margolin. The bacterial Min system. // *Curr Biol*, 2013. 23(13): p. R553-6.
  58. L.J. Wu, J. Errington. Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in Bacillus subtilis. // *Cell*, 2004. 117(7): p. 915-25.
  59. T.G. Bernhardt, P.A. de Boer. SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in E. coli. // *Mol Cell*, 2005. 18(5): p. 555-64.
  60. J. Mannik, F. Wu, F.J. Hol, P. Bisicchia, D.J. Sherratt, J.E. Keymer, C. Dekker. Robustness and accuracy of cell division in Escherichia coli in diverse cell shapes. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(18): p. 6957-62.
  61. J. Mannik, M.W. Bailey. Spatial coordination between chromosomes and cell division proteins in Escherichia coli. // *Frontiers in Microbiology*, 2015. 6: p. 306.

62. V.W. Rowlett, W. Margolin. The Min system and other nucleoid-independent regulators of Z ring positioning. // *Frontiers in Microbiology*, 2015. 6: p. 478.
63. J.F. Lutkenhaus. Coupling of DNA replication and cell division: sulB is an allele of ftsZ. // *J Bacteriol*, 1983. 154(3): p. 1339-46.
64. C. Janion. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. // *Int J Biol Sci*, 2008. 4(6): p. 338-44.
65. J.J. Weigle. Induction of Mutations in a Bacterial Virus. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1953. 39(7): p. 628-36.
66. I.B. Holland, C. Jones. The role of the FtsZ protein (SfiB) in UV-induced division inhibition and in the normal *Escherichia coli* cell division cycle. // *Ann Inst Pasteur Microbiol*, 1985. 136A(1): p. 165-71.
67. T.T. Qin, H.Q. Kang, P. Ma, P.P. Li, L.Y. Huang, B. Gu. SOS response and its regulation on the fluoroquinolone resistance. // *Ann Transl Med*, 2015. 3(22): p. 358.
68. K.A. Hurley, T.M. Santos, G.M. Nepomuceno, V. Huynh, J.T. Shaw, D.B. Weibel. Targeting the Bacterial Division Protein FtsZ. // *J Med Chem*, 2016. 59(15): p. 6975-98.
69. N.R. Stokes, N. Baker, J.M. Bennett, J. Berry, I. Collins, L.G. Czaplewski, A. Logan, R. Macdonald, L. Macleod, H. Peasley, J.P. Mitchell, N. Nayal, A. Yadav, A. Srivastava, D.J. Haydon. An improved small-molecule inhibitor of FtsZ with superior in vitro potency, drug-like properties, and in vivo efficacy. // *Antimicrob Agents Chemother*, 2013. 57(1): p. 317-25.
70. N. Sun, Y.J. Lu, F.Y. Chan, R.L. Du, Y.Y. Zheng, K. Zhang, L.Y. So, R. Abagyan, C. Zhuo, Y.C. Leung, K.Y. Wong. A Thiazole Orange Derivative Targeting the Bacterial Protein FtsZ Shows Potent Antibacterial Activity. // *Frontiers in Microbiology*, 2017. 8: p. 855.
71. J.E. Rubin, K.R. Ball, M. Chirino-Trejo. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. // *Can Vet J*, 2011. 52(2): p. 153-7.
72. B. G.F., C. C., *Mollicutes: Molecular Biology and Pathogenesis*. 2014, Norfolk, UK: Horizon Scientific Press. 333
73. С.Н. Борхсениус, О.А. Чернова, В.М. Чернов, И.Е. Вишняков, *Микоплазмы в биологии и медицине начала XXI века*. 2016, СПб: Наука.
74. G.W. Liechti, E. Kuru, E. Hall, A. Kalinda, Y.V. Brun, M. VanNieuwenhze, A.T. Maurelli. A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan in *Chlamydia trachomatis*. // *Nature*, 2014. 506(7489): p. 507-10.
75. M. Mizutani, I. Tulum, Y. Kinoshita, T. Nishizaka, M. Miyata. Detailed Analyses of Stall Force Generation in *Mycoplasma mobile* Gliding. // *Biophys J*, 2018. 114(6): p. 1411-1419.
76. D.G. Gibson, J.I. Glass, C. Lartigue, V.N. Noskov, R.Y. Chuang, M.A. Algire, G.A. Benders, M.G. Montague, L. Ma, M.M. Moodie, C. Merryman, S. Vashee, R. Krishnakumar, N. Assad-Garcia, C. Andrews-Pfannkoch, E.A. Denisova, L. Young, Z.Q. Qi, T.H. Segall-Shapiro, C.H. Calvey, P.P. Parmar, C.A. Hutchison,

- 3rd, H.O. Smith, J.C. Venter. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. // *Science*, 2010. 329(5987): p. 52-6.
77. C.A. Hutchison, R.-Y. Chuang, V.N. Noskov, N. Assad-Garcia, T.J. Deerinck, M.H. Ellisman, J. Gill, K. Kannan, B.J. Karas, L. Ma, J.F. Pelletier, Z.-Q. Qi, R.A. Richter, E.A. Strychalski, L. Sun, Y. Suzuki, B. Tsvetanova, K.S. Wise, H.O. Smith, J.I. Glass, C. Merryman, D.G. Gibson, J.C. Venter. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. // *Science*, 2016. 351(6280).
78. I.E. Vishnyakov, S.N. Borchsenius, Y.I. Basovskii, S.A. Levitskii, V.N. Lazarev, E.S. Snigirevskaya, Y.Y. Komissarchik. Localization of division protein FtsZ in *Mycoplasma hominis*. // *Cell and Tissue Biology*, 2009. 3(3): p. 254-262.
79. E. Ramond, C. Maclachlan, S. Clerc-Rosset, G.W. Knott, B. Lemaitre. Cell Division by Longitudinal Scission in the Insect Endosymbiont *Spiroplasma poulsonii*. // *MBio*, 2016. 7(4).
80. C.A. Hutchison, S.N. Peterson, S.R. Gill, R.T. Cline, O. White, C.M. Fraser, H.O. Smith, J.C. Venter. Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. // *Science*, 1999. 286(5447): p. 2165-9.
81. M. Lluch-Senar, E. Querol, J. Piñol. Cell division in a minimal bacterium in the absence of ftsZ. // *Molecular Microbiology*, 2010. 78(2): p. 278-289.
82. M.F. Balish. *Mycoplasma pneumoniae*, an underutilized model for bacterial cell biology. // *J Bacteriol*, 2014. 196(21): p. 3675-82.
83. P. de Boer, J.P. Hoogenboom, B.N.G. Giepmans. Correlated light and electron microscopy: ultrastructure lights up! // *Nat Methods*, 2015. 12: p. 503.
84. J. Bewersdorf, A. Egner, S.W. Hell, *4Pi Microscopy*, in *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, J.B. Pawley, Editor. 2006, Springer US: Boston, MA. p. 561-570.
85. E. Betzig, A. Lewis, A. Harootunian, M. Isaacson, E. Kratschmer. Near Field Scanning Optical Microscopy (NSOM): Development and Biophysical Applications. // *Biophys J*, 1986. 49(1): p. 269-79.
86. S.M. Salapaka, M.V. Salapaka. Scanning probe microscopy. // *Ieee Control Systems Magazine*, 2008. 28(2): p. 65-83.
87. S.T. Hess, T.P. Girirajan, M.D. Mason. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. // *Biophys J*, 2006. 91(11): p. 4258-72.
88. I. Schoen, J. Ries, E. Klotzsch, H. Ewers, V. Vogel. Binding-activated localization microscopy of DNA structures. // *Nano Lett*, 2011. 11(9): p. 4008-11.
89. M.J. Rust, M. Bates, X. Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). // *Nat Methods*, 2006. 3(10): p. 793-5.
90. M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schuttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, M. Sauer. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. // *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008. 47(33): p. 6172-6.

91. T. Dertinger, R. Colyer, R. Vogel, M. Heilemann, M. Sauer, J. Enderlein, S. Weiss. Superresolution optical fluctuation imaging (SOFI). // *Adv Exp Med Biol*, 2012. 733: p. 17-21.
92. J. Schnitzbauer, M.T. Strauss, T. Schlichthaerle, F. Schueder, R. Jungmann. Super-resolution microscopy with DNA-PAINT. // *Nat Protoc*, 2017. 12(6): p. 1198-1228.
93. S. Bretschneider, C. Eggeling, S.W. Hell. Breaking the Diffraction Barrier in Fluorescence Microscopy by Optical Shelving. // *Physical Review Letters*, 2007. 98(21): p. 218103.
94. J. Kwon, J. Hwang, J. Park, G.R. Han, K.Y. Han, S.K. Kim. RESOLFT nanoscopy with photoswitchable organic fluorophores. // *Sci Rep*, 2015. 5: p. 17804.
95. U.J. Birk, D. Baddeley, C. Cremer. Nanosizing by spatially modulated illumination (SMI) microscopy and applications to the nucleus. // *Methods Mol Biol*, 2009. 464: p. 389-401.
96. M.G.L. Gustafsson. Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. 102(37): p. 13081-13086.
97. S.J. Sahl, S.W. Hell, S. Jakobs. Fluorescence nanoscopy in cell biology. // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017. 18: p. 685.
98. M.G.L. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. // *Journal of Microscopy-Oxford*, 2000. 198: p. 82-87.
99. R. Heintzmann, T. Huser. Super-Resolution Structured Illumination Microscopy. // *Chem Rev*, 2017. 117(23): p. 13890-13908.
100. L. Schermelleh, P.M. Carlton, S. Haase, L. Shao, L. Winoto, P. Kner, B. Burke, M.C. Cardoso, D.A. Agard, M.G.L. Gustafsson, H. Leonhardt, J.W. Sedat. Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. // *Science*, 2008. 320(5881): p. 1332-1336.
101. M.P. Strauss, A.T. Liew, L. Turnbull, C.B. Whitchurch, L.G. Monahan, E.J. Harry. 3D-SIM super resolution microscopy reveals a bead-like arrangement for FtsZ and the division machinery: implications for triggering cytokinesis. // *PLoS Biol*, 2012. 10(9): p. e1001389.
102. J. Horsington, L. Turnbull, C.B. Whitchurch, T.P. Newsome. Sub-viral imaging of vaccinia virus using super-resolution microscopy. // *J Virol Methods*, 2012. 186(1-2): p. 132-6.
103. S.W. Hell, J. Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. // *Opt Lett*, 1994. 19(11): p. 780-782.
104. T.A. Klar, S.W. Hell. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. // *Opt Lett*, 1999. 24(14): p. 954-956.
105. В.А. Охонин. Способ исследования микроструктуры образца. // 1986.

106. P. Hoopmann, A. Punge, S.V. Barysch, V. Westphal, J. Bückers, F. Opazo, I. Bethani, M.A. Lauterbach, S.W. Hell, S.O. Rizzoli. Endosomal sorting of readily releasable synaptic vesicles. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. 107(44): p. 19055-19060.
107. F. Chen, P.W. Tillberg, E.S. Boyden. Expansion microscopy. // *Science*, 2015. 347(6221): p. 543-548.
108. H. Shen, L.J. Tauzin, R. Baiyasi, W. Wang, N. Moringo, B. Shuang, C.F. Landes. Single Particle Tracking: From Theory to Biophysical Applications. // *Chem Rev*, 2017. 117(11): p. 7331-7376.
109. E. Betzig, R.J. Chichester. Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. // *Science*, 1993. 262(5138): p. 1422-5.
110. T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, T. Yanagida. Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. // *Nature*, 1995. 374: p. 555.
111. H. Geerts, M. De Brabander, R. Nuydens, S. Geuens, M. Moeremans, J. De Mey, P. Hollenbeck. Nanovid tracking: a new automatic method for the study of mobility in living cells based on colloidal gold and video microscopy. // *Biophys J*, 1987. 52(5): p. 775-82.
112. R.J. Ober, S. Ram, E.S. Ward. Localization accuracy in single-molecule microscopy. // *Biophys J*, 2004. 86(2): p. 1185-200.
113. J.C. Vaughan, S. Jia, X. Zhuang. Ultrabright photoactivatable fluorophores created by reductive caging. // *Nat Methods*, 2012. 9(12): p. 1181-4.
114. D.M. Shcherbakova, P. Sengupta, J. Lippincott-Schwartz, V.V. Verkhusha. Photocontrollable Fluorescent Proteins for Superresolution Imaging. // *Annual review of biophysics*, 2014. 43: p. 303-329.
115. A. Szczurek, L. Klewes, J. Xing, A. Gourram, U. Birk, H. Knecht, J.W. Dobrucki, S. Mai, C. Cremer. Imaging chromatin nanostructure with binding-activated localization microscopy based on DNA structure fluctuations. // *Nucleic Acids Research*, 2017. 45(8): p. e56-e56.
116. W.R. Legant, L. Shao, J.B. Grimm, T.A. Brown, D.E. Milkie, B.B. Avants, L.D. Lavis, E. Betzig. High density three-dimensional localization microscopy across large volumes. // *Nat Methods*, 2016. 13(4): p. 359-365.
117. M. Sauer, M. Heilemann. Single-Molecule Localization Microscopy in Eukaryotes. // *Chem Rev*, 2017. 117(11): p. 7478-7509.
118. N.G. Bozhanova, M.S. Baranov, N.V. Klementieva, K.S. Sarkisyan, A.S. Gavrikov, I.V. Yampolsky, E.V. Zagaynova, S.A. Lukyanov, K.A. Lukyanov, A.S. Mishin. Protein labeling for live cell fluorescence microscopy with a highly photostable renewable signal. // *Chem Sci*, 2017. 8(10): p. 7138-7142.
119. N. Gustafsson, S. Culley, G. Ashdown, D.M. Owen, P.M. Pereira, R. Henriques. Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations. // *Nat Commun*, 2016. 7: p. 12471.
120. D.A. Moore, Z.N. Whatley, C.P. Joshi, M. Osawa, H.P. Erickson. Probing for Binding Regions of the FtsZ Protein Surface through Site-Directed Insertions:

- Discovery of Fully Functional FtsZ-Fluorescent Proteins. // *J Bacteriol*, 2017. 199(1).
121. N. Olivier, D. Keller, P. Gonczy, S. Manley. Resolution doubling in 3D-STORM imaging through improved buffers. // *PLoS One*, 2013. 8(7): p. e69004.
  122. A.D. Vedyaykin, A.V. Sabantsev, I.E. Vishnyakov, S.N. Borchsenius, Y.V. Fedorova, A.S. Melnikov, P.Y. Serdobintsev, M.A. Khodorkovskii. Localization microscopy study of FtsZ structures in *E. coli* cells during SOS-response. // 1st International School and Conference Saint-Petersburg Open 2014 on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures, 2014. 541.
  123. M. Ovesny, P. Krizek, J. Borkovec, Z. Svindrych, G.M. Hagen. ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging. // *Bioinformatics*, 2014. 30(16): p. 2389-90.
  124. C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. // *Nat Methods*, 2012. 9(7): p. 671-5.
  125. I.E. Vishnyakov, S.A. Levitskii, V.A. Manuvera, V.N. Lazarev, J.A. Ayala, V.A. Ivanov, E.S. Snigirevskaya, Y.Y. Komissarchik, S.N. Borchsenius. The identification and characterization of IbpA, a novel alpha-crystallin-type heat shock protein from mycoplasma. // *Cell Stress Chaperones*, 2012. 17(2): p. 171-80.
  126. A. Kayumov, A. Heinrich, K. Fedorova, O. Ilinskaya, K. Forchhammer. Interaction of the general transcription factor TnrA with the PII-like protein GlnK and glutamine synthetase in *Bacillus subtilis*. // *FEBS J*, 2011. 278(10): p. 1779-89.
  127. D. Lavysh, M. Sokolova, L. Minakhin, M. Yakunina, T. Artamonova, S. Kozyavkin, K.S. Makarova, E.V. Koonin, K. Severinov. The genome of AR9, a giant transducing *Bacillus* phage encoding two multisubunit RNA polymerases. // *Virology*, 2016. 495: p. 185-96.
  128. V.A. Ivanov, V.J. Fel. On Some Similarity between Membrane-Antigens of the Cell of Zajdela Hepatoma and Liver of Rats Subjected to a Single 4-Dimethylaminoazobenzene Injection. // *Neoplasma*, 1980. 27(6): p. 745-750.
  129. J.C. Vaughan, S. Jia, X. Zhuang. Ultra-bright Photoactivatable Fluorophores Created by Reductive Caging. // *Nat Methods*, 2012. 9(12): p. 1181-1184.
  130. E.V. Ponomareva, I.E. Vishnyakov, N.E. Morozova, V.S. Polinovskaya, M.A. Khodorkovskii, A.D. Vedyaykin. Super-resolution microscopy of living bacterial cells. // 4th International School and Conference "Saint-Petersburg OPEN 2017", Санкт-Петербург, 3-6 апреля 2017 г., 2017.
  131. A.D. Vedyaykin, I.E. Vishnyakov, V.S. Polinovskaya, M.A. Khodorkovskii, A.V. Sabantsev. New insights into FtsZ rearrangements during the cell division of *Escherichia coli* from single-molecule localization microscopy of fixed cells. // *Microbiologyopen*, 2016.
  132. B. Soderstrom, A. Badrutdinov, H. Chan, U. Skoglund. Cell shape-independent FtsZ dynamics in synthetically remodeled bacterial cells. // *Nat Commun*, 2018. 9(1): p. 4323.

133. В. А.Д., С. А.В., В. И.Е., М. Н.Е., Х. М.А. Восстановление процесса деления в бактериальных клетках после индукции белка Sula, отвечающего за прекращение цитокинеза при SOS-ответе. // Цитология, 2016. 58(12): p. 930-935.
134. Y. Chen, S.L. Milam, H.P. Erickson. Sula inhibits assembly of FtsZ by a simple sequestration mechanism. // Biochemistry, 2012. 51(14): p. 3100-3109.
135. H.J. Defeu Soufo, C. Reimold, U. Linne, T. Knust, J. Gescher, P.L. Graumann. Bacterial translation elongation factor EF-Tu interacts and colocalizes with actin-like MreB protein. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. 107(7): p. 3163-3168.
136. G. Butland, J.M. Peregrin-Alvarez, J. Li, W. Yang, X. Yang, V. Canadien, A. Starostine, D. Richards, B. Beattie, N. Krogan, M. Davey, J. Parkinson, J. Greenblatt, A. Emili. Interaction network containing conserved and essential protein complexes in Escherichia coli. // Nature, 2005. 433(7025): p. 531-7.
137. F. Mayer. Cytoskeletons in prokaryotes. // Cell Biol Int, 2003. 27(5): p. 429-38.
138. *String database, FtsZ from M. gallisepticum*. 2018 [cited 2018 2018-05-10]; Available from: <https://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=GYCWxV8oQ87E>.
139. *String database, FtsZ protein from A. laidlawii*. 2018 [cited 2018 2018-05-10]; Available from: <https://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=ATBT EuTfIOQZ>.
140. A.D. Vedyaykin, V.S. Polinovskaya, A.V. Sabantsev, M.A. Khodorkovskii, S.N. Borchsenius, I.E. Vishnyakov. Influence of FtsZ proteins from some mycoplasma species on the division process in Escherichia coli cells. // Cell and Tissue Biology, 2017. 11(5): p. 389-398.
141. A.D. Vedyaykin, A.V. Sabantsev, M.A. Khodorkovskii, A.R. Kayumov, I.E. Vishnyakov. Recombinant FtsZ Proteins from Mollicutes Interact with Escherichia coli Division Machinery. // BioNanoScience, 2016. 6(4): p. 443-446.

## Благодарности

Автор благодарит весь коллектив НИК «НаноБио», в особенности Егора Побегалова, Таню Зюбко и Анатолия Арсениева за интересное общение в стенах лаборатории и вне их. Спасибо Яне Федоровой, Маше Соколовой и Маше Якуниной за помощь в проведении моих первых «пипеточных» экспериментов, а также множество ценных рекомендаций, Иннокентию Вишнякову за помощь и плодотворное сотрудничество, а также за очень внимательное чтение диссертации, Татьяне Олеговне Артамоновой за помощь в проведении масс-спектрометрии, Вадиму Александровичу Иванову за иммунизацию кроликов, Сергею Вадимовичу Мурашову за практическую помощь, Константину Викторовичу Северинову за помощь в доступе к статьям, а также полезные и вредные советы, Елене Пономарёвой за оптимизм и за рисунки, Мише Метелеву, Гарольду Эриксону и Мигелю Висенте за предоставленные для работы штаммы. Спасибо всем тем, кого я забыл здесь поблагодарить!

Благодарю своих учителей и преподавателей, в особенности Наталью Викторовну Щемелеву, Ирину Динаровну Кан, Алексея Николаевича Скворцова, Надежду Константиновну Краснову, Александра Эпаминондовича Фотиади, Сергея Николаевича Гуляева, Игоря Михайловича Рогова, Платона Александровича Карасёва за то, что вложили в меня много знаний и частичку себя.

Благодарю своих родителей, а также родных и близких за поддержку и любовь!

Наконец, я хотел бы поблагодарить 3-х людей, без которых я вряд ли дошёл бы до написания этого документа.

Михаила Алексеевича Ходорковского благодарю за то, что наша лаборатория живёт и развивается, несмотря на обстоятельства и неприятности. Спасибо большое за возможность заниматься любимым делом! И за то, что всегда можно получить ценный совет!

Наталию Морозову благодарю за любовь, терпение и поддержку, за искренность, мотивацию, радость, за то, что ты – моя гордость и отрада!

Отдельное спасибо Антону Сабанцеву, за то, что заинтересовал, научил, а также за интересное общение!

Также благодарю Вас, что прочитали мою работу!