

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский
государственный политехнический университет»

На правах рукописи

Сабанцев Антон Владимирович

Молекулярные механизмы действия белков FtsZ, виллина и системы
рестрикции-модификации Esp1396I, исследованные
флуоресцентными методами.

03.01.02 – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

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

Санкт-Петербург - 2014

Оглавление

1.	Введение.....	4
2.	Обзор литературы.....	12
2.1.	Стохастичность экспрессии генов и системы рестрикции-модификации.	12
2.2.	Локализационная микроскопия	18
2.3.	Методы преодоления дрейфа образца для ЛМ.....	29
2.4.	FtsZ – один из ключевых белков цитокинеза бактерий.....	34
2.5.	Механизм переключения активности актин-связывающего белка виллина	43
3.	Материалы и методы.....	46
3.1.	Исследование стохастичности экспрессии МТ и ЭР СРМ Esp1396I.	46
3.2.	Стабилизация положения объекта для локализационной микроскопии.	54
3.3.	Локализационная микроскопия FtsZ в клетках <i>E. coli</i>	60
3.4.	Исследование взаимодействия домена б виллина с кальцием....	65
4.	Результаты и обсуждение	68
4.1.	Распределения клеток <i>E. coli</i> по концентрации ЭР и МТ СРМ Esp1396I.	68
4.2.	Анализ внутриклеточного распределения МТ и ЭР	70
4.3.	Разработка протокола наблюдения «пробоя» СРМ на уровне одиночных клеток.	74
4.4.	Разработка системы стабилизации положения объекта для ЛМ.	77
4.5.	Структуры, формируемые белком FtsZ в клетках <i>E. coli</i>	81

4.6.	Связывание домена 6 виллина с кальцием.....	91
5.	Выводы.....	96
6.	Список сокращений.....	98
7.	Список публикаций по теме диссертации.....	99
8.	Список литературы.....	101

1. Введение

Актуальность проблемы. Стохастичность процесса экспрессии генов, а также случайные флуктуации концентраций различных веществ в клетке, приводят к тому, что даже в генетически однородной популяции микроорганизмов наблюдаются существенные фенотипические различия, обусловленные различиями в количествах различных белков в отдельных клетках [1]. Важность этого факта была в полной мере осознана лишь недавно, когда было показано, что стохастичность экспрессии генов играет существенную роль в эволюции микроорганизмов, преодолении стрессов, выборе литического или лизогенного пути развития бактериофагом и других процессах [2, 3].

Важную роль в биологии бактерий играют системы рестрикции-модификации (СРМ), которые представляют собой набор ферментов, обычно кодируемых мобильным генетическим элементом, обеспечивающих защиту клетки от чужеродной ДНК, в том числе бактериофагов [4]. Действие СРМ основано на активности двух ферментов: метилтрансферазы (МТ) и эндонуклеазы рестрикции (ЭР). Ферментативная активность ЭР заключается во внесении двунитевого разрыва по определенному сайту в ДНК. МТ в свою очередь осуществляет метилирование оснований ДНК по этому же сайту, тем самым предотвращая разрезание ДНК по этому сайту ЭР. Несмотря на высокую эффективность, СРМ не обеспечивает абсолютной защиты от бактериофага и небольшая доля бактериофагов метилируется и дает начало устойчивому к СРМ потомству. В работе [5] проведен подробный теоретический анализ возможных механизмов преодоления бактериофагом СРМ, который показал, что преодоление СРМ бактериофагом может быть связано со стохастичностью процесса рестрикции/метилирования ДНК бактериофага и со стохастическими вариациями концентраций ЭР и МТ от клетки к клетке. Для проверки этих гипотез было решено проанализировать стохастичность экспрессии геном ЭР и

MT CRM II типа Esp1396I [6] и разработать протокол эксперимента, который позволил бы исследовать корреляцию между концентрациями ЭР и МТ в клетке и вероятностью успешного заражения её бактериофагом λ .

Флуоресцентная микроскопия является одним из важных методов исследования биологических объектов. Привлекательность этого метода обусловлена в первую очередь чрезвычайно широкими возможностями селективного контрастирования различных структур в клетках и тканях. Кроме того, к важным преимуществам флуоресцентной микроскопии надо отнести возможность визуализации структур в живых клетках и многоклеточных организмах.

Несмотря на широкие возможности, флуоресцентная микроскопия обладает одним существенным недостатком: её пространственное разрешение ограничено дифракционным пределом (для видимого света его величина составляет порядка 200 нм в фокальной плоскости и 500 нм вдоль аксиального направления [7]). В связи с ограниченным разрешением флуоресцентная микроскопия долгое время считалась непригодной для исследования биологических структур с характерными размерами порядка сотен нанометров и меньше. В конце 20-го – начале 21-го века была постепенно осознана возможность обхода дифракционного ограничения разрешения флуоресцентной микроскопии и был создан целый ряд методов субдифракционной микроскопии, среди которых наиболее важными являются ближнепольная флуоресцентная микроскопия [8], микроскопия структурированного освещения [9], STED-микроскопия [10] и локализационная микроскопия [11-13]. Эти методы позволяют улучшить разрешение флуоресцентной микроскопии от двух до десяти и более раз во всех трех измерениях.

Метод локализационной микроскопии основывается на отдельной регистрации флуоресценции одиночных молекул и определении их положения

по флуоресцентным изображениям с точностью до нескольких десятков нанометров. Различные методы локализационной микроскопии (ЛМ) в первую очередь отличаются способом разделения флуоресценции молекул, которое чаще всего достигается за счет контролируемой активации/переключения фотоактивируемых или фотопереключаемых красителей, как белковой [14], так и небелковой природы [15], а также за счет обратимого перехода молекул красителя в долгоживущее нефлуоресцентное состояние под действием возбуждающего излучения [16]. Для определения аксиального положения молекул используются интерференционные методы детекции [17], либо модификации оптической схемы, связывающие форму изображения молекулы с её аксиальным положением [18, 19].

Для получение одного ЛМ-изображения требуется от нескольких сотен до десятков тысяч кадров образца, содержащих изображения одиночных молекул, получение которых занимает от секунд до часов. Улучшенное разрешение локализационной микроскопии в сочетании с длительным временем сбора данных предъявляет особенно высокие требования к стабильности положения образца, в связи с чем осуществление ЛМ требует специальных методов борьбы с дрейфом образца. Существуют два основных подхода к решению этой проблемы: коррекция дрейфа на этапе обработки изображений и активная стабилизация положения образца в ходе эксперимента. Из этих двух подходов второй представляется более надежным, особенно в случае трехмерной локализационной микроскопии, так как за время наблюдения при отсутствии компенсации дрейф может привести к выходу образца за пределы области регистрации, что наиболее вероятно для аксиальной оси.

Одной из наиболее перспективных областей применения субдифракционной микроскопии в целом и локализационной микроскопии в частности представляется микробиология, так как типичные размеры прокариотических клеток лишь в разы превышают дифракционный предел, в

связи с чем возможности исследования их организации методом традиционной флуоресцентной микроскопии очень ограничены [20].

Белок FtsZ, бактериальный гомолог тубулина, играет одну из ключевых ролей в цитокинезе [21]. Этот белок обладает ГТФазной активностью и способен формировать различные полимерные структуры как *in vitro*, так и *in vivo* [22]. FtsZ формирует сократительное кольцо между делящимися клетками (Z-кольцо), а также динамические спиральные структуры, локализованные на цитоплазматической стороне внутренней мембраны бактерии, также есть предположение, что FtsZ выполняет в цитокинезе активную роль, являясь источником силы, вызывающей сокращение септы [23]. Несмотря на активные исследования, механизмы контроля полимеризации и положения филаментов FtsZ в клетке, обеспечивающие правильное формирование Z-кольца, до сих пор не до конца ясны [24]. Также FtsZ является мишенью для регуляции клеточного деления в SOS-ответе [25]. Методами субдифракционной микроскопии было показано, что FtsZ формирует различные спиральные структуры, а также кольцо в середине делящейся клетки (SIM [26], STED [27], PALM [28-32]). Помимо роли в клеточном делении, некоторые авторы предполагают, что FtsZ также участвует в поддержании формы клетки [33]. В связи с этим особый интерес представляют данные о структурах, формируемых этим белком в клетках микоплазм, так как представители класса Mollicutes лишены клеточной стенки.

Правильное функционирование белков цитоскелета обеспечивается действием большого количества регуляторных белков. Так, в регулировании функций актиновых филаментов принимают участие белки суперсемейства гельзолина, куда ходят, помимо прочих, виллин [34], северин [35], гельзолин [34], супервиллин [36] и архвиллин [37]. Виллин участвует в поддержании микроворсинок в клетках эпителия кишечника и почек [38], и способен, подобно гельзолину переключать свою активность в зависимости от

концентрации ионов кальция, а именно, в ответ на повышение концентрации ионов кальция переходить от сборки филаментов актина в пучки («bundling») в режим разрыва филаментов актина («severing») [39, 40]. Виллин требует для переключения на порядок более высоких концентраций кальция (100-200 мкМ по сравнению с 10 мкМ для гельзолина). Механизм активации кальцием гельзолина изучен достаточно хорошо [39]. При низких концентрациях кальция домен G6 гельзолина формирует контакт с доменом G2, содержащим сайт связывания актина, что предотвращает связывание белка с F-актином. При связывании кальция с доменом G6 в последнем происходит конформационная перестройка, приводящая к потере контакта с доменом G2 и открытием сайта связывания F-актина. Белок при этом переходит из неактивной закрытой в активную раскрытую конформацию [39, 41]. Одним из ключевых при изучении виллина является вопрос о том, имеет ли этот белок сходный с гельзолином механизм активации открытой конформации кальцием.

Цели и задачи исследования. Таким образом, целью настоящей работы являлось исследование механизмов функционирования белков FtsZ, виллина, МТ и ЭР СРМ Esp1396I флуоресцентными методами. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- Изучение стохастичности экспрессии генов ЭР и МТ СРМ Esp1396I
- Анализ внутриклеточных распределений ЭР и МТ Esp1396I
- Разработка протокола наблюдения преодоления бактериофагом системы рестрикции-модификации Esp1396I в клетках *E. coli* при заражении их бактериофагом λ на уровне одиночных клеток
- Создание и тестирование системы стабилизации положения объекта для осуществления локализационной микроскопии

- Получение субдифракционных изображений структур FtsZ в *E. coli* норме и в ходе SOS-ответа
- Изучение кальций-связывающих свойств домена V6 виллина при помощи спектроскопии собственной флуоресценции белка

В ходе решения поставленных задач получены следующие результаты, которые выносятся на защиту:

- Данные о стохастичности экспрессии рестриктазы и метилазы системы рестрикции-модификации Esp1396I свидетельствуют о том, что случайные вариации концентраций этих ферментов в клетке могут оказывать существенное влияние на процесс преодоления бактериофагом системы рестрикции-модификации.
- Данные флуоресцентной микроскопии свидетельствуют о том, что метилаза, в отличие от рестриктазы Esp1396I, находится в клетках *E. coli* в комплексе с ДНК.
- Метод локализационной микроскопии в сочетании с иммунофлуоресцентным окрашиванием позволяет обнаружить особенности структур, формируемых белком FtsZ в клетках *E. coli*, недоступные для дифракционно-ограниченной флуоресцентной микроскопии, и существенно дополнить данные, получаемые с использованием флуоресцентных химерных белков.
- При SOS-ответе в клетках *E. coli* продолжают действовать механизмы, обеспечивающие преимущественную локализацию FtsZ у мембраны и в областях клетки, свободных от ДНК.
- Данные о связывании домена 6 виллина с ионами кальция, полученные при помощи метода спектроскопии собственной флуоресценции белка, свидетельствуют в пользу того, что виллин

имеет сходный с гельзолином механизм переключения активности в ответ на изменение концентрации ионов кальция.

Научная новизна и практическая ценность работы. Результаты, изложенные в данной работе, получены впервые и носят фундаментальный характер, расширяя знания о молекулярных механизмах функционирования белков FtsZ, виллина, ЭР и МТ СРМ Esp1396I, способствуя тем самым более полному пониманию фундаментальных основ клеточного деления и его регуляции в стрессовых ситуациях, формирования и регуляции клеточных структур на основе актина, а также механизмов работы систем рестрикции-модификации и, в частности, влияния случайных процессов на их эффективность. Практическая ценность данной работы основывается на том, что механизм SOS-ответа способствует выживаемости и приобретению патогенными микроорганизмами устойчивости в ходе антибактериальной терапии. Расширение знаний о механизмах SOS-ответа будут способствовать созданию новых классов препаратов, блокирующих SOS-ответ, которые могли бы использоваться совместно с антибиотиками для увеличения эффективности терапии и предотвращения формирования устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.

Способность виллина переключаться между режимами сборки в пучки («bundling») и фрагментации филаментов актина («severing») используется возбудителем дизентерии (шигеллёза), грамотрицательной бактерией *Shigella flexneri* для проникновения в клетки эпителия кишечника. Шигеллёзом ежегодно заболевают более 100 миллионов людей, из которых около одного миллиона погибают от этого заболевания [42]. Новые данные о механизмах переключения виллина будут способствовать усовершенствованию методов терапии шигеллёза. Более полное знание механизмов «пробоя» СРМ бактериофагом будет полезно для создания защищенных от бактериофагов и другой чужеродной ДНК биотехнологических штаммов микроорганизмов.

Публикации и апробация работы. Материалы работы докладывались на ряде международных и всероссийских конференций [43-47]. По результатам исследований опубликованы 3 статьи в рецензируемых научных журналах [48-50].

Структура и объем работы. Работа изложена на 110 страницах машинописного текста и включает: введение, обзор литературы, описание методов исследования, изложение и обсуждение результатов исследования, выводы и список цитируемой литературы (136 источников). Работа содержит 1 таблицу и 51 иллюстрацию.

2. Обзор литературы

2.1. Стохастичность экспрессии генов и системы рестрикции-модификации.

Стохастичность экспрессии генов. Долгое время изучение экспрессии генов осуществлялось на уровне крупных генетически однородных популяций клеток, что позволяло получить информацию только о средних уровнях экспрессии. С развитием проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии, а также с открытием флуоресцентных белков, стало возможным определять уровень экспрессии генов в одиночных клетках [1]. Было обнаружено, что уровни экспрессии многих генов существенно варьируются от клетки к клетке даже в генетически однородной популяции, и эти вариации играют важную роль в адаптации клеток к меняющимся условиям внешней среды [51] и эволюции популяций бактерий [52].

Процесс экспрессии генов имеет существенно стохастический характер, так как в подавляющем большинстве случаев ген белка представлен в клетке всего одной или несколькими копиями. Процессы транскрипции и трансляции подвержены влиянию множества случайных факторов, как связанных непосредственно со стохастичностью обеспечивающих их биохимических реакций («внутренние» флуктуации), так и со случайными вариациями в уровнях различных клеточных метаболитов («внешние» флуктуации). Эти два типа источников «генетического шума» различаются тем, что второй приводит к коррелированным флуктуациям уровней экспрессии различных генов, в то время, как первый вызывает некоррелированные флуктуации [3].

Одной из первых работ, в которой была продемонстрирована стохастичность экспрессии генов, была опубликована в 1957 году [53]. В этой работе исследовалась индукция экспрессии фермента β -галактозидазы в *E. coli* в ответ на наличие в среде негидролизуемого аналога галактозы (тиометил- β -D-

галактозида, сокр. TMG). Помимо индукции β -галактозидазы, внутриклеточный TMG также вызывает экспрессию активного транспортера галактозид пермеазы, который обеспечивает при полной активации уровень TMG в клетке до 100 раз выше, чем во внеклеточной среде. Таким образом осуществляется положительная обратная связь между внутриклеточной концентрацией TMG и экспрессией галактозид пермеазы, за счет чего в определенных диапазонах концентраций активная экспрессия β -галактозидазы сохраняется даже после снижения концентрации TMG в среде до уровней (называемых поддерживающими), не вызывающих заметной активации экспрессии β -галактозидазы. Именно этот эффект сделал возможным анализ стохастичности экспрессии β -галактозидазы: растили клетки *E. coli* в присутствии различных концентраций TMG, обеспечивающих частичную индукцию экспрессии β -галактозидазы, после чего рассеивали бактерии по пробиркам, содержащим TMG в поддерживающей концентрации, таким образом, что в среднем на 10 пробирок приходилась лишь 1 бактерия. Как и ожидалось, примерно в 10% пробирок наблюдался рост бактерий, и в большей части этих пробирок содержалось, таким образом потомство одной единственной клетки.

Когда выросшие в пробирках клоны были проанализированы на наличие β -галактозидазной активности, оказалось, что при различных концентрациях TMG среди клонов присутствуют как активно экспрессирующие β -галактозидазу, так и клетки с концентрацией этого фермента на 2 порядка ниже. Причем увеличение концентрации TMG приводит к росту доли активных клеток, но не к увеличению экспрессии в них β -галактозидазы.

Успех этого исследования был во многом обусловлен наличием бистабильности в системе β -галактозидазы, что обеспечило наличие условий (концентрации TMG), при которых одиночная бактерия может быть размножена с сохранением состояния экспрессии. Активное развитие этого направления исследований началось только после того, как появились

эффективные и более универсальные методы определения уровней экспрессии на уровне одиночных клеток (проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии) [3].

В одной из основополагающих работ по стохастичности экспрессии генов [1] для разделения «внешних» и «внутренних» источников «шума» в геном *E. coli* были введены гены флуоресцентных белков CFP и YFP под контролем одинаковых промоторов. Это позволило напрямую проследить коррелированные и некоррелированные флуктуации уровней экспрессии этих генов. Оказалось, что в зависимости от промотора и регуляторной системы как абсолютные значения, так и отношение стохастических флуктуаций уровней экспрессии генов, обусловленных «внутренними» и «внешними» источниками, варьируется в широких пределах. Наличие обратной связи в регуляторной цепи гена приводит к существенному снижению флуктуаций уровня его экспрессии [3].

В клетках бактерий трансляция, как и транскрипция, имеет прерывистый характер: периоды активной трансляции или транскрипции («burst») сменяются периодами относительно низкой активности [3, 54]. Прерывистый характер этих процессов приводит к отклонению распределения клеток в генетически однородной популяции по уровню экспрессии гена от статистики Пуассона [54]. Отношение между дисперсией и средним распределения клеток по концентрации белка позволяет оценить среднее количество молекул белка, производимых за период активной трансляции [54].

Возможность анализа экспрессии генов на уровне одиночных молекул в клетках *E. coli* была продемонстрирована в ряде работ [55, 56], а в работе [57] предложена модификация этих методов на случай более высоких уровней экспрессии генов. В этой работе детекция одиночных молекул флуоресцентных белков используется для калибровки интенсивности флуоресценции одиночной

молекулы, которая затем позволяет пересчитать интенсивность флуоресценции бактерии в количество молекул флуоресцентного белка в ней.

Система рестрикции-модификации Esp1396I. Важную роль в биологии бактерий играют системы рестрикции-модификации (СРМ), которые представляют собой набор ферментов, обычно кодируемых мобильным генетическим элементом, обеспечивающих защиту клетки от чужеродной ДНК, в том числе бактериофагов [4]. Действие СРМ второго типа основано на активности двух ферментов: метилтрансферазы (МТ) и эндонуклеазы рестрикции (ЭР). Ферментативная активность ЭР заключается во внесении двунитевого разрыва по определенному сайту в ДНК. МТ в свою очередь осуществляет метилирование оснований ДНК по этому же сайту. СРМ могут рассматриваться как разновидность системы токсин-антитоксин [58]. Действительно, эндонуклеаза рестрикции (токсин) более стабильна в клетке, чем метилтрансфераза (антитоксин), в связи с чем в случае потери плазмиды, кодирующей СРМ, потомство клетки гибнет от активности ЭР после деградации МТ. Сайты узнавания СРМ являются палиндромами и могут быть метилированы по двум основаниям на разных цепях ДНК. Метилирование хотя бы одного из этих оснований предотвращает узнавание этого сайта ЭР. При попадании СРМ в клетку ЭР синтезируется с задержкой относительно МТ, что дает последней достаточно времени, чтобы защитить клеточную ДНК от деградации [59]. Подробнее регуляция экспрессии генов СРМ описана в работе [60]. Таким образом, ДНК клетки, несущей СРМ, метилирована и тем самым защищена от воздействия ЭР, в то время как чужеродная неметилированная ДНК при попадании в клетку с большой вероятностью разрушается ферментом ЭР [4].

СРМ были впервые обнаружены в 1950-х годах в экспериментах по заражению бактерий бактериофагами [61]. Оказалось, что некоторые штаммы бактерий, названные рестрицирующими, заражаются бактериофагами,

выращенными на других, нерестрицирующих штаммах, с очень низкой (порядка 10^{-3}) вероятностью. Однако те бактериофаги, которые преодолели защиту и выросли на клетках рестрицирующего штамма, заражали их уже с вероятностью, близкой к 1. При этом способность бактериофагов с высокой эффективностью заражать клетки рестрицирующих штаммов терялась после размножения их на нерестрицирующих клетках [4]. Изучение этого эффекта показало впоследствии, что устойчивость бактериофагов к СРМ в этих опытах была связана с метилированием их ДНК и требовала для своего поддержания наличия в бактериях МТ [62].

Несмотря на высокую эффективность, СРМ не обеспечивает абсолютной защиты от бактериофага и небольшая доля бактериофагов метилируется и дает начало устойчивому к СРМ потомству. Есть основания полагать, что стохастичность экспрессии генов СРМ может играть важную роль в «пробое» бактериофагом защиты бактерий.

В работе [63] проведено подробное математическое моделирование влияния стохастичности процессов рестрикции/метилования ДНК бактериофага, инфекции и экспрессии генов МТ и ЭР. Дальнейший анализ влияния этих факторов требует экспериментальных данных, в частности, о стохастичности экспрессии генов СРМ.

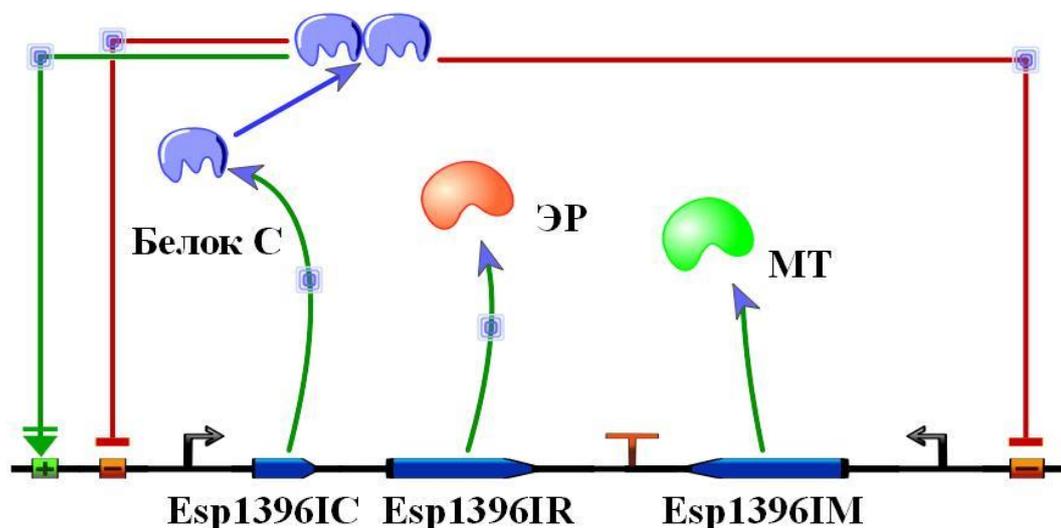


Рис. 2.1.1. Схема регуляции экспрессии генов CPM ESP1396I. Иллюстрация создана при помощи программы TinkerCell [64].

В качестве объекта для изучения влияния стохастичности экспрессии генов на пробой CPM была выбрана система рестрикции-модификации Esp1396I, ферменты которой узнают палиндромные последовательности 5' – CCA(N)₅TGG – 3'. Система состоит из трех генов, кодирующих метилтрансферазу (MT), эндонуклеазу рестрикции (ЭР) и регуляторный С белок [6]. В качестве модельного бактериофага был выбран бактериофаг λ. В геноме бактериофага λ содержится 14 сайтов узнавания для CPM Esp1396I.

Регуляция экспрессии генов CPM Esp1396I изучалась в работе [65]. Было показано, что транскрипция генов ЭР и MT контролируется С-белком. В отсутствие С-белка, что соответствует ситуации попадания плазмиды, кодирующей CPM, в клетку, ген MT активно экспрессируется, в то время, как общий промотор генов ЭР и С-белка малоактивен. При этом, так как ЭР функционирует в виде димера, базальная экспрессия генов ЭР и С-белка не токсична для клетки [6]. С-белок также связывается с регуляторными последовательностями в виде димера. В CPM Esp1396I есть три сайта

связывания С-белка: наиболее сильный сайт расположен вблизи промотора гена МТ, более слабый – на некотором расстоянии от промотора генов С-белка и ЭР, а самый слабый – вблизи этого промотора. В ходе постепенного накопления С-белка в клетке его димеры связываются в первую очередь с регуляторной последовательностью вблизи промотора гена МТ и репрессируют его экспрессию. В ходе дальнейшего роста концентрации С-белка он связывается с сайтом, расположенным на некотором расстоянии от промотора генов ЭР и С-белка и активирует их экспрессию, однако вскоре кооперативное связывание со вторым сайтом, расположенным рядом с этим промотором, ингибирует экспрессию генов ЭР и С-белка. Таким образом устанавливаются равновесные концентрации белков СРМ в клетке. Схема регуляции экспрессии генов СРМ Esp1396I приведена на рис. 2.1.1. К сожалению, данных о СРМ Esp1396I недостаточно для того, чтобы создать достоверную математическую модель экспрессии генов СРМ. В частности, отсутствуют данные о скоростях деградации белков С, ЭР и МТ.

2.2. Локализационная микроскопия

Флуоресцентная микроскопия и дифракционный предел разрешения.

Флуоресцентная микроскопия – один из важнейших методов исследования пространственной организации биологических объектов [66]. Однако волновая природа света ограничивает разрешение этого метода величиной порядка $\lambda/(2 \cdot NA)$, где λ - длина волны флуоресценции, а NA – численная апертура объектива [67]. Точное значение этой величины определяется выбором критерия для разрешения точек. Традиционный эмпирический критерий Релея, определяющий предел разрешения, как расстояние между двумя точечными объектами, при котором минимум интенсивности в изображении между ними составляет 0,8 от максимума, дает коэффициент 1,22 [67].

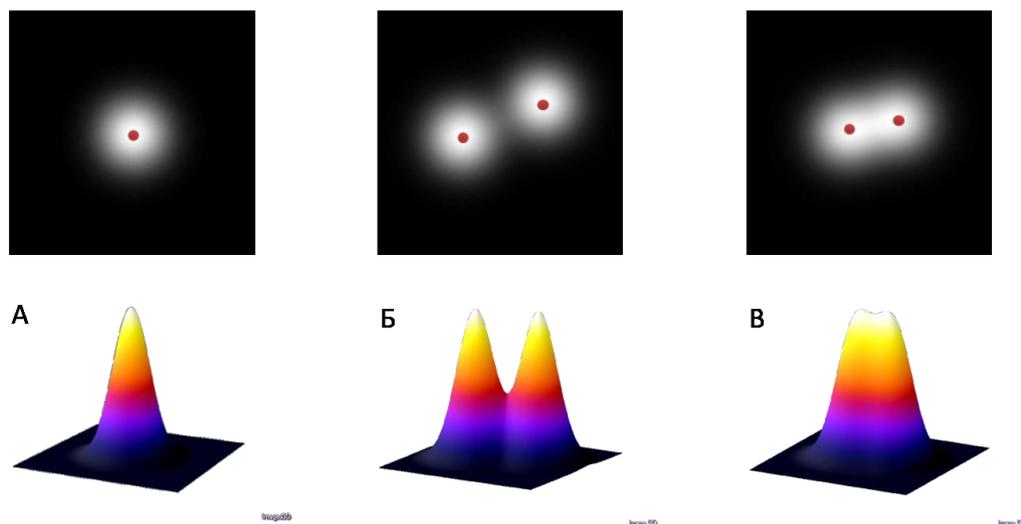


Рис. 2.1.2. Изображения точечных объектов в двумерном представлении (верхний ряд) и в виде поверхностных графиков (нижний ряд). А – аппаратная функция, Б – изображения двух объектов разрешены, В – изображения не разрешены. Красные точки обозначают положения точечных объектов.

Понятие передаточной или аппаратной функции (АФ) позволяет наглядно представить разрешение микроскопа. АФ представляет собой изображение точечного объекта (δ -функция в плоскости образца), которое, вследствие дифракции света, уже не является точкой, а имеет конечную ширину порядка $\lambda/(2 \cdot NA)$ (рис. 2.1.2 А). Решение задачи о дифракции на света от точечного источника на круглой апертуре позволяет определить аппаратную функцию микроскопа во флуоресцентном режиме. Получаемая при этом функция получила название диска Эйри:

$$I(r) = I_0 \left(\frac{J_1 \left(\frac{2\pi r NA}{\lambda} \right)}{\frac{2\pi r NA}{\lambda}} \right)^2$$

где $I(r)$ – интенсивность света как функция расстояния от центра изображения молекулы, I_0 – интенсивность изображения в центре, J_1 – функция Бесселя первого рода, NA – численная апертура объектива, λ – длина волны регистрируемого света. Первый минимум этой функции находится в точке $r = 1,22\lambda/(2NA)$ [67].

Изображение объекта может быть получено как свертка плотности распределения флуоресцентных молекул в образце с АФ [67]. В частности, если в образце две молекулы флуорофора находятся на расстоянии меньше ширины АФ, их изображения наложатся одно на другое и не будут разрешены (см. рис. 2.1.2 Б и В).

Принцип локализационной микроскопии. В основе ЛМ лежит возможность определения положения объекта по его изображению с субдифракционной точностью при условии, что изображение не перекрывается с изображениями других объектов (то есть мы можем быть уверены, что наблюдаем именно изображение единичного объекта). Эта возможность была осознана уже давно и активно используется в целом ряде специальных методов микроскопии. Так, при использовании методики оптического захвата часто положение микросферы в ловушке определяется посредством анализа её изображения, что позволяет достичь точности до единиц нанометров [68, 69]. Аналогичный подход используется в методах Tethered Particle Motion и магнитной ловушки для исследования свойств ДНК на уровне одиночных молекул [70-74].

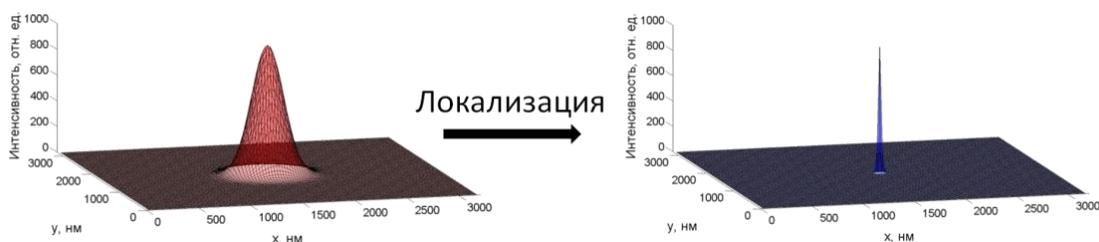


Рис. 2.1.3. Положение одиночного объекта можно определить по его изображению с точностью, существенно превышающей дифракционный предел.

В ЛМ используется метод определения положения объектов, размер которых пренебрежимо мал по сравнению с длиной волны регистрируемого света. В таком случае изображение объекта (молекулы флуорофора) представляет собой аппаратную функцию микроскопа, теоретически

описываемую функцией Эйри [67], которая на практике хорошо аппроксимируется функцией Гаусса [75, 76]. Зная, что в формировании изображения принимала участие только одна молекула, можно определить её положение с точностью, ограниченной только соотношением сигнал-шум и количеством зарегистрированных фотонов [75, 76] (рис. 2.1.3). Это легло в основу методики FIONA (Fluorescence Imaging with One Nanometer Accuracy), которая нашла применение, в частности, в исследовании моторных белков [77]. Методы регистрации траектории одиночных молекул активно используются для исследования диффузии и направленного перемещения биомолекул [78-81].

Из возможности локализации молекулы с субдифракционной точностью естественным образом вытекает идея о возможности получения субдифракционного изображения объекта посредством разделения флуоресценции различных молекул, независимой регистрации их изображений и последующей их локализации (рис. 2.1.4), которая была высказана задолго до первой экспериментальной реализации такого подхода [82, 83]. Идея ЛМ заключается в использовании дополнительной переменной для разделения флуоресценции одиночных молекул и независимого их наблюдения (чаще всего в качестве переменной разделения выступает время, но также использовалось, например, положение пика поглощения молекулы). При этом на первом этапе получается серия кадров образца, в каждом из которых присутствуют изображения лишь малой доли молекул (обычно, менее 1 на дифракционный объем). Далее при помощи компьютерного алгоритма осуществляется обнаружение изображений одиночных молекул и их локализация, которая может осуществляться различными методами, среди которых наибольшее распространение получили вычисление центра масс и нелинейная регрессия изображения двумерной функцией Гаусса. После этого положения всех локализованных молекул откладываются на одном изображении и тем самым получается «карта» распределения флуорофоров в образце с субдифракционным разрешением.

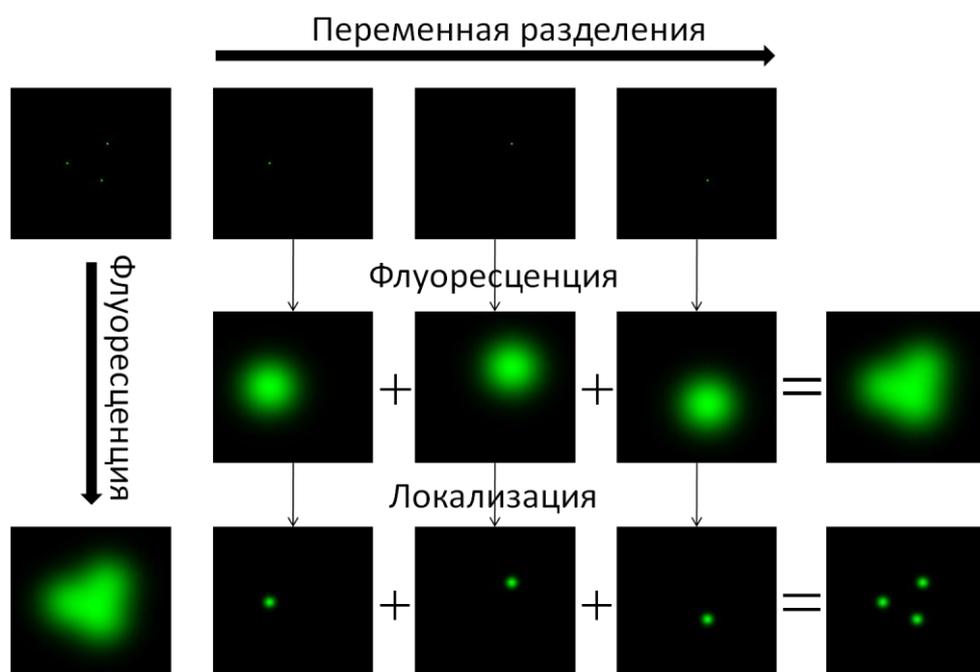


Рис. 2.1.4. Принцип локализационной микроскопии. В первом ряду представлены идеальные изображения объекта (истинное распределение флуорофоров). Во втором ряду представлены изображения отдельных молекул объекта, получаемых при различных значениях переменной разделения, а также (справа) – суммарное изображение. В третьем ряду показан результат локализации отдельных молекул (три центральных изображения) и ЛМ-изображение (справа), полученное, как их сумма, а также обычное флуоресцентное изображение объекта (слева).

Впервые принцип ЛМ был реализован на практике в 1998 году [83, 84]. Идея использования спектральных параметров для разделения флуоресценции отдельных молекул и возможность использования её для субдифракционной микроскопии была сформулирована ещё в работе 1985 года [82]. Такой метод ЛМ получил название SSI (Spectrally Selective Imaging). Эффективно использовать эту идею для ЛМ позволил тот факт, что при температуре жидкого гелия (-1.2 К) спектры поглощения и испускания флуорофоров становятся намного уже, чем при комнатной температуре (точнее, очень узкой становится нулевая фоновая линия, ширина которой, в зависимости от степени неупорядоченности матрицы, может быть на 6 порядков меньше, чем сдвиги в её положении для отдельных молекул [85]). Спектр поглощения

молекул пентацена в кристалле р-терпенила сильно зависит от локального окружения молекулы (напряжения и дефектов кристаллической структуры), в связи с чем различные молекулы возбуждаются светом различной длины волны и могут быть по этому признаку разделены. Ширина нулевой фононной линии для различных молекул пентацена составляет не более 20МГц, в то время, как вариации в положении этой линии вследствие различия в локальном окружении составляют более 3ГГц [84]. Таким образом, теоретически возможно разделение более 100 молекул на дифракционный объем.

Пренебрежимый уровень фотообесцвечивания и полный контроль над выбором молекулы позволил получать серии изображений одной молекулы при различных положениях фокуса с хорошим соотношением сигнал-шум, что дало возможность определить с высокой точностью не только латеральное, но и аксиальное положения молекулы. Стоит отметить, что в работе было исследовано всего 7 молекул. Несмотря на то, что в этих статьях была продемонстрирована принципиальная возможность ЛМ, предложенный метод сложен технически и имеет очень ограниченную область применения. В частности, так и не была продемонстрирована его применимость для биологических образцов, хотя такое развитие метода предполагалось [84].

ЛМ начала активно развиваться после того, как 2006 году в трех работах была продемонстрирована возможность реализации этого принципа с использованием фотоактивируемых или фотопереключаемых красителей (такие методы получили название PALM - PhotoActivation Localization Microscopy[11], FPALM - Fluorescence PhotoActivation Localization Microscopy[12] и STORM - Stochastic Optical Reconstruction Microscopy [13]).

В отличие от метода SSI, эти методы предполагают разделение флуоресценции молекул во времени при помощи явлений фотоактивации или фотопереключения, что значительно упрощает применение их в биологических экспериментах, так как такой подход совместим со стандартными методами

пробоподготовки для флуоресцентной микроскопии. Получение изображения осуществляется в серии циклов, каждый из которых состоит из вспышки активирующего или переключающего света, интенсивность которой обеспечивает необходимую (менее одной на дифракционный объем) плотность наблюдаемых молекул, за которой следует получение их изображений и фотообесцвечивание интенсивным светом возбуждающей длины волны [11-13].

Вышеописанные методики позволяют получать изображения с латеральным разрешением до 20 нм, однако для осуществления ЛМ этими методами требуются специальные красители, а именно фотопереключаемые белки, как, например PAGFP (для PALM и FPALM [11, 12]), либо фотопереключаемые конструкции из пар цианиновых красителей (Cy-3 и Cy-5), расположенных на определенном расстоянии на поверхности антитела для STORM [86, 13], что усложняет процесс пробоподготовки и затрудняет применение ЛМ для различных биологических задач. Стоит отметить механизм фотопереключения пар цианиновых красителей в методе STORM. Регистрируемый краситель (в данном случае Cy-5) способен в особых условиях (ферментативная система поглощения растворенного кислорода – GOC-буфер, с добавлением 140 мМ β-меркаптоэтанола) переходить под действием света возбуждающей длины волны (633 нм, 30 Вт/см²) в долгоживущее нефлуоресцентное состояние (время жизни в отсутствие активации порядка 1 часа и более), возврат из которого обеспечивается поглощением молекулой второго (активирующего) красителя (в данном случае – Cy3), находящейся в непосредственной близости (1 нм) от молекулы регистрируемого красителя, более коротковолнового света (532 нм, 1 Вт/см²). Эффект активации имеет более резкую, по сравнению с FRET, зависимость от расстояния между флуорофорами (увеличение расстояния с 1 до 3 нм приводит к ослаблению эффекта на порядок, в то время, как Фёрстеровский радиус для пары Cy3-Cy5 составляет 5 нм) [86, 13]. Для осуществления ЛМ по методу STORM необходимо, помимо специального буфера, использовать вторичные антитела,

окрашенные парами красителей Cu_3 и Cu_5 на определенном расстоянии и в определенной пропорции, что существенно усложняет процесс пробоподготовки [13].

Красители для локализационной микроскопии. Параллельно с развитием методики ЛМ с использованием редких фотопереключаемых и фотоактивируемых красителей, у многих широко распространенных красителей были обнаружены свойства, делающие их пригодными для ЛМ. Ещё в 2005 году была продемонстрирована способность цианинового красителя Cu_5 к обратимому переходу в долгоживущее нефлуоресцентное состояние (далее – «мерцание») под действием интенсивного света возбуждающей длины волны (633 нм, 14 кВт/см^2) в особых условиях (ферментативная система поглощения растворенного кислорода – GOC-буфер, с добавлением 100 мМ β -меркаптоэтиламина), возврат из которого активируется более коротковолновым светом (488 нм, 14 кВт/см^2) [87]. На основании этого наблюдения в 2008 году была продемонстрирована возможность ЛМ (с разрешением около 20 нм) с использованием в качестве флуоресцентных меток одиночных молекул красителей Cu_5 или очень близкого к нему по химической структуре Alexa 647 [88]. Этот метод очень близок к методу STORM, однако для его осуществления не требуется активирующего красителя, в связи с чем он был назван создателями dSTORM (direct STORM) [88].

Дальнейшее исследование механизма «мерцания» цианиновых красителей с использованием масс-спектрометрии показало [89], что природа этого процесса по всей видимости заключается в фотоиндуцированной реакции присоединения тиола по полиметиновому мостику красителя, что нарушает сопряженное π -электронное облако (рис. 2.1.5).

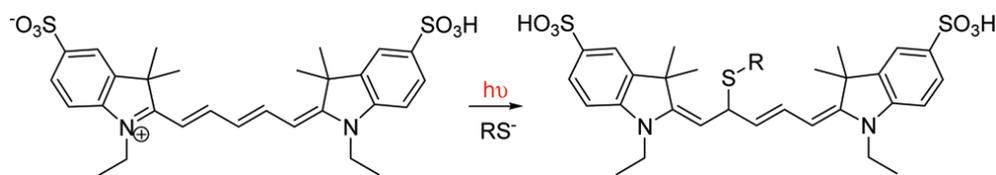


Рис. 2.1.5. Предполагаемая схема образования долгоживущего «темного» состояния красителя Cy5 в условиях ЛМ [89].

В другой работе, вышедшей в 2008 году, была продемонстрирована ЛМ с разрешением 20 нм за счет «мерцания» красителей АТТО 655 и АТТО 680 в буфере, содержащем 10 мМ глутатиона или β -меркаптоэтиламина, но не содержащим ферментативную систему поглощения кислорода [90].

Спектр пригодных для ЛМ флуорофоров был далее расширен в работе [91], где был продемонстрирован эффект аккумуляции большей части (>90%) молекул таких флуорофоров, как родамин-6G, 110 и 123, FITC, Oregon Green, Texas Red, Alexa 488, АТТО 532, АТТО 565, Bodipy, в долгоживущем нефлуоресцирующем («темном») состоянии (время жизни от 0.5 до 1000 мс) под действием высокой освещенности светом возбуждающей длины волны (более 1 кВт/см²) в поливиниловом спирте (ПВС). В этой работе также был продемонстрирован аналогичный эффект для красителей родамин-6G и АТТО 532 в буфере PBS с добавлением ферментативной системы поглощения растворенного кислорода, а также для флуоресцентных белков EGFP, EYFP, Citrine и PhiYFP в PBS. Аналогичный эффект был продемонстрирован *in vivo* для белка слияния Citrine и Map2, экспрессированного в клетках PtK2, что позволило получить *in vivo* изображения тубулинового цитоскелета клеток с разрешением 40 нм [91]. В соответствии с механизмом разделения флуоресценции молекул во времени, этот метод ЛМ был назван авторами GSDIM (Ground-State Depletion followed by Individual Molecule return).

Механизм «мерцания» родамина-6G в ПВС исследовался в работе [92], где при помощи ЭПР и других методов были получены данные,

свидетельствующие о том, что долгоживущее «темное» состояние скорее всего представляет собой радикальный анион красителя.

Более поздняя работа акцентирует внимание на возможности использования таких распространенных флуоресцентных красителей (Alexa 488, Alexa 568 и FITC) в буфере без добавления ферментативной системы поглощения растворенного кислорода и тиолов, однако такая методика (как было показано ранее в [91]) требует существенно более высокой освещенности (100 кВт/см² [93], что на два порядка больше типичной освещенности, необходимой для ЛМ в специальных условиях [91]). Это наблюдение позволило авторам получить изображения актиновых филаментов в фиксированных клетках HEK293, окрашенных Alexa 488-фалоидином, с разрешением 30 нм. Новая методика ЛМ получила название RPM (Reversible Photobleaching Microscopy), что подчеркивает тот факт, что она осуществляется при очень высоких освещенностях, которые ранее считались непригодными для флуоресцентной микроскопии вследствие фотообесцвечивания флуорофоров, которое, как показано в работе, является обратимым [93].

В работах [94, 95] также демонстрируется возможность ЛМ с разрешением до 30 нм с использованием эндогенно экспрессируемых флуоресцентных белков GFP, eGFP, EmGFP, YFP и eYFP, а также низкомолекулярных красителей Alexa 488 и Alexa 568, заключенных в коммерческую среду ProLong[®] Gold (Invitrogen).

Систематическое исследование пригодности флуорофоров Alexa и АТТО для ЛМ было проведено в работе [96], где была продемонстрирована ЛМ фиксированных клеток с использованием Alexa 488, 532 и 568, а также АТТО 520, 565, 590, 655 и 700 в PBS с добавлением 10-200 мМ β-меркаптоэтиламина при освещенности от 1 до 4 кВт/см², а также *in vivo* ЛМ с использованием АТТО 655.

Также недавно была продемонстрирована возможность получения субдифракционных изображений с использованием красителя Alexa647 в заключающей среде VectaShield [97]. Такая комбинация заключающей среды и красителя представляется удачной в связи с тем, что фон биологических образцов при регистрации флуоресценции в ближнем ИК-диапазоне существенно меньше, чем в видимом диапазоне, а заключающая среда VectaShield позволяет хранить образцы в течение длительного времени с сохранением возможности получения субдифракционных изображений.

Таким образом, развитие методов ЛМ привело к существенному упрощению схемы эксперимента и пробоподготовки. Была продемонстрирована возможность ЛМ с использованием широко распространенных флуорофоров (хороший обзор по «мерцанию» флуорофоров можно найти в [98]), что существенно упростило методику пробоподготовки, позволив использовать отработанные десятилетиями протоколы окраски с минимальными модификациями, а также уже существующие генетические конструкции и трансгенные организмы, экспрессирующие химерные конструкции с флуоресцентными белками. В связи с этим отпала необходимость в использовании нескольких источников света различной длины волны (лазеров) и синхронизации детектирования и активации.

В целом стоит отметить, что «мерцание» распространенных флуорофоров является существенно нелинейным эффектом по освещенности. Несмотря на то, что этот эффект очень активно используется на практике, в частности для осуществления ЛМ, механизм его во многом остается неясным, хотя он активно и небезуспешно исследуется [89, 92].

Параллельно с поиском у существующих красителей свойств, делающих их пригодными для локализационной микроскопии, также ведется разработка новых флуоресцентных красителей, обладающих свойством фотоактивации. Преимущество таких красителей для локализационной микроскопии

заключается в том, что их свойство фотоактивации проявляется независимо от окружающей среды, что дает более гибкие возможности для их применения. В частности, был описан новый класс фотоактивируемых красителей – «запертые» производные родаминов, в которых тушащая группа отщепляется при поглощении кванта света с длиной волны в ближнем УФ-диапазоне [99].

2.3. Методы преодоления дрейфа образца для ЛМ

Сочетание высокого разрешения и длительного времени накопления данных делает локализационную микроскопию чрезвычайно чувствительной к дрейфу. Смещение образца на десятки или сотни нанометров за время наблюдения, которое составляет от десятков секунд до часов, оказывает губительное воздействие на разрешение. В связи с этим в области локализационной микроскопии чрезвычайно остро встает проблема коррекции и/или предотвращения дрейфа образца.

Был предложен ряд методов преодоления проблемы дрейфа для локализационной микроскопии, которые можно разделить на методы активной стабилизации положения объекта на этапе сбора данных и методы коррекции дрейфа на этапе обработки данных. В обеих группах можно выделить методы, требующие использования маркерных объектов и основанные на анализе особенностей образца без использования маркерных объектов. Пожалуй, наиболее простым в применении является метод коррекции дрейфа, основанный на вычислении кросс-корреляции ЛМ-изображений, реконструированных на основе части кадров образца [100, 101]. Однако такой подход позволяет компенсировать только низкочастотные смещения образца с частотами на 1 или 2 порядка ниже частоты получения кадров образца. Кроме того, дрейф образца может привести к выходу его за пределы оптимального диапазона детекции, что особенно важно при регистрации аксиального положения молекул и приведет к ухудшению аксиального разрешения.

Методы коррекции дрейфа с использованием маркерных объектов (флуоресцентных микросфер, квантовых точек или металлических наночастиц) позволяет учесть движения объекта, частоты которых сопоставимы с частотой получения кадров образца, однако также не могут обеспечить нахождение объекта в диапазоне оптимального разрешения по оси z [102-104].

В работе [105] продемонстрирована возможность активной стабилизации положения объекта в ходе сбора данных для реконструкции субдифракционного изображения без использования маркерных объектов за счет вычисления кросс-корреляции изображений образца в проходящем свете с эталонными изображениями, полученными при различных положениях фокуса. Такой метод позволяет стабилизировать положения объекта на уровне 10 нм в плоскости xy и 20 нм по оси z с частотой в несколько герц. Однако для реализации такого метода необходимо создание дополнительной схемы визуализации образца в проходящем свете лазера с длиной волны в ближнем ИК-диапазоне и регистрацией изображения при помощи дополнительной камеры, что представляет большие трудности в рамках существующей экспериментальной установки. Кроме того, частота данного метода достаточно низкая. Аналогичный метод с использованием маркерных объектов описан в работе [106], где достигается стабильность лучше 2 нм в плоскости xy и 17 нм по оси z при частоте 10 Гц. В сочетании с особой конструкцией оптической установки, обеспечивающей пассивную минимизацию дрейфа, схожий метод, основанный на определении положения маркерных объектов по изображениям в проходящем свете и компенсации их перемещения за счет перемещения пьезостолика позволил достигнуть стабильности лучше 1 нм в трех измерениях при частоте в 25 Гц и применялся для экспериментов с использованием оптического захвата [107]. Также в этой работе предлагается использовать метод определения положения маркерного объекта в трех измерениях с использованием квадрантного детектора для увеличения частоты стабилизации, аналогично работе [108], в которой комплекс мер, направленных на повышение

стабильности экспериментальной установки, включающий в себя заполнение оптического пути гелием, активную стабилизацию интенсивности следящего лазера, а также активную стабилизацию положения образца с использованием маркерных объектов, представляющих собой микроцилиндры, выращенные на стекле, положение которых в трех измерениях определялось при помощи квадрантного детектора, позволил достичь беспрецедентного уровня стабильности в 0,1 нм при частоте в 100 Гц. Однако такая высокая точность является избыточной для ЛМ, разрешение которой составляет десятки нанометров в трех измерениях. В таблице 1 представлены основные статьи, описывающие методы активной стабилизации положения объекта.

Таблица 1. Статьи, описывающие методы стабилизации положения объекта под микроскопом

Авторы	Название	Год	Журнал	Метод	Параметры
Ryan McGorty, Daichi Kamiyama and Bo Huang	Active microscope stabilization in three dimensions using image correlation	2013	Optical Nanoscopy	Анализ изображений, кросс- корреляция, без опорных объектов	Несколько Гц, 10 нм ху, 20 нм z, применение для локализационной микроскопии [105]
Sang Hak Lee, ..., Paul R. Selvin	Using fixed fiduciary markers for stage drift correction	2012	OPTICS EXPRESS	Определение положения маркеров, наносимых литографически, по изображениям в проходящем свете	10 Гц, 1,25 нм и 1,47 нм по осям x и y, 16,9 нм по оси z, демонстрация на примере «шагания» кинезина [106]
M. Capitanio, R. Cicchi, and F.S.	Position control and optical manipulation for nanotechnology	2005	Eur. Phys. J. B	Определиени положения микросферы по изображениям в проходящем свете,	25 Гц, лучше 1 нм по трем осям, демнострация в

Pavone	applications			устойчивая конструкция	эксперименте с миозином, применение для оптического захвата [107]
Ashley R. Carter, ..., Thomas T. Perkins	Stabilization of an optical microscope to 0.1 nm in three dimensions	2007	APPLIED OPTICS	Припавленные к стеклу микросферы и микроцилиндры, выращенные на стекле. Квадрантная детекция	100 Гц, 0,1 нм по трем осям, , для оптического захвата, сложно в реализации [108]
Lora Nugent-Glandorf and Thomas T. Perkins	Measuring 0.1-nm motion in 1 ms in an optical microscope with differential back-focal-plane detection	2004	OPTICS LETTERS	Микросфера, припавленная к стеклу, использовалась для измерения дрейфа, который затем вычитался из траектории микросферы в оптической ловушке	0,5 нм по ху, по z – нет [109]

2.4. FtsZ – один из ключевых белков цитокинеза бактерий.

Долгое время считалось, что бактерии не имеют цитоскелета, однако в последние годы в бактериях были обнаружены гомологи всех основных белков цитоскелета эукариот [110].

Белок FtsZ – бактериальный гомолог тубулина. Именно этот белок стал первым ключом к пониманию того факта, что бактерии также имеют цитоскелет [111]. Впервые (в 1991 году) методом иммуноэлектронной (позже и иммунофлуоресцентной) микроскопии было установлено [112, 113], что FtsZ сконцентрирован в основном в районе перетяжки во время деления. Было показано, что этот белок формирует Z-кольцо, а мутация, выражающаяся в его недостатке, приводит к образованию длинных неразделившихся клеток. FtsZ присутствует практически во всех видах прокариотических организмов, за редкими исключениями, являясь, таким образом, одним из наиболее консервативных белков прокариот. Более того, FtsZ участвует в делении хлоропластов растительных клеток [114], что указывает на еще большую распространённость данного белка.

Олигомеры FtsZ напоминают микротрубочки, в частности, проявляют ГТФазную активность, но образуют менее стабильные структуры. In vitro FtsZ формирует лишь относительно короткие филаменты (порядка 100 нм в длину). Предполагается, что короткие филаменты в клетке соединяются друг с другом и образуют более сложные структуры, в частности, Z-кольцо.

Полимеризация FtsZ контролируется целым рядом регуляторных белков. Белок MinC ингибирует полимеризацию FtsZ вблизи полюсов клетки, в то время как FtsA и ZipA стабилизируют Z-кольцо (в *E. coli*). Отсутствие 2-х последних белков приводит к нарушению образования Z-кольца. Белок sulA в *E. coli* экспрессируется при повреждении ДНК (в состоянии SOS-ответа) и ингибирует образование Z-кольца, пока повреждение не будет репарировано

[115]. В работе [116] при помощи флуоресцентной микроскопии клеток, экспрессирующих белок слияния FtsZ с GFP, кодируемый плазмидой, было показано, что FtsZ формирует спиралевидные структуры с шагом около 200 нм (изображения получены методом деконволюции) в некоторых клетках *E. coli*, как в присутствии (рис. 2.4.1, E), так и в отсутствие Z-кольца (рис. 2.4.2, C-D).

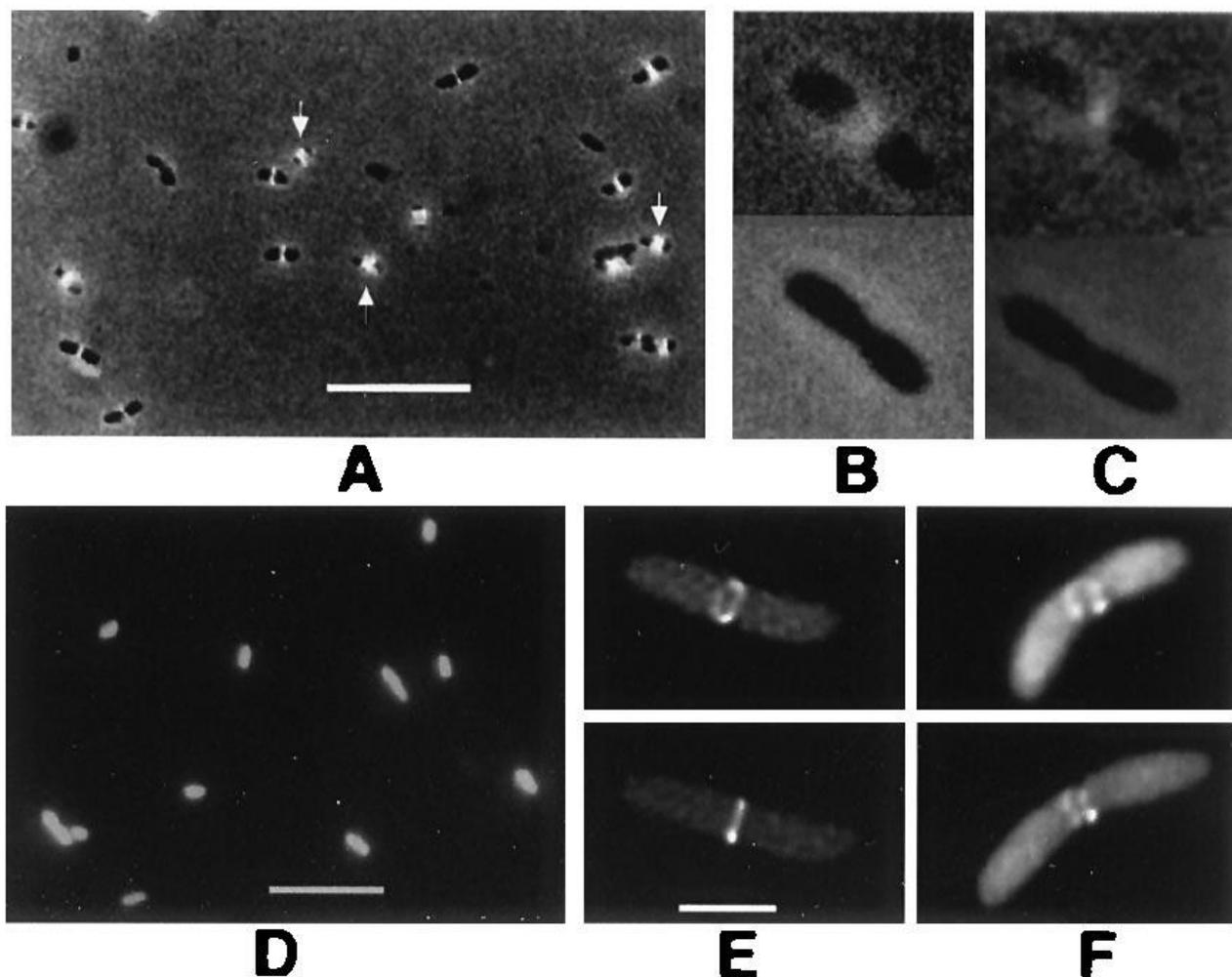


Рис. 2.4.1. Локализация FtsZ-GFP в клетках *E. coli* [116].

Кроме того, в филаментных клетках, присутствующих в нормальной культуре, были обнаружены спиралевидные структуры с периодом около 500 нм (рис. 2.4.2, E) и регулярно расположенные на расстоянии около 300 нм фокусы (рис. 2.4.2, F). Однако экспрессия флуоресцентно-меченого FtsZ в дополнение к нативному белку могла исказить формируемые этими белками структуры.

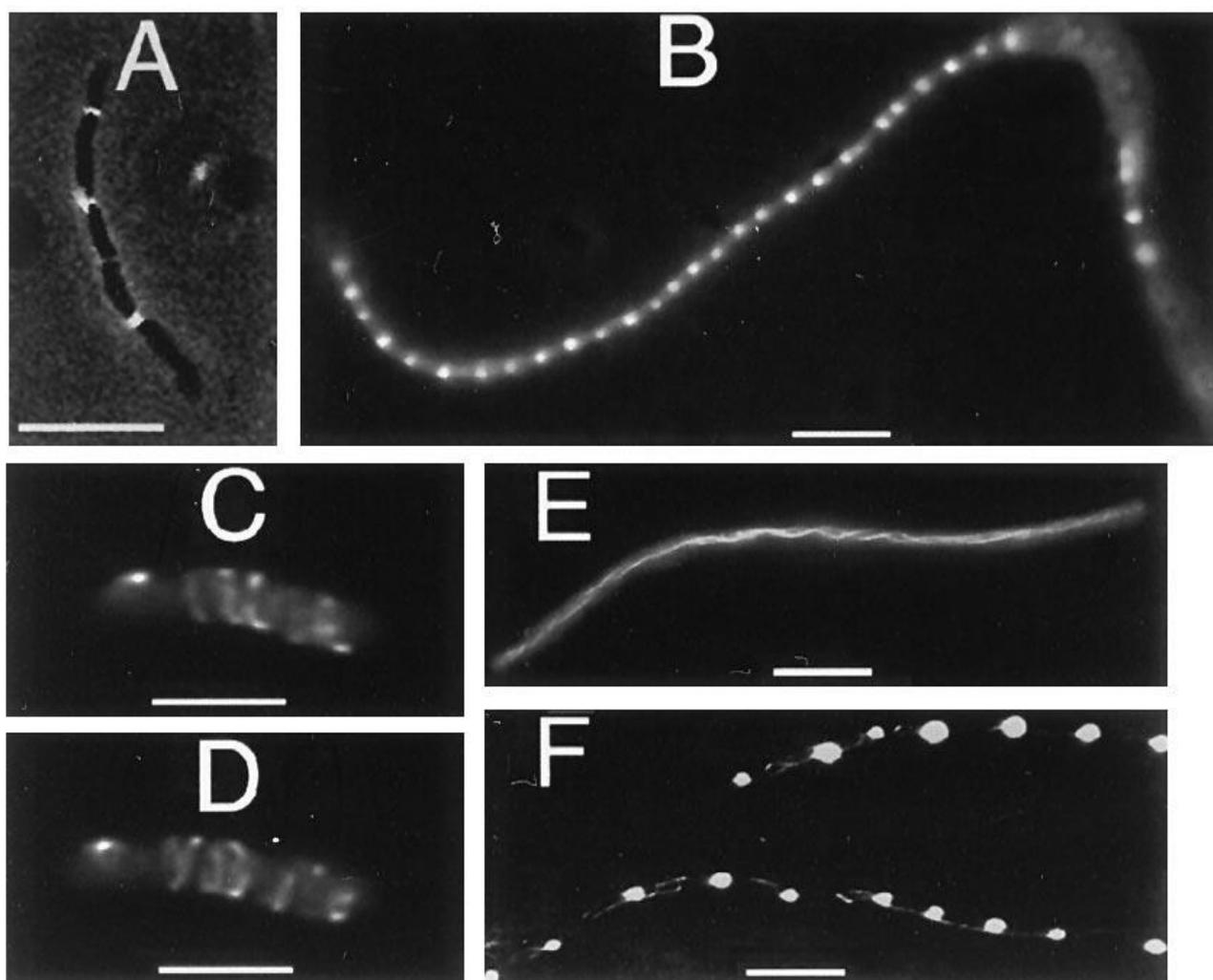


Рис. 2.4.2. Локализация FtsZ-GFP в клетках *E.coli* без Z-кольца [116].

Локализационная микроскопия компонентов бактериального цитоскелета. ЛМ активно применяется для исследования белковых структур в бактериальных клетках.. К примеру, работа [117] посвящена организации мембранных белков, образующих кластеры хемотаксиса в бактериях *E. coli*. Хемотаксис позволяет клетке активно реагировать на изменение внешних условий: мембранные рецепторы запускают механизм, заставляющий бактерию перемещаться (за счет движения жгутиков). В хемотаксис вовлечены белки Tar, CheA, CheW, CheY. Эти белки способны образовывать комплексы, состоящие из тысяч отдельных молекул (кластеры) – вместе они образуют сложную сеть, и для понимания механизмов их формирования авторы использовали метод

PALM. В работе показана справедливость теории спонтанной нуклеации и образования кластеров.

В работе [118] на примере *C. crescentus* изучалась внутриклеточная организация MreB, бактериального гомолога актина. Для визуализации структур, формируемых MreB клетки трансформировались плазмидой, кодирующей белок слияния MreB-YFP (Yellow Fluorescent Protein). Изучалась динамика отдельных молекул данного химерного белка. Для этого записывались траектории молекул, а затем полученные изображения обрабатывались с помощью локализационного алгоритма в среде MATLAB. Для возможности локализации отдельных молекул отбирались только клетки с малой концентрацией MreB-YFP (3-4 шт./клетку). Компенсация дрейфа образца в латеральном направлении осуществлялась за счет одновременной регистрации изображений отдельных квантовых точек, закрепленных в образце неподвижно (в дальнейшем траектории квантовых точек вычитались из траекторий молекул белка). В итоге оказалось возможным локализовать отдельные молекулы MreB-YFP с точностью около 15 нм, что позволило определить параметры движения (в частности, коэффициент диффузии) для каждой молекулы.

Как и ожидалось, часть молекул демонстрировала произвольную траекторию, характерную для свободной частицы, на основании чего можно сделать вывод, что это молекулы глобулярного g-MreB (по аналогии с g-актином). Другая часть молекул практически не перемещалась – молекулы f-MreB (по аналогии с f-актином). Неожиданным результатом данной работы явилось то, что для «свободных» молекул g-MreB коэффициент диффузии оказался значительно ниже теоретически рассчитанного, что авторы связывают с возможным взаимодействием MreB с мембраной и/или с комплексом других белков. Кроме того, рассчитанная скорость деполимеризации MreB *in vivo*

позволила предположить наличие дополнительного фактора деполимеризации в данных бактериях.

В работе [119] также исследовался MreB, в частности, получены изображения, отражающие организацию MreB в *C. crescentus*. В клетках, готовых к делению, белок локализуется в виде кольца примерно посередине бактерии, а в неделящихся клеток – в виде спирали.

В другой работе [120] исследуется пространственная организация белка кресцентина методом трехмерной (3D) ЛМ. Использовались методики SPRAI (Super-resolution by Power-dependent Active Intermittency) и PAINT (Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography). Обе методики являются модификациями стандартных методик ЛМ. Первая методика использовалась для детектирования молекул внутри клетки, вторая – на ее поверхности.

Для реализации 3D ЛМ использовалась аппаратная функция (АФ) в виде двойной спирали (АФДС). Особенностью такого метода 3D ЛМ является то, что изображением каждой точки являются два максимума, взаимная ориентация (поворот) которых зависит от аксиального положения молекулы, что позволяет по изображению молекулы определить её аксиальное положение.

Для визуализации использовались 2 красителя: eYFP (enhanced YFP) для SPRAI и Nile Red для PAINT. Т.к. красители имеют схожий спектр возбуждения, использовался единственный лазер, и изображения с каждым из красителей получали последовательно. Вначале получали около 15000 изображений с eYFP, затем около 25000 с Nile Red.

В согласии с предшествующими исследованиями, было установлено образование кресцентинном продолговатого филамента вдоль внутренней стенки бактерии. Также было получено трехмерное изображение клетки (см. рис. 2.4.3).

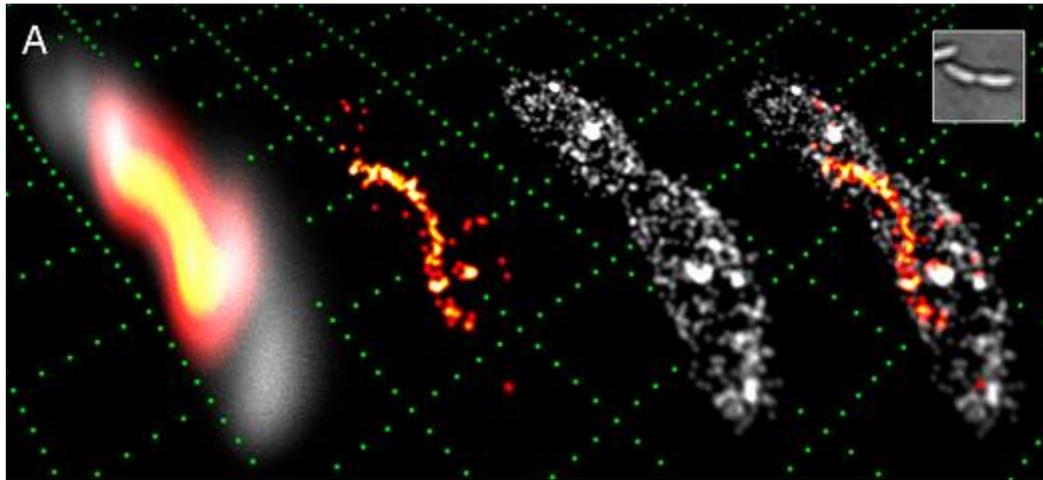


Рис. 2.4.3. 3D изображения клеток *C. crescentus* с использованием ЛМ. Красным и желтым обозначен кресцентин, серым – мембрана. Слева направо: дифракционно-ограниченное изображение во флуоресцентном режиме; кресцентин (ЛМ); мембрана (ЛМ); совмещенный вид. В правом верхнем углу – изображение клеток на просвет. Шаг сетки – 1 мкм. [120]

В работе [121] на примере *C. crescentus* исследуется система разделения хромосом в ходе клеточного деления. Эта система образована парой белков – ParA и ParB, которые конкурируют между собой за связывание с ДНК. Первый белок является АТФазой и образует протяженные филаменты, способствующие расхождению хромосом, второй – ингибирует активность первого, таким образом регулируя процесс расхождения. Наличие мутаций в генах *parA* и *parB* приводит к ошибкам в разделении хромосом. Для визуализации использовали мутантные бактерии, экспрессирующие флуоресцентные химерные белки ParA-eYFP и ParB-mCherry.

В работе, в частности, было установлено, что ParA образует линейную структуру вдоль клетки толщиной около 40 нм, причем до разделения хромосом, во время и после неё структура заметно различается.

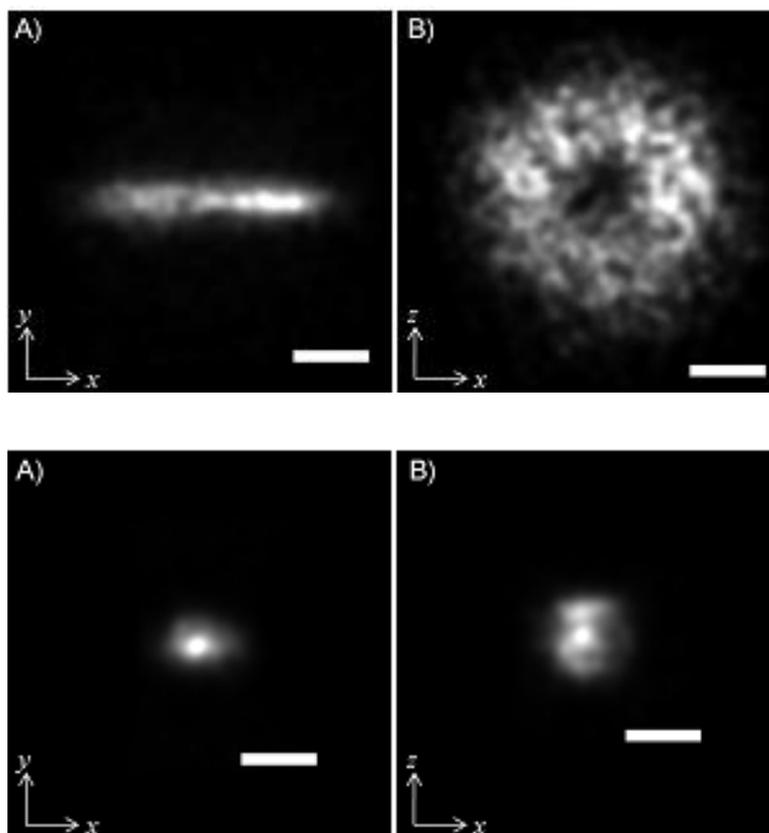


Рис. 2.4.4. 2D проекции 3D-ЛМ изображений FtsZ в живых бактериях *C. crescentus*. А – в аксиальном направлении, В – в латеральном направлении. Вверху – стационарная клетка, внизу – непосредственно перед делением. [28]

Работа [28] также посвящена исследованию бактерий *C. crescentus*. В данном исследовании методом ЛМ визуализировалась пространственная организация FtsZ в различные фазы клеточного цикла (см. рис. 2.4.4). Для реализации 3D ЛМ использовался искусственный астигматизм: помещенная между объектом и камерой цилиндрическая линза деформирует изображение таким образом, что по форме изображения молекулы можно определить аксиальное положение молекулы. Разрешение в аксиальном направлении составляло менее 100 нм. Для визуализации использовался FtsZ, эндогенно-меченый при помощи фотопереключаемого флуоресцентного белка Dendra2. Исследовались как живые, так и фиксированные клетки.

Наблюдение производилось следующим образом: вначале возбуждающим лазером с длиной волны 561 нм «выжигались» молекулы, спонтанно

переключившиеся из зеленого в красный канал флуоресценции. Затем лазерный импульс на длине волны 407 нм (0,5 с при плотности мощности 2 кВт/см²) переключал небольшую часть молекул красителя в красное флуоресцентное состояние, после чего вновь включался возбуждающий лазер, и записывались серии изображений отдельных молекул. Затем цикл (с периодом около 15 с) повторялся. Латеральное разрешение составило 30 нм, аксиальное – менее 100 нм. Изображения, полученные в субдифракционном режиме, позволили оценить форму и размеры z-кольца: оно представляет собой тор с внешним диаметром, соответствующим толщине клетки (650 нм), и размером отверстия около 150 нм.

В одной из последних работ по изучению белка FtsZ в бактериях *S. crescentus* [32] изучалось в частности образование этим белком структур в состоянии SOS-ответа. Интересно, что в SOS-ответе в бактериях данного вида в отличие, например, от *E.coli*, образуется z-кольцо, однако оно обладает иной морфологией (в частности, увеличенным размером). Эта особенность объясняется, по-видимому, иными механизмами остановки клеточного деления, чем ингибирование полимеризации FtsZ (как в *E.coli*) или образования z-кольца (*B.subtilis*).

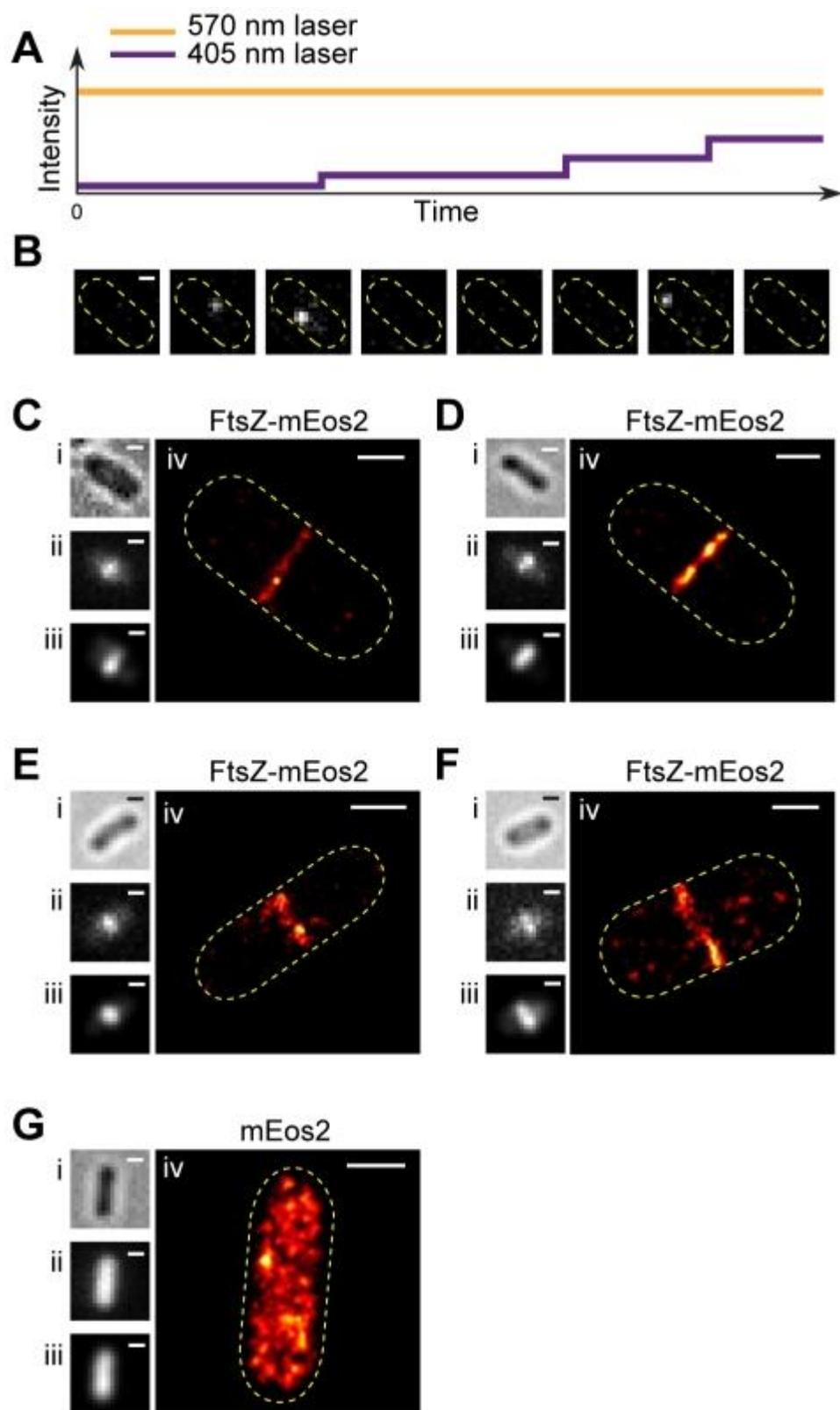


Рис. 2.4.5. ЛМ-изображения белка слияния FtsZ-mEos2 в клетках *E. coli* [31].

В работе [31] с использованием белка слияния FtsZ с фотоактивируемым белком mEos2, кодируемого плазмидой, были получены ЛМ-изображения Z-

кольца (рис. 2.4.5, С-F). Полученные изображения не содержат спиральных структур вдали от центра клетки, что находится в очевидном противоречии с данными, полученными в работе [116]. Это может быть вызвано в частности артефактами, связанными с использованием белков слияния наряду с немеченным геномным FtsZ. Это противоречие подчеркивает важность сравнения данных, получаемых с использованием белков слияния и иммунофлуоресцентного окрашивания, для того, чтобы сделать достоверные выводы о структурах, формируемых белками цитоскелета бактерий.

2.5. Механизм переключения активности актин-связывающего белка виллина

Виллин – модульный белок, состоящий из 826 аминокислотных остатков и относящийся к суперсемейству гельзолин-подобных актинсвязывающих белков [34], куда также входят, помимо прочих, северин [35], гельзолин [34], супервиллин [36] и архвиллин [37]. Виллин участвует в поддержании микроворсинок в клетках эпителия кишечника и почек [38]. Аминокислотную последовательность этого белка можно разделить на две части: гельзолин-подобное ядро на N-конце и небольшой домен («headpiece», HP) на C-конце, который соединен с ядром неструктурированным линкером длиной 40 аминокислотных остатков [34, 122] (рис. 2.5.1, в). Ядро виллина примерно на 50% идентично гельзолину по аминокислотной последовательности и состоит из 6 гомологичных повторов V1-V6 (рис. 2.5.1, в), последний из которых V6 соединен линкером с HP доменом [34].

В регуляции активности виллина участвует ряд факторов, включая уровень кальция [34], фосфорилирование [38] и другие. При физиологическом уровне кальция виллин способен пучковать (bundle) актиновые филаменты (F-актин), а в ответ на повышение уровня кальция [34] или фосфорилирование [123] – нуклеировать, разрезать или блокировать их рост. Гельзолин также обладает способностью фрагментировать актиновые филаменты в ответ на повышение

уровня кальция, для чего требуется около 10 мкМ $[Ca^{2+}]$ [39]. Способность виллина фрагментировать F-актин в свою очередь активируется при 100 - 200 мкМ $[Ca^{2+}]$ [40], такие высокие концентрации кальция достигаются в клетке только при клеточном стрессе и апоптозе. Фосфорилирование ядра виллина, в том числе, домена V6, делает возможным фрагментирование актиновых филаментов этим белком уже при наномолярных концентрациях кальция [38, 123].

Механизм активации кальцием гельзолина изучен достаточно хорошо [39]. При низких концентрациях кальция домен G6 гельзолина формирует контакт с доменом G2, содержащим сайт связывания актина, что предотвращает связывание белка с F-актином. При связывании кальция с доменом G6 в последнем происходит конформационная перестройка, приводящая к потере контакта с доменом G2 и открытием сайта связывания F-актина. Белок при этом переходит из неактивной закрытой в активную раскрытую конформацию [39, 41].

Одним из ключевых при изучении виллина является вопрос о том, имеет ли этот белок сходный с гельзолином механизм активации открытой конформации кальцием. Гидродинамические данные свидетельствуют о том, что этот белок претерпевает масштабное конформационное изменение в зависимости от концентрации кальция с порогом около 20 мкМ, связанное с увеличением симметричности молекулы, а также максимальной длины с 84 до 123 ангстрем [124]. Исследования участка V6-HP виллина курицы, содержащий домен V6 и HP, соединенные гибким линкером, показали, что этот участок находится в состоянии мономера и способен пучковать актиновые филаменты при высоких концентрациях кальция, но при отсутствии кальция теряет эту способность и агрегирует [122]. В то же время, домен HP виллина нечувствителен к кальцию и способен при любых его концентрациях связываться с актиновыми филаментами [125-127]. В связи с этим, было

3. Материалы и методы

3.1. Исследование стохастичности экспрессии МТ и ЭР СРМ Esp1396I.

Для визуализации ЭР и МТ в клетках бактерий при помощи флуоресцентной микроскопии СРМ Esp1396I была клонирована в плазмиду, реплицируемую в клетках *Esherichia coli*. С генами ЭР и МТ были слиты последовательности, кодирующие флуоресцентные белки, таким образом, чтобы плаزمида обеспечивала синтез химерных белков ЭР::mCherry и МТ::Venus.

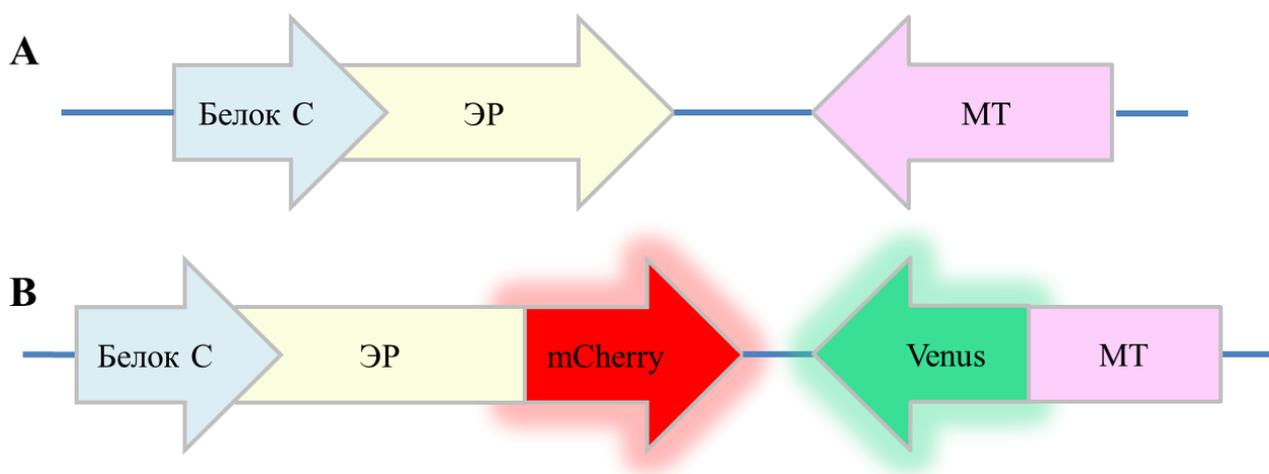


Рис. 3.1.1. Схема расположения генов в плазмидах pEsp1396IRM5.6 (А) и pEsp1396IRM.Dual (В).

В основе использованных в работе генетических конструкций лежит плазмиды pEsp1396IRM5.6 (рис. 3.1.1., А), которая была получена соединением разрезанной по сайту *Bgl* II природной плазмиды pEsp1396, несущей изучаемую систему рестрикции-модификации, и разрезанной по сайту *Bam*HI многокопийной векторной плазмиды pUC19. Плазмиды pEsp1396IRM5.6 несет систему рестрикции-модификации Esp1396I, а также ген устойчивости к ампицилину и имеет длину около 8000 пар оснований. С помощью методов генной инженерии участки ДНК, кодирующие флуоресцентные белки были

вставлены в конце каждого или обоих структурных генов Esp1396I, так что слитые белки представляют собой С-концевые слияния ферментов системы рестрикции модификации с флуоресцентными белками. На рис. 3.1.1, В, приведена схема расположения генов в плазмиде pEsp1396IRM.Dual, в которой ген ЭР слит с последовательностью, кодирующей флуоресцентный белок mCherry [128], а ген МТ – с последовательностью, кодирующей флуоресцентный белок Venus [129]. При этом все варианты модифицированных СРМ сохраняли свою активность, обеспечивая тот же уровень защиты клеток *E. coli* от инфекции бактериофагом λ , как и немодифицированный вариант системы Esp1396I.

Калибровка интенсивности флуоресценции одиночных молекул флуоресцентных белков. Образец для осуществления калибровки представлял собой бактерии *E. coli*, несущие плазмиды МТ::Venus и ЭР::mCherry, закрепленные на поверхности покрытых поли-L-лизинем покровных стекол и фиксированные формальдегидом (5 %, 1 час при +4°C).

Для осуществления абсолютной калибровки измеряемых количеств ЭР и МТ область образца, содержащая бактерии, освещалась интенсивным лазерным излучением с длинами волн 473 нм для Venus и 532 нм для mCherry. Под действием лазеров через некоторое время интенсивность флуоресценции образца начинала изменяться ступенчато, что соответствовало выгоранию одиночных молекул флуоресцентных белков. При этом на разностных изображениях для последовательных кадров образца наблюдались точечные объекты, представляющие собой флуоресцентный сигнал от одиночных молекул флуоресцентных белков, которые находились во флуоресцентном состоянии в первом кадре, но во втором переставали флуоресцировать вследствие фотообесцвечивания. Анализ таких изображений позволил оценить суммарную интенсивность флуоресцентного сигнала одиночной молекулы и определить абсолютные количества ЭР и МТ в клетках.

Построение распределений клеток *E. coli* по количествам ЭР и МТ.

Для анализа распределения клеток по концентрации ЭР и МТ использовались образцы из культур клеток, несущих плазмиду Dual. Клетки, выращенные до оптической плотности $OD_{600} \approx 0,3$ в среде LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина при 37°C, промывались PBS и закреплялись на поверхности блока агарозы, расположенного на поверхности предметного стекла. Для этого 2 мкл суспензии клеток наносились на поверхность агарозы, после чего, спустя 5 мин, накрывались покровным стеклом.

Флуоресценция белка Venus регистрировалась при помощи набора фильтров FilterSet10 (Zeiss), флуоресценция белка mCherry – при помощи набора фильтров mCherry-B (Semrock) при возбуждении ксеноновой лампой. Также для определения положения клеток регистрировались изображения в проходящем свете.

Для упрощения автоматизированной обработки данных изображения в проходящем свете регистрировались при небольшой расфокусировке, благодаря чему изображения бактерий представляют собой яркие области на темном фоне, которые хорошо поддаются автоматической сегментации. Изображения бактерий *E. coli*, экспрессирующих флуоресцентно-меченые ЭР и МТ, обрабатывались при помощи специально созданного для этой цели макроса в программе ImageJ (пакет Fiji [130]). Для пересчета средней интенсивности флуоресценции во внутриклеточную концентрацию ферментов диаметр клетки полагался равным 1 мкм.

Анализ колокализации ЭР и МТ с ДНК в клетках *E. coli*. Для сравнения внутриклеточного распределения ЭР и МТ с распределением ДНК клетки *E. coli*, несущие плазмиду Dual, росли в среде LB до оптической плотности $OD_{600} \approx 0,5$ и окрашивались ДНК-связывающим красителем Hoechst 3334 (Invitrogen) в течение 15 минут при комнатной температуре, после чего клетки иммобилизовались на поверхности агарозы (1,5%). В каждом канале

флуоресценции (Venus, mCherry и Hoechst 3334) регистрировались по 20 изображений, которые обрабатывались фильтром высоких частот для снижения фонового сигнала (функция Subtract Background пакета ImageJ с параметром Rolling ball radius 50 пикселей) и усреднялись.

Разработка камеры для длительного наблюдения за ростом клеток *E. coli* при помощи оптической микроскопии. В ходе работы был опробован ряд различных конструкций камеры для длительного наблюдения за клетками *E. coli* под микроскопом. Для этого необходимо, чтобы клетки были иммобилизованы у поверхности покровного стекла, для чего было решено использовать агарозный гель (1,5%). Эксперименты с иммобилизацией бактерий на поверхности покрытого полилизинном покровного стекла в промываемой камере продемонстрировали непригодность этой конфигурации для наблюдения за ростом бактерий в связи с тем, что большая часть бактерий закреплялась за поверхность одной точкой и их положение не было фиксированным в ходе съемки. Для поддержания роста бактерий к агарозе добавлялась питательная среда LB либо M9 с добавлением 0,5% глицерина. Кроме этого для нормального роста бактерий необходим доступ кислорода.

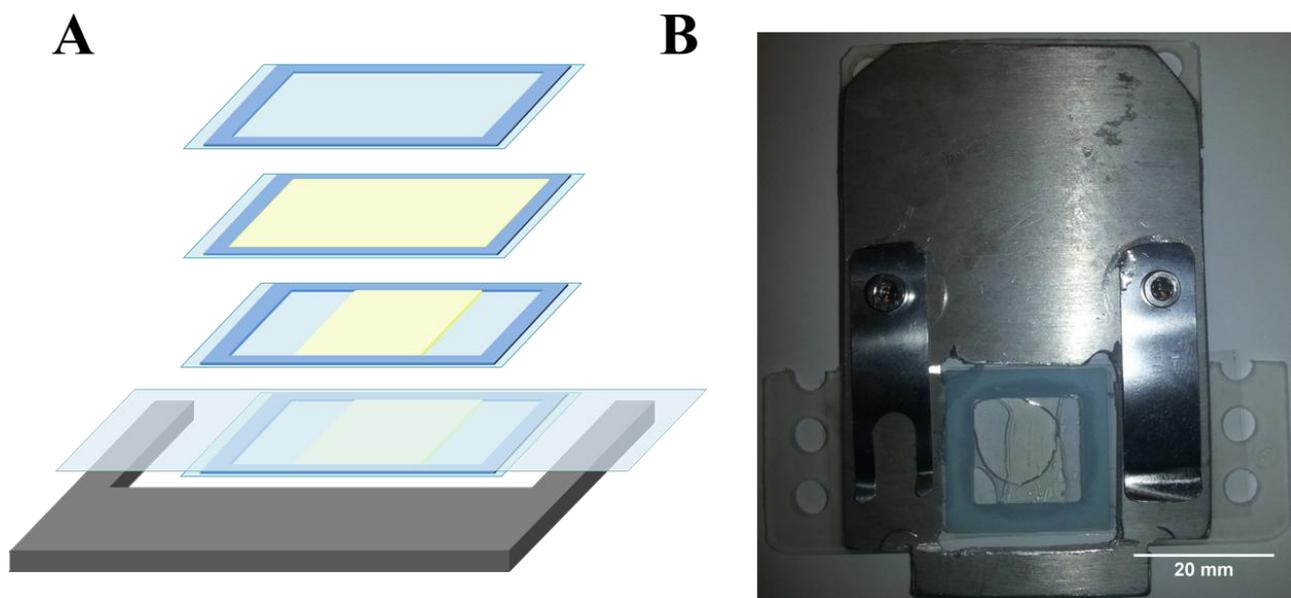


Рис. 3.1.2. Схема (А) и фотография (В) камеры для длительного наблюдения за ростом бактерий под микроскопом с фиксацией положения верхнего покровного стекла.

Из различных камер наиболее удобной оказалась конструкция, изображенная на рис. 3.1.2. Такая камера формируется при помощи рамки GeneFrame (22*22*0,25 мм), создающей герметичный карман между двумя покровными стеклами (нижним 24*24 мм и верхним 24*60 мм). Вначале рамка GeneFrame наклеивается на нижнее покровное стекло и заполняется 100 мкл агарозы (1,5%) с добавлением питательной среды, слой которой выравнивается при помощи второго покровного стекла. После затвердевания агарозы из неё вырезаются полоски по краям камеры для обеспечения доступа кислорода в ходе эксперимента. Добавление около 2 мкл дистиллированной воды сбоку от агарозного геля позволяет предотвратить высыхание геля в ходе эксперимента. Далее на поверхность агарозы наносятся 2 мкл суспензии клеток. После впитывания жидкости камера накрывается верхним покровным стеклом и устанавливается в держатель, обеспечивающий фиксацию в ходе эксперимента положения верхнего покровного стекла относительно столика микроскопа, что позволяет существенно повысить стабильность положения объекта наблюдения относительно объектива по сравнению со стандартной схемой, при которой фиксируется положение предметного стекла относительно столика микроскопа.

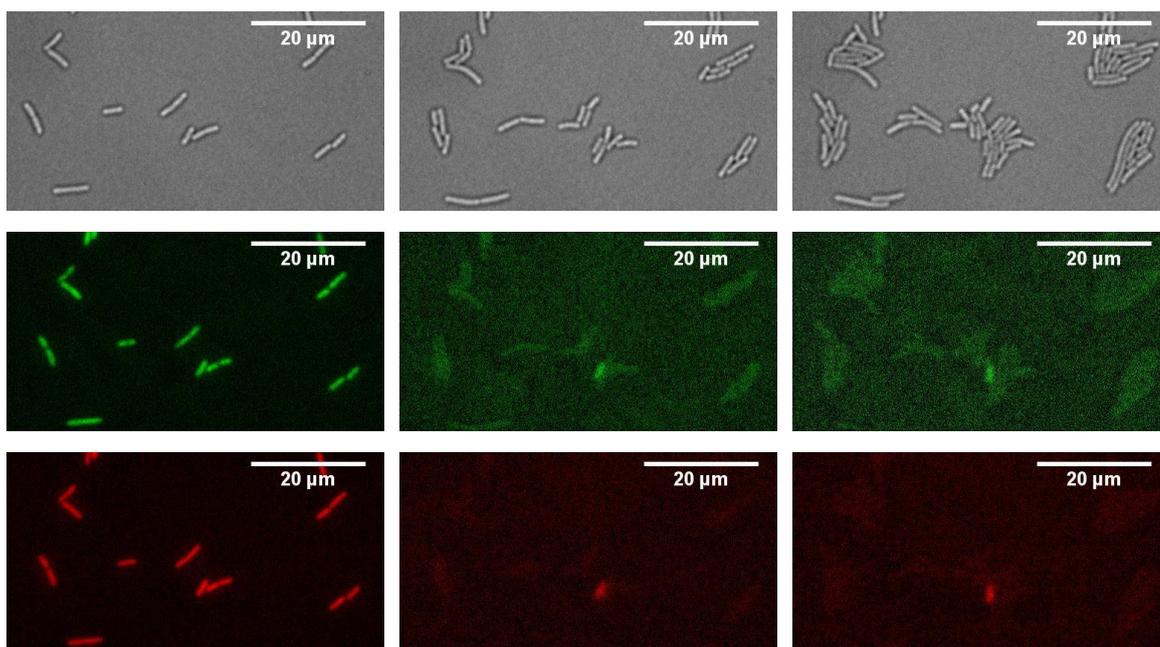


Рис. 3.1.3. Изображения бактерий *E.coli* в среде LB. В первой строке предоставлены изображения на просвет, во второй, в канале Venus, на третьей в канале mCherry, в начале эксперимента, через 60 и 120 мин.

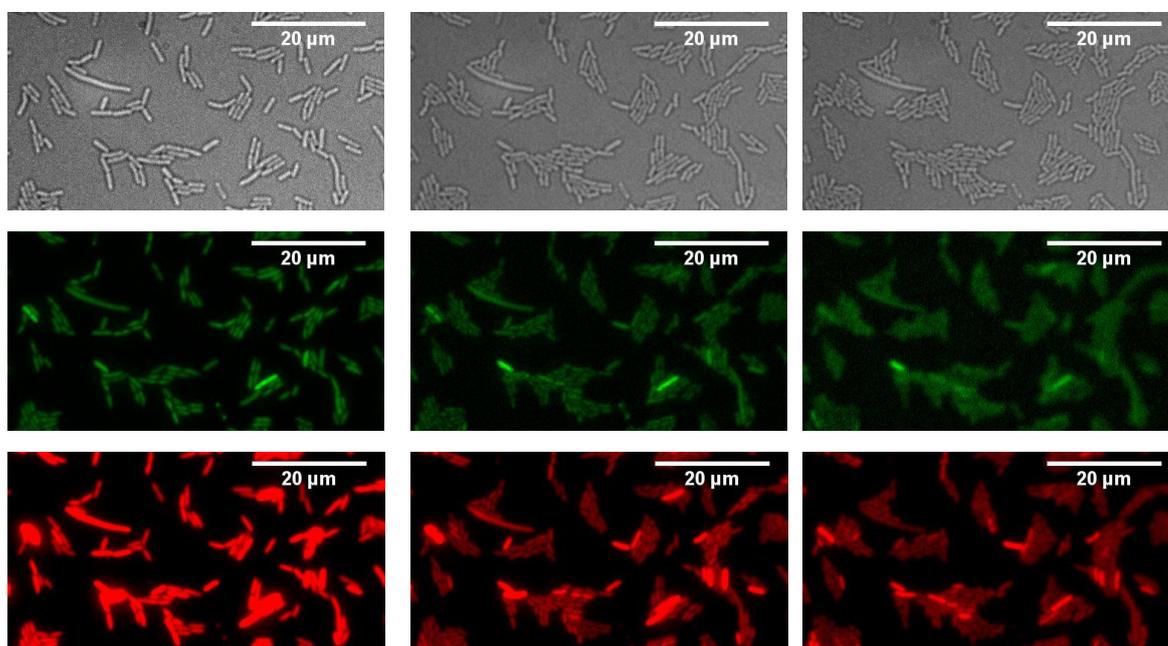


Рис.3.1.4. Изображения бактерий *E.coli* в среде M9. В первой строке предоставлены изображения на просвет, во второй, в канале Venus, на третьей в канале mCherry, в начале эксперимента, через 60 и 120 мин.

В ходе работы сравнивались питательные среды LB и M9 с добавлением 0,5% глицерина для наблюдения роста бактерий под микроскопом. На богатой среде LB (рис. 3.1.3) бактерии быстрее делятся, однако высокий фоновый сигнал не позволяет зарегистрировать флуоресценцию белков Venus и mCherry в бактериях уже спустя 60 минут после начала. Минимальная среда M9 с добавлением 0,5% глицерина приводит к более медленному делению бактерий, однако даже спустя 120 минут после начала эксперимента (рис. 3.1.4) удается уверенно зарегистрировать флуоресценцию в бактериях. В связи с этим, среда M9 с добавлением 0,5% глицерина лучше подходит для изучения динамики уровней ЭР и МТ в клетках бактерий, в то время, как LB предпочтительна при изучении «пробоя» СРМ, так как обеспечивает более быстрый рост бактерий и, соответственно, более короткий цикл заражения бактериофага.

Разработка протокола наблюдения инфекции клеток *E. coli* бактериофагом λ на уровне одиночных клеток. Для наблюдения за ростом одиночных клеток *E. coli* был создан скрипт в программном пакете MicroManager, осуществляющий автоматическую фокусировку и параллельную многоканальную съемку набора полей обзора в образце. Для осуществления фокусировки определяется минимум стандартного отклонения пикселей центральной области изображения образца на просвет. Это позволяет точно и воспроизводимо определить положение фокуса объекта во флуоресцентном режиме и минимизирует фотообесцвечивание.

Для наблюдения «пробоя» СРМ в одиночных клетках *E. coli* бактериофагом λ и сопоставления вероятности «пробоя» с количествами ЭР и МТ в клетке необходимо:

1. Регистрировать концентрации ЭР и МТ в одиночных клетках
2. Наблюдать лизис клеток бактериофагом λ

3. Убедиться в том, что вышедшие после лизиса из клетки бактериофаги метилированы и способны успешно заражать близлежащие бактерии («вторичная инфекция»)

В связи с этим в экспериментах по заражению бактериофагом использовались бактерии, содержащие плазмиду Dual с флуоресцентно-мечеными ЭР и МТ. Для контрольных экспериментов также использовались клетки *E. coli* без СРМ и бактериофаг λ , выращенный на клетках, содержащих СРМ, и, соответственно, метилированный по сайтам узнавания СРМ Esp1396I. В ходе экспериментов было показано, что лизис бактерий происходит с низкой вероятностью и в отсутствие бактериофага. В то же время, «пробой» СРМ – также достаточно редкое событие (вероятность порядка 0,1%), в связи с чем, для однозначной идентификации событий «пробоя» СРМ необходимо убедиться в том, что после лизиса клетки спустя время, соответствующее циклу размножения бактериофага, окружающие клетки также начинают лизироваться. Это свидетельствует о том, что в ходе лизиса клетки высвободились бактериофаги, способные эффективно заражать близлежащие клетки и, следовательно, метилированные. Для эффективного наблюдения «вторичной инфекции» необходимо максимизировать эффективность заражения клеток бактериофагом, для чего в среду для роста клеток, а также в гель для закрепления клеток во время эксперимента, добавляются 20 мМ MgSO₄ и 0,2% мальтозы.

Для эксперимента по заражению клеток *E. coli* бактериофагом лямбда-ночная культура клеток разводилась в 50 раз в свежей среде LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина, 20 мМ MgSO₄ и 0,2% мальтозы и клетки росли до оптической плотности OD₆₀₀≈0,5 при 37°C, после чего 10 мкл суспензии клеток смешивались в пропорции 1 к 1 с суспензией бактериофага λ с титром около 5*10⁹ и инкубировались 10 мин при +4°C и 5 мин при +37°C. Далее суспензия зараженных клеток наносилась на поверхность агарозы в камере для

наблюдения за ростом бактерий под микроскопом и регистрировались изображения набора полей обзора в образце в проходящем свете, а также во флуоресцентном режиме в каналах Venus и mCherry каждые 15 мин при помощи разработанного скрипта для программы MicroManager.

3.2. Стабилизация положения объекта для локализационной микроскопии.

Эксперименты проводились на установке «Лазерный пинцет», основанной на исследовательском моторизованном микроскопе AxioImager.Z1 (Carl Zeiss). Данная установка включает в себя возможности традиционной оптической (в т.ч. флуоресцентной) микроскопии, локализационной микроскопии и оптической ловушки. Оптическая схема смонтирована на оптическом столе с пневматической системой виброизоляции «Newport Smart Table» и расположена на независимом от здания фундаменте. Кроме того, вспомогательное оборудование (контроллеры, блоки питания и др.) смонтированы отдельно от оптического стола. Оптическая схема установки приведена на рис. 3.2.1 (для наглядности в схеме не отмечены оптические элементы, не задействованные в описываемых экспериментах).

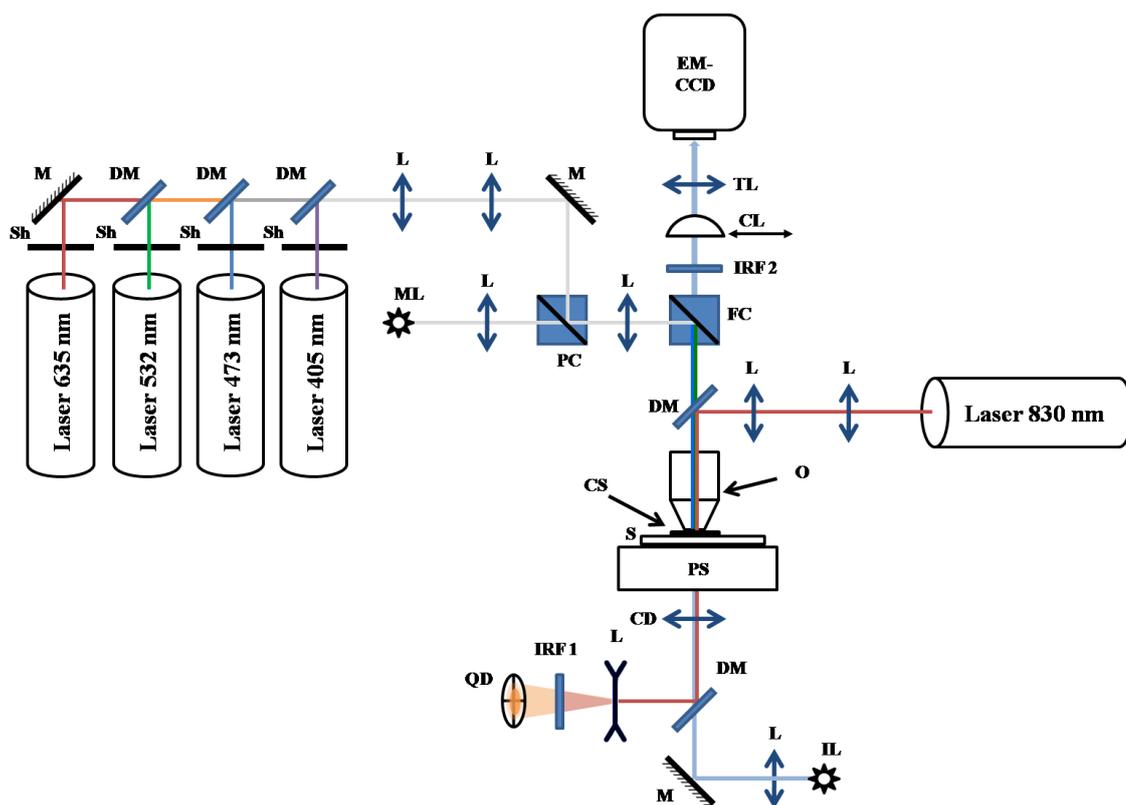


Рис. 3.2.1. Схема экспериментальной установки, относящаяся к локализационной микроскопии. CD – конденсор, CL – цилиндрическая линза, CS – покровное стекло, DM – дихроическое зеркало, EM-CCD – ПЗС камера с электронным усилением, FC – набор фильтров для регистрации флуоресценции, ПЛ – осветитель проходящего света, IRF 1 – полосовой фильтр, пропускающий свет с длиной волны близкой к 830 нм, IRF 2 – фильтр, отсекающий излучение в ближнем ИК-диапазоне, в том числе с длиной волны 830 нм, L – линза, M – зеркало, ML – ртутная лампа для возбуждения флуоресценции, O – объектив, PC – поляризационный кубик, PS – пьезостол, QD – квадрантный фотодетектор, S – образец, Sh – оптический затвор, TL – тубусная линза.

В основе системы стабилизации положения объекта для ЛМ лежит метод определения положения микросферы при помощи квадрантного детектора. Изображение микросферы на детекторе формируется при помощи лазера (Qiortiq iFLEX-2000, 830 нм, 50 мВт, TEM00, DPSS), фокусируемого чуть выше положения микросферы. Это позволяет по сигналам с квадрантного фотодетектора определять положение микросферы в трех измерениях (рис. 3.2.2).

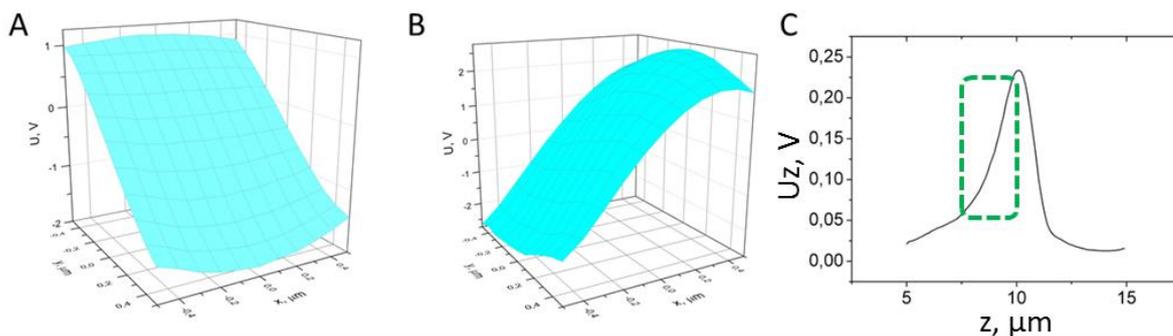


Рис. 3.2.2. Калибровочные кривые системы квадрантного детектирования положения микросферы. А – зависимость сигнала U_y от положения микросферы в плоскости xy , В - зависимость сигнала U_x от положения микросферы в плоскости xy , С – зависимость сигнала U_z от положения микросферы вдоль оси z . Оптимальная для работы системы стабилизации положения объекта область по оси z выделена пунктирным прямоугольником.

Для стабилизации положения образца на этапе пробоподготовки на поверхности покровного стекла закрепляются микросферы из ПММА диаметром 2,35 мкм (Bangs Laboratories). Перед активацией алгоритма стабилизации луч лазера автоматически центрируется на одной из микросфер посредством нахождения локального максимума суммарной интенсивности попадающего на детектор света. Данее осуществляется калибровка зависимостей сигналов с детектора от положения микросферы, перемещаемой при помощи пьезостолика $U_x(x)$, $U_x(y)$, $U_y(x)$, $U_y(y)$ и $U_z(z)$. Эти зависимости аппроксимируются линейными функциями и далее используются в ходе работы алгоритма для пересчета сигналов с детектора в положение микросферы. Положение фокуса следящего лазера при необходимости подстраивается для обеспечения максимальной чувствительности определения аксиального положения микросферы. В ходе основного цикла работы алгоритма последовательно осуществляются измерение сигналов с квадрантного детектора, вычисление положения микросферы и сдвиг пьезостолика для компенсации отклонения микросферы от начального положения (для предотвращения самовозбуждения вектор сдвига пьезостолика домножается на

коэффициент обратной связи β , находящийся в пределах от 0,1 до 0,8). Вблизи максимума U_z мало зависит от x и y , однако, если микросфера смещается на значительное расстояние от начального положения в плоскости xu , зависимость $U_z(x,y)$ становится существенной. Поэтому, в случае, если сдвиг микросферы от начального положения превышает пороговое значение R_{\max} , обычно принимаемое равным 100 нм, алгоритм смещает пьезостолик только в плоскости xu до тех пор, пока микросфера не окажется снова достаточно близко к исходному положению в плоскости xu для надежного вычисления её аксиального положения. Схема работы алгоритма стабилизации приведена на рис. 3.2.3.

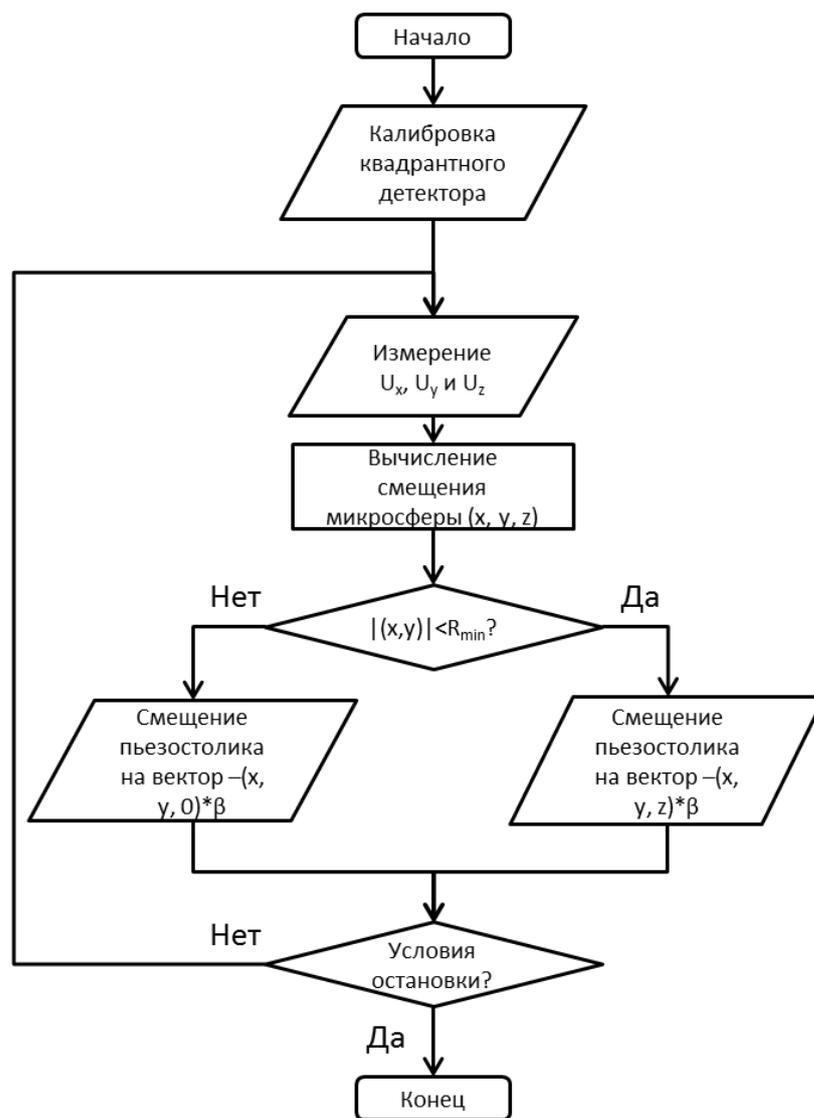


Рис. 3.2.3. Схема алгоритма стабилизации положения объекта для ЛМ.

Зависимости сигналов с квадрантного детектора от положения микросферы сами могут быть подвержены флуктуациям, одним из основных источников которых могут являться флуктуации интенсивности излучения следящего лазера. Поэтому сигналы с квадрантного детектора сами по себе не могут служить адекватной оценкой достигаемого уровня стабильности образца. Для определения эффективности стабилизации объекта использовалась возможность точного определения положения флуоресцентных микросфер по их изображениям в трех измерениях (с использованием искусственного астигматизма за счет введения в оптический путь регистрации флуоресценции

цилиндрической линзы для увеличения точности определения аксиального положения микросферы).

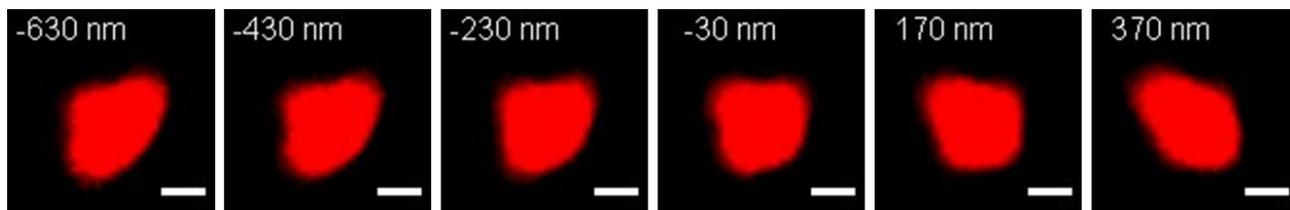


Рис. 3.2.4. Изображения флуоресцентной микросферы при различных положениях её по оси z . Изображения регистрировались при наличии в оптическом пути цилиндрической линзы. Шкала 1 мкм.

Тестовые образцы представляли собой промываемые камеры между покровным и предметным стеклами, в которых на поверхности покровного стекла были закреплены два типа микросфер: ПММА микросферы диаметром 2.35 мкм для работы алгоритма стабилизации и флуоресцентные микросферы из полистирола диаметром 1 мкм (Invitrogen, FluoSpheres Neutravidin red fluorescent 580/605) для независимой регистрации дрейфа объекта. Флуоресценция микросфер регистрировалась при помощи набора фильтров mCherry (Semrock, BrightLine 40LP ZERO) с экспозицией 100 мс и частотой 1 Гц. В ходе эксперимента в оптический путь микроскопа была добавлена цилиндрическая линза, в связи с чем положение фокуса по осям x и y различались и форма изображения микросферы менялась в зависимости от положения её по оси z .

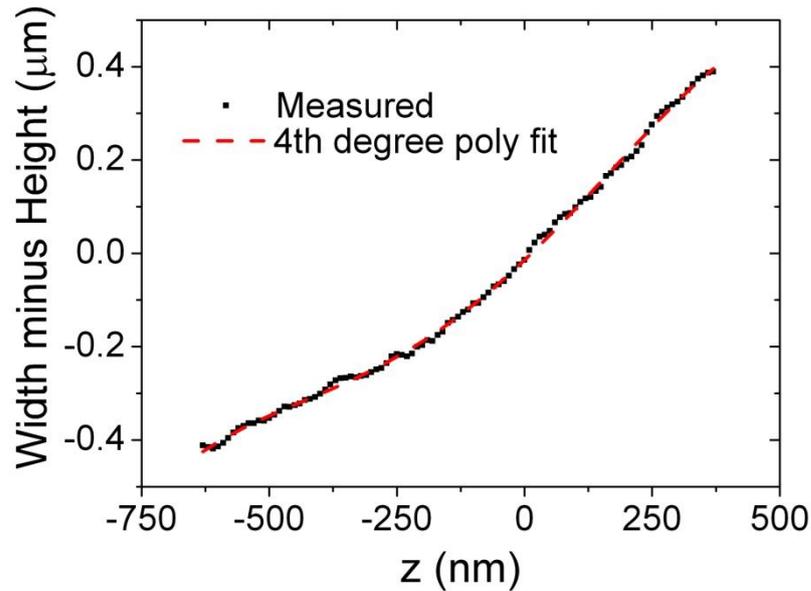


Рис. 3.2.5. Зависимость параметра формы изображения от положения микросферы по оси z .

На рис. 3.2.4 приведены изображения микросферы при различных положениях её по оси z . В качестве параметра, характеризующего форму изображения микросферы, использовалась разность полной ширины изображения на полувысоте по осям x и y . Ось цилиндра линзы не совпадает с осями ПЗС-камеры, поэтому на этапе обработки изображения микросферы поворачивались на 40 градусов против часовой стрелки. Обработка изображений микросферы осуществлялась при помощи плагина QuickPALM [102] для пакета ImageJ [131, 132] (сборка Fiji [130]). Для построения калибровочной зависимости параметра формы изображения от положения микросферы по оси z использовалась функция Create 3D calibration плагина QuickPALM, полученная калибровочная зависимость представлена на рис. 3.2.5. Далее изображения микросферы в ходе эксперимента анализировались при помощи функции Analyze Particles плагина QuickPALM.

3.3. Локализационная микроскопия FtsZ в клетках *E. coli*.

В работе использовался штамм *E. coli* KD403, геном которого содержит CRISP-R систему (гены *casA-E*, 1,2 под контролем арабинозного промотора и

ген *cas3* под контролем *lac*-промотора) с праймером к сайту в геноме бактерии. В связи с этим, добавление индукторов (арабинозы и IPTG) приводит к появлению двунитевых разрывов в геноме бактерии и активации SOS-ответа. Бактерии росли при 37°C до оптической плотности $OD_{600} \approx 0,5$, после чего окрашивались при помощи первичных антител кролика к белку FtsZ (Acris) и вторичных антител козы, конъюгированных с флуорофорами ATTO-532 (Active Motif) или Cage 635 (Abberior).

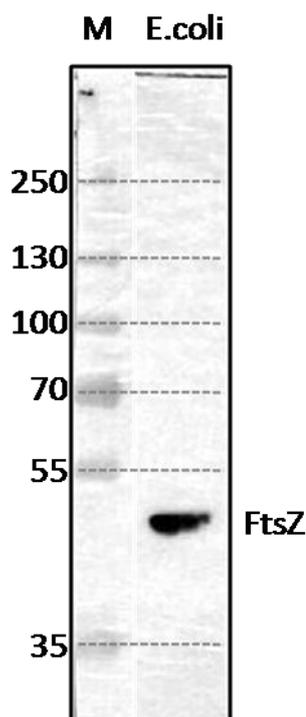


Рис. 3.3.1. Western-blot клеточного лизата *E. coli* с первичными антителами к белку FtsZ *E.coli*.

Проверка специфичности первичных антител была проведена методом Western-blot. Электрофорез клеточных лизатов *E.coli* и *M.Hominis* проводили в 8% ДДС-ПААГ. В эксперименте использовали маркеры молекулярного веса PageRuller (ThermoScientific). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану Hybond (Amersham) осуществляли полусухим способом в буфере трис-лициновом буфере с 20% метанола в течение 1,5 часа при напряжении 100 В.

Далее мембрану инкубировали на шейкере 10 мин в буфере PBS+0,1% Tween 20 (далее PBS-Tween), а затем инкубировали 1 час в 5% обезжиренном сухом молоке в буфере PBS-Tween. Инкубацию с первичными антителами осуществляли в течение 1 часа в буфере PBS-Tween, после чего мембрану в течение 30 мин отмывали в буфере PBS-Tween (6 смен буфера). В качестве вторичных антител использовали козы анти-кроличьи антитела конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma) в разведении 1:6000 в буфере PBS-Tween. Детекция осуществлялась при помощи набора реагентов Pierce ECL. Антитела к FtsZ *E.coli* использовались в разведении – 1:500. Результаты эксперимента подтвердили специфичность первичных антител (рис. 3.3.1).

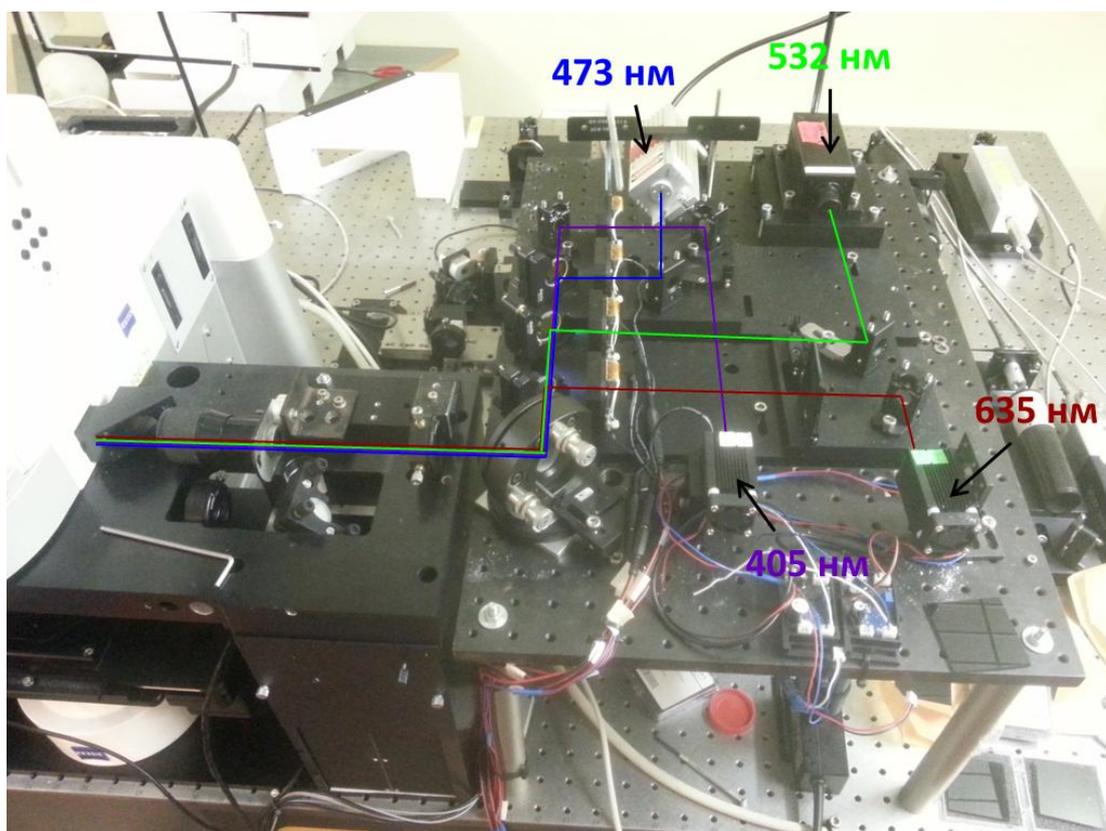


Рис. 3.3.2. Фотография модернизированной системы возбуждения флуоресценции. На фото обозначены лазеры с длинами волн излучения 405 нм, 473 нм, 532 нм и 635 нм, а также соответствующие оптически пути.

Для осуществления локализационной микроскопии была создана дополнительная оптическая схема возбуждения флуоресценции (рис. 3.3.2). Излучение четырех лазеров с длинами волн 405 нм (диодный лазер с максимальной мощностью излучения 500 мВт), 473 нм (твердотельный лазер с диодной накачкой, 200 мВт), 532 нм (твердотельный лазер с диодной накачкой, 100 мВт) и 635 нм (диодный лазер, 500 мВт) сводится в единый луч при помощи дихроических зеркал (Semrock) и через резервный порт микроскопа и набор фильтров для регистрации флуоресценции попадает на объектив микроскопа, который фокусирует его в область диаметром около 40 мкм в фокальной плоскости. Набор оптических затворов, управляемых вручную и при помощи персонального компьютера, позволяет в зависимости от потребностей эксперимента независимо перекрывать или открывать оптические пути всех четырех лазеров. При использовании в ходе эксперимента нескольких лазеров (например, 635 нм для возбуждения флуоресценции и 405 для активации молекул красителя) входной фильтр набора для регистрации флуоресценции демонтировался из держателя и перемещался в оптический путь лазера с длиной волны 635 нм, что позволяет с одной стороны обеспечить доступ излучения с длиной волны 405 нм в образец, с другой – подавить длинноволновой «хвост» спектра излучения диодного лазера с длиной волны 635 нм, который в противном случае создает значительный фоновый сигнал при регистрации флуоресценции.

Окрашивание осуществлялось в промываемых камерах, образованных между покровным и предметным стеклами при помощи двухсторонней клейкой ленты толщиной 130 мкм (Scotch). Для закрепления бактерий и микросфер для стабилизации поверхности камеры покрывались поли-L-лизином (Sigma-Aldrich, 0,1%, 30 мин). Сначала на поверхности покровного стекла закреплялись микросферы из ПММА (Bangs Laboratories, 2,35 мкм, 1 к 500 в 10-кратном PBS, 15 мин покровным стеклом вниз). Далее аналогичным образом на поверхности покровного стекла закреплялись бактерии (10 мин). Образцы

фиксируются при помощи смеси метанола, уксусной кислоты и дистиллированной воды в соотношении 3:1:4 (также были опробованы другие протоколы фиксации, однако именно этот обеспечивал наиболее качественные результаты). Затем осуществлялась обработка в течение 5 мин раствором лизоцима (Sigma-Aldrich, 5 мкг/мл) в буфере GTE (Tris 32.5 мМ, рН = 7,5 глюкоза 50 мМ, ЭДТА 10 мМ) для разрушения клеточной стенки. Блокирование неспецифического связывания осуществлялось при помощи БСА (20 мг/мл, 30 мин). Инкубация с первичными антителами осуществлялась в течение ночи при +4°C, со вторичными – 1 час при комнатной температуре, после пятикратной промывки 0,05% Tween в PBS. В некоторые образцы также добавлялся на 10 мин краситель YOYO-1 в концентрации 100 нМ для визуализации ДНК.

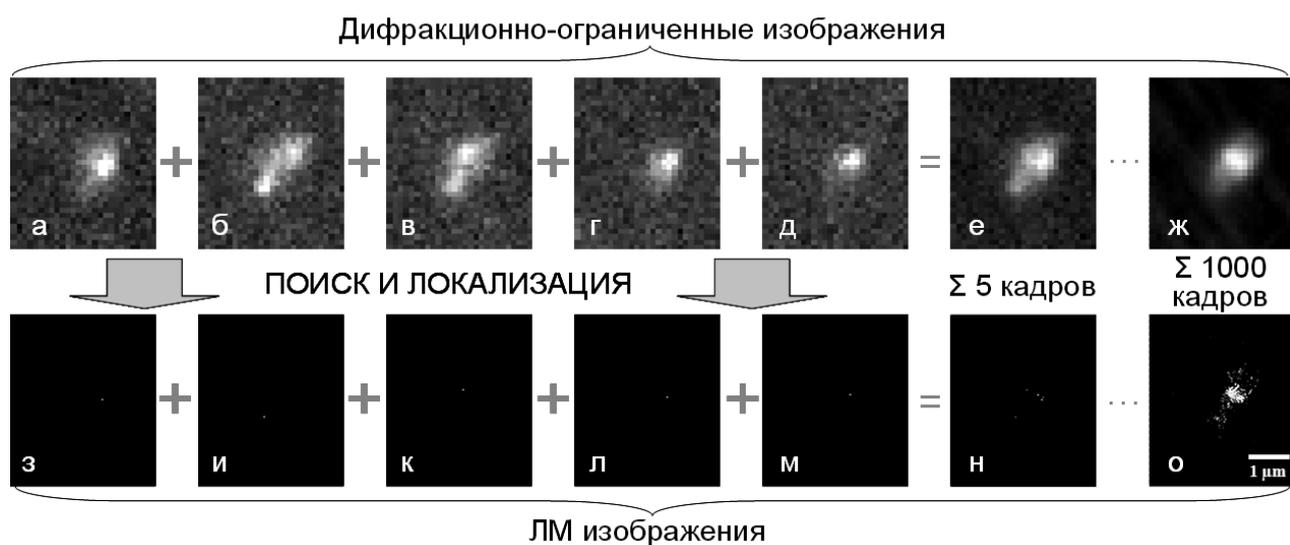


Рис. 3.3.3. Исходные данные и реконструкция субдифракционного изображения FtsZ в клетках *E. coli*. а-д – кадры образца, содержащие изображения одиночных молекул Sage 635, и локализованные положения молекул (з-м). е-ж – усредненные по 5 и 1000 кадров соответственно изображения образца, н-о – реконструированные по 5 и 1000 кадров соответственно субдифракционные изображения образца.

Для получения данных ЛМ образец, окрашенный вторичными антителами с красителем Sage 635, одновременно освещался диодными лазерами с длинами волн 635 нм (10 кВт/см^2 – возбуждение флуоресценции молекул красителя) и

405 нм (около 100 Вт/см^2 – активация молекул красителя). При помощи EM-CCD камеры регистрировалось от 1000 до 10000 кадров, содержащих одиночные флуоресцентные молекулы, с экспозицией 100 мс (рис. 3.3.3, а-д). Для регистрации флуоресценции использовался набор фильтров Semrock LF635/LP-B, входной фильтр которого был перемещен в оптический путь лазера с длиной волны 635 нм. Сбор данных осуществлялся при активном алгоритме стабилизации положения объекта. Для реконструкции ЛМ-изображений использовался плагин ThunderSTORM [103] для ImageJ [131, 132], осуществляющий обнаружение изображений одиночных молекул и их локализацию с последующей реконструкцией субдифракционного изображения (см. рис. 3.3.4).

3.4. Исследование взаимодействия домена 6 виллина с кальцием.

Подготовка образца V6 домена виллина. Процедура экспрессии и выделения домена 6 виллина была подробно описана ранее [41]. Домен V6 сверхэкспрессировался в клетках *E.coli* клеточной линии BL21(DE3) (Novagen), после чего клетки лизировались и лизат подвергался двум этапам хроматографической очистки на колонках Sephadex G50 и GE Superdex 75 HP-SEC. Лизирование и хроматография осуществлялись в буфере А (150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂, 5 мМ дитиотрейтол, 0,01% NaN₃, 20 мМ PIPES; pH = 7,0).

Для перевода белка в буфер без кальция осуществлялся обмен буфера с использованием мембранных концентраторов Millipore (порог отсечения 3 кДа), после чего к образцу добавлялся стократный избыток этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), которая затем также удалялась посредством обмена буфера.

Флуориметрические исследования. Для регистрации собственной флуоресценции остатков триптофана в белке использовался флуориметр Cary Eclipse (Varian). Для исследования обратимости связывания домена V6 виллина

с кальцием к образцу белка концентрации 10 мкМ в буфере А добавлялась EDTA до концентрации 5 мМ, что приводило к снижению концентрации кальция не менее, чем на два порядка. После этого концентрация кальция в растворе восстанавливалась до уровня 5 мМ добавлением раствора CaCl₂. В ходе эксперимента регистрировались спектры флуоресценции образца в диапазоне от 290 до 500 нм при возбуждении на длине волны 280 нм.

Регистрация динамики установления равновесия при добавлении кальция к домену V6 виллина осуществлялась в акриловой УФ-прозрачной кювете при непрерывном перемешивании при помощи магнитной мешалки. В образец объемом 2,25 мл и концентрацией V6 2,23 мкМ добавлялся раствор CaCl₂ до концентрации 5,0 мМ. При этом регистрировалась динамика интенсивности флуоресценции образца на длине волны 350 нм при возбуждении на длине волны 280 нм.

Титрование домена V6 виллина кальцием осуществлялось посредством добавления к образцу в кювете (концентрация белка 2,23 мкМ, объем 1000 мкл) по 1 мкл раствора CaCl₂ соответствующих концентраций (от 0,6 мМ до 0,6 М). После каждого добавления кальция образец инкубировался 2 мин для установления равновесия, после чего осуществлялось 100-кратное измерение уровня флуоресценции на длине волны 350 нм при возбуждении на 280 нм с экспозицией 0,2 сек. Время инкубации было выбрано с учетом данных о кинетике установления равновесия при добавлении кальция к домену V6 виллина (рис. 9), демонстрирующих, что установление равновесия занимает менее 10 с.

Обработка кривой титрования осуществлялась двумя моделями, описывающими обратимое независимое связывание лиганда с одним или двумя сайтами в белке соответственно:

$$I = I_0 + \Delta I_1 * \frac{V6 + Ca + Kd_1 - \sqrt{V6 + Ca + Kd_1^2 - 4 * V6 * Ca}}{2 * V6}$$

и

$$I = I_0 + \Delta I_1 * \frac{V_6 + Ca + Kd_1 - \sqrt{V_6 + Ca + Kd_1^2 - 4 * V_6 * Ca}}{2 * V_6} +$$
$$+ \Delta I_2 \frac{V_6 + Ca + Kd_2 - \sqrt{V_6 + Ca + Kd_2^2 - 4 * V_6 * Ca}}{2 * V_6}$$

где I – регистрируемая интенсивность флуоресценции; I_0 – интенсивность флуоресценции белка, свободного от кальция; ΔI_1 – разность между интенсивностями флуоресценции белка, первый сайт которого связан с кальцием и свободного от него; ΔI_2 – разность между интенсивностями флуоресценции белка, оба сайта которого связаны с кальцием, и белка, первый сайт которого связан с кальцием; $[V_6]$, $[Ca^{2+}]$ – концентрации белка и кальция; Kd_1 , Kd_2 – константы диссоциации для реакции связывания первого и второго сайта белка с кальцием соответственно.

4. Результаты и обсуждение

4.1. Распределения клеток *E. coli* по концентрации ЭР и МТ СРМ Esp1396I.

Полученные флуоресцентные изображения (рис. 4.1.1) клеток *E. coli*, содержащих плазмиду, кодирующую СРМ Esp1396I, ЭР и МТ в которой слиты с флуоресцентными белками mCherry и Venus соответственно, позволили проанализировать внутриклеточное распределение этих ферментов, а также вариации их концентраций от клетки к клетке (рис. 4.1.2).

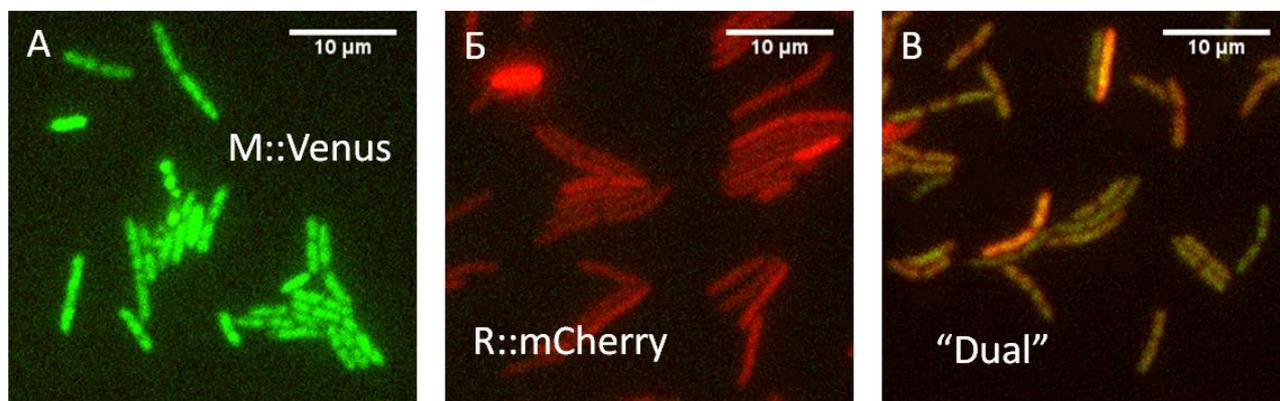


Рис.4.1.1. Флуоресцентные изображения бактерий *E.coli*, экспрессирующих флуоресцентные белки слияния компонентов СРМ Esp1396I А – МТ с белком Venus, Б – ЭР с белком mCherry, В - МТ с Venus и ЭР с mCherry одновременно.

Были определены параметры распределения клеток по количествам и концентрациям ЭР и МТ. Среднее количество (\pm стандартное отклонение) молекул ЭР на клетку составило 610 ± 480 , МТ - 230 ± 100 , концентрации: ЭР - 360 ± 230 нМ, МТ - 140 ± 40 нМ. Таким образом, среднее количество ЭР в 2,6 раза больше, чем МТ. Кроме того, коэффициент вариации (отношение стандартного отклонения к среднему значению) ЭР в 2,8 раза выше, чем МТ (0,64 против 0,27). Анализ корреляции концентраций ЭР и МТ (рис. 4.1.2, В) показывает, что распределение распадается на две части: основная часть бактерий (обозначена черной штриховой линией на графике) демонстрирует значительную

корреляцию между уровнями ЭР и МТ (коэффициент корреляции 0,56), однако часть бактерий (около 5 %) содержат аномально высокое количество ЭР при незначительном превышении среднего уровня МТ. На рис. 4.1.2, С представлено распределение клеток по соотношению концентраций МТ и ЭР. Эти данные показывают, что относительные уровни рестриктазной и метилазной активности могут варьироваться в достаточно широких пределах.

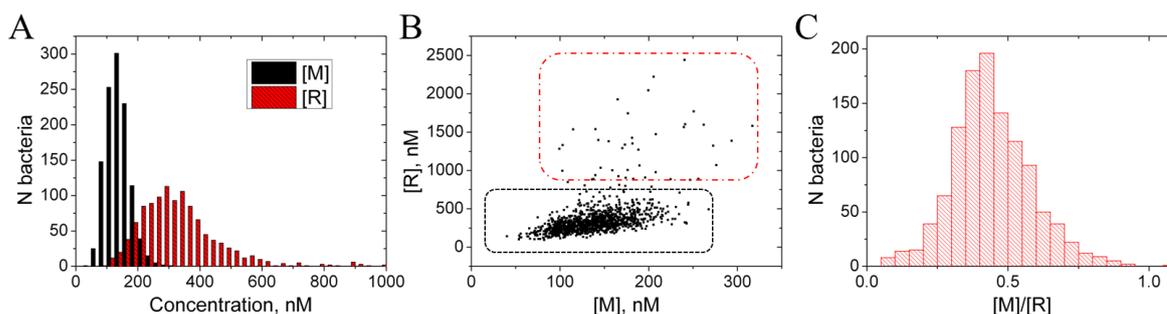


Рис. 4.1.2. Распределения клеток *E. coli* по концентрациям ЭР и МТ Esp1396I. А – гистограммы распределений (МТ – черные сплошные столбцы, ЭР – красные штрихованные столбцы), В – корреляционный график для концентраций ЭР (ось ординат) и МТ (ось абсцисс), черной штрихованной линией обозначена основная часть распределения, красным штрих-пунктиром – клетки с аномально высокими концентрациями ЭР, С – гистограмма распределения клеток *E. coli* по соотношению концентраций МТ и ЭР.

Существенный уровень корреляции между концентрациями ЭР и МТ свидетельствует о том, что вариации концентраций в значительной мере обусловлены «внешними» источниками шума, общими для обоих генов. Существенно более высокий уровень вариации концентрации ЭР является достаточно неожиданным результатом, так как ген ЭР находится под контролем положительной и отрицательной обратных связей, которые должны поддерживать постоянный уровень продукта, в то время, как ген МТ не имеет обратной связи и лишь репрессируется С-белком. Несмотря на то, что имеются достаточно подробные данные о регуляции экспрессии генов СРМ Esp1396I [65, 6], отсутствие ряда ключевых параметров не позволяет провести эффективное математическое моделирование работы этой системы. Так,

например, отсутствуют данные о стабильностях белков ЭР, МТ и С в клетке. Предположительно, С-белок и ЭР могут обладать существенно отличными временами жизни, что может приводить к повышению флуктуаций концентрации ЭР, так как именно С-белок осуществляет положительную и отрицательную обратную связь в гене *Esp1396ICR*. В связи с этим представляется целесообразным провести эксперименты по изучению стабильности белков СРМ *Esp1396I* в клетке. В работе [133] теоретически предсказано и экспериментально подтверждено существование бистабильности и гистерезиса в СРМ II типа *PvuII*. В частности, показано, что количество копий генов СРМ может оказывать существенное воздействие на регуляцию экспрессии белков СРМ. Использование описанной в работе [133] плазмиды с регулируемой копийностью в сочетании с измерением концентраций ЭР и МТ при помощи флуоресцентной микроскопии должно позволить лучше понять механизмы регуляции СРМ II типа.

4.2. Анализ внутриклеточного распределения МТ и ЭР

Анализ флуоресцентных изображений бактерий, несущих плазмиду «Dual» показал, что внутриклеточное распределение ЭР и МТ существенно отличаются друг от друга (рис. 4.2.1 и 4.2.2). В то время, как ЭР распределена по объему клетки равномерно, МТ во многих клетках концентрируется в двух областях вблизи полюсов, а в середине клетки наблюдается локальный минимум флуоресцентного сигнала. Подобное пространственное распределение характерно для ДНК в клетках *E. coli*, в связи с чем неравномерное распределение МТ в клетках может объясняться тем, что этот фермент находится в комплексе с ДНК.

Для проверки этой гипотезы были получены флуоресцентные изображения клеток, несущих плазмиду «Dual», с ДНК, окрашенной красителем Hoechst3334 (рис. 4.2.3 и 4.2.4). Эти изображения показывают, что распределение МТ действительно повторяет распределение ДНК в клетке, что подтверждает

гипотезу о том, что в клетках *E. coli* МТ Esp1396I находится преимущественно в ДНК-связанном состоянии, чего не наблюдается для ЭР. Для того, чтобы количественно охарактеризовать колокализацию МТ, ЭР и ДНК были построены профили интенсивности флуоресценции в различных каналах вдоль клеток (рис. 4.2.3, Е и 4.2.4, Е, для построения графиков из значений интенсивности был вычтен фоновый сигнал, после чего зависимости нормировались на среднюю интенсивность флуоресценции). В качестве меры для количественной оценки совпадения профилей интенсивности в различных каналах был выбран коэффициент корреляции Пирсона. Сам факт локализации анализируемых объектов (ЭР, МТ и ДНК) внутри бактерии приводит к тому, что при анализе полных профилей интенсивности наблюдается высокая корреляция всех трех сигналов. Тем не менее, коэффициент корреляции МТ и ДНК в обоих случаях выше, чем для ЭР и ДНК и ЭР и МТ (0,993 против 0,982 и 0,986 соответственно для профилей на рис. 4.2.3 и 0,992 против 0,973 и 0,976 соответственно для профилей на рис. 4.2.4). Если ограничиться рассмотрением только профилей интенсивности внутри клетки (диапазон от 1,95 до 8,73 на рис. 4.2.3, Е и от 1,3 до 7,67 на рис. 4.2.4, Е), различие во внутриклеточном распределении ЭР и МТ проявляется более очевидно: коэффициент корреляции МТ и ДНК составляет 0,89 против 0,502 для ЭР и ДНК и 0,684 для ЭР и МТ для профилей на рис. 4.2.3 и 0,915 против 0,757 и 0,696 соответственно для профилей на рис. 4.2.4.

Полученные данные свидетельствуют о том, что МТ, в отличие от ЭР в клетках *E. coli*, экспрессирующих флуоресцентно-модифицированную СРМ Esp1396I, колокализуется с ДНК. По всей видимости, МТ преимущественно находится в клетках в комплексе с ДНК, в то время, как ЭР преимущественно находится в несвязанном с ДНК состоянии. Этот факт может способствовать более быстрому метилированию новореплицированной геномной ДНК, а также снижению концентрации свободной МТ в клетке, что увеличивает вероятность того, что чужеродная ДНК будет рестрицирована, а не метилирована, при

попадании в клетку. Таким образом, нахождение МТ в комплексе с геномной ДНК может способствовать повышению эффективности работы СРМ. Для рестриктазы IV типа Mrrg недавно была продемонстрирована локализация на ряде сайтов в геноме *E. coli* [134]. В дальнейшем планируется использовать биохимические, генно-инженерные и микробиологические методы в сочетании с флуоресцентной микроскопией для анализа причин и роли внутриклеточной локализации МТ СРМ Esp1396I в её работе, а также сравнить внутриклеточную локализацию ферментов СРМ Esp1396I с другими системами рестрикции-модификации для того, чтобы оценить универсальность полученных наблюдений.

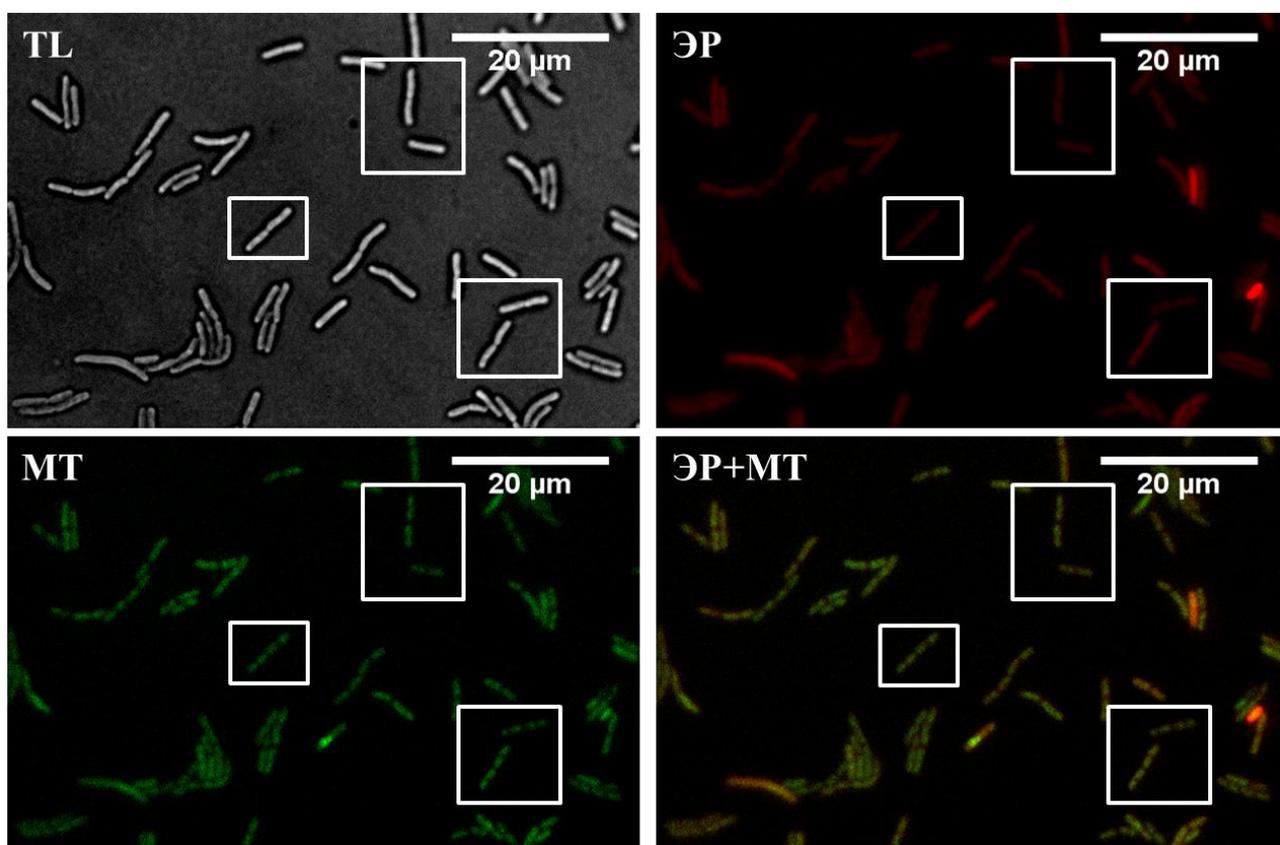


Рис. 4.2.1. Изображения клеток *E. coli*, несущих плазмиду «Dual» в проходящем свете (TL) и флуоресцентные изображения в канале mCherry (ЭР), Venus (МТ), а также наложение изображений в каналах Venus и mCherry (ЭР+МТ).

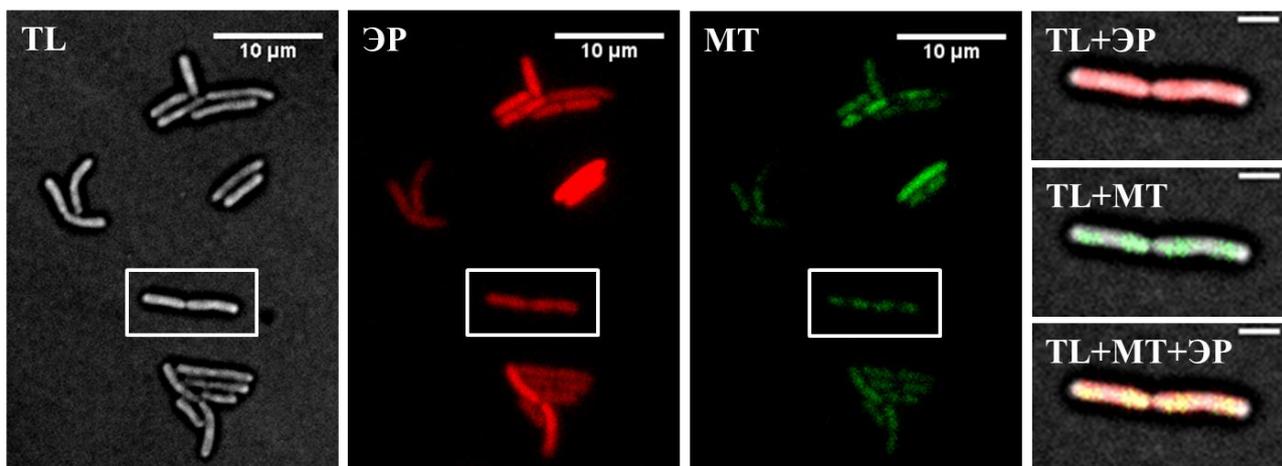


Рис. 4.2.2. Изобаржения клеток *E. coli*, несущих плазмиду «Dual» в проходящем свете (TL) и флуоресцентные изображения в канале mCherry (ЭР), Venus (МТ), а также наложение изображений в проходящем свете и Venus (TL+ЭР), в проходящем свете и mCherry (TL+МТ) и во всех трех каналах (TL+МТ+ЭР).

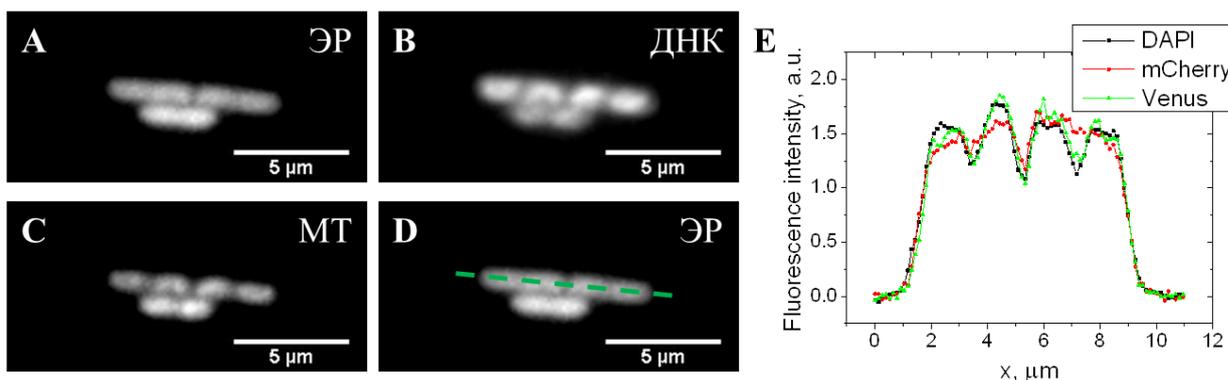


Рис. 4.2.3. Анализ колокализации МТ и ЭР Esp1396I с ДНК в клетках *E. coli*. Флуоресцентные изображения в каналах mCherry (A, ЭР), Venus (B, МТ) и Hoechst3334 (C, ДНК). D – флуоресцентное изображение бактерий в канале mCherry с линией, вдоль которой анализировались профили интенсивности флуоресценции в различных каналах (E).

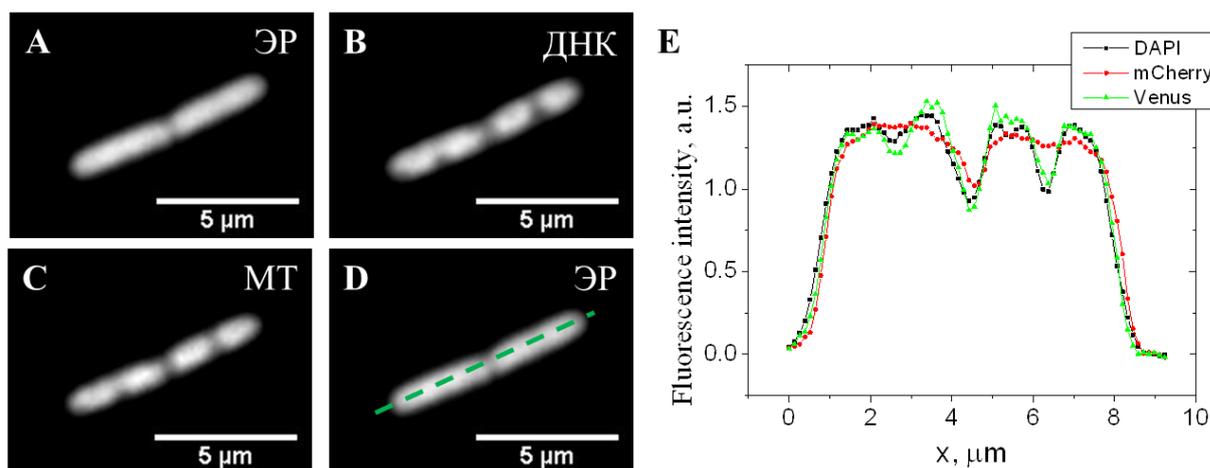


Рис. 4.2.4. Анализ колокализации МТ и ЭР Esp1396I с ДНК в клетках *E.coli*. Флуоресцентные изображения в каналах mCherry (А, ЭР), Venus (В, МТ) и Hoechst3334 (С, ДНК). D – флуоресцентное изображение бактерий в канале mCherry с линией, вдоль которой анализировались профили интенсивности флуоресценции в различных каналах (Е).

4.3. Разработка протокола наблюдения «пробоя» СРМ на уровне одиночных клеток.

Разработанный протокол длительного наблюдения за ростом бактерий *E. coli*, экспрессирующих флуоресцентные белки слияния ЭР::mCherry и МТ::Venus позволил проанализировать корреляцию уровней ЭР и МТ в клетке с её способностью делиться. Оказалось, что средний уровни ЭР в клетках, не способных к делению, в 2 раза выше, чем в способных делиться (рис. 4.3.1). Такое различие статистически достоверно ($p < 0,001$ на основании t-теста Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни). В то же время, увеличение концентрации МТ не столь значительно (20%) и не настолько статистически достоверно ($p \approx 0,01$). С одной стороны, этот факт может отражать особенности регуляции СРМ Esp1396I и опасность слишком большого количества ЭР, с другой же – может быть следствием нахождения части клеток в особом физиологическом состоянии независимо от наличия СРМ. Для того, чтобы разрешить этот вопрос, требуются дополнительные эксперименты.

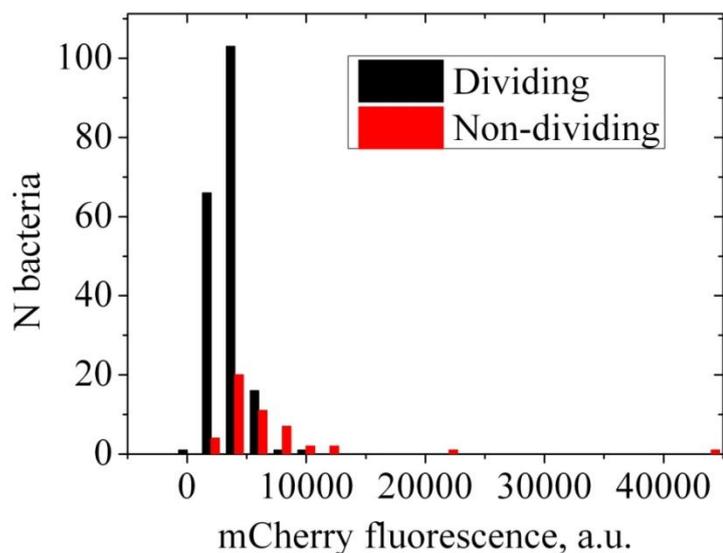


Рис. 4.3.1. Распределения способных (черные) и не способных (красные) делиться клеток бактерий по концентрациям ЭР.

Полученные данные о распределении клеток *E. coli* по концентрациям ЭР и МТ Esp1396I свидетельствуют о том, что концентрации ЭР и МТ СРМ Esp1396I в клетках *E. coli* варьируются в достаточно широких пределах, что может играть существенную роль в преодолении бактериофагом защиты СРМ. Для того, чтобы проанализировать влияние случайных факторов на «пробой» СРМ необходимо было разработать протокол, позволяющий наблюдать это событие на уровне одиночных клеток. Для этого клетки *E. coli* в экспоненциальной фазе роста, выращенные с добавлением 0,2% мальтозы и 20 мМ MgCl₂ и несущие плазмиду, содержащую СРМ Esp1396I с белками слияния R::mCherry M::Venus, заражались бактериофагом λ в соотношении 5 бактериофагов на 1 бактерию 30 мин при +4°C и затем 5 мин при 37°C и наносились в объеме 20 мкл на поверхность слоя агарозы (1,5%, 1 мм толщиной) с добавлением среды LB, 20 мМ MgCl₂ и 0,2% мальтозы на предметном стекле. Капля подсушивалась в течение 5 мин при комнатной температуре, после чего слой агарозы накрывался покровным стеклом. В ходе эксперимента температура образца поддерживалась на уровне 37°C при помощи нагревателя объектива (использовался маслянно-иммерсионный объектив со стократным

увеличением, Zeiss). Автоматизированный сбор данных осуществлялся при помощи скрипта для программы MicroManager.

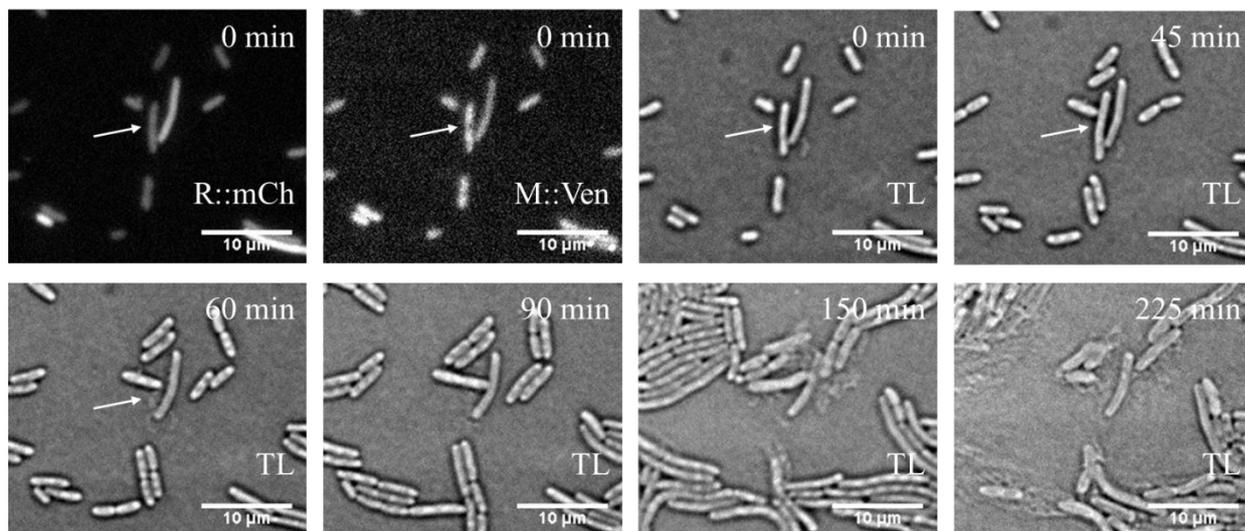


Рис. 4.3.2. Визуализация «пробоя» СРМ и заражения близлежащих клеток модифицированным бактериофагом. Стрелкой отмечена клетка, в которой произошел «пробой».

На рис. 4.3.2 приведены результаты визуализации «пробоя» СРМ Esp1396I на уровне одиночной клетки. Между моментами времени 45 мин и 60 мин с начала съемки наблюдается лизис клетки (отмечена стрелкой), который, спустя ещё примерно час, приводит к лизису окружающих клеток и формированию негативной микроколони. Флуоресцентные изображения позволяют определить уровни ЭР и МТ в зараженной клетке. Контрольные эксперименты с клетками без СРМ и с метилированным бактериофагом показали, что в данных экспериментальных условиях спустя час после начала наблюдения лизируется большинство клеток, а вероятность лизиса при заражении устойчивым к СРМ бактериофагом не связана с количествами ЭР и МТ.

Флуоресцентная микроскопия также позволяет визуализировать частицы бактериофагов (при помощи ДНК-красителей или флуоресцентных белков), количество которых на клетку является ещё одним важным источником стохастичности процесса «пробоя» СРМ. На рис. 4.3.3 представлены

флуоресцентные изображения частиц бактериофага λ , окрашенных ДНК-связывающим красителем YOYO-1. Титрование флуоресцентно-меченого бактериофага показало, что он способен успешно заражать клетки бактерий. Снижения титра бактериофага после окрашивания не наблюдалось.

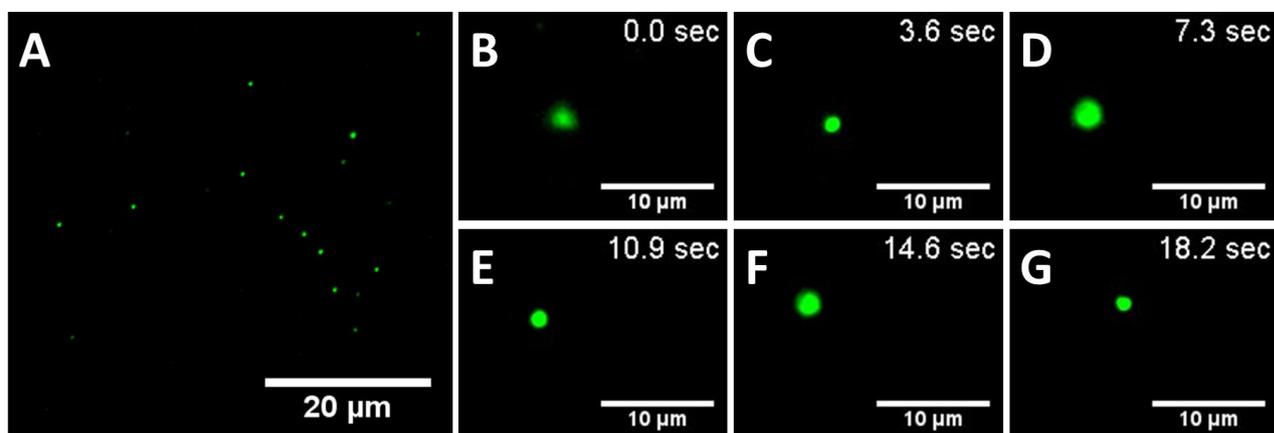


Рис. 4.3.3. Флуоресцентное окрашивание бактериофага λ . А – фаговые частицы, неспецифически адсорбированные на стекле; В-Г – диффузия фаговой частицы в растворе.

Таким образом, был разработан протокол, позволяющий наблюдать «пробой» СРМ на уровне одиночных бактерий при помощи оптической, в том числе флуоресцентной, микроскопии. Этот протокол позволяет определять концентрации ЭР и МТ по флуоресцентным изображениям, наблюдать лизис одиночных бактерий *E. coli* и инфекцию близлежащих клеток модифицированным бактериофагом λ . Разработанный протокол также может быть использован в сочетании с флуоресцентной визуализацией фаговых частиц, что позволит учесть такой важный источник стохастичности при «пробое» СРМ, как вариации числа фаговых частиц на клетку.

4.4. Разработка системы стабилизации положения объекта для ЛМ.

Для определения эффективности работы созданной системы стабилизации положения объекта для ЛМ использовались два подхода. Первый заключается в том, что в ходе работы алгоритма стабилизации записываются измеряемые при помощи квадрантного детектора координаты микросферы, а также положение

пьезостолика. При этом положение микросферы поддерживается алгоритмом постоянным и по его отклонению от начального можно судить о достигаемом уровне стабильности положения объекта, в то время, как перемещение положения пьезостолика отражает дрейф образца. Результаты тестирования алгоритма стабилизации описанным методом представлены на рис. 4.4.1.

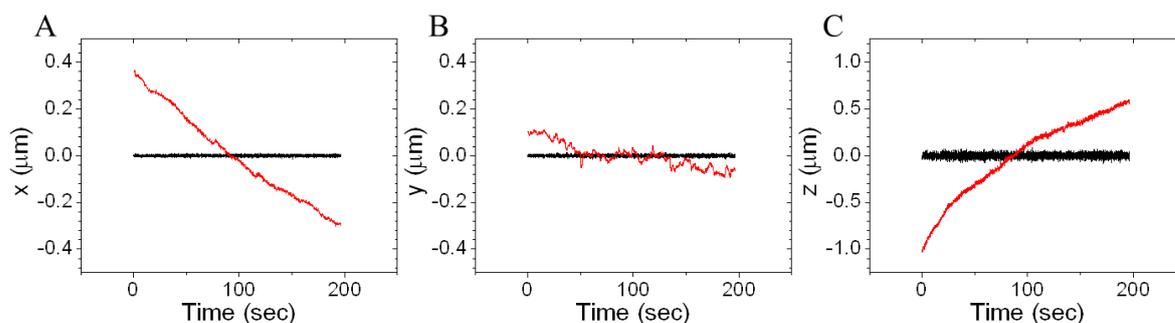


Рис. 4.4.1. Эффективность работы системы стабилизации по данным с квадрантного фотодетектора. Черные графики – измеряемые квадрантным детектором положения микросферы, красные – положения пьезостолика, отражающие дрейф образца.

Полученные данные показали, что алгоритм стабилизации позволил снизить стандартные отклонения положения объекта, измеренного при помощи квадрантного детектора, с более 100 нм в плоскости xu и 400 нм по оси z до менее 5 нм в плоскости xu и 23 нм по оси z . Однако калибровочные зависимости для квадрантного детектора в свою очередь также подвержены случайным флуктуациям, одним из основных источников которых является дрейф интенсивности следящего лазера. В связи с этим, для адекватной оценки достигаемого уровня стабильности положения объекта необходимо использовать независимый метод регистрации его перемещений. Поэтому также были проведены тесты эффективности работы системы стабилизации с использованием флуоресцентных микросфер, положения которых в трех измерениях определялись по их флуоресцентным изображениям. Для определения аксиального положения микросфер использовалась цилиндрическая линза. Результаты этого тестирования приведены на рис. 4.4.2.

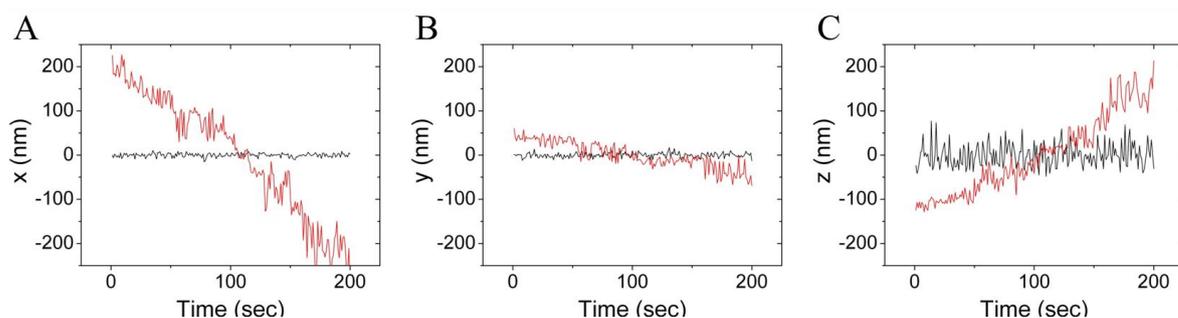


Рис. 4.4.2. Эффективность работы системы стабилизации по данным, полученным посредством независимого определения положения флуоресцентных микросфер. Красные графики – положения флуоресцентной микросферы без стабилизации, черные – во время работы системы стабилизации.

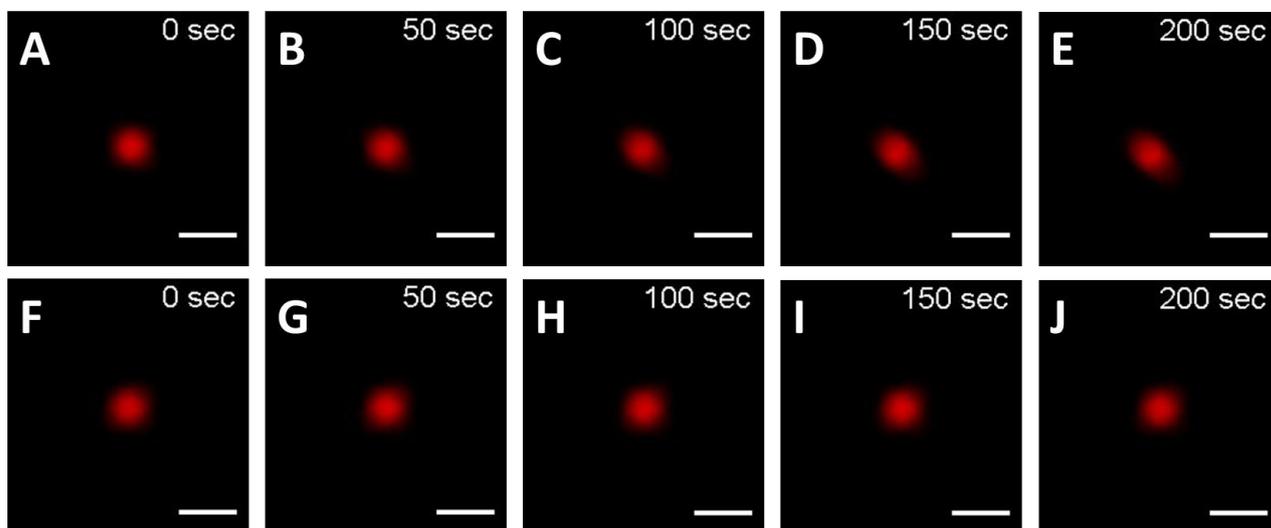


Рис. 4.4.3. Изображения флуоресцентных микросфер при отключенной (А-Е) и включенной (F-G) системе активной стабилизации положения объекта.

Эти данные показывают, что созданная система позволяет снизить стандартное отклонение положений флуоресцентной микросферы до 5,5 нм в плоскости xu и 26 нм по оси z . Стоит заметить, что частота определения положения флуоресцентной микросферы составляла 1 Гц, в то время, как частота измерения положений микросферы при помощи квадрантного детектора на рис. 4.4.1 составляла 33 Гц. Если из данных, полученных при помощи квадрантного детектора, выделить низкочастотную компоненту при помощи фильтра «скользящее среднее», стандартное отклонение положений

микросферы по всем трем координатам окажется менее 1 нм. В то же время независимое измерение положения объекта показывает существенно более низкий уровень стабильности. Это скорее всего объясняется тем, что флуктуации интенсивности следящего лазера снижают эффективность стабилизации. Зависимость сигнала квадрантного детектора от времени в отсутствие образца (рис. 4.4.4) позволила оценить уровень стабильности интенсивности следящего лазера, который составил около 0,7% (RMS за 30 мин). Вариации интенсивности следящего лазера пропорционально сказываются на всех трех сигналах, получаемых с квадрантного фотодетектора (U_x , U_y и U_z), в связи с чем нормирования сигнала на интенсивность следящего лазера достаточно, чтобы значительно снизить влияние нестабильности интенсивности следящего лазера (рис. 4.4.4, В). В связи с этим в дальнейшем планируется отвести часть интенсивности следящего лазера на дополнительный фотодиод и нормировать сигналы с квадрантного фотодетектора на измеряемую таким образом интенсивность следящего лазера. Это позволит учесть флуктуации интенсивности, нормировав сигнал с квадрантного детектора на интенсивность, и достичь ещё более высокого уровня стабильности положения объекта.

Таким образом, была создана новая система стабилизации положения объекта для локализационной микроскопии, обеспечивающая стабильность лучше 6 нм в латеральной плоскости и 30 нм в аксиальном направлении (стандартное отклонение). Система стабилизации делает влияние дрейфа образца на разрешение ЛМ незначительным. Одним из основных источников остаточных флуктуаций, по всей видимости, является дрейф интенсивности следящего лазера. В связи с этим планируется усовершенствовать систему стабилизации, отведя часть излучения следящего лазера на фотодиод.

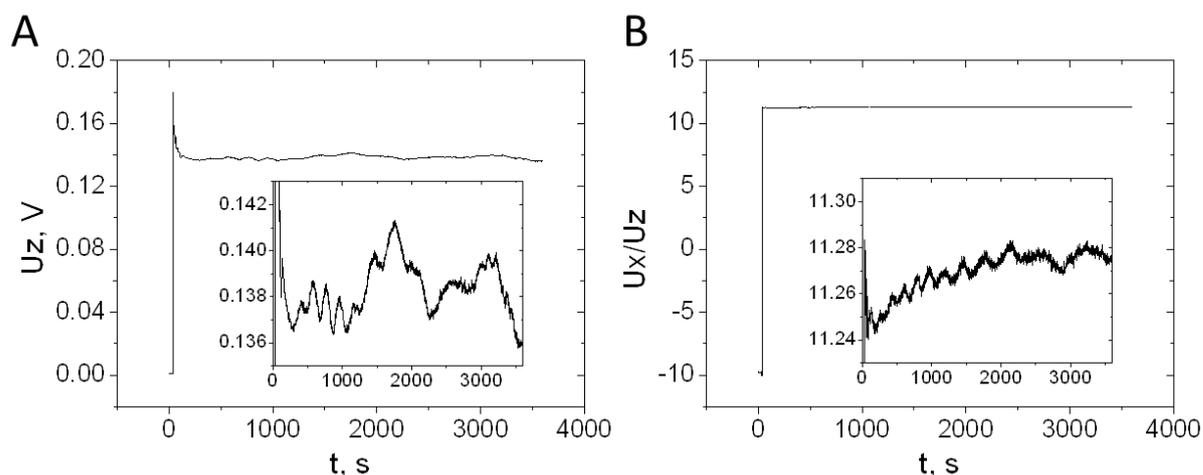


Рис. 4.4.4. Анализ стабильности мощности следящего лазера. А – суммарный сигнал квадрантного фотодетектора в течение 1 часа с момента включения следящего лазера. $RMS=0,7\%$. В – отношение разностного сигнала по x (U_x) к суммарному сигналу (U_z) квадрантного фотодетектора в течение 1 часа с момента включения следящего лазера. $RMS=0,03\%$. Врезки – увеличенные конечные участки графиков

4.5. Структуры, формируемые белком FtsZ в клетках *E. coli*.

На рис. 4.5.1 приведены изображения бактерий *E. coli*, в которых FtsZ визуализирован при помощи иммуноцитохимического окрашивания с вторичными антителами, конъюгированными с красителем Atto-532, а ДНК – при помощи красителя YOYO-1. Эти данные показывают, что FtsZ в большинстве клеток локализуется преимущественно, но не исключительно, вблизи середины клетки, и его распределение обратно распределению ДНК в клетках. На рис. 4.5.2 представлено характерное распределение ДНК и FtsZ вдоль клетки *E. coli* на основании данных флуоресцентной микроскопии. Максимумы концентрации ДНК соответствуют минимумам в профиле распределения FtsZ.

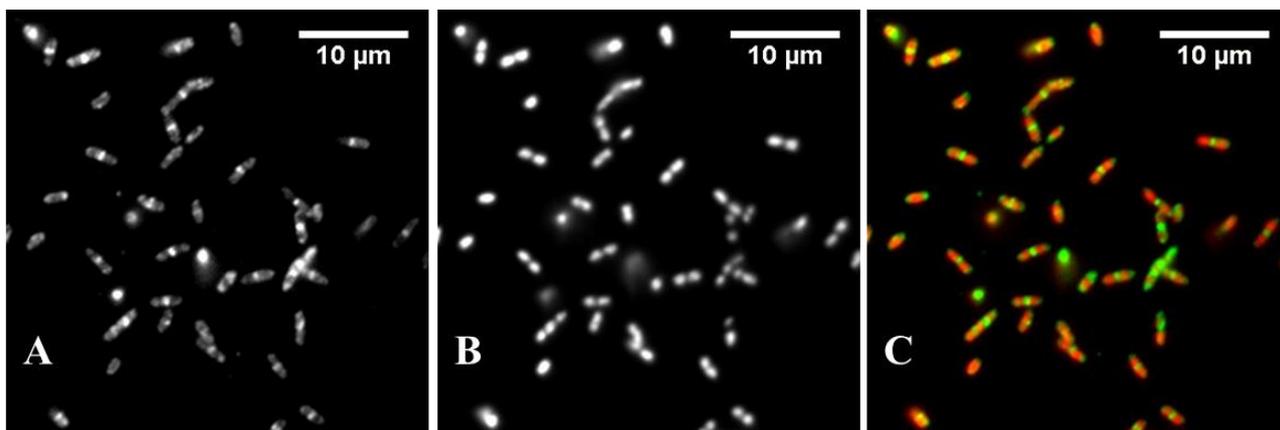


Рис. 4.5.1. Изображения структур, формируемых белком FtsZ в нормально делящихся клетках *E. coli*, иммунофлуоресцентно окрашенных красителем Atto-532 (А), и ДНК, окрашенной красителем YOYO-1 (В), а также наложение этих изображений (С, красный – ДНК, зеленый – FtsZ).

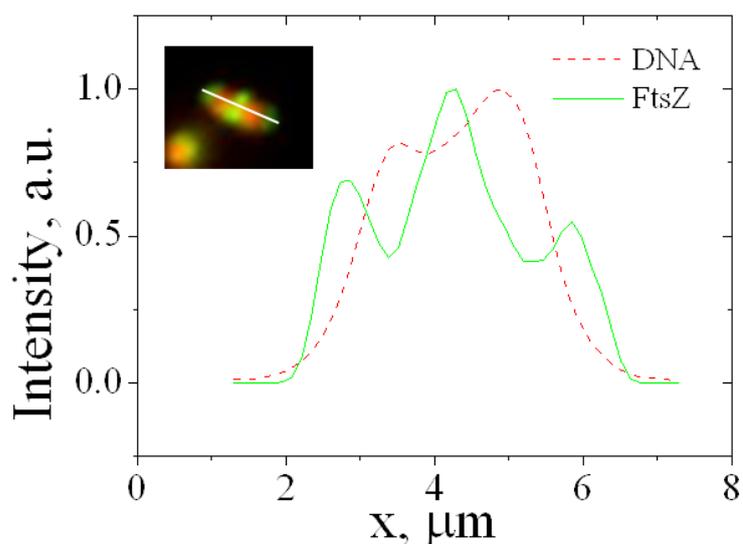


Рис. 4.5.2. Характерное распределение ДНК (зеленая сплошная линия) и FtsZ (красная пунктирная линия) вдоль клетки *E. coli* в норме.

Эти наблюдения хорошо согласуются с литературными данными, полученными в том числе с использованием флуоресцентных белков слияния [116]. Согласно имеющимся данным, преимущественная локализация FtsZ в областях, свободных от ДНК, обеспечивается белком SlmA, который способствует деполимеризации филаментов FtsZ. Способность SlmA

ингибировать полимеризацию FtsZ активируется при связывании SlmA с сайтами узнавания в геноме бактерии [135]. Этот эффект, получивший название «нуклеоидная окклюзия» (nucleoid occlusion) предотвращает формирование Z-кольца в области клетки, содержащей ДНК, и тем самым способствует координации процессов сегрегации хромосом и формирования перетяжки при делении клетки.

На рис. 4.5.3 представлены флуоресцентные изображения FtsZ и ДНК в клетках *E. coli*, находящихся в состоянии SOS-ответа. Распределение ДНК в этих клетках существенно отличается от нормы: ДНК практически равномерно заполняет среднюю часть удлинненных клеток и отсутствует у полюсов. При этом FtsZ преимущественно сосредотачивается вблизи полюсов клеток, в областях, лишенных ДНК (рис. 4.5.4). Таким образом, несмотря на существенное отличие в распределении ДНК в клетках в норме и при SOS-ответе, механизм ингибирования полимеризации FtsZ вблизи ДНК продолжает действовать при SOS-ответе, что приводит к концентрации FtsZ вблизи полюсов удлинненных клеток.

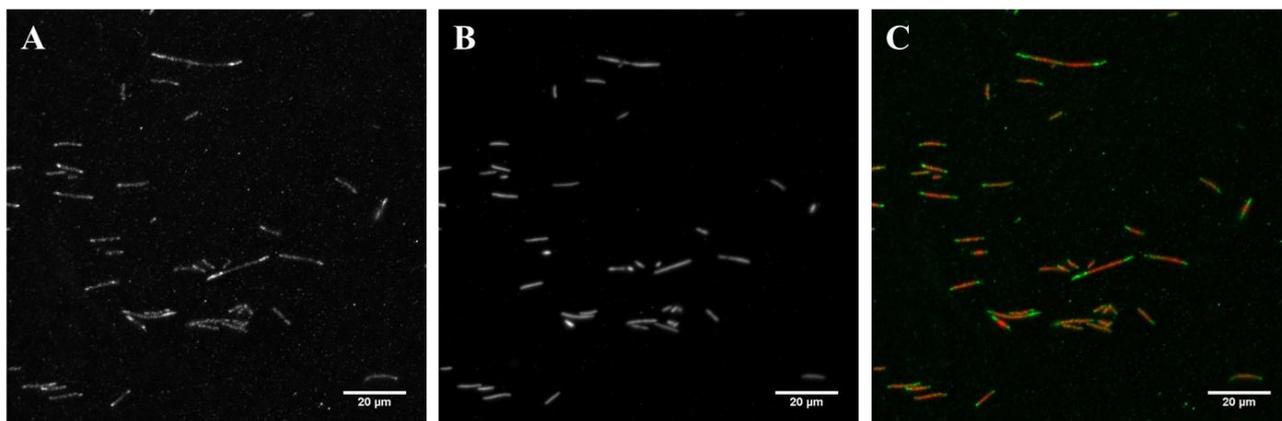


Рис. 4.5.3. Изображения структур, формируемых белком FtsZ в клетках *E. coli*, находящихся в состоянии SOS-ответа (A) и ДНК (B), а также наложение этих изображений (C, красный – ДНК, зеленый – FtsZ).

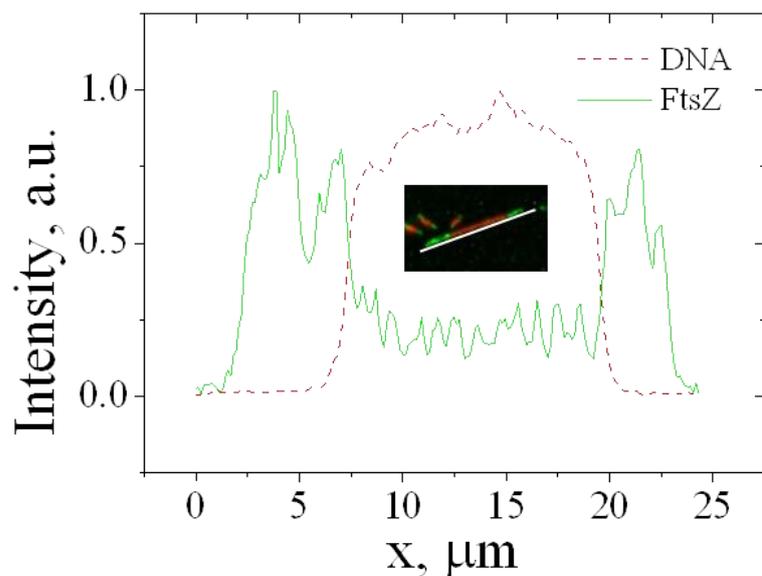


Рис. 4.5.4. Характерное распределение ДНК (зеленая сплошная линия) и FtsZ (красная пунктирная линия) вдоль клетки *E. coli* в состоянии SOS-ответа.

Дифракционный предел существенно ограничивает возможности исследования структур, формируемых белком FtsZ в клетках *E. coli*, однако это ограничение может быть преодолено при помощи метода локализационной микроскопии. Созданная система стабилизации положения объекта позволила исследовать структуры, формируемые белком FtsZ в клетках *E. coli* с субдифракционным разрешением. Для визуализации этих структур использовался метод иммунофлуоресцентного окрашивания, который позволяет работать с организмами, генноинженерные манипуляции с которыми затруднительны (например, *M. hominis*), а также позволяет потенциально добиться более высокого разрешения, так как используемые в этом методе низкомолекулярные флуорофоры как правило испускают в разы и десятки раз больше фотонов до фотообесцвечивания, чем флуоресцентные белки. Кроме того, данные, полученные при помощи иммунофлуоресцентного окрашивания и химерных белков дополняют друг друга, так как оба метода контрастирования вносят различные возмущения в нативные структуры.

На рисунках 4.5.5 и 4.5.6 представлены субдифракционные изображения структур, формируемых FtsZ в клетках *E. coli*. На некоторых изображениях в проходящем свете помимо бактерий также видны микросферы, используемые для стабилизации положения объекта в ходе сбора данных для локализационной микроскопии (ряды 2 и 4 на рисунке 4.5.5).

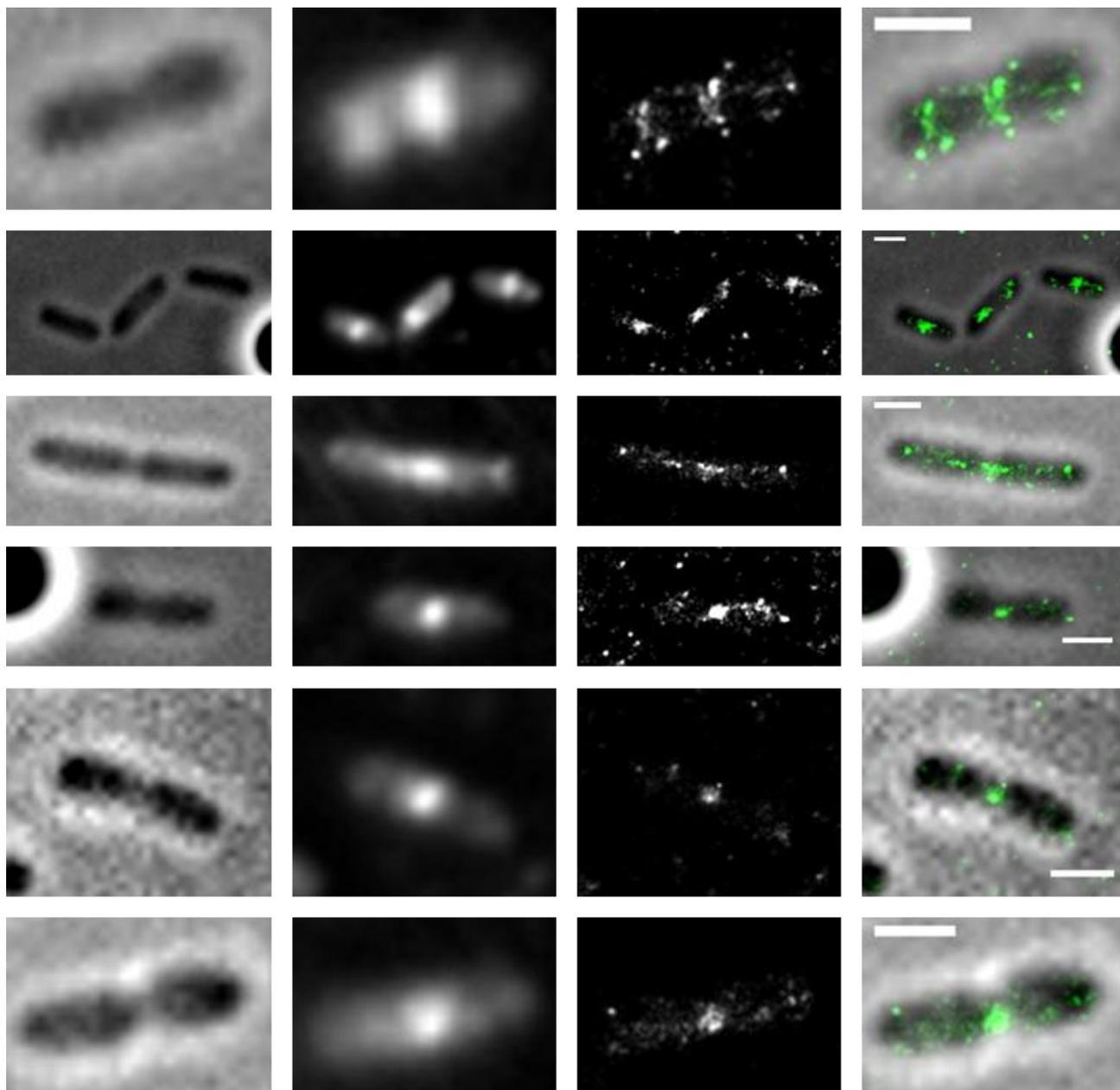


Рис. 4.5.5. Структуры, формируемые FtsZ в клетках *E. coli*. Первый столбец – изображения в проходящем свете. Второй столбец – дифракционно-ограниченные флуоресцентные изображения FtsZ, полученные как усреднение кадров образца, содержащих изображения одиночных молекул красителя. Третий столбец – субдифракционные изображения FtsZ.

Четвертый столбец – наложение субдифракционных изображений (зеленые) на изображения в проходящем свете (черно-белые). Шкала – 1 мкм.

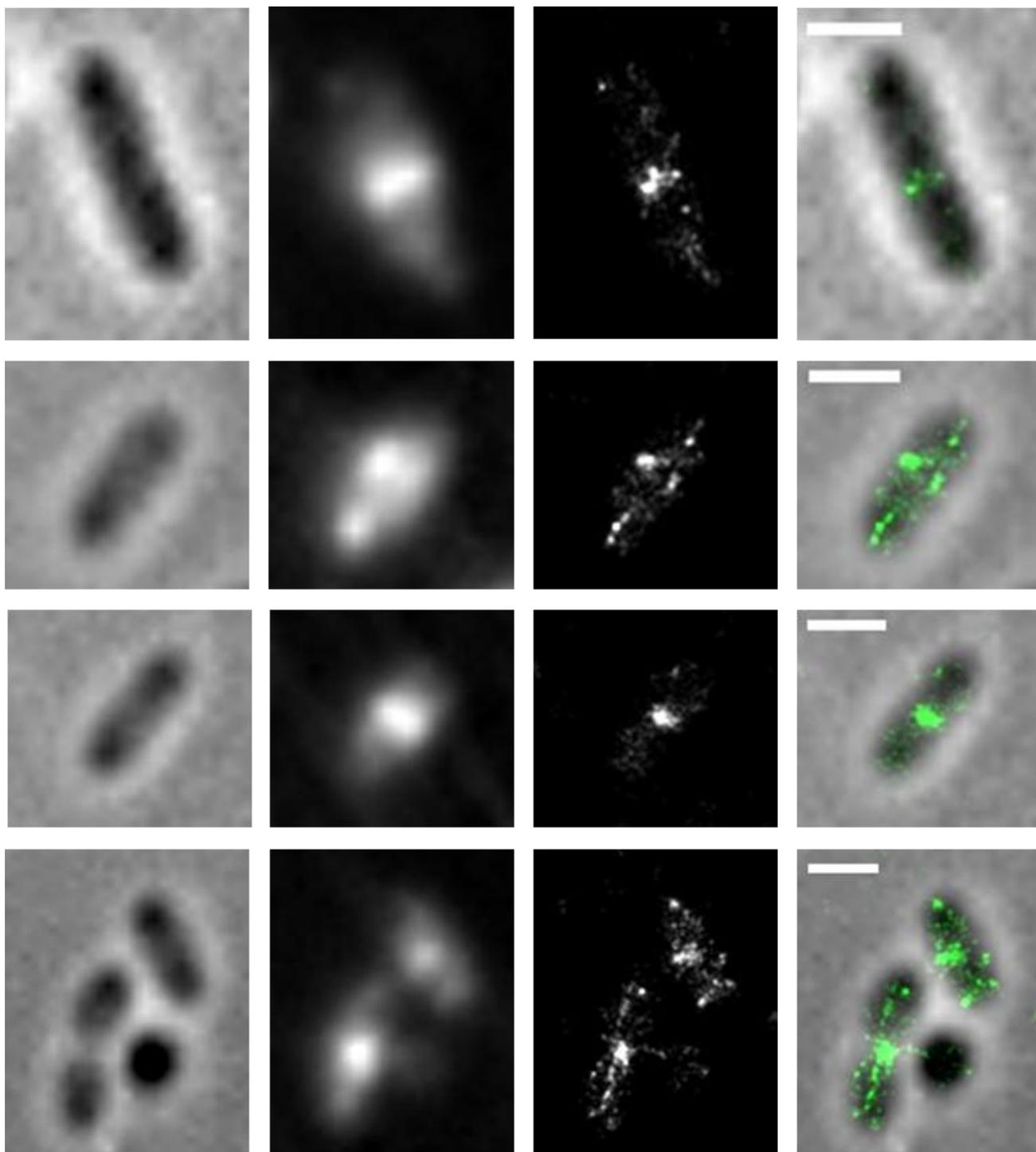


Рис. 4.5.6. Структуры, формируемые FtsZ в клетках *E. coli*. Первый столбец – изображения в проходящем свете. Второй столбец – дифракционно-ограниченные флуоресцентные изображения FtsZ, полученные как усреднение кадров образца, содержащих изображения одиночных молекул красителя. Третий столбец – субдифракционные изображения FtsZ.

Четвертый столбец – наложение субдифракционных изображений (зеленые) на изображения в проходящем свете (черно-белые). Шкала – 1 мкм.

В клетках, находящихся в процессе деления, FtsZ локализуется преимущественно в середине клетки, однако зачастую этот белок также формирует протяженные спиралевидные структуры, преимущественно вблизи полюсов клеток (например, 4.5.5, 1 и 4 ряд, а также нижняя клетка в 4 ряду на рис. 4.5.6). В клетках, находящихся на стадии формирования перетяжки между дочерними клетками (рис. 4.5.7 и 4.5.8) FtsZ формирует вытянутые по направлению вдоль клеток структуры шириной от 200 до 300 нм и длиной около 500 нм, в которых наблюдается периодичность с шагом от 80 до 150 нм. Скорее всего, эти структуры представляют собой плотные спирали, составленные из филаментов FtsZ, которые формируются в процессе сокращения Z-кольца. Эти данные поддерживают гипотезу о том, что Z-кольцо представляет собой спираль филаментов FtsZ, которая сжимается в ходе деления [23].

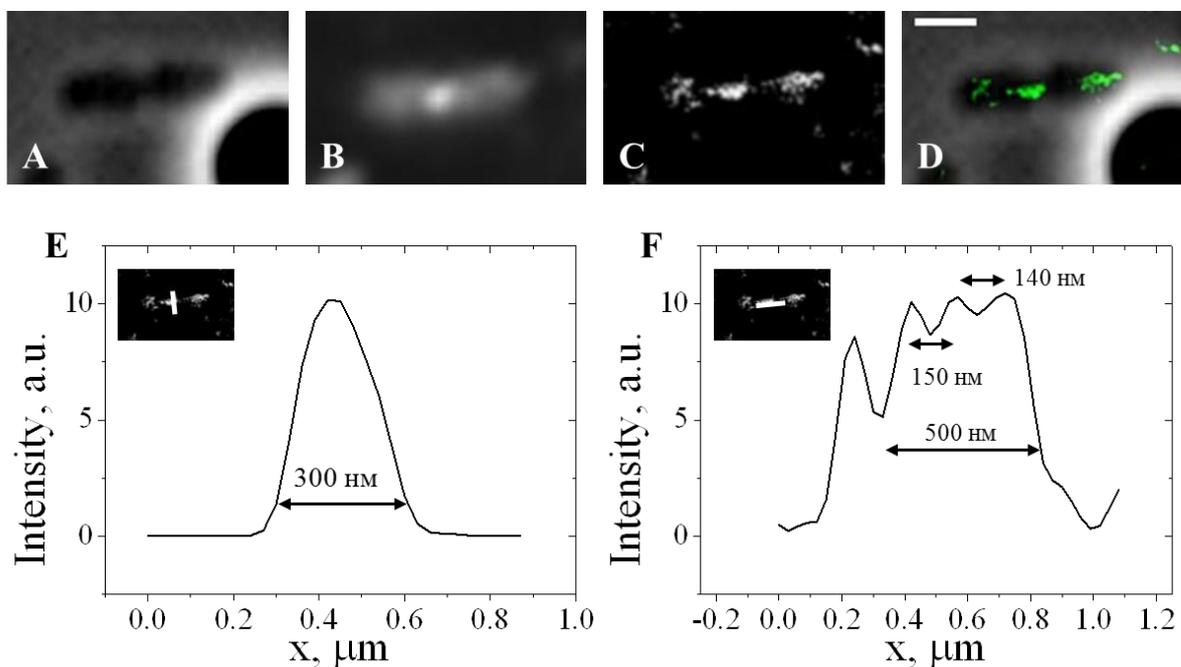


Рис. 4.5.7. Структуры, формируемые FtsZ в клетках на стадии формирования перетяжки между дочерними клетками. А – изображение в проходящем свете, В – дифракционно-ограниченное флуоресцентное изображение FtsZ, полученное как усреднение кадров

образца, содержащих изображения одиночных молекул красителя, С – субдифракционное изображение FtsZ, D - наложение субдифракционного изображения (зеленое) на изображение в проходящем свете (черно-белое). Шкала – 1 мкм. E – профиль интенсивности субдифракционного изображения вдоль линии, проходящей поперек клетки, F - профиль интенсивности субдифракционного изображения вдоль линии, проходящей вдоль клетки.

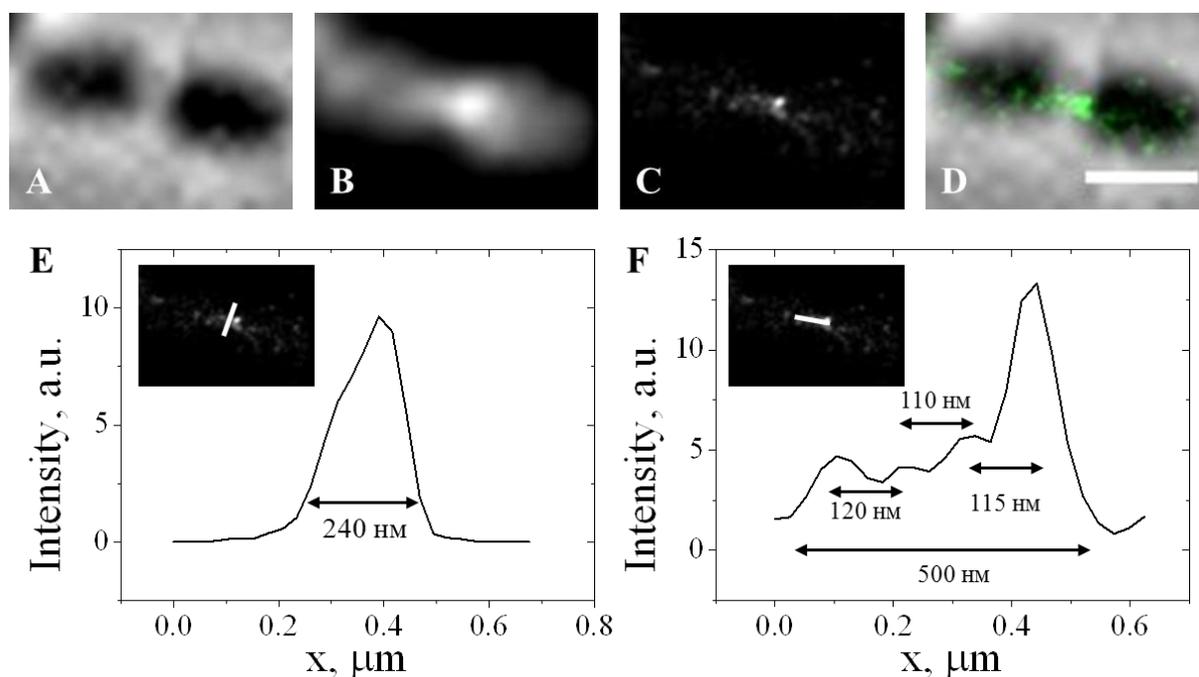


Рис. 4.5.7. Структуры, формируемые FtsZ в клетках на стадии формирования перетяжки между дочерними клетками. А – изображение в проходящем свете, В – дифракционно-ограниченное флуоресцентное изображение FtsZ, полученное как усреднение кадров образца, содержащих изображения одиночных молекул красителя, С – субдифракционное изображение FtsZ, D - наложение субдифракционного изображения (зеленое) на изображение в проходящем свете (черно-белое). Шкала – 1 мкм. E – профиль интенсивности субдифракционного изображения вдоль линии, проходящей поперек клетки, F - профиль интенсивности субдифракционного изображения вдоль линии, проходящей вдоль клетки.

Также были получены субдифракционные изображения структур, формируемых FtsZ в клетках *E. coli* в ходе SOS-ответа (рис. 4.5.8). FtsZ не формирует Z-колец, однако распределен по клетке неравномерно, формируя частично периодические структуры с различным шагом. При этом белок преимущественно локализуется у мембраны (рис. 4.5.9). Это свидетельствует о том, что механизм ингибирования полимеризации FtsZ при SOS-ответе не

нарушает механизм локализации белка у мембраны. По всей видимости, либо при SOS-ответе происходит лишь частичная деполимеризация филаментов FtsZ, либо мономеры FtsZ связываются с белком ZipA, который в норме обеспечивает связь филаментов FtsZ с мембраной [136].

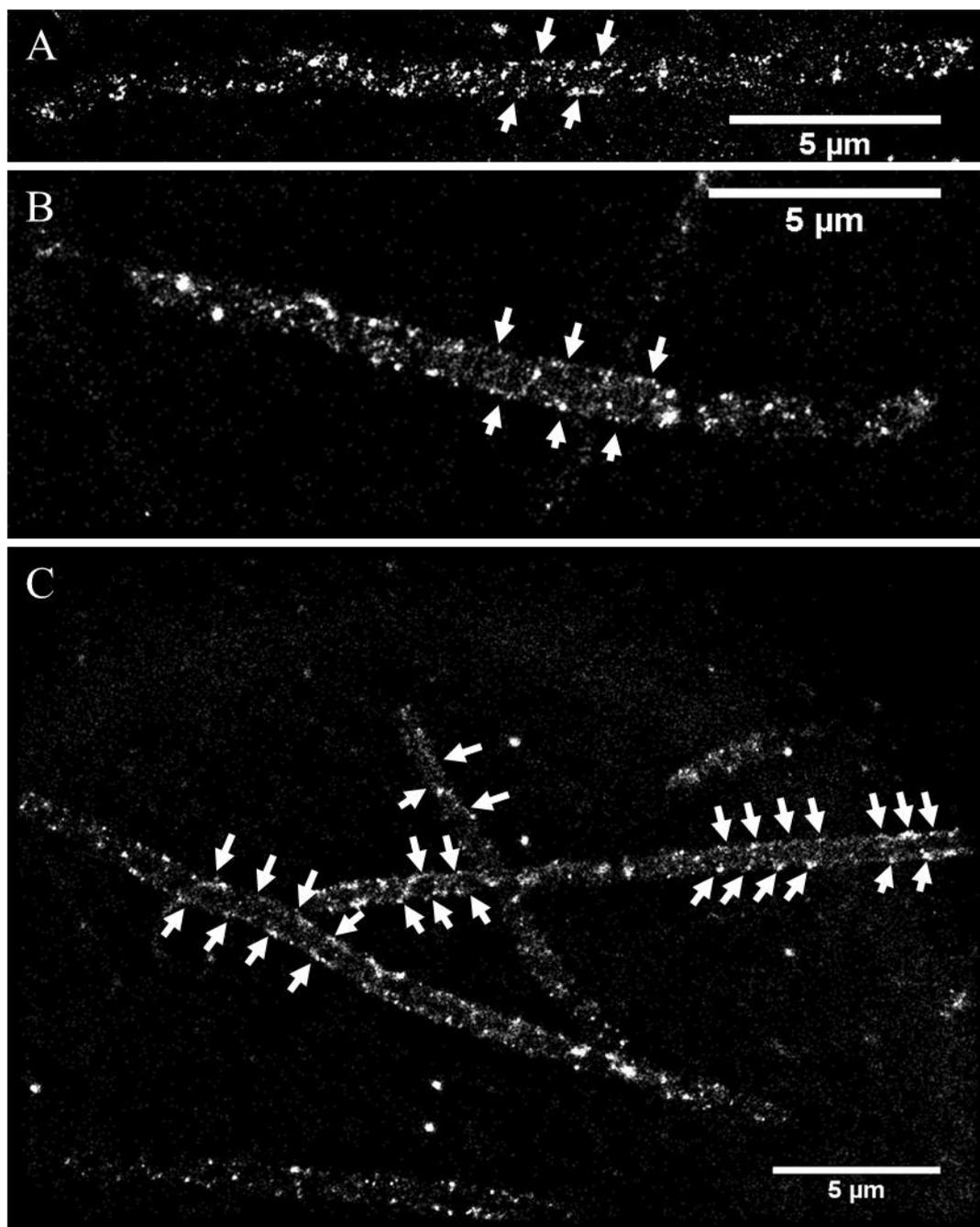


Рис. 4.5.8. Структуры, формируемые FtsZ в клетках *E. coli* в состоянии SOS-ответа. Стрелками отмечены спиралевидные структуры.

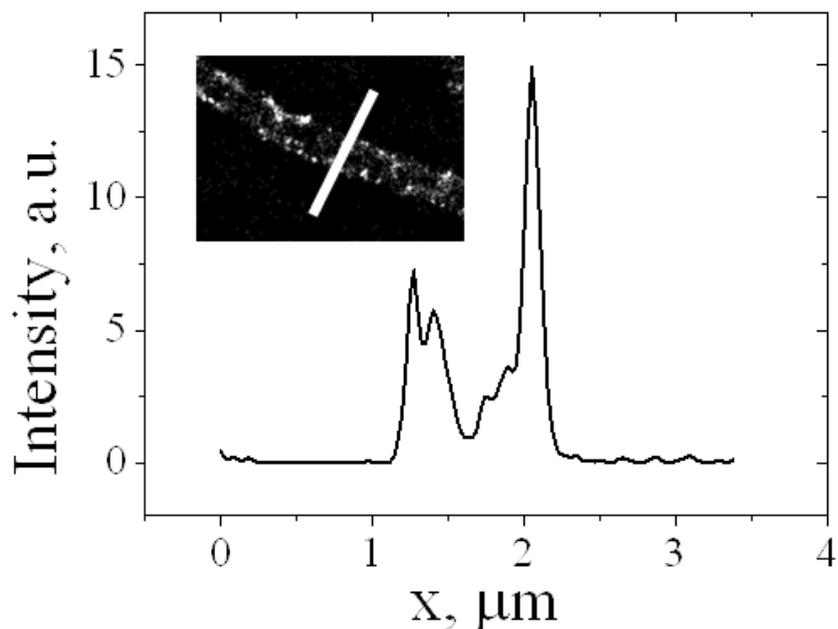


Рис. 4.5.9. Распределение FtsZ вдоль линии, перпендикулярной к клетке *E. coli*, находящейся в состоянии SOS-ответа.

По литературным данным, FtsZ *B. subtilis* также теряет способность формировать Z-кольца в ходе SOS-ответа, однако его распределение в клетке заметно отличается от полученного для *E. coli*. Часть спиралевидных структур с периодом около 1 мкм похожи на структуры, наблюдавшиеся в норме в клетках *E. coli* при помощи метода STED [27]. При этом полученные данные находятся в ярком контрасте с данными о структурах, формируемых FtsZ при SOS-ответе в клетках *C. crescentus*, полученными методом ЛМ. В работе [32] было показано, что в норме в этих клетках формируется разомкнутое Z-кольцо, которое при SOS-ответе становится замкнутым и более плотными. Это подчеркивает различие в механизмах остановки деления при SOS-ответе в *E. coli* и *C. crescentus*.

Таким образом, локализационная микроскопия позволяет обнаружить особенности организации бактериального цитоскелета, недоступные для дифракционно-ограниченной флуоресцентной микроскопии. Кроме того, локализационная микроскопия в сочетании с иммунофлуоресцентным

окрашиванием существенно дополняет данные, полученные с использованием флуоресцентных химерных белков, так как эти методы вносят различные возмущения в нативные структуры. Разработанный подход открывает широкие возможности для исследования внутренней организации микроорганизмов и может быть достаточно быстро адаптирован для исследования других белков и других микроорганизмов. Особенно ценной представляется возможность исследования внутренней организации микроорганизмов, для которых не существует надежных методов генной инженерии, например, микоплазм.

4.6. Связывание домена 6 виллина с кальцием.

Конформационные изменения белков вызывают в них трансформацию ближайшего окружения остатков триптофана, что отражается на интенсивности собственной флуоресценции. Было обнаружено, что при снижении концентрации кальция в растворе домена 6 виллина (V6) посредством добавления 5 мМ EDTA интенсивность собственной флуоресценции белка возрастала примерно на 10%. Повторное добавление кальция к раствору белка возвращало интенсивность флуоресценции к исходным значениям (рис. 4.6.1 и 4.6.2, А).

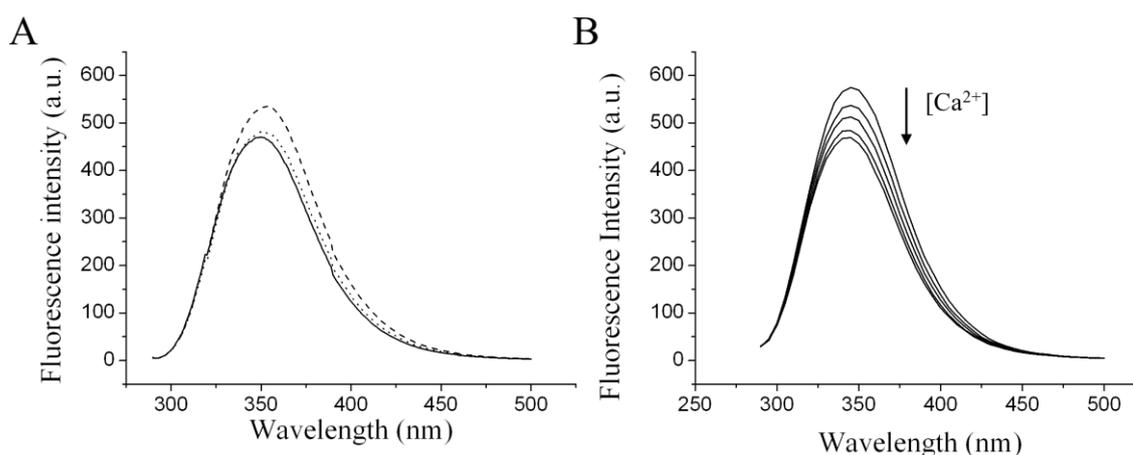


Рис. 4.6.2. Изменение спектров флуоресценции V6 при взаимодействии с Ca²⁺. А – обратимое изменение спектров при последовательном добавлении 5 мМ EDTA и 5 мМ Ca²⁺: сплошная линия – до добавления EDTA, штриховая линия – после добавления EDTA,

пунктирная линия – после добавления Ca^{2+} . В – изменения спектров в ходе титрования кальцием. Приведены спектры при $[\text{Ca}^{2+}] = 0, 22, 440, 8700$ и 81000 мкМ, стрелка указывает на изменение спектров при повышении концентрации кальция.

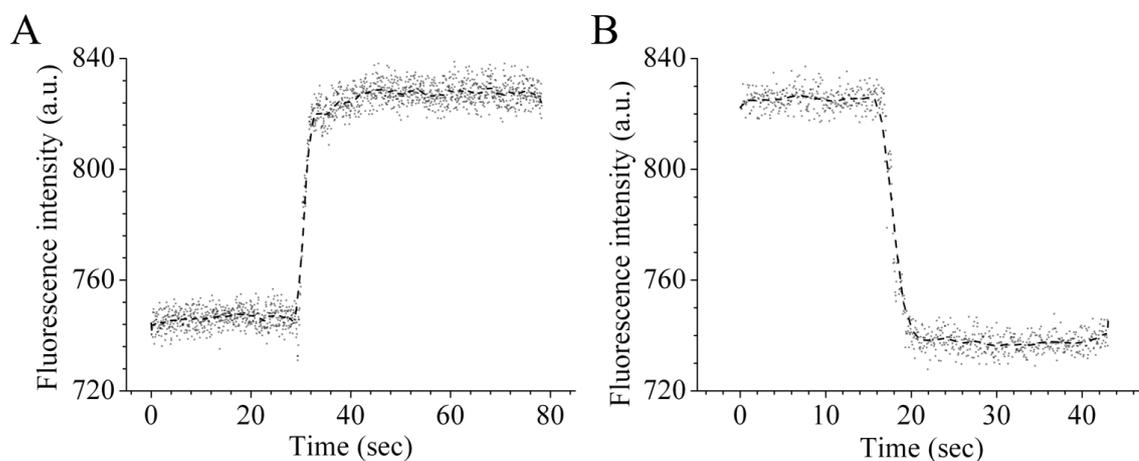


Рис. 4.6.1. Динамика связывания домена V6 виллина с кальцием А – после добавления EDTA до концентрации 5 мМ, и В - после повторного увеличения уровня Ca^{2+} до 5 мМ (3); на графиках показаны исходный (серые точки) и сглаженный (штрихованная линия) сигналы; окно сглаживания в 50 точек

Полученные данные позволяют заключить, что домен V6 виллина способен обратимо связывать ионы Ca^{2+} , что, по всей видимости, приводит к конформационной перестройке в этом домене. Кинетические данные о процессе установления равновесия показывают, что интенсивность флуоресценции белка после добавления кальция выходит на насыщение менее, чем за 10 с (рис. 9). Такая высокая скорость установления равновесия указывает на то, что скорость связывания V6 с кальцием лимитирована диффузией, что может иметь существенное значение для регуляции микроворсинок (толщина 0,2 мкм) виллином.

Для дальнейшей характеристики кальций-связывающих свойств домена V6 виллина было проведено титрование кальцием в диапазоне от 0 до 81 мМ $[\text{Ca}^{2+}]$, в ходе которого регистрировались спектры и интенсивность собственной флуоресценции образца (рис. 4.6.2, В и 4.6.3). На рис. 10, В приведены спектры собственной флуоресценции домена V6 виллина при различных концентрациях

кальция. При повышении концентрации кальция наблюдаются снижение интенсивности флуоресценции и небольшой сдвиг полосы испускания в коротковолновую область.

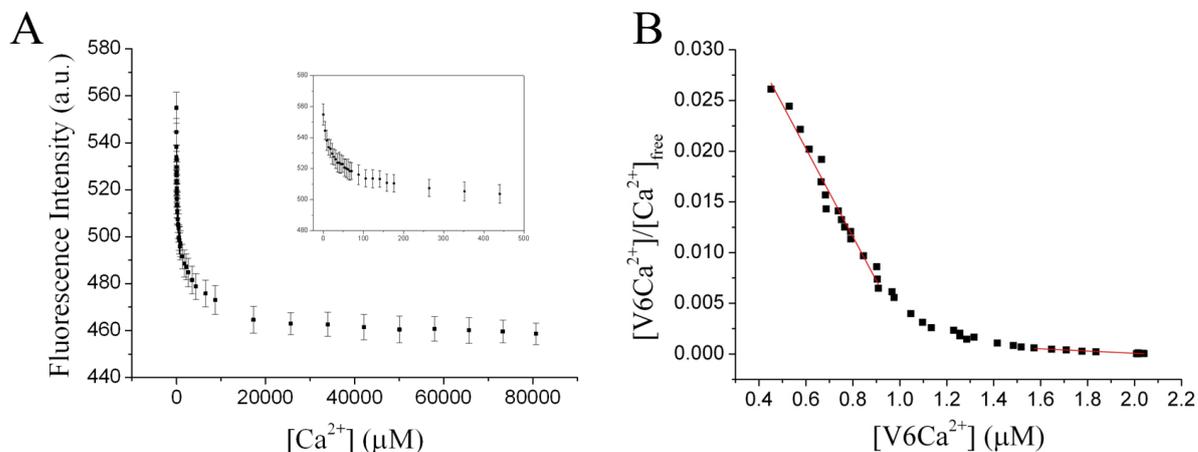


Рис. 4.6.3. Результаты титрования домена V6 кальцием. А – кривая титрования, врезка – увеличенный начальный участок; В – график Скэтчерда.

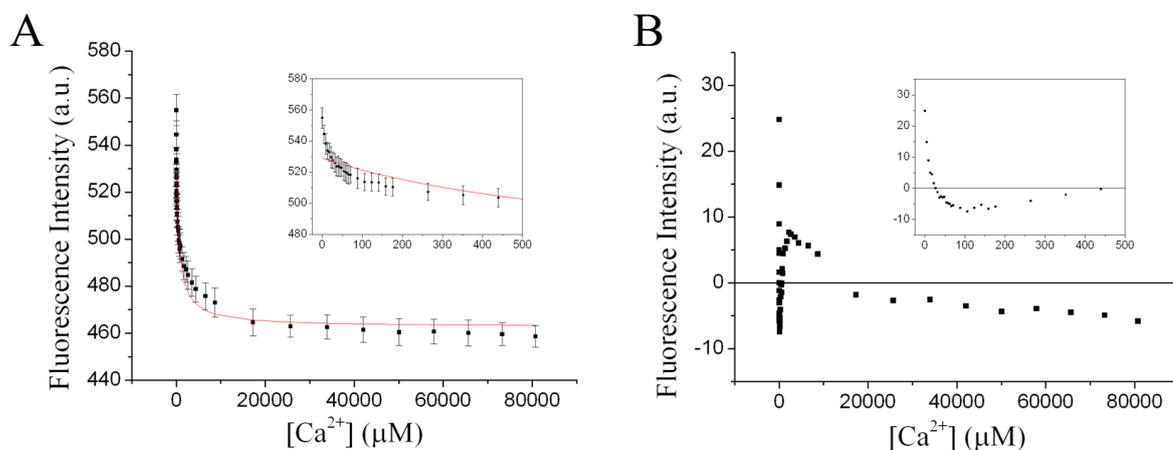


Рис. 4.6.4. Нелинейная регрессия кривой титрования моделью, предполагающей один сайт связывания. А – кривая титрования (символы) и результат нелинейной регрессии (красная линия), врезка – увеличенный начальный участок; В – график невязки, врезка – увеличенный начальный участок.

График Скэтчерда (рис. 4.6.3, В) свидетельствует о наличии двух сайтов связывания кальция в белке с константами связывания порядка 20 мкМ и 1 мМ (по результатам линейной регрессии начального и конечного участков

зависимости). Результаты нелинейной регрессии кривой титрования моделью, описывающей связывание кальция с одним сайтом в белке приведены на рис. 4.6.4. Из графика видно, что модель плохо описывает ход кривой титрования, особенно в области низких концентраций кальция. Невязка имеет выраженный систематический характер.

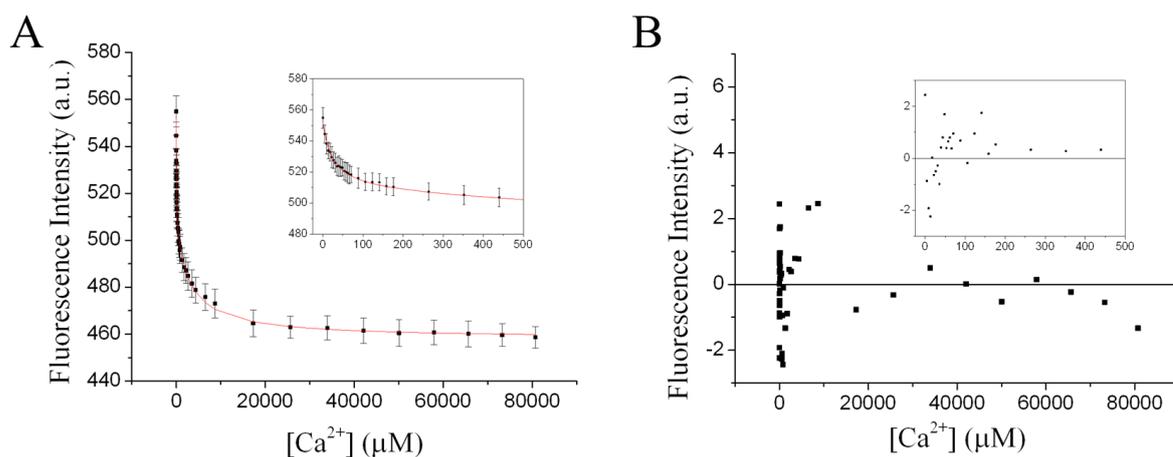


Рис. 4.6.5. Нелинейная регрессия кривой титрования моделью, предполагающей два сайта связывания. А – кривая титрования (символы) и результат нелинейной регрессии (красная линия), врезка – увеличенный начальный участок; В – график невязки, врезка – увеличенный начальный участок.

В то же время, нелинейная регрессия моделью, описывающей связывание кальция с двумя сайтами в белке (рис. 4.6.5), оказалась существенно качественнее. Модель достоверно описывает ход кривой титрования, а график невязки демонстрирует отсутствие заметных систематических отклонений экспериментальных данных от модели. F-тест показал, что включение второго сайта связывания в регрессионную модель статистически значимо ($p < 10^{-6}$). Нелинейная регрессия позволила оценить константы диссоциации для связывания каждого из сайтов с кальцием, которые составили 22 мкМ и 2,8 мМ.

Таким образом, при помощи спектроскопии собственной флуоресценции белка показано, что домен 6 виллина способен обратимо связываться с кальцием. Получена кривая титрования домена 6 виллина кальцием, которая

хорошо описывается моделью двухстадийного связывания с константами диссоциации 22 ± 2 мкМ и $2,8 \pm 0,2$ мМ. Полученные данные совместно с данными ЯМР-спектроскопии свидетельствуют в пользу того, что виллин имеет сходный с гельзолином механизм активации фрагментации филаментов актина («severing») и хорошо согласуются с тем фактом, что виллин претерпевает масштабное конформационное изменение в зависимости от концентрации ионов кальция с порогом около 20 мкМ [124].

5. Выводы

- 1) Коэффициент вариации концентраций рестриктазы системы рестрикции-модификации Esp1396I (70%) в клетках *E. coli* в 2,4 раза выше, чем метилазы (30%).
- 2) Внутриклеточная концентрация рестриктазы находится в обратной корреляции со способностью клеток к делению. Для метилазы такой эффект менее выражен и не столь статистически достоверен.
- 3) Метилаза, в отличие от рестриктазы Esp1396I, колокализуется с ДНК в клетках *E. coli*.
- 4) Методом субдифракционной локализационной микроскопии в сочетании с иммунофлуоресцентным окрашиванием установлено, что:
 - а) на стадии формирования перетяжки FtsZ преимущественно локализуется в клетках *E. coli* в области между дочерними клетками, формируя вытянутые по направлению вдоль клеток частично периодические структуры с шагом в пределах от 80 до 150 нм.
 - б) при SOS-ответе в клетках *E. coli* происходит частичная разборка FtsZ-филаментов, Z-кольца перестают формироваться, однако FtsZ продолжает формировать спиралевидные структуры с различным шагом и локализуется преимущественно вблизи мембраны клетки.
- 5) При SOS-ответе сохраняется преимущественная локализация FtsZ в областях клетки, свободных от ДНК.
- 6) Показано, что домен 6 виллина обратимо связывается с ионами кальция с константами диссоциации 22 мкМ и 2,8 мМ. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что виллин имеет сходный с гельзолином механизм

переключения активности в ответ на изменение концентрации ионов кальция.

6. Список сокращений

ЛМ – локализационная микроскопия

ПММА – полиметилметакрилат

БСА – бычий сывороточный альбумин

МТ – метилтрансфераза

ЭР – эндонуклеаза рестрикции

СРМ – система рестрикции-модификации

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

PBS – фосфатно-солевой буфер

7. Список публикаций по теме диссертации

Публикации в рецензируемых научных журналах:

1. S.O. Fedechkin, J. Brockerman, D.A. Pfaff, L. Burns, T. Webb, A. Nelson, F. Zhang, A.V. Sabantsev, A.S. Melnikov, C.J. McKnight, S.L. Smirnov. Gelsolin-like activation of villin: calcium sensitivity of the long helix in domain 6. // *Biochemistry*, 2013. 52(45): p. 7890-900.
2. А.В. Сабанцев, Г.Е. Побегалов, С.В. Мурашов, А.С. Мельников, М.А. Ходорковский. Модернизация флуоресцентного микроскопа для исследования биологических структур с субдифракционным разрешением. // *Научно-технические ведомости СПбГПУ*, 2012(2(146)): p. 94-99.
3. А.В. Сабанцев, С.О. Федечкин, М.А. Ходорковский, Г.Е. Побегалов, А.Д. Ведяйкин, С.Л. Смирнов. Характеризация кальций-связывающих свойств домена 6 виллина. // *Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математически науки*, 2014(1(189)): p. 101-107.

Материалы конференций:

1. A. Sabantsev, G. Pobegalov, A. Arseniev, A. Melnikov, M. Khodorkovskiy. Three-dimensional cross-correlation tracking of DIC bead images for optical trapping. First International Workshop on Pontin and Reptin. 2012. Bordeaux.
2. A. Sabantsev, I. Vishnyakov, A. Vedyaykin, G. Pobegalov, S. Borchsenius, M. Khodorkovskiy. Study of structures formed by FtsZ in *Escherichia coli* and *Mycoplasma hominis* cells. // *FEBS Journal, Special Issue: 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, 2013*. 280(Sup. s1): p. 469.
3. A.D. Vedyaykin, A.V. Sabantsev, I.E. Vishnyakov, Y.V. Fedorova, A.S. Melnikov, P.Y. Serdobintsev. Localization microscopy study of FtsZ structures in *E. coli* cells during SOSresponse. 1st International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures. 2014. St. Petersburg, Russia,.
4. Н.Е. Морозова, А.Д. Ведяйкин, А.В. Сабанцев, Я.В. Федорова, М.В. Якунина, К.В. Северинов, Изучение механизма преодоления бактериофагом системы рестрикции-модификации, Научно-практическая конференция с международным участием XLII «Неделя науки СПбГПУ». 2013: Санкт-Петербург, Россия. p. 232.

5. А.В. Сабанцев, А.Д. Ведяйкин, Г.Е. Побегалов, М.А. Ходорковский, С.Н. Борхсениус, И.Е. Вишняков. Исследование надмолекулярных белковых структур, формируемых в клетках микоплазм, методом локализационной микроскопии. БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА: 17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 21 - 26 апреля 2013 г.). 2013.
6. Semenova, E., Datsenko, K., Savitskaya, E., Sabantsev, A., Fedorova, Y., Strotskaja, A., Nenarokova, A., Musharova, O., and Severinov, K. (2014) Use of auto-primed spacer acquisition to study CRISPR adaptation in *Escherichia coli*, In CRISPR 2014 - The Prokaryotic Immune System CRISPR/Cas, Berlin, Germany.
7. Semenova, E., Datsenko, K., Savitskaya, E., Sabantsev, A., Fedorova, Y., and Severinov, K. (2014) Autoprimered spacer acquisition in *E.coli* cells, In CRISPR 2014 - The Prokaryotic Immune System CRISPR/Cas, Berlin, Germany

8. Список литературы

1. M.B. Elowitz, A.J. Levine, E.D. Siggia, P.S. Swain. Stochastic gene expression in a single cell. // *Science*, 2002. 297(5584): p. 1183-6.
2. K.I. Harrington, A. Sanchez. Eco-evolutionary dynamics of complex social strategies in microbial communities. // *Commun Integr Biol*, 2014. 7(1): p. e28230.
3. A. Raj, A. van Oudenaarden. Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences. // *Cell*, 2008. 135(2): p. 216-26.
4. G.G. Wilson, N.E. Murray. Restriction and modification systems. // *Annu Rev Genet*, 1991. 25: p. 585-627.
5. F.N. Enikeeva, K.V. Severinov, M.S. Gelfand. Restriction-modification systems and bacteriophage invasion: who wins? // *J Theor Biol*, 2010. 266(4): p. 550-9.
6. E. Cesnaviciene, G. Mitkaite, K. Stankevicius, A. Janulaitis, A. Lubys. Esp1396I restriction-modification system: structural organization and mode of regulation. // *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(2): p. 743-9.
7. B. Huang, M. Bates, X. Zhuang. Super-resolution fluorescence microscopy. // *Annu Rev Biochem*, 2009. 78: p. 993-1016.
8. N. Hayazawa, Y. Inouye, S. Kawata. Evanescent field excitation and measurement of dye fluorescence in a metallic probe near-field scanning optical microscope. // *J Microsc*, 1999. 194(Pt 2-3): p. 472-6.
9. M.G. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. // *J Microsc*, 2000. 198(Pt 2): p. 82-7.
10. S.W. Hell, J. Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. // *Opt Lett*, 1994. 19(11): p. 780-2.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. H. Shroff, H. White, E. Betzig. Photoactivated localization microscopy (PALM) of adhesion complexes. // *Curr Protoc Cell Biol*, 2008. Chapter 4: p. Unit 4 21.
15. D. Eggert, M. Naumann, R. Reimer, C.A. Voigt. Nanoscale glucan polymer network causes pathogen resistance. // *Sci Rep*, 2014. 4: p. 4159.

16. A. Benke, S. Manley. Live-cell dSTORM of cellular DNA based on direct DNA labeling. // *Chembiochem*, 2012. 13(2): p. 298-301.
17. G. Shtengel, J.A. Galbraith, C.G. Galbraith, J. Lippincott-Schwartz, J.M. Gillette, S. Manley, R. Sougrat, C.M. Waterman, P. Kanchanawong, M.W. Davidson, R.D. Fetter, H.F. Hess. Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(9): p. 3125-30.
18. B. Huang, S.A. Jones, B. Brandenburg, X. Zhuang. Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution. // *Nat Methods*, 2008. 5(12): p. 1047-52.
19. S.R. Pavani, M.A. Thompson, J.S. Biteen, S.J. Lord, N. Liu, R.J. Twieg, R. Piestun, W.E. Moerner. Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(9): p. 2995-9.
20. C. Coltharp, J. Xiao. Superresolution microscopy for microbiology. // *Cell Microbiol*, 2012. 14(12): p. 1808-18.
21. J. Lutkenhaus, S. Pichoff, S. Du. Bacterial cytokinesis: From Z ring to divisome. // *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2012. 69(10): p. 778-90.
22. P.L. Graumann. Cytoskeletal elements in bacteria. // *Annu Rev Microbiol*, 2007. 61: p. 589-618.
23. 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.
24. L.G. Monahan, A.T. Liew, A.L. Bottomley, E.J. Harry. Division site positioning in bacteria: one size does not fit all. // *Front Microbiol*, 2014. 5: p. 19.
25. Y. Chen, S.L. Milam, H.P. Erickson. SulaA inhibits assembly of FtsZ by a simple sequestration mechanism. // *Biochemistry*, 2012. 51(14): p. 3100-9.
26. 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.
27. P.C. Jennings, G.C. Cox, L.G. Monahan, E.J. Harry. Super-resolution imaging of the bacterial cytokinetic protein FtsZ. // *Micron*, 2010.
28. J.S. Biteen, E.D. Goley, L. Shapiro, W.E. Moerner. Three-dimensional super-resolution imaging of the midplane protein FtsZ in live *Caulobacter crescentus* cells using astigmatism. // *Chembiochem*, 2012. 13(4): p. 1007-12.
29. 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.
30. J. Buss, C. Coltharp, J. Xiao. Super-resolution imaging of the bacterial division machinery. // *J Vis Exp*, 2013(71).

31. 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.
32. 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.
33. S. Thanedar, W. Margolin. FtsZ exhibits rapid movement and oscillation waves in helix-like patterns in *Escherichia coli*. // Curr Biol, 2004. 14(13): p. 1167-73.
34. A. Bretscher, K. Weber. Villin is a major protein of the microvillus cytoskeleton which binds both G and F actin in a calcium-dependent manner. // Cell, 1980. 20(3): p. 839-847.
35. E. Andre, F. Lottspeich, M. Schleicher, A. Noegel. Severin, gelsolin, and villin share a homologous sequence in regions presumed to contain F-actin severing domains. // J Biol Chem, 1988. 263(2): p. 722-7.
36. K.N. Pestonjamas, R.K. Pope, J.D. Wulfschlegel, E.J. Luna. Supervillin (p205): A novel membrane-associated, F-actin-binding protein in the villin/gelsolin superfamily. // J Cell Biol, 1997. 139(5): p. 1255-69.
37. S.S. Gangopadhyay, N. Takizawa, C. Gallant, A.L. Barber, H.D. Je, T.C. Smith, E.J. Luna, K.G. Morgan. Smooth muscle archvillin: a novel regulator of signaling and contractility in vascular smooth muscle. // J Cell Sci, 2004. 117(Pt 21): p. 5043-57.
38. S. Khurana, S.P. George. Regulation of cell structure and function by actin-binding proteins: villin's perspective. // FEBS Lett, 2008. 582(14): p. 2128-39.
39. A.M. McGough, C.J. Staiger, J.K. Min, K.D. Simonetti. The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions. // FEBS Lett, 2003. 552(2-3): p. 75-81.
40. T.P. Walsh, A. Weber, K. Davis, E. Bonder, M. Mooseker. Calcium dependence of villin-induced actin depolymerization. // Biochemistry, 1984. 23(25): p. 6099-102.
41. А.П. Якимов, С.О. Федечкин, К.Б. Нериновский, К.А. Шабалин, С.Л. Смирнов. Структурная стабильность домена б виллина в отсутствие ионов кальция. // Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки, 2013(2 (170)): p. 149-154.
42. A.V. Jennison, N.K. Verma. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. // FEMS Microbiol Rev, 2004. 28(1): p. 43-58.
43. A. Sabantsev, G. Pobegalov, A. Arseniev, A. Melnikov, M. Khodorkovskiy. *Three-dimensional cross-correlation tracking of DIC bead images for optical trapping*. in *First International Workshop on Pontin and Reptin*. 2012. Bordeaux.
44. A. Sabantsev, I. Vishnyakov, A. Vedyaykin, G. Pobegalov, S. Borchsenius, M. Khodorkovskiy. Study of structures formed by FtsZ in *Escherichia coli* and *Mycoplasma hominis* cells. // FEBS Journal, Special Issue: 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, 2013. 280(Sup. s1): p. 469.

45. A.D. Vedyaykin, A.V. Sabantsev, I.E. Vishnyakov, Y.V. Fedorova, A.S. Melnikov, P.Y. Serdobintsev. *Localization microscopy study of FtsZ structures in E. coli cells during SOSresponse.* in *1st International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures.* 2014. St. Petersburg, Russia,.
46. Н.Е. Морозова, А.Д. Ведяйкин, А.В. Сабанцев, Я.В. Федорова, М.В. Якунина, К.В. Северинов, *Изучение механизма преодоления бактериофагом системы рестрикции-модификации,* in *Научно-практическая конференция с международным участием XLII «Неделя науки СПбГПУ».* 2013: Санкт-Петербург, Россия. p. 232.
47. А.В. Сабанцев, А.Д. Ведяйкин, Г.Е. Побегалов, М.А. Ходорковский, С.Н. Борхсениус, И.Е. Вишняков. *Исследование надмолекулярных белковых структур, формируемых в клетках микоплазм, методом локализационной микроскопии.* in *БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА: 17-я Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 21 - 26 апреля 2013 г.).* 2013.
48. S.O. Fedechkin, J. Brockerman, D.A. Pfaff, L. Burns, T. Webb, A. Nelson, F. Zhang, A.V. Sabantsev, A.S. Melnikov, C.J. McKnight, S.L. Smirnov. Gelsolin-like activation of villin: calcium sensitivity of the long helix in domain 6. // *Biochemistry*, 2013. 52(45): p. 7890-900.
49. А.В. Сабанцев, Г.Е. Побегалов, С.В. Мурашов, А.С. Мельников, М.А. Ходорковский. Модернизация флуоресцентного микроскопа для исследования биологических структур с субдифракционным разрешением. // *Научно-технические ведомости СПбГПУ*, 2012(2(146)): p. 94-99.
50. А.В. Сабанцев, С.О. Федечкин, М.А. Ходорковский, Г.Е. Побегалов, А.Д. Ведяйкин, С.Л. Смирнов. Характеризация кальций-связывающих свойств домена 6 виллина. // *Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки*, 2014(1(189)): p. 101-107.
51. G.P. Singh. Coupling Between Noise and Plasticity in *E. coli*. // *G3*, 2013. 3(12): p. 2115-20.
52. A. Eldar, V.K. Chary, P. Xenopoulos, M.E. Fontes, O.C. Loson, J. Dworkin, P.J. Piggot, M.B. Elowitz. Partial penetrance facilitates developmental evolution in bacteria. // *Nature*, 2009. 460(7254): p. 510-4.
53. A. Novick, M. Weiner. Enzyme Induction as an All-or-None Phenomenon. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1957. 43(7): p. 553-66.
54. A. Sanchez, I. Golding. Genetic determinants and cellular constraints in noisy gene expression. // *Science*, 2013. 342(6163): p. 1188-93.
55. P.J. Choi, L. Cai, K. Frieda, X.S. Xie. A stochastic single-molecule event triggers phenotype switching of a bacterial cell. // *Science*, 2008. 322(5900): p. 442-6.
56. J. Yu, J. Xiao, X. Ren, K. Lao, X.S. Xie. Probing gene expression in live cells, one protein molecule at a time. // *Science*, 2006. 311(5767): p. 1600-3.
57. Y. Taniguchi, P.J. Choi, G.W. Li, H. Chen, M. Babu, J. Hearn, A. Emili, X.S. Xie. Quantifying *E. coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. // *Science*, 2010. 329(5991): p. 533-8.

58. I. Mruk, I. Kobayashi. To be or not to be: regulation of restriction-modification systems and other toxin-antitoxin systems. // *Nucleic Acids Res*, 2014. 42(1): p. 70-86.
59. I. Mruk, R.M. Blumenthal. Real-time kinetics of restriction-modification gene expression after entry into a new host cell. // *Nucleic Acids Research*, 2008. 36(8): p. 2581-2593.
60. M.O. Nagornyykh, E.S. Bogdanova, A.S. Protsenko, M.V. Zakharova, A.S. Solonin, K.V. Severinov. [Regulation of gene expression in type II restriction-modification system]. // *Genetika*, 2008. 44(5): p. 606-15.
61. S.E. Luria, M.L. Human. A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses. // *J Bacteriol*, 1952. 64(4): p. 557-69.
62. W. Arber, D. Dussoix. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. I. Host controlled modification of bacteriophage lambda. // *J Mol Biol*, 1962. 5: p. 18-36.
63. F.N. Enikeeva, K.V. Severinov, M.S. Gelfand. Restriction-modification systems and bacteriophage invasion: Who wins? // *Journal of Theoretical Biology*, 2010. 266(4): p. 550-559.
64. D. Chandran, F.T. Bergmann, H.M. Sauro. TinkerCell: modular CAD tool for synthetic biology. // *J Biol Eng*, 2009. 3: p. 19.
65. E. Bogdanova, M. Zakharova, S. Streeter, J. Taylor, T. Heyduk, G. Kneale, K. Severinov. Transcription regulation of restriction-modification system Esp1396I. // *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(10): p. 3354-66.
66. B. Alberts, J.H. Wilson, T. Hunt, *Molecular biology of the cell*. 5th ed. 2008, New York: Garland Science. xxxiii, 1601, 90 p.
67. D.E. Wolf, *The Optics of Microscope Image Formation*, in *Methods in Cell Biology*. 2003, Academic Press. p. 11-43.
68. J. Dai, M.P. Sheetz. Mechanical properties of neuronal growth cone membranes studied by tether formation with laser optical tweezers. // *Biophys J*, 1995. 68(3): p. 988-96.
69. S. Keen, et al. Comparison of a high-speed camera and a quadrant detector for measuring displacements in optical tweezers. // *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 2007. 9(8): p. S264.
70. H.F. Fan, M.M. Cox, H.W. Li. Developing single-molecule TPM experiments for direct observation of successful RecA-mediated strand exchange reaction. // *PLoS One*, 2011. 6(7): p. e21359.
71. H.F. Hsu, K.V. Ngo, S. Chittani-Pattu, M.M. Cox, H.W. Li. Investigating *Deinococcus radiodurans* RecA protein filament formation on double-stranded DNA by a real-time single-molecule approach. // *Biochemistry*, 2011. 50(39): p. 8270-80.
72. D. Kilinc, G.U. Lee. Advances in magnetic tweezers for single molecule and cell biophysics. // *Integr Biol (Camb)*, 2014. 6(1): p. 27-34.
73. N. Pouget, C. Dennis, C. Turlan, M. Grigoriev, M. Chandler, L. Salome. Single-particle tracking for DNA tether length monitoring. // *Nucleic Acids Res*, 2004. 32(9): p. e73.

74. D.A. Schafer, J. Gelles, M.P. Sheetz, R. Landick. Transcription by single molecules of RNA polymerase observed by light microscopy. // *Nature*, 1991. 352(6334): p. 444-448.
75. M.K. Cheezum, W.F. Walker, W.H. Guilford. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. // *Biophys J*, 2001. 81(4): p. 2378-88.
76. R.E. Thompson, D.R. Larson, W.W. Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. // *Biophys J*, 2002. 82(5): p. 2775-83.
77. A. Yildiz, P.R. Selvin. Fluorescence imaging with one nanometer accuracy: application to molecular motors. // *Acc Chem Res*, 2005. 38(7): p. 574-82.
78. D. Alcor, G. Gouzer, A. Triller. Single-particle tracking methods for the study of membrane receptors dynamics. // *Eur J Neurosci*, 2009. 30(6): p. 987-97.
79. G.R. Bowman, L.R. Comolli, J. Zhu, M. Eckart, M. Koenig, K.H. Downing, W.E. Moerner, T. Earnest, L. Shapiro. A polymeric protein anchors the chromosomal origin/ParB complex at a bacterial cell pole. // *Cell*, 2008. 134(6): p. 945-55.
80. C. Kural, H. Kim, S. Syed, G. Goshima, V.I. Gelfand, P.R. Selvin. Kinesin and dynein move a peroxisome in vivo: a tug-of-war or coordinated movement? // *Science*, 2005. 308(5727): p. 1469-72.
81. J. Ortega-Arroyo, P. Kukura. Interferometric scattering microscopy (iSCAT): new frontiers in ultrafast and ultrasensitive optical microscopy. // *Phys Chem Chem Phys*, 2012. 14(45): p. 15625-36.
82. D.H. Burns, J.B. Callis, G.D. Christian, E.R. Davidson. Strategies for attaining superresolution using spectroscopic data as constraints. // *Appl. Opt.*, 1985. 24(2): p. 154-161.
83. A.M. van Oijen, J. Köhler, J. Schmidt, M. Müller, G.J. Brakenhoff. 3-Dimensional super-resolution by spectrally selective imaging. // *Chemical Physics Letters*, 1998. 292(1-2): p. 183-187.
84. A.M. van Oijen, J. Köhler, J. Schmidt, M. Müller, G.J. Brakenhoff. Far-field fluorescence microscopy beyond the diffraction limit. // *J. Opt. Soc. Am. A*, 1999. 16(4): p. 909-915.
85. A.V. Naumov, A.A. Gorshlev, Y.G. Vainer, L. Kador, J. Kohler. Far-field nanodiagnostics of solids with visible light by spectrally selective imaging. // *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009. 48(51): p. 9747-50.
86. M. Bates, T.R. Blosser, X. Zhuang. Short-range spectroscopic ruler based on a single-molecule optical switch. // *Phys Rev Lett*, 2005. 94(10): p. 108101.
87. M. Heilemann, E. Margeat, R. Kasper, M. Sauer, P. Tinnefeld. Carbocyanine Dyes as Efficient Reversible Single-Molecule Optical Switch. // *Journal of the American Chemical Society*, 2005. 127(11): p. 3801-3806.
88. M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, M. Sauer. Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes. // *Angewandte Chemie International Edition*, 2008. 47(33): p. 6172-6176.

89. G.T. Dempsey, M. Bates, W.E. Kowtoniuk, D.R. Liu, R.Y. Tsien, X. Zhuang. Photoswitching Mechanism of Cyanine Dyes. // *Journal of the American Chemical Society*, 2009. 131(51): p. 18192-18193.
90. S. van de Linde, R. Kasper, M. Heilemann, M. Sauer. Photoswitching microscopy with standard fluorophores. // *Applied Physics B: Lasers and Optics*, 2008. 93(4): p. 725-731.
91. J. Fölling, M. Bossi, H. Bock, R. Medda, C.A. Wurm, B. Hein, S. Jakobs, C. Eggeling, S.W. Hell. Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. // *Nat Meth*, 2008. 5(11): p. 943-945.
92. R. Zondervan, F. Kulzer, S.B. Orlinskii, M. Orrit. Photoblinking of Rhodamine 6G in Poly(vinyl alcohol): Radical Dark State Formed through the Triplet. // *The Journal of Physical Chemistry A*, 2003. 107(35): p. 6770-6776.
93. D. Baddeley, I.D. Jayasinghe, C. Cremer, M.B. Cannell, C. Soeller. Light-Induced Dark States of Organic Fluochromes Enable 30 nm Resolution Imaging in Standard Media. // *Biophysical journal*, 2009. 96(2): p. L22-L24.
94. P. Lemmer, M. Gunkel, D. Baddeley, R. Kaufmann, A. Urich, Y. Weiland, J. Reymann, P. Müller, M. Hausmann, C. Cremer. SPDM: light microscopy with single-molecule resolution at the nanoscale. // *Applied Physics B: Lasers and Optics*, 2008. 93(1): p. 1-12.
95. P. Lemmer, M. Gunkel, Y. Weiland, P. MÜLLER, D. Baddeley, R. Kaufmann, A. Urich, H. Eipel, R. Amberger, M. Hausmann, C. Cremer. Using conventional fluorescent markers for far-field fluorescence localization nanoscopy allows resolution in the 10-nm range. // *Journal of Microscopy*, 2009. 235(2): p. 163-171.
96. M. Heilemann, S. van de Linde, A. Mukherjee, M. Sauer. Super-Resolution Imaging with Small Organic Fluorophores. // *Angewandte Chemie International Edition*, 2009. 48(37): p. 6903-6908.
97. N. Olivier, D. Keller, V.S. Rajan, P. Gonczy, S. Manley. Simple buffers for 3D STORM microscopy. // *Biomed Opt Express*, 2013. 4(6): p. 885-99.
98. J. Vogelsang, C. Steinhauer, C. Forthmann, I.H. Stein, B. Person-Skegro, T. Cordes, P. Tinnefeld. Make them Blink: Probes for Super-Resolution Microscopy. // *ChemPhysChem*, 2010. 11(12): p. 2475-2490.
99. V.N. Belov, C.A. Wurm, V.P. Boyarskiy, S. Jakobs, S.W. Hell. Rhodamines NN: a novel class of caged fluorescent dyes. // *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010. 49(20): p. 3520-3.
100. M.J. Mlodzianoski, J.M. Schreiner, S.P. Callahan, K. Smolkova, A. Dlaskova, J. Santorova, P. Jezek, J. Bewersdorf. Sample drift correction in 3D fluorescence photoactivation localization microscopy. // *Opt Express*, 2011. 19(16): p. 15009-19.
101. Y. Wang, J. Schnitzbauer, Z. Hu, X. Li, Y. Cheng, Z.-L. Huang, B. Huang. Localization events-based sample drift correction for localization microscopy with redundant cross-correlation algorithm. // *Optics Express*, 2014. 22(13): p. 15982-15991.
102. R. Henriques, M. Lelek, E.F. Fornasiero, F. Valtorta, C. Zimmer, M.M. Mhlanga. QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ. // *Nat Methods*, 2010. 7(5): p. 339-40.

103. 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.
104. A.G. York, A. Ghitani, A. Vaziri, M.W. Davidson, H. Shroff. Confined activation and subdiffractional localization enables whole-cell PALM with genetically expressed probes. // *Nat Methods*, 2011. 8(4): p. 327-33.
105. R. McGorty, D. Kamiyama, B. Huang. Active Microscope Stabilization in Three Dimensions Using Image Correlation. // *Opt Nanoscopy*, 2013. 2(1).
106. S.H. Lee, M. Baday, M. Tjioe, P.D. Simonson, R. Zhang, E. Cai, P.R. Selvin. Using fixed fiduciary markers for stage drift correction. // *Opt Express*, 2012. 20(11): p. 12177-83.
107. W. Steffen, D. Smith, R. Simmons, J. Sleep. Mapping the actin filament with myosin. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(26): p. 14949-54.
108. A.R. Carter, G.M. King, T.A. Ulrich, W. Halsey, D. Alchenberger, T.T. Perkins. Stabilization of an optical microscope to 0.1 nm in three dimensions. // *Appl Opt*, 2007. 46(3): p. 421-7.
109. L. Nugent-Glandorf, T.T. Perkins. Measuring 0.1-nm motion in 1 ms in an optical microscope with differential back-focal-plane detection. // *Opt Lett*, 2004. 29(22): p. 2611-3.
110. Y.L. Shih, L. Rothfield. The bacterial cytoskeleton. // *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006. 70(3): p. 729-54.
111. 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.
112. S.G. Addinall, J. Lutkenhaus. *FtsZ*-spirals and -arcs determine the shape of the invaginating septa in some mutants of *Escherichia coli*. // *Mol Microbiol*, 1996. 22(2): p. 231-7.
113. E.F. Bi, J. Lutkenhaus. *FtsZ* ring structure associated with division in *Escherichia coli*. // *Nature*, 1991. 354(6349): p. 161-4.
114. R. Strepp, S. Scholz, S. Kruse, V. Speth, R. Reski. Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division for the homolog of the bacterial cell division protein *FtsZ*, an ancestral tubulin. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(8): p. 4368-73.
115. I. Erill, S. Campoy, J. Barbe. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. // *FEMS Microbiol Rev*, 2007. 31(6): p. 637-56.
116. 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.
117. D. Greenfield, A.L. McEvoy, H. Shroff, G.E. Crooks, N.S. Wingreen, E. Betzig, J. Liphardt. Self-organization of the *Escherichia coli* chemotaxis network imaged with super-resolution light microscopy. // *PLoS Biol*, 2009. 7(6): p. e1000137.

118. S.Y. Kim, Z. Gitai, A. Kinkhabwala, L. Shapiro, W.E. Moerner. Single molecules of the bacterial actin MreB undergo directed treadmilling motion in *Caulobacter crescentus*. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(29): p. 10929-34.
119. J.S. Biteen, L. Shapiro, W.E. Moerner. Exploring protein superstructures and dynamics in live bacterial cells using single-molecule and superresolution imaging. // *Methods Mol Biol*, 2011. 783: p. 139-58.
120. M.D. Lew, S.F. Lee, J.L. Ptacin, M.K. Lee, R.J. Twieg, L. Shapiro, W.E. Moerner. Three-dimensional superresolution colocalization of intracellular protein superstructures and the cell surface in live *Caulobacter crescentus*. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(46): p. E1102-10.
121. J.L. Ptacin, S.F. Lee, E.C. Garner, E. Toro, M. Eckart, L.R. Comolli, W.E. Moerner, L. Shapiro. A spindle-like apparatus guides bacterial chromosome segregation. // *Nat Cell Biol*, 2010. 12(8): p. 791-8.
122. S.L. Smirnov, N.G. Isern, Z.G. Jiang, D.W. Hoyt, C.J. McKnight. The isolated sixth gelsolin repeat and headpiece domain of villin bundle F-actin in the presence of calcium and are linked by a 40-residue unstructured sequence. // *Biochemistry*, 2007. 46(25): p. 7488-96.
123. N. Kumar, S. Khurana. Identification of a functional switch for actin severing by cytoskeletal proteins. // *J Biol Chem*, 2004. 279(24): p. 24915-8.
124. L.K. Hesterberg, K. Weber. Ligand-induced conformational changes in villin, a calcium-controlled actin-modulating protein. // *J Biol Chem*, 1983. 258(1): p. 359-64.
125. J. Finidori, E. Friederich, D.J. Kwiatkowski, D. Louvard. In vivo analysis of functional domains from villin and gelsolin. // *J Cell Biol*, 1992. 116(5): p. 1145-55.
126. J. Meng, D. Vardar, Y. Wang, H.C. Guo, J.F. Head, C.J. McKnight. High-resolution crystal structures of villin headpiece and mutants with reduced F-actin binding activity. // *Biochemistry*, 2005. 44(36): p. 11963-73.
127. D. Vardar, D.A. Buckley, B.S. Frank, C.J. McKnight. NMR structure of an F-actin-binding "headpiece" motif from villin. // *J Mol Biol*, 1999. 294(5): p. 1299-310.
128. N.C. Shaner, R.E. Campbell, P.A. Steinbach, B.N. Giepmans, A.E. Palmer, R.Y. Tsien. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. // *Nat Biotechnol*, 2004. 22(12): p. 1567-72.
129. T. Nagai, K. Ibata, E.S. Park, M. Kubota, K. Mikoshiba, A. Miyawaki. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. // *Nat Biotechnol*, 2002. 20(1): p. 87-90.
130. J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. // *Nat Methods*, 2012. 9(7): p. 676-82.
131. T.J. Collins. ImageJ for microscopy. // *Biotechniques*, 2007. 43(1 Suppl): p. 25-30.

132. V. Girish, A. Vijayalakshmi. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. // *Indian J Cancer*, 2004. 41(1): p. 47.
133. K. Williams, M.A. Savageau, R.M. Blumenthal. A bistable hysteretic switch in an activator-repressor regulated restriction-modification system. // *Nucleic Acids Res*, 2013. 41(12): p. 6045-57.
134. A. Ghosh, I. Passaris, M. Tesfazgi Mebrhatu, S. Rocha, K. Vanoirbeek, J. Hofkens, A. Aertsen. Cellular localization and dynamics of the Mrr type IV restriction endonuclease of *Escherichia coli*. // *Nucleic Acids Res*, 2014. 42(6): p. 3908-18.
135. H. Cho, H.R. McManus, S.L. Dove, T.G. Bernhardt. Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(9): p. 3773-8.
136. И.Е. Вишняков, С.Н. Борхсениус. Белок FtsZ и цитокинез у бактерий. // *Цитология*, 2007. 49(5): p. 421-429.