

Санкт-Петербургский политехнический университет  
Петра Великого  
Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций

На правах рукописи

**Ведяйкин Алексей Дмитриевич**

**Характеризация структур, формируемых белками FtsZ в клетках  
*Escherichia coli*, *Mycoplasma gallisepticum* и *Acholeplasma laidlawii* с  
использованием методов микроскопии сверхвысокого разрешения**

Направление подготовки **03.06.01 Физика и астрономия**

---

*Код и наименование*

Направленность **03.06.01 12 «Биофизика»**

---

*Код и наименование*

## **НАУЧНЫЙ ДОКЛАД**

об основных результатах научно-квалификационной работы (диссертации)

Автор работы: Ведяйкин А.Д.

Научный руководитель: к.ф.-м.н. Ходорковский М.А.

Санкт Петербург – 2018

Научно-квалификационная работа выполнена в НИК «Нанобиотехнологии» Института физики, нанотехнологий и телекоммуникаций федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Директор НИК  
Нанобиотехнологии СПбПУ:

*Ходорковский М.А., к.ф.-м.н.*

Научный руководитель:

*Ходорковский М.А., к.ф.-м.н.*

Рецензент:

*Байтин Д.М., к.б.н.,  
НИЦ «Курчатовский  
институт» ФГБУ ПИЯФ им.  
Б.П. Константинова,  
Старший научный сотрудник*

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» и на сайте Электронной библиотеки СПбПУ по адресу: <http://elib.spbstu.ru>

## Содержание

Аннотация .....	4
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ .....	5
Актуальность работы.....	5
Цель и задачи исследования .....	6
Научная новизна.....	7
Теоретическая и практическая значимость .....	8
Апробация работы.....	9
Публикации.....	9
Представление научного доклада: основные положения .....	9
СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.....	11
Объекты и методы исследования .....	11
Результаты и их обсуждение.....	13
Заключение .....	25
Выводы .....	26
Список литературы .....	27
Список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной работы (диссертации).....	29

## **Аннотация**

В данной работе были исследованы некоторые свойства белков FtsZ видов *Escherichia coli*, *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma gallisepticum*. При помощи методов флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения и электронной микроскопии были проанализированы особенности структур, формируемых данными белками в бактериальных клетках. Также были исследованы межбелковые взаимодействия с участием указанных белков. Результаты работы проливают свет на многие детали процесса деления как хорошо изученного вида — *E. coli*, так и слабо изученных видов микоплазм — *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*.

Выпускная квалификационная работа (научный доклад) изложена на 29 страницах машинописного текста и включает: общую характеристику работы; основную часть (содержание работы), в том числе объекты и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы (12 источников); список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной работы (диссертации). Работа содержит 10 иллюстраций.

Ключевые слова: FtsZ, белки цитоскелета, локализационная микроскопия, дивисома, цитокинез.

In this paper, some properties of FtsZ proteins of *Escherichia coli*, *Acholeplasma laidlawii* and *Mycoplasma gallisepticum* were investigated. Using the methods of super-resolution fluorescence microscopy and electron microscopy, some features of the structures formed by these proteins in bacterial cells were analyzed. Protein-protein interactions involving these proteins were also studied. The results of the work shed light on many details of division process of both well-studied species - *E. coli* and poorly studied mycoplasma species - *A. laidlawii* and *M. gallisepticum*.

Key words: FtsZ, cytoskeleton proteins, single-molecule localization microscopy, divisome, cytokinesis.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность работы

Данная работа посвящена изучению белков FtsZ трёх видов бактерий: *Escherichia coli*, *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma gallisepticum*. Белок FtsZ — хорошо известный белок цитоскелета бактерий, являющийся гомологом эукариотического тубулина. Данный белок является одним из наиболее консервативных белков цитоскелета и присутствует в большинстве бактерий, у многих архей, а также в некоторых органеллах эукариот, выполняя ключевую роль в процессе цитокинеза.

В *E.coli*, а также в нескольких других модельных видах FtsZ формирует так называемое сократительное кольцо (или Z-кольцо), которое в комплексе с несколькими десятками дополнительных белков деления выполняет роль аппарата деления бактерий (или дивисомы). Существует две основные модели, описывающие роль FtsZ в процессе деления. Согласно одной из них, этот белок формирует Z-кольцо, состоящее из слабо упорядоченных линейных полимеров FtsZ. В рамках этой модели основная функция белка FtsZ заключается в формировании каркаса для других белков дивисомы. Другая модель предполагает более высокую степень упорядочения полимеров FtsZ в составе Z-кольца, которые выровнены друг относительно друга и формируют замкнутое кольцо или спираль. При этом предполагается, что проскальзывание полимеров FtsZ друг относительно друга обеспечивает генерацию сократительной силы. Несмотря на интенсивное изучение процесса бактериального деления, до сих пор нет консенсуса по поводу точной структуры Z-кольца, поэтому невозможно сказать, какая из указанных выше моделей является справедливой. Получение дополнительных данных о точной структуре этого кольца на разных стадиях деления клетки могло бы помочь в уточнении роли белка FtsZ. В рамках настоящей работы был разработан ряд методик локализационной

микроскопии, что позволило визуализировать Z-кольцо в клетках *E.coli* с субдифракционным разрешением.

Если даже в таком хорошо изученном организме, как *E.coli*, существуют значительные пробелы в понимании роли и функций белка FtsZ, то данные о функциях и структурах, формируемых этим белком в микоплазмах, исследование которых представляет не только фундаментальный, но и практический интерес, практически полностью отсутствуют. В значительной мере отсутствие структурных данных обусловлено тем, что размер этих организмов слишком мал для традиционной флуоресцентной микроскопии.

В связи с тем, что разработанные нами методики локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения обеспечивают возможность характеризовать белковые структуры в объектах с такими размерами, в рамках настоящей работы были визуализованы структуры белка FtsZ двух видов микоплазм *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma gallisepticum* и получены сведения о его функциях путем определения белков-партнеров биохимическими методами.

Так как объекты исследования в настоящей работе являются патогенами, а белок FtsZ в них может быть использован в качестве перспективной мишени для антибиотиков, то получение новых данных о его свойствах и процессах с его участием имеет безусловно практическую значимость, что и определяет актуальность задач настоящей работы.

### **Цель и задачи исследования**

**Цель работы** — исследование свойств белков FtsZ видов *Escherichia coli*, *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma gallisepticum* для выявления их роли в процессе деления.

### **Задачи работы:**

1. Разработка методик, позволяющих осуществлять субдифракционную визуализацию методами флуоресцентной микроскопии в фиксированных и

живых клетках в различных режимах: двухмерная, трехмерная, многоцветная визуализация.

2. Субдифракционная визуализация структур, формируемых белком FtsZ *E. coli* в фиксированных (метод иммунофлуоресценции) и живых клетках (флуоресцентный белок слияния) *E. coli*.

3. Получение и тестирование поликлональных антител к белкам FtsZ видов *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*.

4. Субдифракционная визуализация структур, формируемых белками FtsZ видов *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* в фиксированных клетках *E. coli*, *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* (метод иммунофлуоресценции).

5. Получение штамма *M. gallisepticum* с эндогенно-экспрессируемым флуоресцентно-меченым белком FtsZ, а также визуализация с его использованием структур, формируемых этим белком в живых клетках. Сравнение результатов визуализации с результатами, полученными методом иммунофлуоресценции (задача №4).

6. Идентификация белков – партнеров белков FtsZ видов *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* в клетках *E. coli*, *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* (методы ко-иммунопреципитации и со-осаждения).

### **Научная новизна**

Результаты, изложенные в данной работе, получены впервые.

Выявлено утолщение Z-кольца в ходе его сокращения в *E. coli*, что поддерживает гипотезу о том, что Z-кольцо сокращается за счёт перераспределения протофиламентов FtsZ в его составе, а не за счёт их укорочения или исключения из Z-кольца.

Впервые визуализированы структуры, формируемые белками FtsZ в клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*. Эти структуры существенно отличаются от классического Z-кольца. Более того, способность белков FtsZ микоплазм ко-локализоваться с ДНК, а также в области терминальной

органеллы может говорить о вовлечении белков FtsZ в отличные от цитокинеза процессы, а именно в репликацию и сегрегацию ДНК и клеточную подвижность.

Впервые идентифицированы белки - партнеры FtsZ в клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*. Среди этих белков не было выявлено гомологов белков деления, однако было установлено, что FtsZ микоплазм взаимодействует с предполагаемыми цитоскелет-подобными белками (EFtu, DnaK, IbpA), а также с рядом белков, участвующих в различных метаболических путях. Взаимодействие с белками цитоскелета может отражать участие FtsZ в формировании сложного белкового каркаса микоплазменной клетки, что косвенно указывает на одну из гипотетических ролей FtsZ, связанную с поддержанием формы клетки.

Для получения новых данных о свойствах белков FtsZ видов *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* было исследовано их влияние на деление *E. coli*, в том числе были визуализированы структуры, формируемые данными белками при гетерологической экспрессии в *E. coli*, а также охарактеризованы белок-белковые взаимодействия. Это позволило сделать вывод о том, что механизм блокирования деления в случае экспрессии белка FtsZ *A. laidlawii* основан на связывании мономеров FtsZ *E. coli*, что приводит к понижению эффективной концентрации последнего, вследствие чего Z-кольцо не формируется. Кроме того, были выявлены белки *E. coli*, с которыми взаимодействуют белки FtsZ микоплазм, что позволило предположить наличие аналогичных взаимодействий в клетках микоплазм.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Результаты данной работы носят как фундаментальный, так и прикладной характер. Как отмечено выше, продемонстрированное в работе утолщение Z-кольца в клетках *E. coli* указывает на то, что в ходе сокращения имеет место перераспределение протофиламентов в составе Z-кольца, причём протофиламенты не исключаются из состава Z-кольца.



Данные о структурах, формируемых белком FtsZ в клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*, позволили предположить существенное отличие роли и функций белка FtsZ в клетках микоплазм от таковых в клетках хорошо изученных видов, в том числе *E. coli*. Анализ белков-партнеров FtsZ отмеченных видов микоплазм также указывает на то, что в будущем требуется более детально исследовать как механизмы деления микоплазм в целом, так и характер участия белка FtsZ в этом процессе.

Принимая во внимание тот факт, что белок FtsZ рассматривается как одна из перспективных мишеней для антибиотиков будущего, в долгосрочной перспективе исследование свойств данного белка может иметь практический интерес для лечения бактериальных инфекций.

Кроме того, разработанные методики микроскопии сверхвысокого разрешения могут быть в дальнейшем использованы для широкого спектра задач, связанных с визуализацией внутриклеточных структур с субдифракционным разрешением.

### **Апробация работы**

Промежуточные результаты работы докладывались на ряде международных и всероссийских конференций. Было опубликовано 10 тезисов докладов.

### **Публикации**

В ходе выполнения работы опубликовано 8 статей в рецензируемых научных журналах.

### **Представление научного доклада: основные положения**

1. Разработанная методика микроскопии сверхвысокого разрешения позволяет осуществлять визуализацию структур, формируемых белком FtsZ *E. coli*, с разрешением не хуже 20 нм в плоскости образца.

2. При помощи микроскопии сверхвысокого разрешения показано, что Z-кольцо *E. coli* утолщается в ходе сокращения, что говорит в пользу того, что сокращение Z-кольца происходит за счёт перемещения протофиламентов FtsZ друг относительно другов, а не за счёт их исключения из Z-кольца.

3. Структуры, формируемые белками FtsZ видов *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*, отличаются от классического Z-кольца *E. coli*, однако локализация в области перетяжки подтверждает участие FtsZ в делении микоплазм.

4. Белки FtsZ *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* взаимодействуют с белками DnaK, IbpA и EFTu, которые являются гипотетическими цитоскелет-подобными белками, что может говорить об участии FtsZ в формировании многокомпонентного белкового каркаса микоплазменной клетки

5. Белок FtsZ *M. gallisepticum* способен локализоваться в области терминальной органеллы, что может говорить об участии FtsZ в механизмах подвижности клетки.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Объекты и методы исследования

Объектом исследования работы является белок FtsZ трёх видов бактерий — *Escherichia coli*, *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma gallisepticum*. Хорошо известно, что данный белок играет одну из ключевых ролей в процессе деления бактерий и в настоящее время рассматривается как одна из перспективных мишеней для новых антибиотиков [1]. FtsZ способен полимеризоваться с формированием так называемого Z-кольца, которое выступает каркасом для нескольких десятков белков; все вместе они образуют дивисому — комплекс деления [2]. В *E. coli* (а также в нескольких других модельных видах) роль FtsZ в целом ясна, она заключается в основном в направлении активности белков, вовлеченных в ремоделирование клеточной стенки [3]. Однако до сих пор неизвестна точная структура Z-кольца, которая может иметь большое значение для понимания молекулярных механизмов функционирования дивисомы, в частности, для оценки влияния гипотетической сократительной силы, которую может генерировать Z-кольцо [4]. Следует отметить, что FtsZ демонстрирует высокую консервативность среди различных видов, однако механизмы деления в целом довольно существенно различаются в различных видах бактерий. Например, в *B. subtilis* FtsZ участвует не только в бинарном делении, но и в споруляции [5], а в одном из родственных *E. coli* видов бактерий FtsZ участвует в формировании уникальной дивисомы, которая расположена вдоль длинной оси клетки [6]. В различных видах FtsZ имеет различный набор белков-партнеров, входящих в состав комплекса деления. Важно отметить, что механизм деления, основанный на способности FtsZ формировать Z-кольцо, не является единственным; так, в состоянии L-формы *B. subtilis* делится за счёт избыточного синтеза мембраны, который обеспечивает спонтанный цитокинез, при этом FtsZ не является необходимым для успешного деления [5]. Существуют виды, лишённые

белка FtsZ, хотя среди бактерий это является исключением. Например, в хламидиях цитокинез обеспечивается, по-видимому, формированием кольца деления, основанного на другом белке цитоскелета – MreB [7]. Совершенно удивительными бактериями в плане деления представляются микоплазмы (класс *Mollicutes*), большинство которых имеет ген *ftsZ*. На основании гомологии с другими видами бактерий, предполагают, что микоплазмы имеют схожие с другими видами бактерий механизмы деления. Однако в микоплазмах закономерно отсутствуют все гены, связанные с синтезом и ремоделированием клеточной стенки, так как хорошо известно, что микоплазмы лишены её. С учётом обсуждаемой выше роли FtsZ в *E. coli* становится непонятной соответствующая роль FtsZ в микоплазмах. Можно предположить, что FtsZ в микоплазмах не связан с делением, и микоплазмы делятся подобно L-форме за счёт усиленного синтеза мембраны, однако имеющиеся литературные данные на настоящий момент не позволяют сделать об этом однозначный вывод.

Для исследования структур, формируемых белком FtsZ в клетках трёх видов бактерий — *E. coli*, *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*, в данной работе были использованы методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения (главным образом локализационная микроскопия) и электронной микроскопии. Для флуоресцентного мечения целевых белков были использованы два основных подхода: не прямое иммунофлуоресцентное мечение и эндогенно экспрессируемый белок слияния с флуоресцентным белком. Для электронной микроскопии использовалось мечение иммунозолотом.

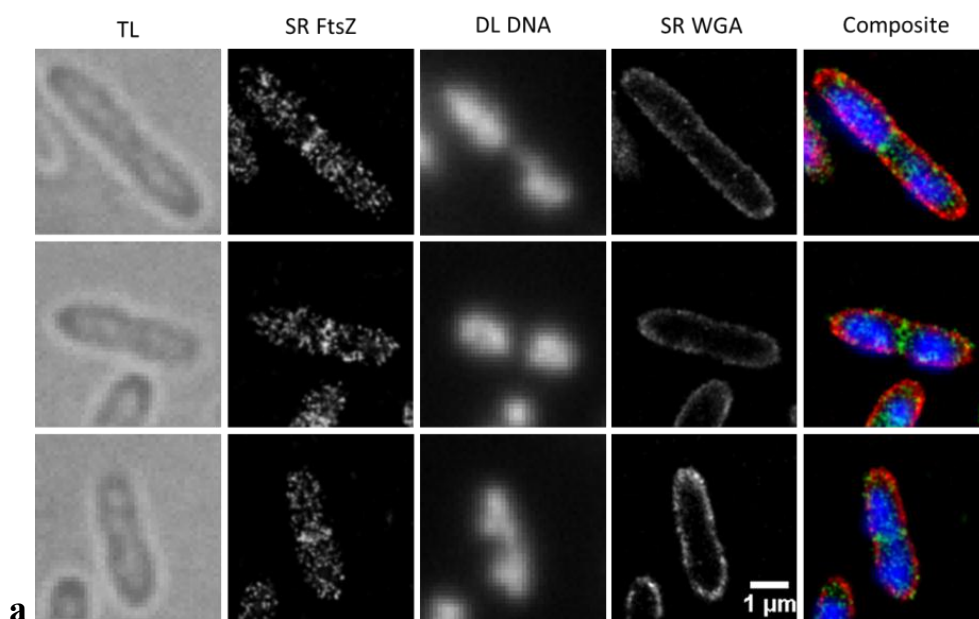
Для дальнейшего исследования роли FtsZ в двух видах микоплазм — *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*, а также более точной интерпретации структур, визуализированных указанными выше методами, были использованы методы анализа белок-белковых взаимодействий, в том числе ко-иммунопреципитация и со-осаждение за аффинный таг.

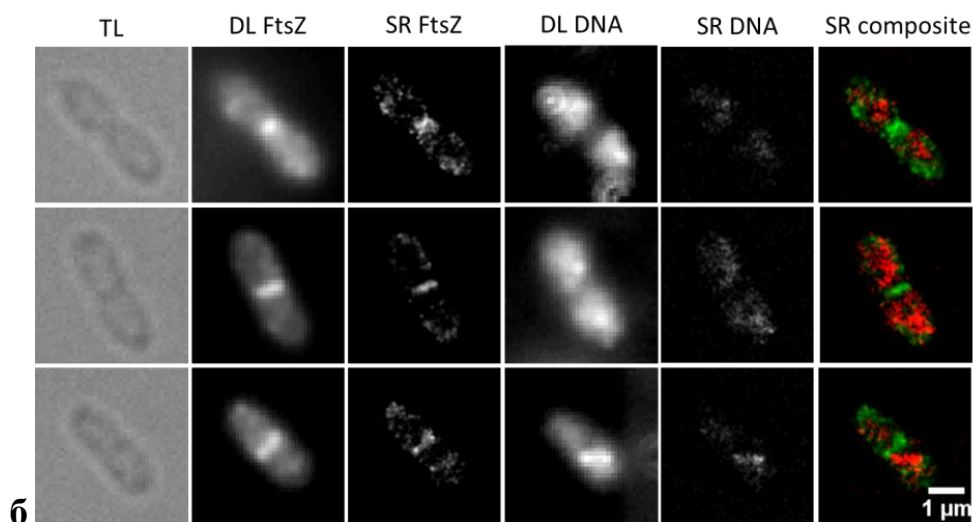
## Результаты и их обсуждение

### 1. Оптимизация методик микроскопии сверхвысокого разрешения

Несмотря на принципиальную простоту, реализация метода локализационной микроскопии требует нетривиальных усилий по подбору условий, обеспечивающих адекватную визуализацию с высоким разрешением. Поэтому одна из задач работы заключалась в разработке методик, которые обеспечивали бы возможности двумерной и трехмерной визуализации; многоцветной визуализации с субдифракционным разрешением. Эти методики позволяют реализовать визуализацию при помощи локализационной микроскопии в сочетании как с иммунофлуоресцентным, так и с эндогенным флуоресцентным мечением.

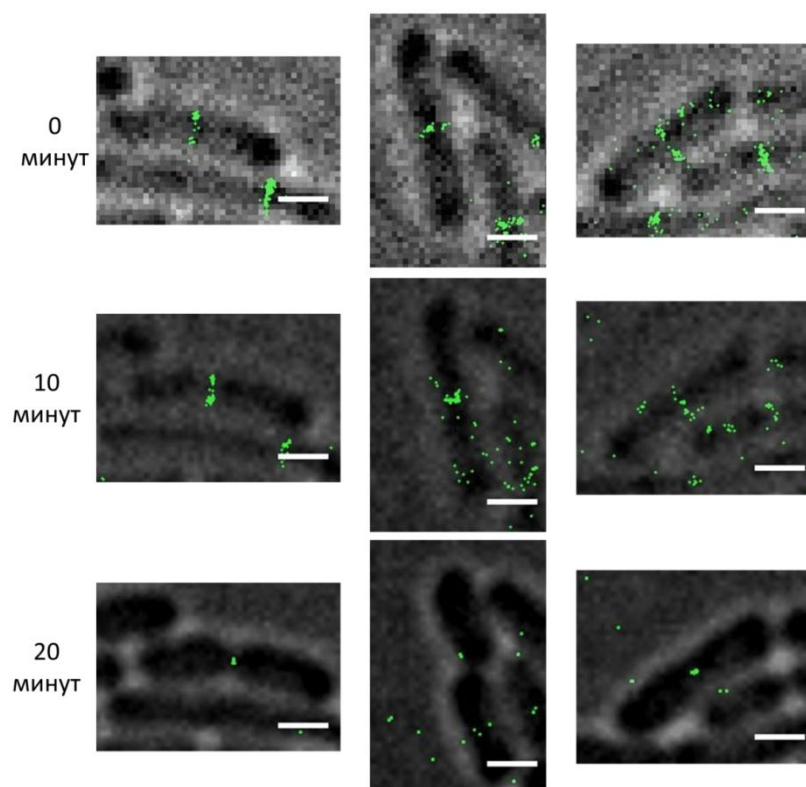
Разработанная методика многоцветной локализационной микроскопии позволяет осуществлять одновременную визуализацию клеточной оболочки, ДНК и белка FtsZ с субдифракционным разрешением (см. Рисунок 1) [8].



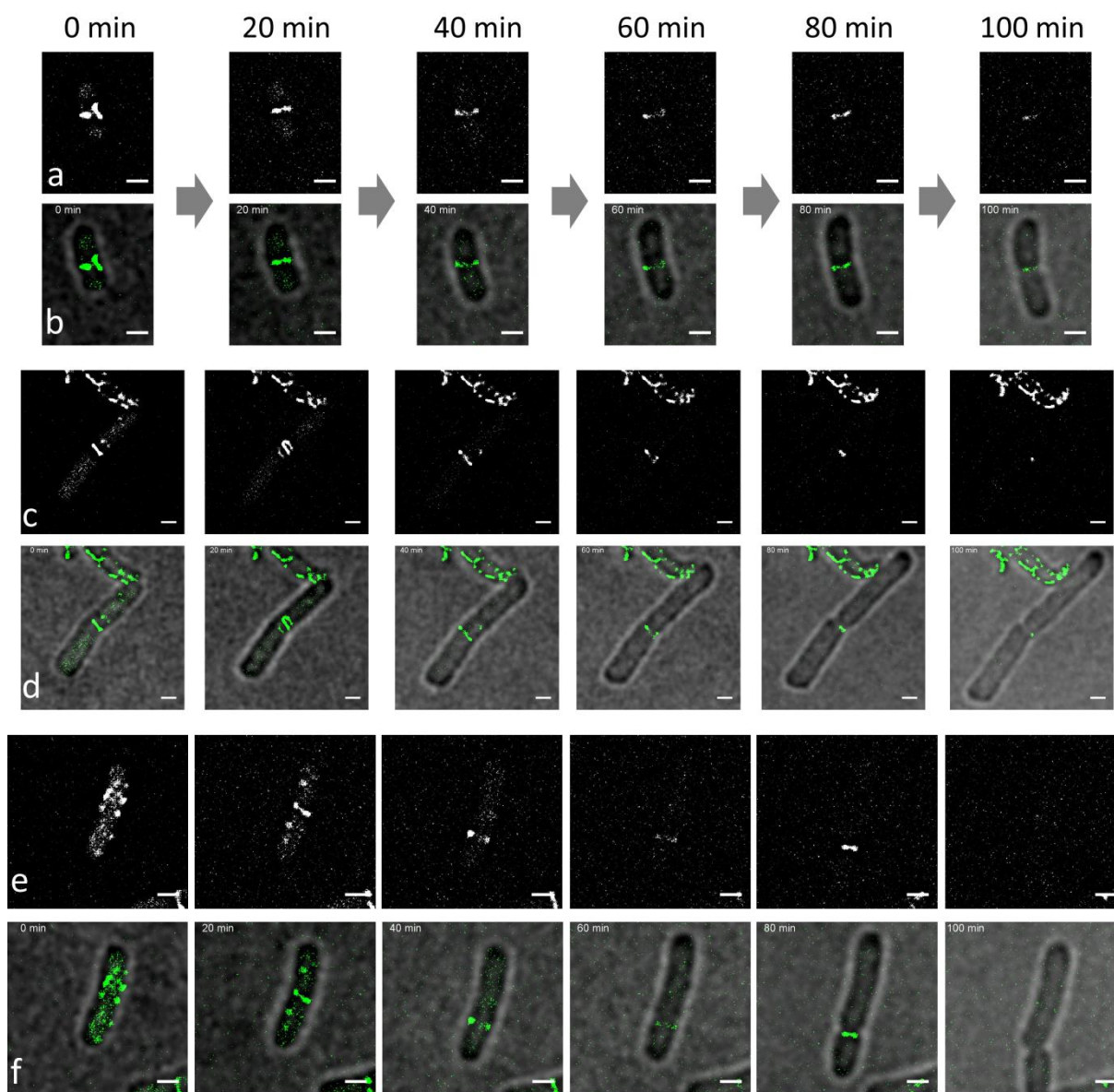


**Рисунок 1.** Многоцветная локализационная микроскопия с одновременной визуализацией FtsZ и ДНК (а) и с одновременной визуализацией FtsZ и клеточной оболочки (б). TL – проходящий свет; SR FtsZ – локализационная микроскопия FtsZ; DL FtsZ - ; DL DNA - ; SR DNA - локализационная микроскопия ДНК; Composite – комбинированное изображение; SR WGA - локализационная микроскопия клеточной оболочки

Проведение исследований потребовало также разработать методику, позволяющую осуществлять субдифракционную визуализацию структур FtsZ в живых клетках *E.coli* с использованием полностью функционального белка слипания FtsZ с флуоресцентным белком [9]. Для этого, наряду с методом локализационной микроскопии (см. Рисунок 2), был использован родственный ему, недавно разработанный метод микроскопии радиальных флуктуаций (SRRF, см. Рисунок 3). В основе последнего лежит анализ изображений с большой плотностью флуоресцентных молекул, которые невозможно анализировать в рамках классического метода локализационной микроскопии. Визуализация структур, формируемых белком FtsZ в живых клетках *E.coli*, с помощью метода SRRF позволила добиться разрешения не хуже 100 нм.



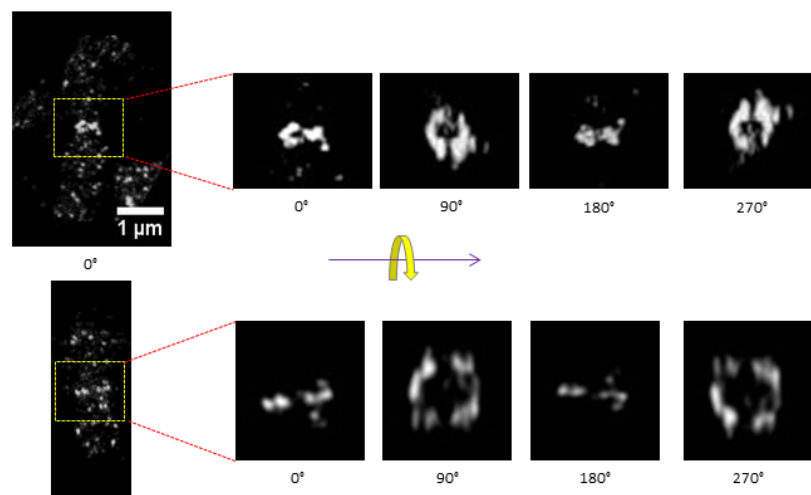
**Рисунок 2.** Кинетические серии субдифракционных изображений нормально делящихся клеток *E. coli*. Представлены комбинированные изображения, состоящие из изображений в проходящем свете (градации серого) и ЛМ-изображения FtsZ (зелёный цвет) для трёх временных точек. Шкала соответствует 1 мкм



**Рисунок 3.** Микроскопия сверхвысокого разрешения (метод SRRF) белка FtsZ в живых клетках *E.coli*. а, с, е – последовательные изображения с интервалом 20 минут, полученные в канале FtsZ; б, д, ф – то же, но изображения комбинированы с изображениями в проходящем свете для лучшей демонстрации морфологии клетки. Шкала – 1 мкм

С помощью методики трехмерной локализационной микроскопии были проведены работы по визуализации белка FtsZ в клетках *E.coli* (см. Рисунок 4). Полученные данные подтверждают неоднородный характер Z-кольца, и могут быть использованы для визуализации структур, формируемых белками FtsZ в клетках микоплазм.



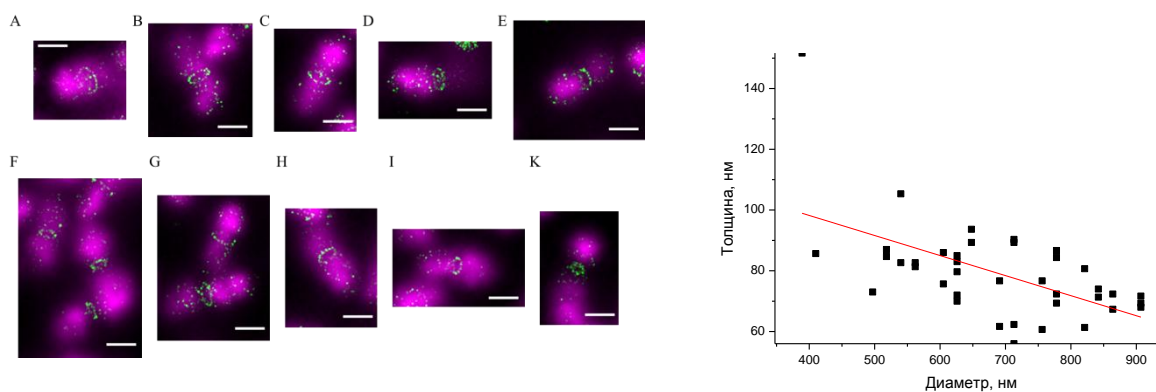


**Рисунок 4.** 3D-реконструкция структур, формируемых белком FtsZ *E.coli* (в особенности Z-кольца). Представлены 2D-изображение клетки (слева) и фрагмент этого же изображения клетки (в желтом прямоугольнике), полученные с использованием рендеринга с четырьмя различными углами (от 0 до 270 градусов)

### **Характеризация структур, формируемых белком FtsZ бактерии *E.coli***

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

На Рисунок 5 приведены изображения этих колец на разных стадиях деления клетки. Анализ этих изображений показывает, что структура колец неоднородна, а толщина их зависит от диаметра кольца. Кольца организованы в виде цепочек, состоящих из кластеров белка FtsZ со средним размером кластера порядка 100-150 нанометров. Полученные впервые данные о структуре Z-кольца со столь высоким пространственным разрешением существенным образом дополняют имеющиеся в литературе сведения о неоднородности Z-кольца и поддерживает гипотезу, что оно является лишь каркасом для других белков деления, в котором протофиламенты FtsZ слабо упорядочены, а их перераспределение в процессе цитокинеза ведет к изменению толщины Z-кольца.

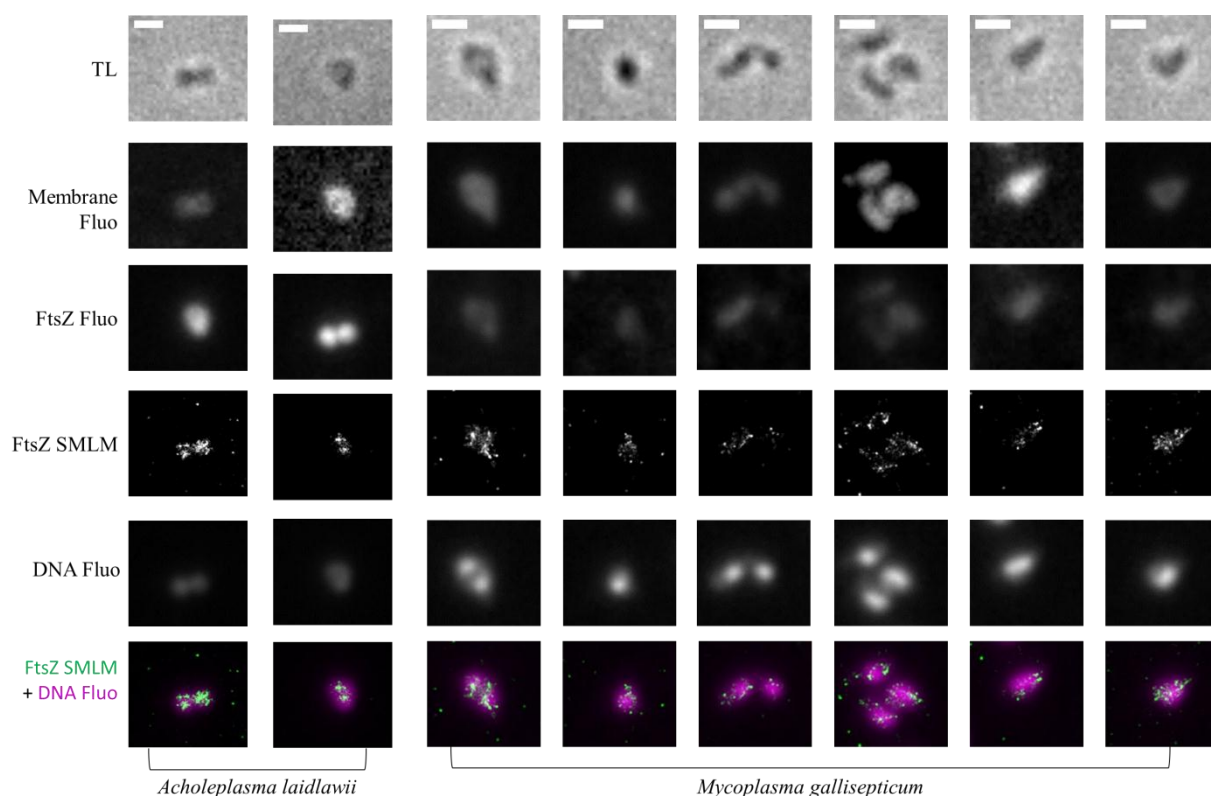


**Рисунок 5.** Слева: изображения Z-колец, полученные при помощи локализационной микроскопии (зелёный цвет) с дополнительной визуализацией ДНК (фиолетовый). Справа: зависимость толщины Z-кольца от его диаметра, черные прямоугольники – экспериментальные точки, красная линия – линейная аппроксимация

В целом, метод локализационной микроскопии в сочетании с иммунофлуоресцентным мечением показал себя как мощный метод визуализации, позволяющий достичь разрешения порядка 20 нм в горизонтальной плоскости. Этот метод был нами также использован для изучения структур, формируемых белком FtsZ в процессе восстановления деления клеток *E. coli* после его нарушения под действием экспрессии белка Sula – ингибитора FtsZ в ходе SOS-ответа. Это позволило показать, что формирование функциональных Z-колец происходит через промежуточную стадию формирования спиралевидных структур и что основным механизмом позиционирования Z-кольца при восстановлении деления является нуклеидная окклюзия, тогда как при нормальном делении основным механизмом считается Min-система [10].

### **Характеризация структур, формируемых белками FtsZ в клетках *Mycoplasma gallisepticum* и *Acholeplasma laidlawii***

Данные, полученные при помощи локализационной микроскопии FtsZ в клетках микоплазм (см. Рисунок 6), а также анализ белок-белковых взаимодействий (проведенный с использованием методов ко-иммунопреципитации и со-осаждения с белками FtsZ) с участием FtsZ свидетельствуют об активной роли белка FtsZ в процессе деления микоплазм.



**Рисунок 6.** Изображения структур, формируемых белком FtsZ в клетках *A. laidlawii* (два ряда изображений слева) и *M. gallisepticum* (справа). TL – изображение в проходящем свете; Membrane Fluo – дифракционно-ограниченное флуоресцентное изображение мембраны клетки; FtsZ Fluo – дифракционно-ограниченное флуоресцентное изображение белка FtsZ; FtsZ SMLM – субдифракционное флуоресцентное изображение белка FtsZ, полученное методом локализационной микроскопии; DNA Fluo – дифракционно-ограниченное флуоресцентное изображение ДНК; FtsZ SMLM+DNA Fluo – комбинированное изображение из субдифракционного флуоресцентного изображения белка FtsZ (зеленый цвет) и дифракционно-ограниченного флуоресцентного изображения ДНК (фиолетовый цвет). Шкала соответствует 1 мкм

В частности, выявлена локализация белка FtsZ в области нуклеоидов, а также в области перетяжки (септы) между дочерними клетками. Локализация белка FtsZ в септальной области очевидным образом говорит о вовлечении белков FtsZ микоплазм в процесс цитокинеза. В сочетании с данными, полученными методом иммуноэлектронной микроскопии, это позволяет сделать вывод о том, что FtsZ в микоплазмах действительно может участвовать в формировании перегородки между дочерними клетками. Однако механизм его вовлечения по-видимому существенно отличается от такового в случае *E.coli* (прежде всего потому, что у микоплазм отсутствует клеточная стенка). Локализация FtsZ в области нуклеоидов, по-видимому,

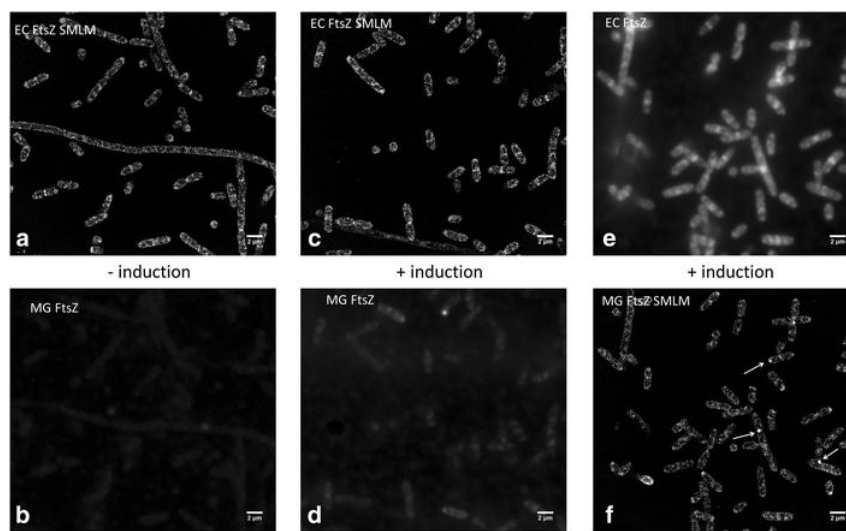
говорит о вовлечении FtsZ микоплазм в процессы репликации и сегрегации. С учетом существенно упрощенной организации микоплазменной клетки (микоплазмы близки к концепту «минимальной клетки» [11]), можно сделать предварительный вывод, что белки FtsZ могут выполнять несколько функций одновременно, в том числе в цитокинезе, а также репликации и сегрегации ДНК.

Поиск белков-партнеров FtsZ (использовалась ко-иммунопреципитация через антитела к FtsZ микоплазм) позволил показать взаимодействие FtsZ с несколькими белками, которые могут формировать цитоскелетоподобные структуры (GapD, DnaK, Hsp20 и другие), а также белками, предположительно вовлеченными в репликацию и сегрегацию ДНК. В частности, отмеченный выше DnaK предположительно вовлечен в процесс репликации *E.coli*. Взаимодействие с белком DnaK может объяснять наблюдаемую локализацию FtsZ в области нуклеоида).

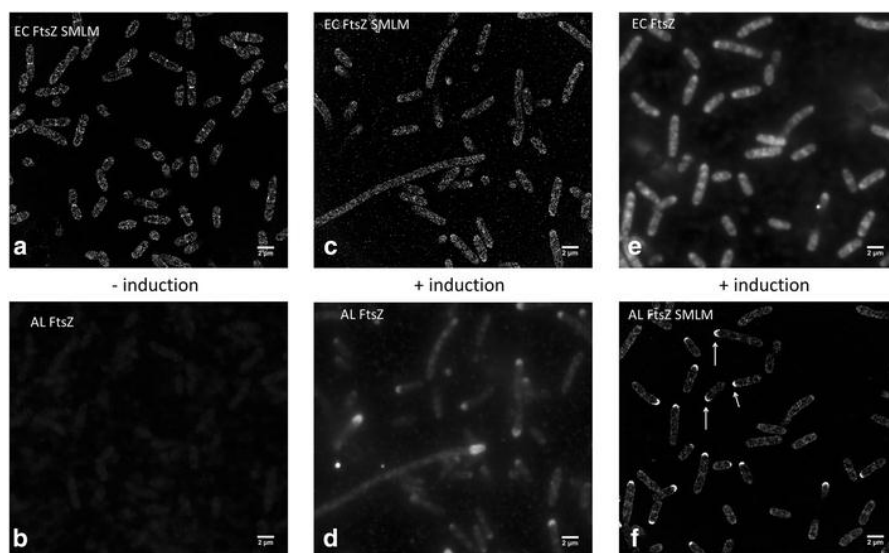
Интересно отметить, что белок DnaK, известный также как молекулярный шаперон Hsp70, в *E.coli* участвует также в репликации ДНК, что указывает на то, что в микоплазмах эта его функция сохранилась. Другая гипотетическая функция DnaK микоплазм вытекает из его высокой гомологии с другим актиноподобным белком цитоскелета бактерий – MreB, который участвует в поддержании формы бактериальной клетки. Таким образом, взаимодействие FtsZ с белком DnaK, возможно, отражает как вовлечение FtsZ в механизм репликации/сегрегации ДНК, так и наличие у него другой возможной функции, связанной с поддержанием формы клетки. Связь белка FtsZ микоплазм с другими предполагаемыми белками цитоскелета отражает сложный характер взаимодействий между различными белками цитоскелета микоплазм, а также многообразие функций этих белков.

**Характеризация структур, формируемых рекомбинантными белками FtsZ видов *Mycoplasma gallisepticum* и *Acholeplasma laidlawii* в клетках *E.coli*.**

С целью получения дополнительных данных о свойствах белков FtsZ видов *A. laidlawii* & *M. gallisepticum* были исследованы структуры, формируемые ими в клетках *E.coli* и идентифицированы белки *E.coli*, с которыми взаимодействуют белки указанных видов микоплазм. Было показано, что белки FtsZ из этих двух видов микоплазм взаимодействуют с аппаратом деления *E.coli*, формируя упорядоченные структуры (см. Рисунок 7Рисунок 8).



**Рисунок 7.** Экспрессия FtsZ *M. gallisepticum*. Верхний ряд – изображения структур, формируемых белком FtsZ *E.coli*. Нижний ряд - изображения структур, формируемых белком FtsZ *M. gallisepticum* в клетках *E.coli*. Изображения а, с и f получены методом локализационной микроскопии, изображения b, d, e – методом традиционной флуоресцентной микроскопии



**Рисунок 8.** Экспрессия FtsZ *A. laidlawii*. Верхний ряд – изображения структур, формируемых белком FtsZ *E.coli*. Нижний ряд - изображения структур, формируемых белком *A. laidlawii* в клетках *E.coli*. Изображения а, с и f получены методом локализационной микроскопии, изображения b, d, e – методом традиционной флуоресцентной микроскопии

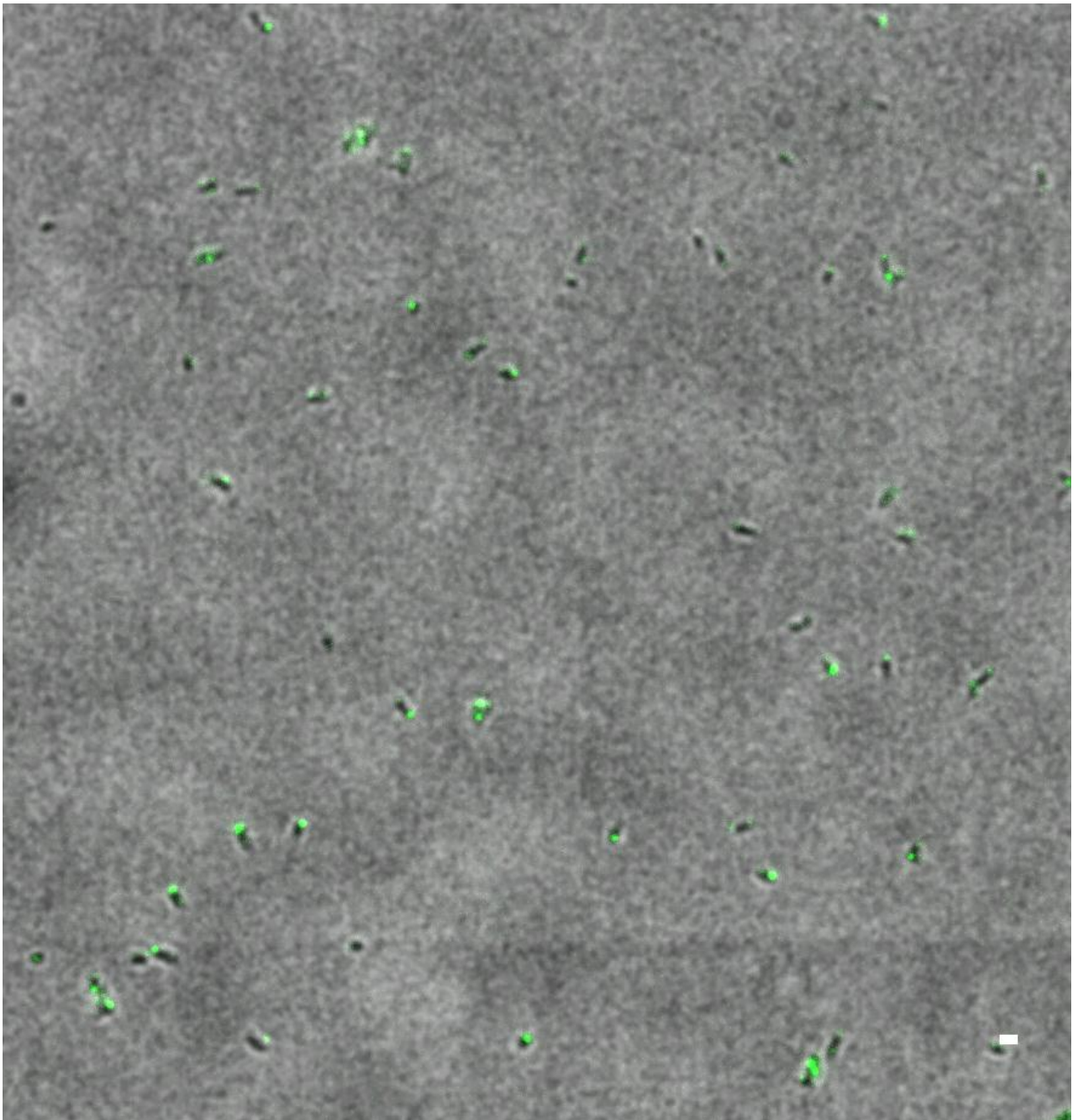
Таким образом, результаты, полученные в ходе визуализации структур, формируемых рекомбинантными белками FtsZ видов *Mycoplasma gallisepticum* и *Acholeplasma laidlawii* в клетках *E. coli*, а также анализ белок-белковых взаимодействий с участием этих белков дополнительно свидетельствуют об активной роли белков FtsZ в процессе деления указанных видов микоплазм [12, 13].

### **Характеризация структур, формируемых белком слияния FtsZ с флуоресцентным белком mMaple 2 в живых клетках *Mycoplasma gallisepticum***

В ходе выполнения данной работы был также создан штамм, который позволил осуществить субдифракционную визуализацию белка FtsZ в живых клетках *M. gallisepticum*. Использование эндогенно-экспрессируемой флуоресцентной метки (белок mMaple 2) позволило визуализировать структуры, формируемые белком FtsZ, в живых клетках *M. gallisepticum* (Рисунок 9), в том числе с субдифракционным разрешением (Рисунок 10). Из рисунка 9 видно, что FtsZ преимущественно локализуется в виде плотных

структур на одном из концов клетки, что выглядит интригующе и позволяет предположить его взаимодействие с терминальной органеллой, хотя известные белки терминальной органеллы не были выявлены методами ко-иммунопреципитации и со-осаждения. Предполагаемая локализация FtsZ в области терминальной органеллы подтверждается данными, полученными методом иммуноэлектронной микроскопии.

В то же время, как видно из рисунка 10, изображения структур, полученные данным методом, существенно отличаются от полученных методом иммунофлуоресцентного мечения (см. Рисунок 6). Это можно объяснить артефактами, вносимыми одним и другим методами. Для объяснения наблюдаемого отличия данных, получаемых двумя методами, требуется дальнейшее исследование.



**Рисунок 9.** Изображения структур, формируемых белком FtsZ в живых клетках *M. gallisepticum*, полученные с использованием флуоресцентного белка mMaple 2 (зеленый цвет). Для представления о морфологии клетки дифракционно-ограниченное флуоресцентное изображение FstZ объединено с изображением в проходящем свете (оттенки серого). Шкала - 1 мкм





**Рисунок 10.** Изображения структур, формируемых белком FtsZ в живых клетках *M. gallisepticum*, полученные с использованием флуоресцентного белка mMaple 2. Субдифракционное изображение FtsZ (зеленый цвет) объединено с дифракционно-ограниченным изображением ДНК (фиолетовый цвет). Шкала - 1 мкм

### **Заключение**

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

Было показано, что Z-кольцо, формируемое белком FtsZ *E. coli*, представляет собой неоднородную структуру, состоящую из кластеров размером порядка 100 нм каждый. Впервые для бактерии *E. coli* было показано, что Z-кольцо утолщается в ходе сокращения его диаметра. Несмотря на то, что в микоплазмах не удалось наблюдать структуру, аналогичную Z-кольцу, было показано, что в клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* белок FtsZ может локализоваться в области септы, хотя в других клетках имеет место ко-локализация с нуклеоидом. Последнее наблюдение может быть связано с вовлеченностью FtsZ микоплазм в процессы репликации и сегрегации ДНК, что подтверждается исследованием белок-белковых взаимодействий. Ещё одна возможная роль белка FtsZ микоплазм связана с поддержанием формы клеток, так как установлено его взаимодействие с несколькими цитоскелет-подобными белками.

Помимо фундаментального значения, результаты работы весьма полезны с методологической точки зрения. В частности, для визуализации клеток микоплазм был впервые использован метод локализационной микроскопии, который может быть полезен для изучения других структур, например, так называемой терминальной органеллы некоторых видов микоплазм, что открывает большие возможности для будущих исследований этой структуры, играющей значительную роль в патогенезе подвижных микоплазм, в том числе, *M. gallisepticum*. Кроме того, большой интерес представляет изучение структур, формируемых цитоскелет-подобными белками (например, отмеченными выше белками DnaK, Hsp20 и GapD), для этого метод локализационной микроскопии также представляется востребованным.

## **Выводы**

1. Разработанная методика микроскопии сверхвысокого разрешения позволила визуализировать структуры, формируемые белком FtsZ *E. coli*, с разрешением не хуже 20 нм в плоскости образца.

2. При помощи микроскопии сверхвысокого разрешения показано, что Z-кольцо *E. coli* утолщается в ходе сокращения, что говорит в пользу того, что сокращение Z-кольца происходит за счёт проскальзывания протофиламентов друг относительно друг, а не за счёт их исключения из Z-кольца.

3. Показано, что структуры, формируемые белками FtsZ видов *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*, отличаются от классического Z-кольца *E. coli*, однако локализация в области перетяжки подтверждает участие FtsZ в делении микоплазм.

4. Выявлено, что белки FtsZ *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* взаимодействуют с белками DnaK, IbpA и EFTu, которые являются гипотетическими цитоскелет-подобными белками, что может говорить об участии FtsZ в формировании многокомпонентного белкового каркаса микоплазменной клетки

5. Обнаружено, что белок FtsZ *M. gallisepticum* способен локализоваться в области терминальной органеллы, что может говорить об участии FtsZ в механизмах подвижности клетки.

### Список литературы

1. D. Panda, D. Bhattacharya, Q.H. Gao, P.M. Oza, H.Y. Lin, B. Hawkins, D.E. Hibbs, P.W. Groundwater. Identification of agents targeting FtsZ assembly. // *Future Med Chem*, 2016. 8(10): p. 1111-32.
2. D.P. Haeusser, W. Margolin. Splitsville: structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring. // *Nat Rev Microbiol*, 2016. 14(5): p. 305-19.
3. J. Lutkenhaus, S. Du. *E. coli* Cell Cycle Machinery. // *Subcell Biochem*, 2017. 84: p. 27-65.
4. 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.
5. J. Errington, L.J. Wu, *Cell Cycle Machinery in Bacillus subtilis*, in *Prokaryotic Cytoskeletons: Filamentous Protein Polymers Active in the Cytoplasm of Bacterial and Archaeal Cells*, J. Löwe and L.A. Amos, Editors. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 67-101.

6. N. Leisch, N. Pende, P.M. Weber, H.R. Gruber-Vodicka, J. Verheul, N.O. Vischer, S.S. Abby, B. Geier, T. den Blaauwen, S. Bulgheresi. Asynchronous division by non-ring FtsZ in the gammaproteobacterial symbiont of *Robbea hypermnestra*. // *Nat Microbiol*, 2016. 2: p. 16182.
7. N. Jacquier, P.H. Viollier, G. Greub. The role of peptidoglycan in chlamydial cell division: towards resolving the chlamydial anomaly. // *FEMS Microbiology Reviews*, 2015. 39(2): p. 262-275.
8. A.D. Vedyaykin, V.V. Gorbunov, A.V. Sabantsev, V.S. Polinovskaya, I.E. Vishnyakov, A.S. Melnikov, P.Y. Serdobintsev, M.A. Khodorkovskii. Multi-color localization microscopy of fixed cells as a promising tool to study organization of bacterial cytoskeleton. // 2nd International School and Conference Saint-Petersburg Open on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures (Spbopen2015), 2015. 643.
9. E.V. Ponomareva, I.E. Vishnyakov, N.E. Morozova, V.S. Polinovskaya, M.A. Khodorkovskii, A.D. Vedyaykin. Super-resolution microscopy of living bacterial cells. // 4th International School and Conference "Saint-Petersburg OPEN 2017", Санкт-Петербург, 3-6 апреля 2017 г., 2017.
10. В. А. Д., С. А. В., В. И. Е., М. Н. Е., Х. М. А. Восстановление процесса деления в бактериальных клетках после индукции белка SulA, отвечающего за прекращение цитокинеза при SOS-ответе. // *Цитология*, 2016. 58(12): p. 930-935.
11. C.A. Hutchison, R.-Y. Chuang, V.N. Noskov, N. Assad-Garcia, T.J. Deerinck, M.H. Ellisman, J. Gill, K. Kannan, B.J. Karas, L. Ma, J.F. Pelletier, Z.-Q. Qi, R.A. Richter, E.A. Strychalski, L. Sun, Y. Suzuki, B. Tsvetanova, K.S. Wise, H.O. Smith, J.I. Glass, C. Merryman, D.G. Gibson, J.C. Venter. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. // *Science*, 2016. 351(6280).
12. A.D. Vedyaykin, V.S. Polinovskaya, A.V. Sabantsev, M.A. Khodorkovskii, S.N. Borchsenius, I.E. Vishnyakov. Influence of FtsZ proteins from some mycoplasma species on the division process in *Escherichia coli* cells. // *Cell and Tissue Biology*, 2017. 11(5): p. 389-398.
13. A.D. Vedyaykin, A.V. Sabantsev, M.A. Khodorkovskii, A.R. Kayumov, I.E. Vishnyakov. Recombinant FtsZ Proteins from Mollicutes Interact with *Escherichia coli* Division Machinery. // *BioNanoScience*, 2016. 6(4): p. 443-446.

**Список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной работы (диссертации)**

**Публикации в изданиях, рецензируемых ВАК:**

1. ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ FTSZ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ МИКОПЛАЗМ НА ПРОЦЕСС ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI*. Ведяйкин А.Д., Полиновская В.С., Сабанцев А.В., Ходорковский М.А., Борхсениус С.Н., Вишняков И.Е. Цитология. 2017. Т. 59. № 5. С. 328-336.

2. ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПРОЦЕССА ДЕЛЕНИЯ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПОСЛЕ ИНДУКЦИИ БЕЛКА *SULA*, ОТВЕЧАЮЩЕГО ЗА ПРЕКРАЩЕНИЕ ЦИТОКИНЕЗА ПРИ SOS-ОТВЕТЕ. Ведяйкин А.Д., Сабанцев А.В., Вишняков И.Е., Морозова Н.Е., Ходорковский М.А. Цитология. 2016. Т. 58. № 12. С. 930-935.

3. НОВЫЕ ДАННЫЕ О СТРУКТУРАХ, ФОРМИРУЕМЫХ БЕЛКОМ FTSZ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI* В ПРОЦЕССЕ ДЕЛЕНИЯ, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДОМ ЛОКАЛИЗАЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ. Ведяйкин А.Д., Вишняков И.Е., Полиновская В.С., Артамонова Т.О., Ходорковский М.А., Сабанцев А.В. Цитология. 2015. Т. 57. № 11. С. 823-830.

**Публикации в других изданиях:**

1. Vedyaykin, A.D., et al., Multi-color localization microscopy of fixed cells as a promising tool to study organization of bacterial cytoskeleton. 2nd International School and Conference Saint-Petersburg Open on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures (Spbopen2015), 2015. 643.

2. Vedyaykin, A.D., et al., 3D super-resolution microscopy of bacterial division machinery. 3rd International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures (Saint Petersburg Open 2016), 2016. 741.

3. Ponomareva, E.V., et al., Super-resolution microscopy of living bacterial cells. 4th International School and Conference "Saint-Petersburg OPEN 2017", Санкт-Петербург, 3-6 апреля 2017 г., 2017.

4. Vedyaykin, A.D., et al., New insights into FtsZ rearrangements during the cell division of *Escherichia coli* from single-molecule localization microscopy of fixed cells. *Microbiologyopen*, 2016. 5(3): p. 378-386.

5. Vedyaykin, A.D., et al., Recombinant FtsZ Proteins from Mollicutes Interact with *Escherichia coli* Division Machinery. *BioNanoScience*, 2016. 6(4): p. 443-446.

Аспирант \_\_\_\_\_ Ведяйкин А.Д.