

На правах рукописи



Сабанцев Антон Владимирович

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

03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург – 2014

Работа выполнена в НИК «Нанобиотехнологии», Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет»

Научный руководитель:

Ходорковский Михаил Алексеевич, к. ф.-м. н., в.н.с., директор
НИК «Нанобиотехнологии» ФГАОУ ВО «СПбПУ».

Официальные оппоненты:

Хайтлина Софья Юрьевна, д.б.н., в.н.с., ФГБУН Институт
цитологии РАН

Анкудинов Александр Витальевич, к.ф.-м.н., с.н.с., ФГБУН
ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Институт
аналитического приборостроения РАН

Защита состоится 25 ноября 2014 года в 16-00 на заседании диссертационного совета Д 212.229.25 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет» по адресу: 194012, г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д. 5, ауд. 416.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Санкт-Петербургского Государственного Политехнического Университета по адресу: 195251, Санкт-Петербург, Политехническая, 29 и на сайте ФГАОУ ВО «СПбПУ».

Автореферат разослан _____ 2014 года.

Ученый секретарь Диссертационного Совета

доктор физико-математических наук

Власова Ольга Леонардовна.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 [5]. 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 [10, 21].

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 [24]. 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 [6] 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.

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 [15]). 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 [11], микроскопия структурированного освещения [9], STED-микроскопия [12] и локализационная микроскопия [1, 13, 22]. 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. Для получения 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 образца, в связи с чем осуществление ЛМ требует специальных методов борьбы с дрейфом образца.

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 флуоресцентной микроскопии очень ограничены [4].

Белок FtsZ, бактериальный гомолог тубулина, играет одну из ключевых ролей в цитокинезе [17]. Этот белок обладает ГТФазной активностью и способен формировать различные полимерные структуры как *in vitro*, так и *in vivo* [8]. FtsZ формирует сократительное кольцо между делящимися клетками (Z-кольцо), а также динамические спиральные структуры, локализованные на цитоплазматической стороне внутренней мембраны бактерии. 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 [19]. Также FtsZ является мишенью для регуляции клеточного деления в SOS-ответе [2].

Правильное функционирование белков цитоскелета обеспечивается действием большого количества регуляторных белков. Так, в регулировании функций актиновых филаментов принимают участие белки суперсемейства гельзолина, куда входят, помимо прочих, виллин, северин, гельзолин, супервиллин и архвиллин. Виллин участвует в поддержании микроворсинок в клетках эпителия кишечника и почек [16], и способен, подобно гельзолину, в ответ на повышение концентрации ионов кальция активировать функцию фрагментирования филаментов актина («severing») [18, 23], хотя требует для этого на порядок более высоких концентраций кальция (100-200 мкМ по сравнению с 10 мкМ для гельзолина). Механизм активации кальцием гельзолина изучен достаточно хорошо [18]. 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 б 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. По результатам исследований опубликованы 3 статьи в рецензируемых научных журналах.

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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование стохастичности экспрессии МТ и ЭР СРМ Esp1396I. Для визуализации ЭР и МТ в клетках бактерий использовалась плаزمиды, несущая СРМ Esp1396I, в которой гены ЭР и МТ слиты с последовательностями, кодирующими флуоресцентные белки mCherry и Venus соответственно. При этом модифицированная СРМ сохраняет свою активность, обеспечивая тот же уровень защиты клеток *E. coli* от инфекции бактериофагом λ , как и немодифицированный вариант системы Esp1396I.

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.

В ходе экспериментов было показано, что лизис бактерий происходит с низкой вероятностью и в отсутствии бактериофага. В то же время, преодоление бактериофагом 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.

Система стабилизации положения объекта для локализационной микроскопии. Эксперименты проводились на установке «Лазерный пинцет», основанной на исследовательском моторизованном микроскопе AxioImager.Z1 (Carl Zeiss). 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 (Qiprtiq 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.

Для стабилизации положения образца на этапе пробоподготовки на поверхности покровного стекла закрепляются микросферы из ПММА диаметром 2,35 мкм (Bangs Laboratories). Для определения эффективности стабилизации объекта использовалась возможность точного определения положения флуоресцентных микросфер по их изображениям в трех измерениях. 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 для независимой регистрации дрейфа объекта.

Локализационная микроскопия FtsZ в клетках *E. coli*. В работе использовался штамм *E. coli* KD403, геном которого содержит CRISPR-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 растились 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).

Образцы фиксировались при помощи смеси метанола, уксусной кислоты и дистиллированной воды в соотношении 3:1:4. 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 краситель YOYO-1 для визуализации ДНК.

Для получения субдифракционных изображений образец, окрашенный вторичными антителами с красителем Cage 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 2000 кадров, содержащих одиночные флуоресцентные молекулы, с экспозицией 100 мс. 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 [20] для ImageJ [3].

Подготовка образца V6 домена виллина. Процедура экспрессии и выделения домена 6 виллина была подробно описана ранее [25]. 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). 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. Обработка кривой титрования осуществлялась в рамках модели, описывающей обратимое независимое связывание лиганда с двумя сайтами в белке.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределения клеток *E. coli* по концентрации ЭР и МТ СРМ Esp1396I. Полученные флуоресцентные изображения (рис. 12) 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. 1).

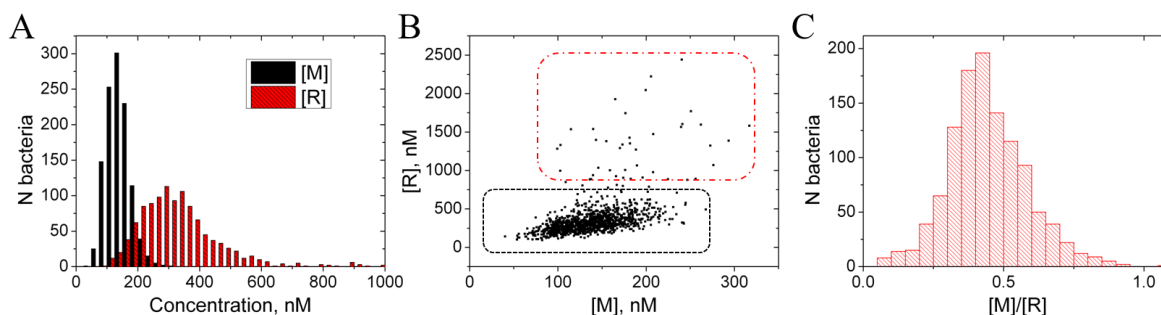


Рис. 1. Распределения клеток *E. coli* по концентрациям ЭР и МТ Esp1396I. А – гистограммы распределений (МТ – черные сплошные столбцы, ЭР – красные штрихованные столбцы), В – корреляционный график для концентраций ЭР (ось ординат) и МТ (ось абсцисс), черной штрихованной линией обозначена основная часть распределения, красным штрих-пунктиром – клетки с аномально высокими концентрациями ЭР, С – гистограмма распределения клеток *E. coli* по соотношению концентраций МТ и ЭР.

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). Эти данные показывают, что как концентрации ЭР и МТ, так и их отношение могут изменяться в достаточно широких пределах от клетки к клетке, что делает некоторые клетки более уязвимыми для заражения бактериофагом, а другие – менее уязвимыми.

Данные динамической микроскопии показали, что уровень ЭР в клетках с высоким уровнем статистической достоверности ($p < 0,001$) обратно коррелирует с их способностью к делению. Средний уровень ЭР в клетках, неспособных к делению, в 2 раза выше, чем в делящихся клетках. При этом увеличение среднего уровня МТ не столь значительно (20%) и менее статистически достоверно ($p \approx 0,01$).

Данные флуоресцентной микроскопии свидетельствуют о том, что МТ в клетках *E. coli* колокализует с ДНК (рис. 2), чего не наблюдается для ЭР. 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.

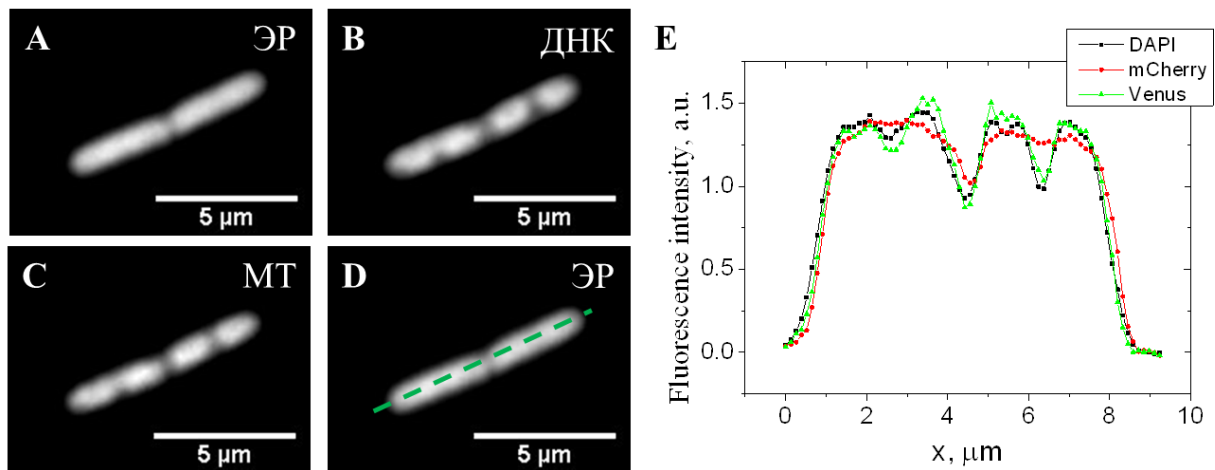


Рис. 2. Анализ колокализации МТ и ЭР Esp1396I с ДНК в клетках *E.coli*. Флуоресцентные изображения в каналах mCherry (А, ЭР), Venus (В, МТ) и Hoechst3334 (С, ДНК). D – флуоресцентное изображение бактерий в канале mCherry с линией, вдоль которой анализировались профили интенсивности флуоресценции в различных каналах (Е).

Разработка протокола наблюдения «пробоя» СРМ на уровне одиночных клеток. Для того, чтобы проанализировать влияние случайных факторов на преодоление СРМ бактериофагом необходимо было разработать протокол, позволяющий наблюдать это событие на уровне одиночных клеток. В ходе работы был разработан протокол динамической микроскопии клеток *E. coli*, иммобилизованных на поверхности агарозного геля, позволяющий наблюдать преодоление бактериофагом защиты СРМ на уровне одиночных клеток и сопоставить вероятность этого события с концентрациями ЭР и МТ в клетке.

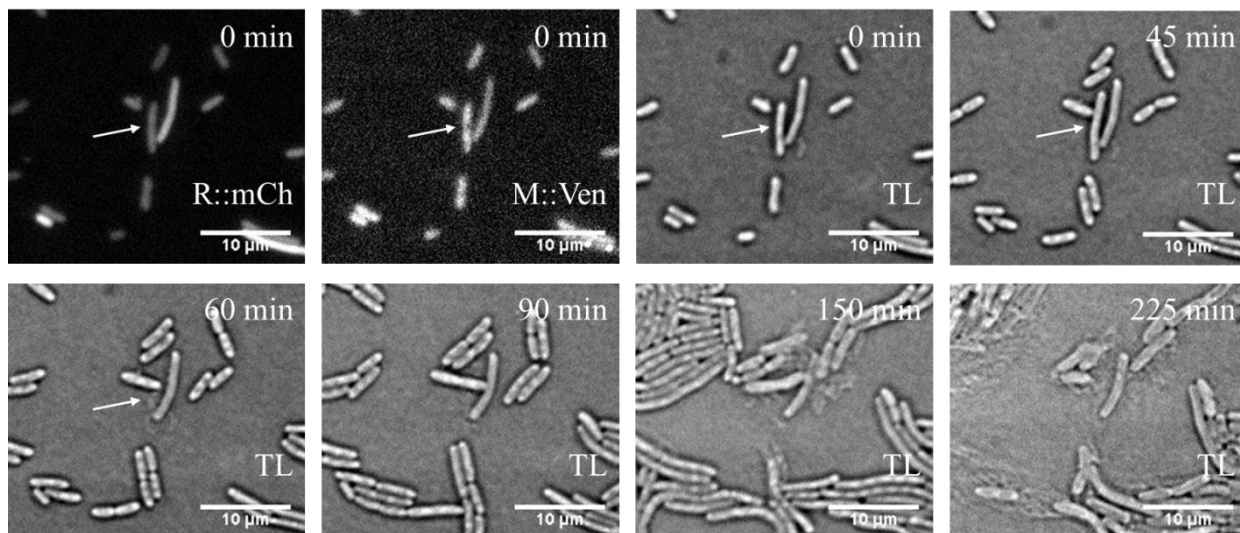


Рис. 3. Визуализация преодоления СРМ бактериофагом и заражения близлежащих клеток модифицированным бактериофагом. Стрелкой отмечена клетка, в которой произошел «пробой».

На рис. 3 приведены результаты визуализации преодоления СРМ Esp1396I бактериофагом на уровне одиночной клетки. Между моментами времени 45 мин и 60 мин с начала съемки произошел лизис клетки (отмечена стрелкой), который, спустя ещё примерно час, привел к лизису окружающих клеток и формированию негативной микроколонии. Флуоресцентные изображения позволяют определить уровни ЭР и МТ в зараженной клетке. **Тестирование системы стабилизации положения объекта для ЛМ.** В ходе работы была создана система стабилизации положения объекта для локализационной микроскопии и 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 тестирования приведены на рис. 4.

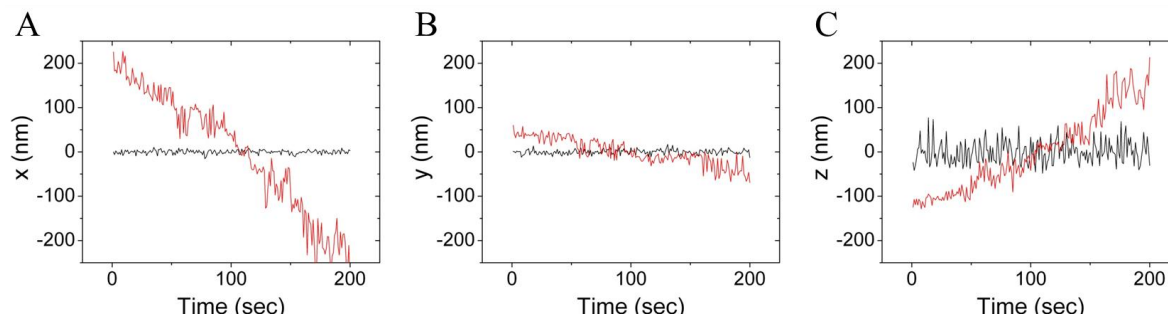


Рис. 4. Эффективность работы системы стабилизации по данным, полученным посредством независимого определения положения флуоресцентных микросфер. Красные графики – положения флуоресцентной микросферы без стабилизации, черные – во время работы системы стабилизации.

Эти данные показывают, что созданная система позволяет снизить стандартное отклонение положений флуоресцентной микросферы до 5,5 нм в плоскости x и y и 26 нм по оси z .

Пространственное распределение FtsZ в клетках *E. coli*. На рис. 5 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.

Созданная система стабилизации положения объекта позволила исследовать структуры, формируемые белком FtsZ в клетках *E. coli*, с субдифракционным разрешением. 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. В клетках, находящихся на стадии формирования перетяжки между дочерними клетками (рис. 6) 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 [7].

Также были получены субдифракционные изображения структур, формируемых FtsZ в клетках *E. coli* в ходе SOS-ответа. 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. 7). Это свидетельствует о том, что механизм ингибирования полимеризации FtsZ при SOS-ответе не нарушает механизм локализации белка у мембраны.

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*. При этом полученные данные находятся в ярком контрасте с данными о структурах, формируемых FtsZ при SOS-ответе в клетках *C. crescentus* методом ЛМ [14], которые показали, 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*.

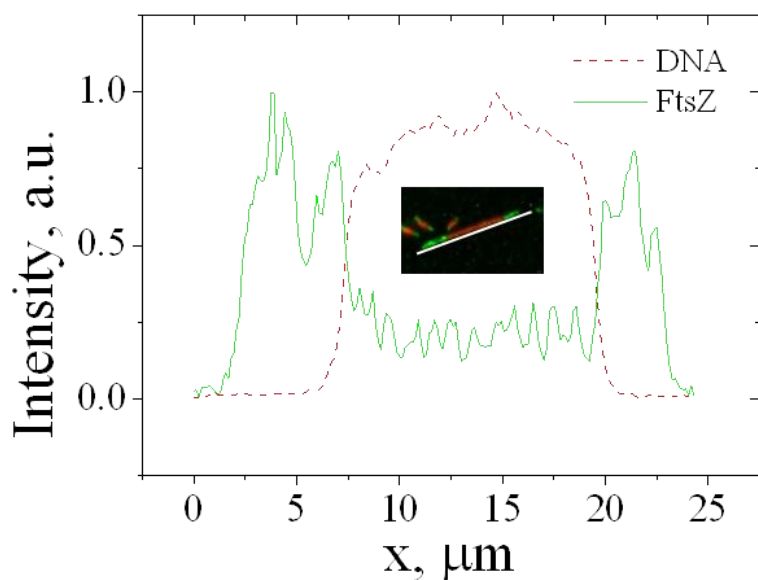


Рис. 5. Характерное распределение ДНК (зеленая сплошная линия) и FtsZ (красная пунктирная линия) вдоль клетки *E. coli* в состоянии SOS-ответа.

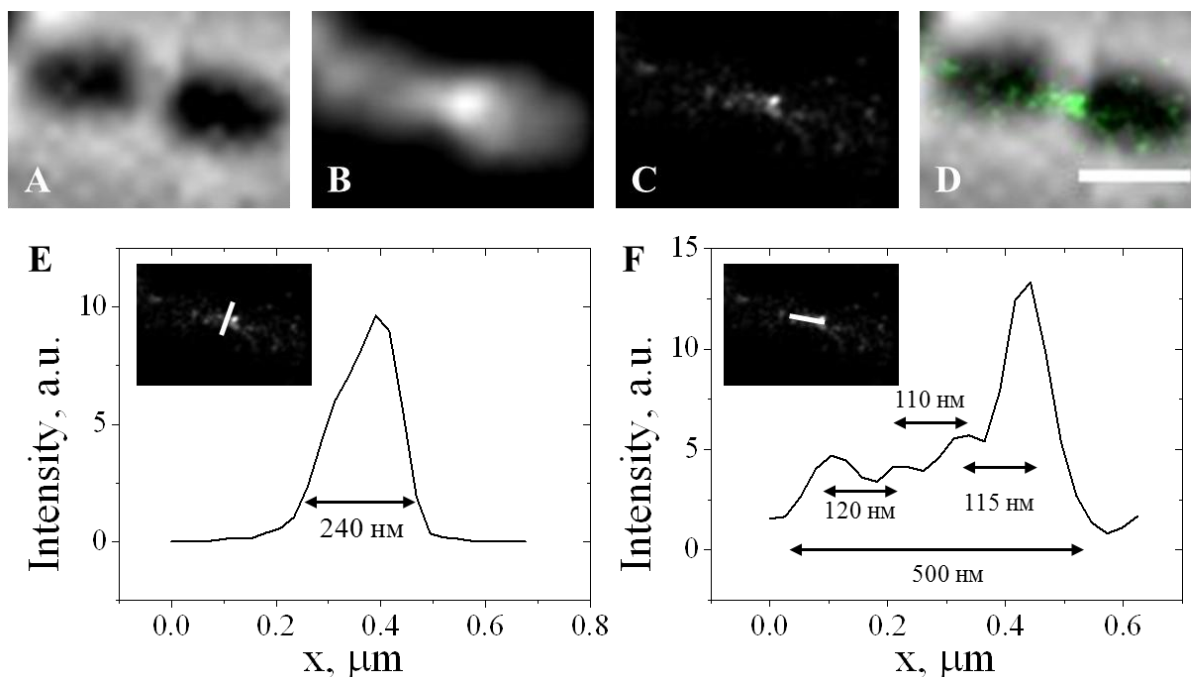


Рис. 6. Структуры, формируемые FtsZ в клетках на стадии формирования перетяжки между дочерними клетками. А – изображение в проходящем свете, В – дифракционно-ограниченное флуоресцентное изображение FtsZ, полученное как усреднение кадров образца, содержащих изображения одиночных молекул красителя, С – субдифракционное изображение FtsZ, D – наложение субдифракционного изображения (зеленое) на изображение в проходящем свете (черно-белое). Шкала – 1 мкм. Е – профиль интенсивности субдифракционного изображения вдоль линии, проходящей поперек клетки, F – профиль интенсивности субдифракционного изображения вдоль линии, проходящей вдоль клетки.

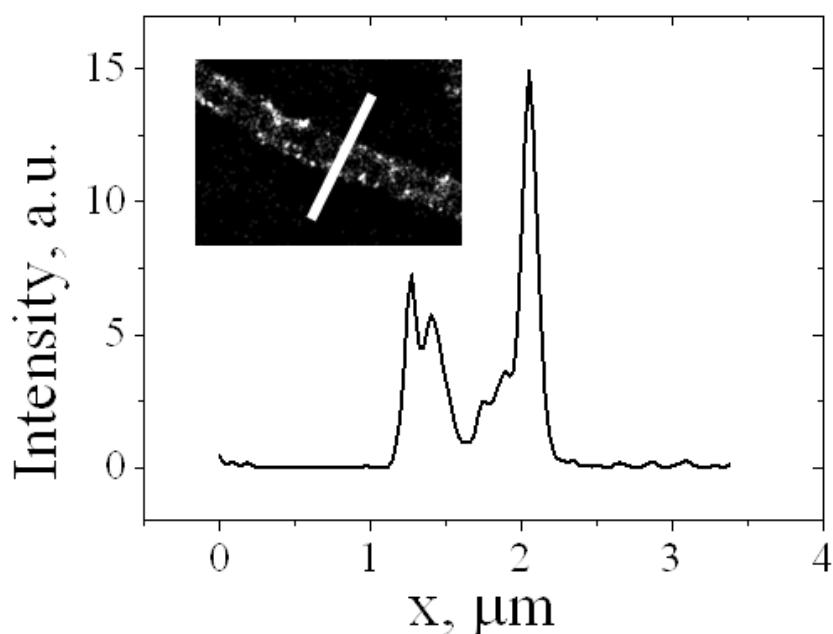


Рис. 7. Распределение FtsZ вдоль линии, перпендикулярной к клетке *E. coli*, находящейся в состоянии SOS-ответа.

Связывание домена 6 виллина с кальцием. Конформационные изменения белков вызывают в них трансформацию ближайшего окружения остатков триптофана, что отражается на интенсивности собственной флуоресценции. Для характеристики кальций-связывающих свойств домена V6 виллина было проведено титрование кальцием в диапазоне от 0 до 81 мМ $[Ca^{2+}]$, в ходе которого регистрировались спектры и интенсивность собственной флуоресценции образца (рис. 4). График Скэтчерда (рис. 11, А) 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). Нелинейная регрессия кривой титрования уравнением, описывающим связывание кальция с двумя независимыми сайтами связывания в белке (1) позволила оценить константы диссоциации для связывания каждого из сайтов с кальцием, которые составили 22 мкМ и 2,8 мМ.

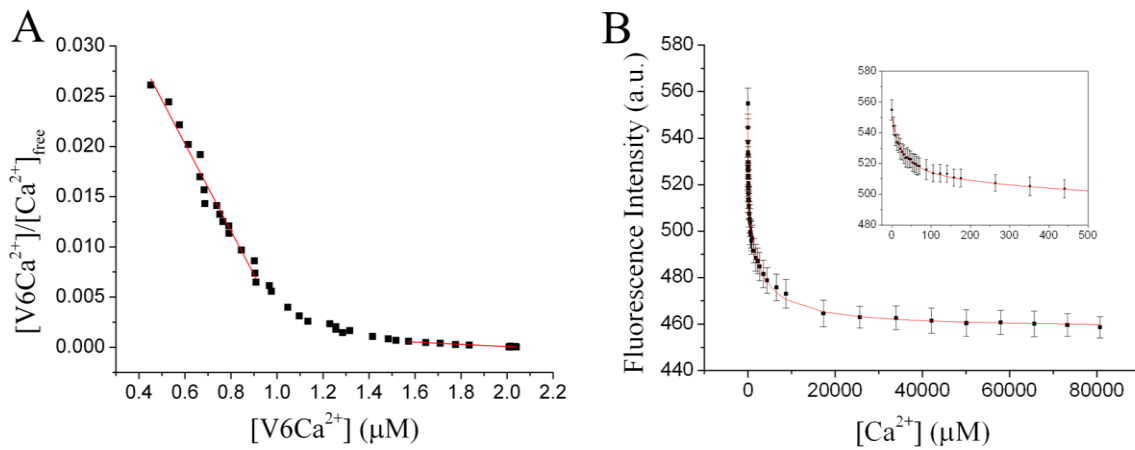


Рис. 4. Результаты титрования домена V6 кальцием. А – график Скэтчарда, В – кривая титрования (врезка – увеличенный начальный участок кривой).

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, колокализуетея 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.

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

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных журналах:

1. Fedechkin S. O., Brockerman J., Pfaff D. A., Burns L., Webb T., Nelson A., Zhang F., Sabantsev A. V., Melnikov A. S., McKnight C. J., Smirnov S. L. Gelsolin-like activation of villin: calcium sensitivity of the long helix in domain 6 // *Biochemistry*. -- 2013. -- Nov 12. -- Т. 52, № 45. -- С. 7890-900.
2. Сабанцев А. В., Побегалов Г. Е., Мурашов С. В., Мельников А. С., Ходорковский М. А. Модернизация флуоресцентного микроскопа для исследования биологических структур с субдифракционным разрешением // *Научно-технические ведомости СПбГПУ*. -- 2012. № 2(146). -- С. 94-99.

3. Сабанцев А. В., Федечкин С. О., Ходорковский М. А., Побегалов Г. Е., Ведяйкин А. Д., Смирнов С. Л. Характеризация кальций-связывающих свойств домена 6 виллина // Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. -- 2014. № 1(189). -- С. 101-107.

Публикации в сборниках тезисов конференций:

1. Sabantsev A., Pobegalov G., Arseniev A., Melnikov A., Khodorkovskiy M. Three-dimensional cross-correlation tracking of DIC bead images for optical trapping // First International Workshop on Pontin and Reptin -- Bordeaux, 2012. -- С. 44.
2. Sabantsev A., Vishnyakov I., Vedyaykin A., Pobegalov G., Borchsenius S., Khodorkovskiy M. Study of structures formed by FtsZ in Escherichia coli and Mycoplasma hominis cells // FEBS Journal, Special Issue: 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia. -- 2013. -- Т. 280, № Sup. s1. -- С. 469.
3. Vedyaykin A. D., Sabantsev A. V., Vishnyakov I. E., Fedorova Y. V., Melnikov A. S., Serdobintsev P. Y. Localization microscopy study of FtsZ structures in E. coli cells during SOSresponse // 1st International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures -- St. Petersburg, Russia, , 2014. -- С. 140-141.
4. Морозова Н. Е., Ведяйкин А. Д., Сабанцев А. В., Федорова Я. В., Якунина М. В., Северинов К. В. Изучение механизма преодоления бактериофагом системы рестрикции-модификации // Научно-практическая конференция с международным участием XLII «Неделя науки СПбГПУ». -- Санкт-Петербург, Россия, 2013. -- С. 232.
5. Сабанцев А. В., Ведяйкин А. Д., Побегалов Г. Е., Ходорковский М. А., Борхсениус С. Н., Вишняков И. Е. Исследование надмолекулярных белковых структур, формируемых в клетках микоплазм, методом локализационной микроскопии // БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА: 17-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 21 - 26 апреля 2013 г.) --, 2013. -- С. 185.
6. Semenova E., Datsenko K., Savitskaya E., Sabantsev A., Fedorova Y., Severinov K. Autoprimered spacer acquisition in E.coli cells // CRISPR 2014 - The Prokaryotic Immune System CRISPR/Cas -- Berlin, Germany, 2014.
7. Semenova E., Datsenko K., Savitskaya E., Sabantsev A., Fedorova Y., Strotskaja A., Nenarokova A., Musharova O., Severinov K. Use of auto-primed spacer acquisition to study CRISPR adaptation in Escherichia coli // CRISPR 2014 - The Prokaryotic Immune System CRISPR/Cas -- Berlin, Germany, 2014.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Betzig E., Patterson G. H., Sougrat R., Lindwasser O. W., Olenych S., Bonifacino J. S., Davidson M. W., Lippincott-Schwartz J., Hess H. F. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution // *Science*. -- 2006. -- Sep 15. -- T. 313, № 5793. -- C. 1642-5.
2. Chen Y., Milam S. L., Erickson H. P. SulA inhibits assembly of FtsZ by a simple sequestration mechanism // *Biochemistry*. -- 2012. -- Apr 10. -- T. 51, № 14. -- C. 3100-9.
3. Collins T. J. ImageJ for microscopy // *Biotechniques*. -- 2007. -- Jul. -- T. 43, № 1 Suppl. -- C. 25-30.
4. Coltharp C., Xiao J. Superresolution microscopy for microbiology // *Cell Microbiol*. -- 2012. -- Dec. -- T. 14, № 12. -- C. 1808-18.
5. Elowitz M. B., Levine A. J., Siggia E. D., Swain P. S. Stochastic gene expression in a single cell // *Science*. -- 2002. -- Aug 16. -- T. 297, № 5584. -- C. 1183-6.
6. Enikeeva F. N., Severinov K. V., Gelfand M. S. Restriction-modification systems and bacteriophage invasion: who wins? // *J Theor Biol*. -- 2010. -- Oct 21. -- T. 266, № 4. -- C. 550-9.
7. Erickson H. P., Anderson D. E., Osawa M. FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one // *Microbiol Mol Biol Rev*. -- 2010. -- Dec. -- T. 74, № 4. -- C. 504-28.
8. Graumann P. L. Cytoskeletal elements in bacteria // *Annu Rev Microbiol*. -- 2007. -- T. 61. -- C. 589-618.
9. Gustafsson M. G. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy // *J Microsc*. -- 2000. -- May. -- T. 198, № Pt 2. -- C. 82-7.
10. Harrington K. I., Sanchez A. Eco-evolutionary dynamics of complex social strategies in microbial communities // *Commun Integr Biol*. -- 2014. -- Jan 1. -- T. 7, № 1. -- C. e28230.
11. Hayazawa N., Inouye Y., Kawata S. Evanescent field excitation and measurement of dye fluorescence in a metallic probe near-field scanning optical microscope // *J Microsc*. -- 1999. -- May-Jun. -- T. 194, № Pt 2-3. -- C. 472-6.
12. Hell S. W., Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy // *Opt Lett*. -- 1994. -- Jun 1. -- T. 19, № 11. -- C. 780-2.
13. Hess S. T., Girirajan T. P., Mason M. D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy // *Biophys J*. -- 2006. -- Dec 1. -- T. 91, № 11. -- C. 4258-72.
14. Holden S. J., Pengo T., Meibom K. L., Fernandez Fernandez C., Collier J., Manley S. High throughput 3D super-resolution microscopy reveals *Caulobacter crescentus* in

- vivo Z-ring organization // Proc Natl Acad Sci U S A. -- 2014. -- Mar 25. -- T. 111, № 12. -- C. 4566-71.
15. Huang B., Bates M., Zhuang X. Super-resolution fluorescence microscopy // Annu Rev Biochem. -- 2009. -- T. 78. -- C. 993-1016.
 16. Khurana S., George S. P. Regulation of cell structure and function by actin-binding proteins: villin's perspective // FEBS Lett. -- 2008. -- Jun 18. -- T. 582, № 14. -- C. 2128-39.
 17. Lutkenhaus J., Pichoff S., Du S. Bacterial cytokinesis: From Z ring to divisome // Cytoskeleton (Hoboken). -- 2012. -- Oct. -- T. 69, № 10. -- C. 778-90.
 18. McGough A. M., Staiger C. J., Min J. K., Simonetti K. D. The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions // FEBS Lett. -- 2003. -- Sep 25. -- T. 552, № 2-3. -- C. 75-81.
 19. Monahan L. G., Liew A. T., Bottomley A. L., Harry E. J. Division site positioning in bacteria: one size does not fit all // Front Microbiol. -- 2014. -- T. 5. -- C. 19.
 20. Ovesny M., Krizek P., Borkovec J., Svindrych Z., Hagen G. M. ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging // Bioinformatics. -- 2014. -- Apr 25.
 21. Raj A., van Oudenaarden A. Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences // Cell. -- 2008. -- Oct 17. -- T. 135, № 2. -- C. 216-26.
 22. Rust M. J., Bates M., Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) // Nat Methods. -- 2006. -- Oct. -- T. 3, № 10. -- C. 793-5.
 23. Walsh T. P., Weber A., Davis K., Bonder E., Mooseker M. Calcium dependence of villin-induced actin depolymerization // Biochemistry. -- 1984. -- Dec 4. -- T. 23, № 25. -- C. 6099-102.
 24. Wilson G. G., Murray N. E. Restriction and modification systems // Annu Rev Genet. -- 1991. -- T. 25. -- C. 585-627.
 25. Якимов А. П., Федечкин С. О., Нериновский К. Б., Шабалин К. А., Смирнов С. Л. Структурная стабильность домена 6 виллина в отсутствие ионов кальция // Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. -- 2013. № 2 (170). -- C. 149-154.