

Биофизика и медицинская физика

Научная статья

УДК 577.359

DOI: <https://doi.org/10.18721/JPM.15205>

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПЕРЕСТРОЕК ВНУТРИ ОДИНОЧНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ИНФЕКЦИИ БАКТЕРИОФАГОМ ϕ KZ С ПОМОЩЬЮ ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ

**Д. А. Антонова, А. Д. Зотова, А. А. Усатых,
Н. Е. Морозова, М. В. Якунина** 

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

 yakuninam@nanobio.spbstu.ru

Аннотация. В работе проведена оценка ключевых свойств флуоресцентных белков (ФБ) с целью их использования при наблюдении процессов перераспределения целевых белков между цитоплазмой и псевдоядром, которое образуется в ходе инфицирования бактериальной клетки бактериофагом ϕ KZ. С помощью флуоресцентной микроскопии были изучены четыре ФБ: mNeonGreen, mCherry, ECFP и EYFP. Установлено, что белок EYFP, в отличие от остальных, локализуется в псевдоядре во время инфекции, что послужило основанием для его исключения из дальнейших опытов. В результате анализа полученных значений ключевых параметров ФБ был выявлен набор ФБ, перспективных для исследования процесса инфицирования бактериальных клеток.

Ключевые слова: флуоресцентный белок, оптическая микроскопия, бактериальная клетка, бактериофаг ϕ KZ

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 19-74-10030 от 15.08.2019).

Для цитирования: Антонова Д. А., Зотова А. Д., Усатых А. А., Морозова Н. Е., Якунина М. В. Характеризация флуоресцентных белков для изучения морфологических перестроек внутри одиночных бактериальных клеток при инфекции бактериофагом ϕ KZ с помощью оптической микроскопии // Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. 2022. Т. 15. № 2. С. 46–55. DOI: <https://doi.org/10.18721/JPM.15205>

Статья открытого доступа, распространяемая по лицензии CC BY-NC 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)



Original article

DOI: <https://doi.org/10.18721/JPM.15205>

CHARACTERIZATION OF FLUORESCENT PROTEINS FOR STUDYING THE MORPHOLOGICAL REARRANGEMENTS INSIDE SINGLE BACTERIAL CELLS DURING INFECTION WITH ϕ KZ BACTERIOPHAGE

D. A. Antonova, A. D. Zotova, A. A. Usatykh,
N. E. Morozova, M. V. Yakunina 

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

 yakuninam@nanobio.spbstu.ru

Abstract. This work deals with evaluation of key properties of some fluorescent proteins (FPs) in order to use them for observation of redistributing the target proteins between the cytoplasm and pseudonucleus forming in bacterial cell infection by bacteriophage ϕ KZ. Four FPs, namely, mNeonGreen, mCherry, ECFP and EYFP, have been investigated using fluorescence microscopy. It was established that EYFP, unlike other objects, localized in the pseudonucleus during the infection. This phenomenon gave grounds to exclude EYFP from further experiments. As a result of analyzing the obtained values of FP key parameters, a set of FPs suitable for studying the process of bacterial cells infection by fluorescence microscopy was found.

Keywords: fluorescent protein, optical microscopy, bacterial cell, ϕ KZ bacteriophage

Funding: The reported study was funded by Russian Science Foundation (Agreement No. 19-74-10030 dated August 15, 2019).

For citation: Antonova D. A., Zotova A. D., Usatykh A. A., Morozova N. E., Yakunina M. V., Characterization of fluorescent proteins for studying the morphological rearrangements inside single bacterial cells during infection with ϕ KZ bacteriophage, St. Petersburg State Polytechnical University Journal. Physics and Mathematics. 15 (2) (2022) 46–55. DOI: <https://doi.org/10.18721/JPM.15205>

This is an open access article under the CC BY-NC 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

Введение

Гигантские бактериофаги обладают большим кодирующим потенциалом их генома, и для большей части генов гомологичные последовательности среди других организмов на данный момент не обнаружены, поэтому сложно определить и их функции. Повышенный интерес к исследованию ϕ KZ-подобных бактериофагов вызван тем, что они в ходе инфекционного цикла формируют в центре клетки сферическую структуру, названную псевдоядром [1].

Псевдоядро покрыто белковой оболочкой, которая экранирует ДНК бактериофага от защитных систем инфицированной клетки, таких как системы рестрикции-модификации и CRISPR/Cas, которые направлены на разрушение чужеродных ДНК [2, 3]. Локализация псевдоядра обеспечивается благодаря наличию фагового аналога цитоскелета, образованного тубулиноподобным белком TubZ [1, 4]. Было показано [1], что во время развития инфекции псевдоядро отделяет от цитоплазмы клетки не только фаговую ДНК, но и аппарат транскрипции, в то время как механизмы трансляции протекают в цитоплазме. Была также обнаружена селективность транспорта ферментов в просвет псевдоядра: в опытах с фаговой невирионной РНК-полимеразой была подтверждена пост-трансляци-

онная транслокация через белковую стенку, что предполагает существование механизма избирательного транспорта [5, 6].

Таковыми же свойствами обладают ядра эукариотических клеток. В связи с этим можно предположить, что предшественники phiKZ-подобных вирусов, способных к формированию псевдоядер, могли сыграть ключевую роль в эволюционном происхождении ядра у современных эукариотических клеток [7].

Дальнейшее изучение процессов формирования фагового псевдоядра, механизмов транслокации белковых продуктов в его полость, механизмов селекции при транспорте и других процессов внутриклеточного развития бактериофага поможет провести больше параллелей с жизнедеятельностью эукариотической клетки, что позволит расширить понимание эволюционных путей возникновения многоклеточной жизни на Земле.

Объектом наших исследований служил фаг phiKZ, первый из описанных гигантских бактериофагов [8] (его геном имеет размер 280 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов)), и этот бактериофаг инфицирует бактерии вида *P. aeruginosa* [8]. Псевдоядро данного фага еще мало охарактеризовано, в отличие от родственного ему 201phi2-1 [5].

Одним из эффективных методов изучения бактериальной клетки является метод флуоресцентной микроскопии. Флуоресцентная визуализация позволяет установить, какие изменения происходят с клеткой во время инфицирования бактериофагом. В одном из исследований гигантских фагов путем слияния красного флуоресцентного белка (ФБ) mCherry с целевым белком было показано, что у бактериофага phiKZ белковая оболочка псевдоядра состоит в основном из белка Grp54 [1]. Это в значительной степени обусловило наш подход к исследованию белков бактериофага phiKZ во время развития инфекции в клетках. Однако также было показано, что мутированный вариант ФБ GFP – GFPmut1 – обнаруживает способность транслоцироваться в псевдоядро бактериофага phiKZ [3]. Это указало на необходимость проверки и подбора ФБ для дальнейших экспериментов.

В нашей работе мы провели отбор и проверили экспрессию нескольких генов ФБ в условиях инфекции клеток бактериофагом, чтобы выбрать среди них оптимальные для дальнейших исследований по развитию бактериофага phiKZ в клетках синегнойной палочки *P. aeruginosa*. В ходе подбора нам также удалось обнаружить еще один ФБ (EYFP), способный к транслокации через белковую оболочку псевдоядра.

Флуоресцентные методы

Флуоресцентные методы широко используются для изучения клеточных компартментов, белков и ДНК. В зависимости от объекта исследования, могут применяться различные способы флуоресцентного мечения. Для окраски частей клетки активно применяются органические низкомолекулярные красители. Так, для визуализации клеточных мембран используют липофильные красители Nile Red, для окраски мембран митохондрий – MitoRed, MitoTracker Red [9], а для локализации ДНК в клетке довольно часто применяют такие, как DAPI, Propidium Iodide, YOYO-1 и другие [1]. Некоторые красители обладают способностью окрашивать только мертвые клетки, что позволяет оценивать количество жизнеспособных бактерий в популяции. Однако набор специфичных красителей ограничен, и в большинстве случаев невозможно селективно окрасить какую-либо биомолекулу, вызывающую интерес.

Селективное флуоресцентное мечение часто осуществляется с помощью антител, которые обладают высокоспецифичным связыванием с мишенью. Антитела могут быть модифицированы молекулой флуорофора, что позволяет наблюдать за местоположением антитела (а значит и его мишени) в клетке с помощью флуоресцентной микроскопии [10]. Однако этот метод также имеет ограничения, например, возможность наблюдать мишень лишь в зафиксированных мертвых клетках, необходимость производства антител, специфичных к молекуле, вызывающей интерес (далее для краткости будет применяться формулировка «молекула интереса» или «белок интереса»), а также высокая стоимость модифицированных антител.

Для визуализации белковых структур, в том числе в живых клетках, широко используются ФБ. На данный момент существует большое разнообразие ФБ, имеющих различные спектры возбуждения и испускания, различающиеся яркостью, временем созревания, чувствительностью к рН и т. п. Это позволяет исследователям выбирать белки, наиболее

подходящие для каждого конкретного эксперимента. Для создания белков слияния, гены ФБ встраивают в одну рамку считывания с генами белков интереса. В результате экспрессии такого гена получается белковая макромолекула, содержащая и белок интереса, и ФБ. Это позволяет детектировать местоположение флуоресцентного белка, а, следовательно, и белка интереса, с помощью флуоресцентной микроскопии живых клеток в течение длительного времени. Однако при использовании белков слияния необходимо убедиться, что ФБ принимает в клетке правильную конформацию и не мешает белку интереса выполнять свою функцию. Возможность наблюдения белка интереса внутри живой клетки в течение длительного времени служит наиболее важным критерием для дальнейших экспериментов, поэтому мы остановили свой выбор на мечении белков интереса с помощью ФБ.

Выбор флуоресцентных белков

Для наблюдения за синтезом и локализацией белков в режиме реального времени и в течение длительного периода, нам необходимо было выбрать оптимальные по своим характеристикам ФБ, которые в дальнейшем были бы удобны для одновременного наблюдения нескольких белков в одной клетке.

Мы рассмотрели следующие ФБ: ECFP, EGFP, mNeonGreen, EYFP, TagRFP, mCherry и FusionRed (табл. 1); данные были взяты из базы данных флуоресцентных белков FPbase [11].

Наиболее важными характеристиками ФБ явились в нашем исследовании время созревания белка *in vivo*, яркость свечения и стабильность.

По яркости, вычисляемой как произведение коэффициента молярной экстинкции на квантовый выход флуоресценции, самыми интенсивными оказались ФБ mNeonGreen, EYFP и TagRFP. Однако красный флуоресцентный белок TagRFP сильно уступал другим по времени созревания, которое также служит важной характеристикой, так как избыточно длительное культивирование бактериальной культуры может повлиять на результаты исследования, исказив их. По этому параметру также не подошел другой

Таблица 1

Ключевые характеристики ряда флуоресцентных белков

| Параметр | Значение параметра для флуоресцентного белка | | | | | | |
|---------------------------------------|--|-------|-------|-------|--------|---------|-------|
| | ECFP | EGFP | mNG | EYFP | TagRFP | mCherry | FR |
| Максимум возбуждения, нм | 434 | 488 | 506 | 513 | 555 | 587 | 580 |
| Максимум испускания, нм | 477 | 507 | 517 | 527 | 584 | 610 | 608 |
| ЕС, М ⁻¹ ·см ⁻¹ | 32,5 | 55,9 | 116 | 67,0 | 100 | 72 | 94,5 |
| QY | 0,40 | 0,60 | 0,80 | 0,67 | 0,48 | 0,22 | 0,19 |
| Расчетная яркость | 13,00 | 33,54 | 92,80 | 44,89 | 48,00 | 15,84 | 17,95 |
| pKa | 4,7 | 6,0 | 5,7 | 6,9 | 3,8 | 4,5 | 4,6 |
| Время созревания, мин | – | 60 | 10 | 9 | 100 | 15 | 130 |
| Структура <i>in vivo</i> | М | WD | М | WD | WD | М | М |

Обозначения: ЕС – коэффициент молярной экстинкции при максимуме поглощения; QY – квантовый выход флуоресценции; pKa – значение pH, при котором интенсивность флуоресценции падает до 50 % от максимального значения; М – мономер; WD – слабая димеризация.

Примечание. Яркость рассчитана как произведение ЕС × QY.

красный белок – FusionRed, несмотря на его высокую рН-стабильность. Таким образом, из красных белков, достаточно стабильным и с быстрым созреванием, оказался белок mCherry, хотя он и уступает TagRFP по яркости.

Белки mNeonGreen и EYFP превосходят белок EGFP по яркости свечения, а также обладают малыми временами созревания, по сравнению с ним, поэтому зеленый белок EGFP мы исключили из анализа. Несмотря на слабую рН-стабильность (высокое рКа) желтого белка EYFP, было решено его протестировать ввиду приемлемого уровня остальных его параметров. Белок ECFP является стабильным мономером, однако он обладает довольно слабой яркостью свечения, поэтому для дальнейших экспериментов его не рассматривали.

Исходя из приведенной выше аргументации мы выбрали для тестирования только три ФБ из списка: mNeonGreen, EYFP и mCherry. Для последующей экспрессии в клетках были сконструированы генные конструкции, содержащие гены этих ФБ.

Методика эксперимента

Флуоресцентная микроскопия позволяет визуализировать местоположение ФБ в клетках. Однако небольшое количество ФБ может затруднить последующую обработку изображений и анализ локализации белка в клетке. В текущих экспериментах, для улучшения качества изображений, клетки с вышеупомянутыми генными конструкциями растили в присутствии индуктора в среде, который активирует синтез белка в клетке. Таким образом, к началу эксперимента клетки уже содержали некоторое количество ФБ. Клетки инфицировали бактериофагом, немедленно помещали на предметное стекло с агарозной подложкой, содержащей индуктор и питательную среду, и накрывали покровным стеклом. В качестве контрольных использовали неинфицированные клетки. Препарат помещали под микроскоп для последующей съемки. Для флуоресцентной микроскопии использовали инвертированный микроскоп Nikon Eclipse Ti-E (Япония), оборудованный инкубатором, с использованием канала проходящего света, а также красного и желто-зеленого флуоресцентного канала. Для детекции красной флуоресценции использовался набор полосовых фильтров TxRed-4040C, для детекции желтой или зеленой флуоресценции – YFP-2427B (в обоих случаях фильтры компании Semrock, США). Во избежание обесцвечивания ФБ в клетках, во время съемки использовали фильтр ND8 (фирмы Fujifimi, Япония). Экспозиция была одинакова для всех белков и подбиралась таким образом, чтобы сигнал от ФБ не был слишком сильным во избежание зашкаливания. Съемка проводилась с частотой 1 раз в 10 мин в течение 3 ч при температуре 37 °С с помощью пользовательского скрипта в MicroManager.

Результаты и их обработка

Обработка полученных изображений проводилась с помощью программы ImageJ. Первоначально из них вычитали фон, затем в клетках измеряли относительную интенсивность свечения в клетке вне псевдоядра (I_0) и внутри него (I_1) для каждого тестируемого ФБ. Положение псевдоядра в клетках подтверждали с помощью окраски ДНК клеток флуоресцентным красителем DAPI (фирмы Beckman Counter Life Sciences, США). Поскольку абсолютное количество ФБ индивидуально для каждой клетки, была подсчитана его относительная величина в виде отношения I_1/I_0 в одной и той же инфицированной клетке. Затем для этого отношения находили среднее значение и среднеквадратичное отклонение среди рассматриваемых инфицированных клеток. Результаты расчетов сведены в табл. 2.

Следует отметить, что в неинфицированных клетках ФБ был распределен равномерно, в то время как поведение белка в клетке в процессе инфицирования было разным и зависело от типа белка (рис. 1). Флуоресцентный белок EYFP в ходе инфекции перераспределялся в псевдоядро, и средняя интенсивность свечения внутри него в клетке была вдвое выше, чем вне псевдоядра. Было признано, что такое поведение белка EYFP ограничивает его применение в дальнейших исследованиях. В то же время белки mNeonGreen и mCherry не входили в псевдоядро, так как интенсивность свечения внутри него в сходных условиях снизилась в среднем на 20 – 35 % (в зависимости от типа белка).

Немаловажным параметром для анализа данных флуоресцентной микроскопии служит также яркость белков в клетках. Чем выше интенсивность свечения белка, тем легче

Таблица 2

Результаты количественных расчетов содержания выбранных флуоресцентных белков в инфицированных клетках

| Флуоресцентный белок | Количество рассматриваемых клеток | Среднее значение I_1/I_0 | Среднеквадратичное отклонение |
|----------------------|-----------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| EYFP | 45 | 2,10 | 0,50 |
| mNeonGreen | 37 | 0,80 | 0,11 |
| mCherry | 50 | 0,66 | 0,14 |

Обозначение: I_1/I_0 – отношение относительных интенсивностей свечения флуоресценции в клетке внутри псевдоядра (I_1) и вне его (I_0).

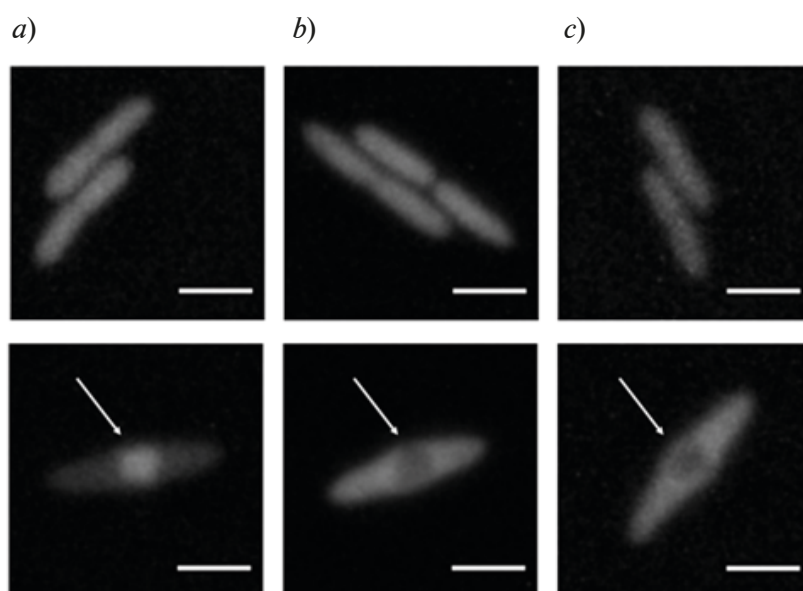


Рис. 1. Микрофотографии препаратов неинфицированных (верхний ряд) и инфицированных (нижний ряд) клеток, содержащих флуоресцентные белки EYFP (a), mNeonGreen (b) и mCherry (c) через 60 мин после начала инфицирования. Белые стрелки указывают на псевдоядра.

Длина масштабных отрезков – 2 мкм

обрабатывать и анализировать полученные изображения. Для каждого типа ФБ была подсчитана средняя интенсивность свечения по 80 неинфицированным клеткам, а также соответствующее среднеквадратичное отклонение на первом кадре съемки. Результаты этих расчетов следующие (в относительных единицах):

| Флуоресцентный белок | Средняя интенсивность свечения, отн. ед. |
|----------------------|--|
| mNeonGreen | 550 ± 390, |
| mCherry | 210 ± 110, |
| EYFP | 250 ± 100. |

Представленные результаты наглядно показывают, что белок mNeonGreen лучше всех отвечает требованиям для дальнейших экспериментов, поскольку он не только не перераспределяется в псевдоядро, но и проявляет самую высокую яркость из рассматриваемых. Хотя средняя интенсивность свечения белка EYFP и была несколько выше, чем у

mCherry, но белок EYFP, в отличие от него, перераспределялся в псевдоядро, поэтому был отбракован. Обесцвечивание белка в данном эксперименте не налагает существенного ограничения, поскольку частота съемки была довольно низкой (1 раз в 10 мин) и новый ФБ успевал синтезироваться за временной интервал между кадрами съемки.

Оценка связи между аминокислотными последовательностями ФБ и их локализациями внутри клеток, инфицированных бактериофагом

В отличие от других вариантов изначального белка GFP (а именно, sfGFP и pMutinGFP), белок GFPmut1, перераспределяющийся в псевдоядро, содержит аминокислотные замены в позициях 99, 153 и 163. В положении 99 серин заменен на фенилаланин (99F), в 153 – тирозин на метионин (153M), в 163 – аланин на валин (163V), и наибольшее влияние на перераспределение в псевдоядро было отведено 99-фенилаланину и 153-метионину. ФБ EYFP, GFPmut1, а также ECFP, являются производными одного белка. Белок ECFP, как указано в статье [3], не перераспределяется в псевдоядро, в отличие от двух других. С целью проверки этого результата мы создали экспрессионную плазмиду, содержащую ген ECFP, и проанализировали его локализацию в условиях нашего эксперимента. Согласно полученным нами данным, белок ECFP действительно не входит в псевдоядро (рис. 2). Мы также проанализировали его аминокислотную последовательность и выровняли его с белками EYFP и GFPmut1 (рис. 3).

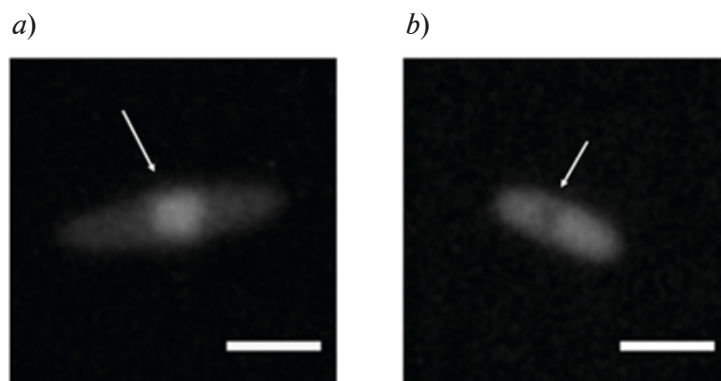


Рис. 2. Сравнение микрофотографий препаратов инфицированных клеток, содержащих флуоресцентные белки EYFP (a) и ECFP (b). Белые стрелки указывают на псевдоядра. Длина масштабных отрезков – 2 мкм

| | | |
|---------|---|-----|
| EYFP | MVSKGEELFTGVVPIVLVDGVDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPT | 60 |
| ECFP | MVSKGEELFTGVVPIVLVDGVDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPT | 60 |
| GFPmut1 | -MSKGEELFTGVVPIVLVDGVDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPT | 59 |
| | ***** | |
| EYFP | LVTTFGYGLQCFARYPDHFKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTL | 120 |
| ECFP | LVTTLTWGVQCFSRYPDHFKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTL | 120 |
| GFPmut1 | LVTTLTYGVCFSRYPDHFKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTL | 119 |
| | ****: :*: :***** | |
| | 99 | |
| EYFP | VNRIELKGI ⁹⁹ DFKEDGNILGHKLEYNYN ¹⁵³ SHNVYI ¹⁶³ ADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLA | 180 |
| ECFP | VNRIELKGI ⁹⁹ DFKEDGNILGHKLEYN ¹⁵³ YISHNVYI ¹⁶³ ADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLA | 180 |
| GFPmut1 | VNRIELKGI ⁹⁹ DFKEDGNILGHKLEYNYN ¹⁵³ SHNVYI ¹⁶³ ADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLA | 179 |
| | ***** | |
| | 153 163 | |
| EYFP | DHYQQNTPIGGDPVLLPDNHYLSTQSALS ¹⁵³ KDPNEKR ¹⁶³ DH ¹⁶³ IVLLEFVTAAGITLGM ¹⁶³ DELYK | 239 |
| ECFP | DHYQQNTPIGGDPVLLPDNHYLSTQSALS ¹⁵³ KDPNEKR ¹⁶³ DH ¹⁶³ IVLLEFVTAAGITLGM ¹⁶³ DELYK | 239 |
| GFPmut1 | DHYQQNTPIGGDPVLLPDNHYLSTQSALS ¹⁵³ KDPNEKR ¹⁶³ DH ¹⁶³ IVLLEFVTAAGITLGM ¹⁶³ DELYK | 238 |
| | ***** | |

Рис. 3. Выравнивание последовательностей аминокислот родственных флуоресцентных белков EYFP, ECFP и GFPmut1. Подчеркнуты и отмечены аминокислоты 99, 153 и 163 белка GFPmut1. В положении 99 у всех трех типов находится фенилаланин (F)



Как видно на рис. 3, белок EYFP содержит в своей последовательности обе аминокислоты, которые (по утверждению авторов предыдущего исследования) обеспечивают перераспределение ФБ внутрь псевдоядра, так что наши результаты, казалось бы, согласуются с указанным утверждением авторов. Однако белок ECFP, который в положении 99 также содержит фенилаланин, не перераспределяется внутрь псевдоядра, оставаясь в цитоплазме. В положение 153 белок ECFP несет ту же аминокислоту, что белки EYFP и EGFP.

Таким образом, полученные нами данные позволяют предположить, что механизм распределения ФБ между псевдоядром и цитоплазмой не зависит от наличия тех или иных аминокислот в определенных положениях, а связан, скорее всего, с общими изменениями структуры, которые ими вызываются.

Заключение

Проведенное исследование преследовало цель поиска флуоресцентных белков (ФБ), пригодных для мониторинга процессов их перераспределения между цитоплазмой и псевдоядром, образующимся в ходе инфицирования бактериальной клетки бактериофагом phiKZ.

В связи с указанной целью был проведен выбор ФБ для экспериментов по съемке живых клеток. Отобранные ФБ были протестированы по уровню яркости, и на этой основе изучено распределение ФБ в инфицированных клетках. Эксперименты показали, что белки ECFP, mNeonGreen и mCherry не поступают в псевдоядро, тогда как белок EYFP перераспределяется в псевдоядро в процессе инфицирования и по этой причине не подходит для дальнейших опытов. Помимо этого, дальнейшие эксперименты позволили опровергнуть традиционную теорию о связи конкретных мутаций во флуоресцентных белках с их положением относительно псевдоядра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chaikerasitak V., Nguyen K., Egan M. E., Erb M. L., Vavilina A., Pogliano J. The phage nucleus and tubulin spindle are conserved among large *Pseudomonas* phages // Cell Reports. 2017. Vol. 20. No. 7. Pp. 1563–1571.
2. Danilova Ya. A., Belousova V. V., Moiseenko A. V., Vishnyakov I. E., Yakunina M. V., Sokolova O. S. Maturation of pseudo-nucleus compartment in *P. aeruginosa*, infected with giant phiKZ phage // Viruses. 2020. Vol. 12. No. 10. P. 1197.
3. Nguyen K. T., Sugie J., Khanna K., Egan M. E., Birkholz E. A., Lee J., Beierschmitt C., Villa E., Pogliano J. Selective transport of fluorescent proteins into the phage nucleus // PloS ONE. 2021. Vol. 16. No. 6. P. e0251429.
4. Chaikerasitak V., Birkholz E. A., Pogliano J. The phage nucleus and PhuZ spindle: Defining features of the subcellular organization and speciation of nucleus-forming jumbo phages // Frontiers in Microbiology. 2021. 13 July. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.641317>.
5. Chaikerasitak V., Nguyen K. T., Khanna K., et al., Assembly of a nucleus-like structure during viral replication in bacteria // Science. 2017. Vol. 355. No. 6321. Pp. 194–197.
6. Ceysens P.-J., Minakhin L., den Bossche A. V., et al. Development of giant bacteriophage phiKZ is independent of the host transcription apparatus // Journal of Virology. 2014. Vol. 88. No. 18. Pp. 10501–10510.
7. Bell P. J. L. Evidence supporting a viral origin of the eukaryotic nucleus, Virus Research. 2020. Vol. 289. November. P. 198168.
8. Krylov V., Bourkaltseva M., Pleteneva E., Shaburova O., Krylov S., Karaulov A., Zhavoronok S., Svitich O., Zverev V. Phage phiKZ – The first of giants // Viruses. 2021. Vol. 13. No. 2. P. 149.
9. Shibata T., Yamashita S., Hirusaki K., Katoh K., Ohta Y. Isolation of mitochondria by gentle cell membrane disruption, and their subsequent characterization // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2015. Vol. 463. No. 4. Pp. 563–568.
10. Oakeley E. J., Podesta A., Jost J.-P. Developmental changes in DNA methylation of the two tobacco pollen nuclei during maturation // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1997. Vol. 94. No. 21. Pp. 11721–11725.
11. Lambert T. J. FPbase: a community-editable fluorescent protein database // Nature Methods. 2019. Vol. 16. No. 4. Pp. 277–278.

REFERENCES

1. Chaikerasak V., Nguyen K., Egan M. E., et al., The phage nucleus and tubulin spindle are conserved among large *Pseudomonas* phages, *Cell Rep.* 20 (7) (2017) 1563–1571.
2. Danilova Ya. A., Belousova V. V., Moiseenko A. V., et al., Maturation of pseudo-nucleus compartment in *P. aeruginosa*, infected with giant phiKZ phage, *Viruses.* 12 (10) (2020) 1197.
3. Nguyen K. T., Sugie J., Khanna K., et al., Selective transport of fluorescent proteins into the phage nucleus, *PLoS ONE.* 16 (6) (2021) e0251429.
4. Chaikerasak V., Birkholz E. A., Pogliano J., The phage nucleus and PhuZ spindle: Defining features of the subcellular organization and speciation of nucleus-forming jumbo phages, *Front. Microbiol.* 2021. 13 July, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.641317>.
5. Chaikerasak V., Nguyen K. T., Khanna K., et al., Assembly of a nucleus-like structure during viral replication in bacteria, *Science.* 355 (6321) (2017) 194–197.
6. Ceysens P.-J., Minakhin L., den Bossche A. V., et al., Development of giant bacteriophage phiKZ is independent of the host transcription apparatus, *J. Virol.* 88 (18) (2014) 10501–10510.
7. Bell P. J. L., Evidence supporting a viral origin of the eukaryotic nucleus, *Virus Research.* 289 (November) (2020) 198168.
8. Krylov V., Bourkaltseva M., Pleteneva E., et al., Phage phiKZ – The first of giants, *Viruses.* 13 (2) (2021) 149.
9. Shibata T., Yamashita S., Hirusaki K., et al., Isolation of mitochondria by gentle cell membrane disruption, and their subsequent characterization, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463 (4) (2015) 563–568.
10. Oakeley E. J., Podesta A., Jost J.-P., Developmental changes in DNA methylation of the two tobacco pollen nuclei during maturation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (21) (1997) 11721–11725.
11. Lambert T. J., FPbase: a community-editable fluorescent protein database, *Nat. Methods.* 16 (4) (2019) 277–278.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

АНТОНОВА Дарья Александровна – стажер-исследователь Лаборатории молекулярной микробиологии Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
nasada12@mail.ru
ORCID: 0000-0002-2611-081X

ЗОТОВА Анастасия Дмитриевна – лаборант-исследователь Лаборатории молекулярной микробиологии Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
avotozana@gmail.com
ORCID: 0000-0002-0152-3220

УСАТЫХ Андрей Алексеевич – студент Института биомедицинских систем и биотехнологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
andrew.usatih@yandex.ru
ORCID: 0000-0002-5377-3934

МОРОЗОВА Наталия Евгеньевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник Лаборатории молекулярной микробиологии Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
natusmorozovna@gmail.com
ORCID: 0000-0002-3001-2593

ЯКУНИНА Мария Вячеславовна — кандидат биологических наук, научный сотрудник Лаборатории молекулярной микробиологии Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
yakuninam@nanobio.spbstu.ru
ORCID: 0000-0003-2083-3643

THE AUTHORS

ANTONOVA Daria A.

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia
nasada12@mail.ru
ORCID: 0000-0002-2611-081X

ZOTOVA Anastasia D.

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia
avotozana@gmail.com
ORCID: 0000-0002-0152-3220

USATYKH Andrey A.

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia
andrew.usatih@yandex.ru
ORCID: 0000-0002-5377-3934

MOROZOVA Natalia E.

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia
natusmorozovna@gmail.com
ORCID: 0000-0002-3001-2593

YAKUNINA Maria V.

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia
yakuninam@nanobio.spbstu.ru
ORCID: 0000-0003-2083-3643

Статья поступила в редакцию 27.04.2022. Одобрена после рецензирования 28.04.2022. Принята 28.04.2022.

Received 27.04.2022. Approved after reviewing 28.04.2022. Accepted 28.04.2022.