

## НОВЫЕ ДАННЫЕ О СТРУКТУРАХ, ФОРМИРУЕМЫХ БЕЛКОМ FtsZ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI* В ПРОЦЕССЕ ДЕЛЕНИЯ, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДОМ ЛОКАЛИЗАЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ

© А. Д. Ведяйкин,<sup>1</sup> И. Е. Вишняков,<sup>1,2</sup> В. С. Полиновская,<sup>1</sup> Т. О. Артамонова,<sup>1</sup>  
М. А. Ходорковский,<sup>1</sup> А. В. Сабанцев<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251,  
и <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;  
\* электронный адрес: [sabantsev.a.v@gmail.com](mailto:sabantsev.a.v@gmail.com)

FtsZ, бактериальный гомолог тубулина, является одним из ключевых белков деления бактерий, формирующих сократительное Z-кольцо в середине делящейся клетки. В настоящей работе использовали иммунофлуоресцентное окрашивание в совокупности с методом локализационной микроскопии (ЛМ) для визуализации нативных структур, формируемых этим белком в клетках бактерии *Escherichia coli*. Используемый подход позволил реконструировать поэтапную реорганизацию FtsZ-структур в процессе цитокинеза. Получены новые данные, поддерживающие гипотезу о том, что Z-кольцо представляет собой спиралевидную структуру, которая сжимается в ходе деления, способствуя формированию перетяжки между дочерними клетками.

Ключевые слова: локализационная микроскопия, система стабилизации положения образца, *Escherichia coli*, цитокинез, FtsZ, кольцо сжатия.

Принятые сокращения: ЛМ — локализационная микроскопия.

Белок FtsZ, бактериальный гомолог тубулина, играет одну из ключевых ролей в цитокинезе (Lutkenhaus et al., 2012). Этот белок обладает ГТФазной активностью и способен формировать различные полимерные структуры как *in vitro*, так и *in vivo* (Graumann, 2007). FtsZ формирует сократительное кольцо в середине делящейся клетки (Z-кольцо), а также динамические спиралевидные структуры, локализованные на цитоплазматической стороне внутренней мембраны бактерий. Предполагают, что FtsZ выполняет активную роль в цитокинезе, генерируя силу, способствующую формированию перетяжки между дочерними клетками (Erickson et al., 2010). Помимо роли в клеточном делении, некоторые авторы предполагают, что FtsZ также участвует в поддержании формы клетки (Thandagar, Margolin, 2004). Несмотря на проводимые в течение более 20 лет активные исследования структуры и функций как бактериальных белков деления (Monahan et al., 2014), так и растительных гомологов FtsZ, участвующих в разделении пластид (Osteryoung, Ryke, 2014), механизмы контроля полимеризации и положения протофиламентов FtsZ в клетке, обеспечивающие правильное позиционирование, формирование и работу Z-кольца, до сих пор до конца не ясны.

Много информации о структурах, формируемых бактериальными FtsZ, было получено с использованием методов флуоресцентной микроскопии (Ma et al., 1996; Willemse, van Wezel, 2009). Однако, несмотря на широкие возможности специфического контрастирования, высокую чувствительность и относительную простоту пробо-

подготовки, возможности флуоресцентной микроскопии по изучению структур, формируемых различными белками в клетках прокариот, существенно ограничены дифракционным пределом разрешения, составляющим около 200 нм (Coltharp, Xiao, 2012). В последнее время появились и получили широкое распространение ряд методов, позволяющих преодолеть дифракционный предел разрешения для флуоресцентной микроскопии. Среди них стоит выделить метод ЛМ (Betzig et al., 2006; Hess et al., 2006; Rust et al., 2006), основная идея которого заключается в разделении сигнала от одиночных молекул флуоресцентного красителя во времени с последующим определением положения этих молекул в образце по их неперекрывающимся изображениям с точностью до нескольких десятков нанометров. Для получения изображения методом ЛМ снимают от нескольких сотен до десятков тысяч последовательных кадров, содержащих изображения одиночных флуоресцентных молекул в образце, и в ходе последующей обработки определяют их местоположение. Координаты локализованных молекул позволяют в итоге реконструировать распределение молекул красителя в образце с субдифракционной точностью. Разделение флуоресценции одиночных молекул во времени может осуществляться за счет явлений фотоактивации или фотопереключения (Betzig et al., 2006; Hess et al., 2006), а также за счет обратимого перехода молекул красителя в долгоживущее нефлуоресцентное состояние (Endesfelder, Heilemann, 2015).

Методами субдифракционной микроскопии удалось не только подтвердить способность FtsZ к формирова-

нию кольца сжатия в клетках разных бактерий, но и значительно лучше определить его структуру *in vivo* (SIM (Strauss et al., 2012), STED (Jennings et al., 2010), PALM (Fu et al., 2010; Biteen et al., 2012; Buss et al., 2013a, 2013b; Holden et al., 2014)). Однако при этом для получения субдифракционных изображений FtsZ в *Escherichia coli* обычно использовали флуоресцентные белки слияния (Fu et al., 2010; Buss et al., 2013a, 2015), способные вносить искажения в нативные структуры, формируемые белком деления. Например, в работе Ванга с соавторами (Wang et al., 2014) продемонстрировано, что белок mEos2, использованный для визуализации FtsZ в вышеупомянутых работах, за счет тенденции к мультимеризации способен менять локализацию визуализируемого белка в бактериальной клетке. Кроме того, белок слияния FtsZ-mEos2 оказался неспособным поддерживать деление клеток в отсутствие нативного FtsZ, что свидетельствует об изменении функциональной активности белка деления при слиянии с флуоресцентным белком.

В настоящей работе мы использовали альтернативный метод контрастирования образцов — иммунофлуоресцентное окрашивание, применимый только для фиксированного (неживого) материала, однако позволяющий визуализировать нативные структуры, формируемые белком FtsZ в бактериальной клетке. Кроме того, мы оборудовали экспериментальную установку для осуществления ЛМ системой активной стабилизации положения образца, реализующей метод, предложенный в работе Стеффена и соавторов (Steffen et al., 2001), но, насколько нам известно, так до сих пор для этой цели не применявшийся. Это позволило нам при помощи метода ЛМ визуализировать структуры, формируемые нативным FtsZ в клетках *E. coli* на различных этапах клеточного цикла со значительно более высоким разрешением по сравнению с обычной флуоресцентной микроскопией. Полученные нами данные существенно дополняют *in vivo* исследования бактериальных FtsZ-структур с участием белков слияния.

## Материал и методика

**Подготовка образцов.** Культуру микроорганизмов *E. coli* Top10 выращивали на жидкой питательной среде LB при 37 °C до оптической плотности  $OD_{600} \approx 0.5$ , после чего клетки бактерий закрепляли на поверхности покровного стекла в промываемой камере, образованной между покровным и предметным стеклами при помощи двухсторонней клейкой ленты. Поверхность камеры предварительно покрывали поли-L-лизинем (Sigma-Aldrich, Великобритания) в концентрации 0.1 % в течение 30 мин, а также микросферами из полиметилметакрилата (2.35 мкм в диаметре; Bangs Laboratories, США) в разведении 1 : 500 в PBS 10× в течение 15 мин. Микросферы необходимы для работы системы стабилизации положения образца. Образцы фиксировали смесью метанола, уксусной кислоты и дистиллированной воды в соотношении 3 : 1 : 4 и обрабатывали 5 мкг/мл лизоцима (Sigma-Aldrich, Великобритания) в буфере GTE (32.5 мМ Tris, 50 мМ глюкозы и 10 мМ ЭДТА, pH 7.5) в течение 5 мин. Неспецифическое связывание антител блокировали обработкой раствором БСА-PBS (БСА в PBS 1×, 20 мг/мл, 30 мин). Инкубацию с кроличьими поликлональными антителами к белку FtsZ *E. coli* (Acris Antibodies, Германия) в разведении 1 : 200 в БСА-PBS осуществ-

ляли в течение ночи при 4 °C. В качестве вторичных антител использовали козьи антикроличьи антитела, конъюгированные с фотоактивируемым красителем Cage 635 (Belov et al., 2014) (Abberior, Германия), в разведении 1 : 100 в БСА-PBS, инкубируя с ними образцы в течение 1 ч при комнатной температуре после тщательной отмывки от первичных антител (5-кратная промывка PBS с добавлением 0.05 % Tween).

**Экспериментальная установка.** Для получения изображений методом ЛМ использовали исследовательский моторизованный микроскоп Axiolmager.Z1 (Carl Zeiss, Германия), оснащенный дополнительной лазерной системой освещения, а также системой стабилизации положения образца в ходе съемки. Схема экспериментальной установки представлена на рис. 1, а. Система стабилизации положения объекта основана на методе определения положения микросферы при помощи квадрантного фотодетектора: изображение микросферы на детекторе формируется при помощи лазера с длиной волны испускания 830 нм (Quioptiq iFLEX-2000, 830 нм), который фокусируется в образце несколько выше положения микросферы, что позволяет определять положение микросферы в трех измерениях по сигналам с детектора. Перемещение пьезостолика для компенсации смещения микросферы от начального положения осуществляли при помощи программы в среде LabView, созданной нами для осуществления активной стабилизации положения образца в ходе сбора данных для реконструкции ЛМ-изображения. Для анализа эффективности системы стабилизации регистрировали перемещение флуоресцентных микросфер из полистирола диаметром 1 мкм (Invitrogen, FluoSpheres Neutravidin red fluorescent). Для этого в оптический путь микроскопа была добавлена длиннофокусная цилиндрическая линза ( $f = 4$  м), что позволило определять аксиальное положение микросфер по форме их изображения во флуоресцентном режиме при помощи плагина QuickPALM (Henriques et al., 2010) для пакета ImageJ (Girish, Vijayalakshmi, 2004; Collins, 2007) (сборка Fiji (Schindelin et al., 2012)). Съемку осуществляли с частотой 1 Гц. Для регистрации флуоресценции микросфер использовали набор фильтров BrightLine 40LP ZERO (Semrock, США). Флуоресценцию красителя Cage 635 регистрировали при помощи набора фильтров LF635/LP-B (Semrock, США). Для обеспечения возможности активации красителя при помощи лазера с длиной волны испускания 405 нм входной фильтр был перемещен в оптический путь лазера с длиной волны испускания 635 нм.

Получение изображений методом ЛМ. Образец одновременно освещали диодными лазерами с длинами волн испускания 635 (10 кВт/см<sup>2</sup>) и 405 (около 100 Вт/см<sup>2</sup>) нм для возбуждения и активации молекул красителя соответственно. Регистрировали не менее 1000 кадров во флуоресцентном режиме с экспозицией 100 мс. Для реконструкции ЛМ-изображений использовали плагин ThunderSTORM (Ovesny et al., 2014) для ImageJ (Girish, Vijayalakshmi, 2004; Collins, 2007).

## Результаты и обсуждение

Система стабилизации положения образца. Высокое разрешение ЛМ в сочетании с длительным временем сбора данных для реконструкции изображения (от десятков секунд до часов) делают этот метод крайне чувствительным к дрейфу образца. Компенсация дрейфа

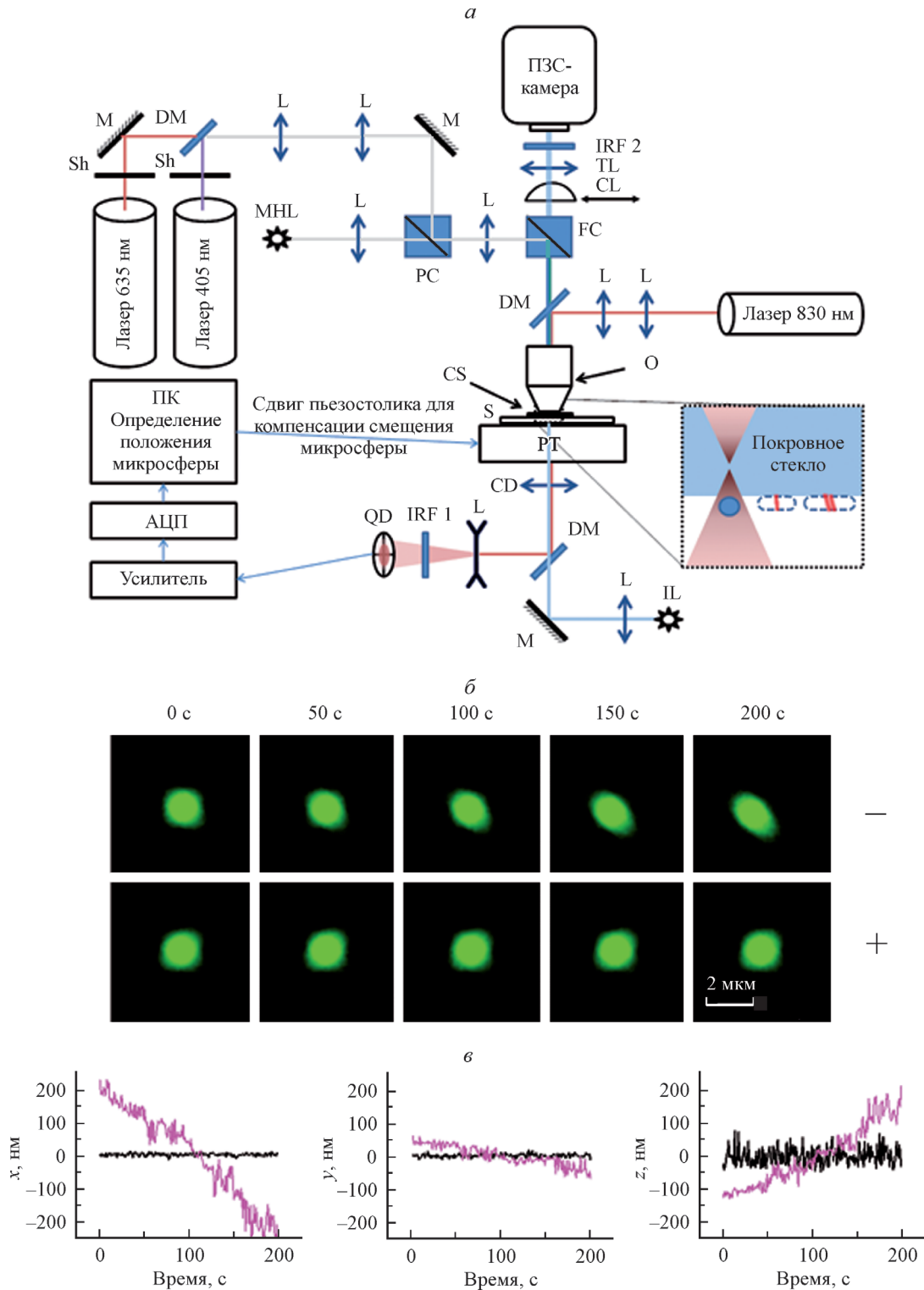


Рис. 1. Система стабилизации положения образца.

*a* — схема экспериментальной установки для локализационной микроскопии. CD — конденсатор, CL — цилиндрическая линза, CS — покровное стекло, DM — дихроическое зеркало, FC — набор фильтров для регистрации флуоресценции, IL — осветитель проходящего света, IRF1 — полосовой фильтр, пропускающий свет с длиной волны, близкой к 830 нм, IRF2 — фильтр, отсекающий излучение в ближнем ИК-диапазоне, в том числе с длиной волны 830 нм, L — линза, M — зеркало, MHL — металлогалогенная лампа для возбуждения флуоресценции, O — объектив, PC — поляризационный кубик, PT — пьезостол, QD — квадрантный фотодетектор, S — образец, Sh — оптический затвор, TL — тубусная линза. *б* — изображения единичной флуоресцентной микросферы, полученные в результате последовательной съемки в течение 200 с при неактивной (–) либо активной (+) системе стабилизации положения образца. *в* — траектории единичной микросферы при неактивной (кривая фиолетового цвета) и активной (кривая черного цвета) системах стабилизации положения образца по осям *x*, *y* и *z* соответственно.

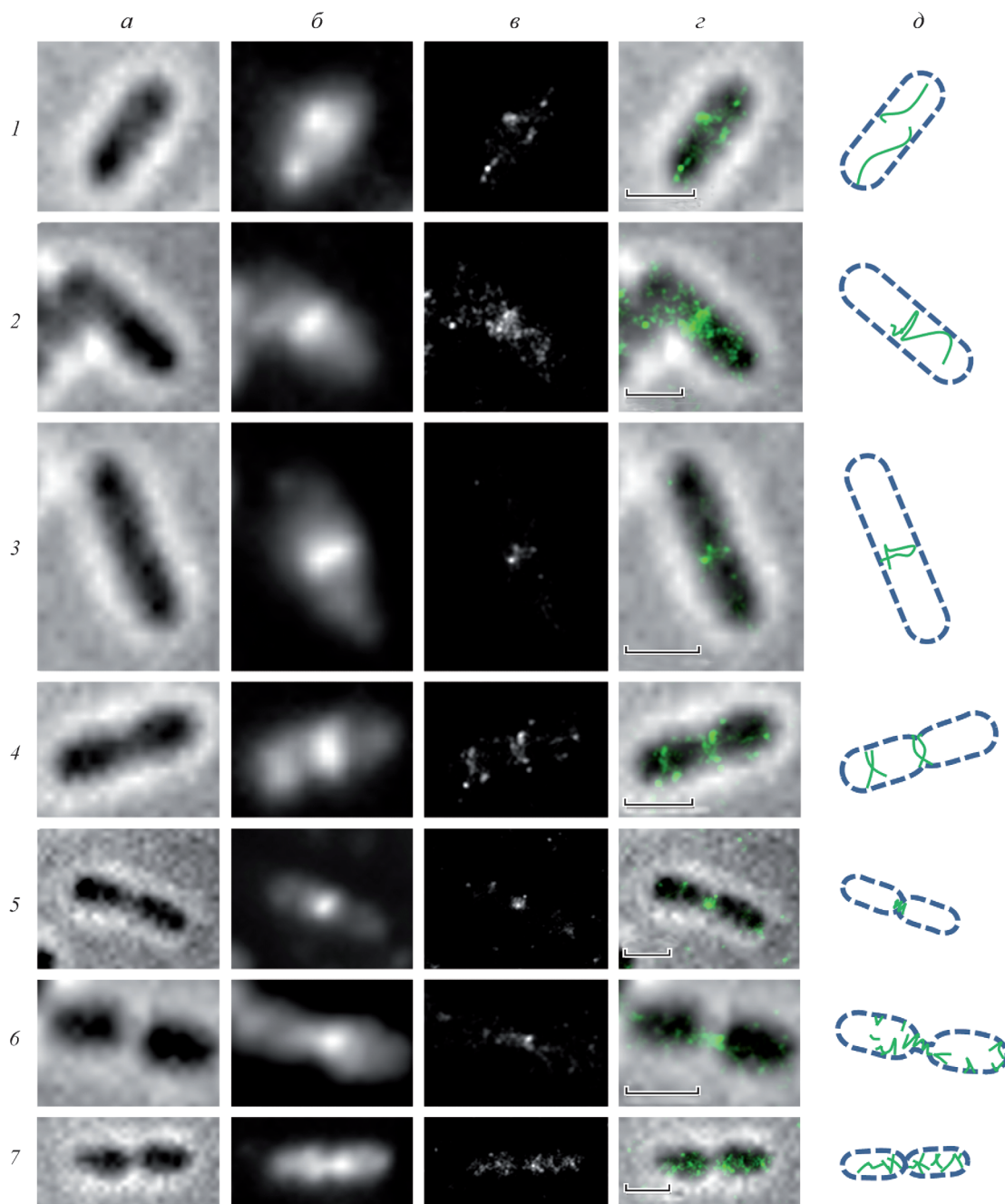


Рис. 2. Структуры, формируемые белком FtsZ в клетках *E. coli* в процессе деления.

*a* — изображения бактериальных клеток в проходящем свете; *б* — дифракционно-ограниченные флуоресцентные изображения FtsZ-структур, полученные в результате усреднения кадров образца, содержащих изображения одиночных молекул красителя; *в* — субдифракционные изображения FtsZ-структур; *г* — наложение субдифракционных изображений FtsZ-структур (выделены зеленым цветом) на черно-белые изображения клеток, полученные в проходящем свете; *д* — схематичное изображение структур, формируемых белком FtsZ в клетках *E. coli* в процессе деления. Изображения расположены в порядке, отражающем ход деления бактериальной клетки (ряды 1—7), от момента начала формирования кольца сжатия (ряд 1) до распределения отдельных протофиламентов FtsZ по дочерним клеткам по завершении цитокинеза (ряд 7). Масштабный отрезок — 1 мкм.

может осуществляться как на этапе обработки данных (коррекция дрейфа (Henriques et al., 2010; Mlodzianoski et al., 2011; York et al., 2011; Ovesny et al., 2014; Wang et al., 2014)), так и на этапе сбора данных (активная стабилизация положения образца (Steffen et al., 2001; Lee et al., 2012; McGorty et al., 2013)). В обоих случаях компенсация дрейфа может осуществляться как с использованием маркерных объектов (Steffen et al., 2001; Henriques et al., 2010; York et al., 2011; Lee et al., 2012; Ovesny

et al., 2014), так и без них (Mlodzianoski et al., 2011; McGorty et al., 2013; Wang et al., 2014).

Для проведения ЛМ нами была создана система активной стабилизации положения образца, основанная на определении положения маркерного объекта (микросферы из полистирола) при помощи квадрантного детектора, изображение микросферы на котором создается при помощи лазера с длиной волны излучения в ближнем инфракрасном диапазоне (830 нм). Обратная связь, осуществ-

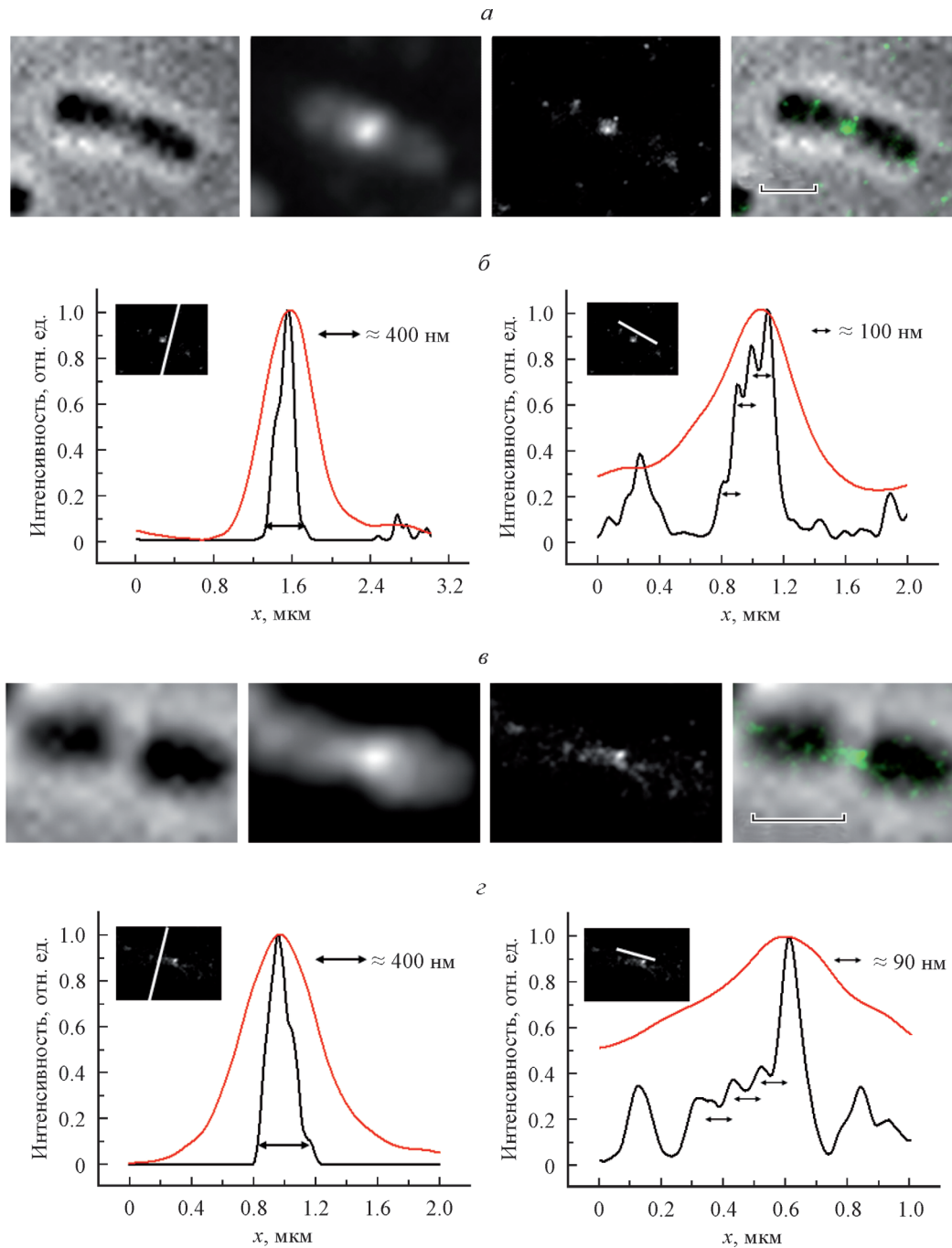


Рис. 3. Характеристика структур, формируемых белком FtsZ в процессе образования перетяжки между дочерними клетками *Escherichia coli*.

*а, в* — клетки *E. coli*, находящиеся на завершающей стадии деления, соответствуют клеткам на рис. 2 в рядах 5 (*а*) и 6 (*в*). 1 — вид клеток в проходящем свете, 2 — дифракционно-ограниченное флуоресцентное изображение FtsZ-структур, 3 — субдифракционное изображение FtsZ-структур, 4 — наложение субдифракционного изображения (выделено зеленым цветом) на изображение клетки в проходящем свете (черно-белое). Масштабный отрезок — 1 мкм. *б, г* — профили распределения сигнала на флуоресцентно-ограниченном (красная кривая) и субдифракционном (черная кривая) изображениях FtsZ-структур по оси, проведенной поперек (слева) либо вдоль (справа) клетки.

ляемая при помощи пьезостолика, позволяет компенсировать дрейф образца в ходе эксперимента. Проверка эффективности работы системы стабилизации за счет независимой регистрации дрейфа посредством определения траекторий флуоресцентных микросфер, закрепленных на поверхности покровного стекла (рис. 1, *б*), показала, что созданная система позволяет снизить стандартное отклонение положений образца до 6 нм и менее в плоскости

ху и до 30 нм по оси *z* (рис. 1, *в*). Таким образом, система стабилизации делает влияние дрейфа образца на разрешение ЛМ незначительным.

Возможность использования для ЛМ метода активной стабилизации положения образца на основе определения положения маркерного объекта при помощи квадрантного детектора продемонстрирована нами впервые. Этот метод в отличие от других методов стабилизации

(Steffen et al., 2001; Lee et al., 2012; McGorty et al., 2013) обладает более высоким быстродействием, позволяя осуществлять измерения положения объекта с частотой до десятков килогерц, а для его работы требуется меньше вычислительных ресурсов, так как исключается этап компьютерного анализа изображений.

Исследование структур, формируемых белком FtsZ в клетках *E. coli* в процессе деления. Дифракционный предел существенно ограничивает возможности исследования структур, формируемых белком FtsZ (как и любыми другими белками) в бактериальной клетке, однако это ограничение может быть преодолено при помощи метода ЛМ. Созданная система стабилизации положения объекта позволила нам исследовать структуры, формируемые белком FtsZ в клетках *E. coli*, с субдифракционным разрешением. Для визуализации этих структур мы использовали иммунофлуоресцентное окрашивание, позволяющее добиться более высокой точности локализации благодаря используемым низкомолекулярным (небелковым) флуорофорам, испускающим, как правило, в несколько (до десятков) раз больше фотонов до фотообесцвечивания, чем флуоресцентные белки.

На рис. 2 представлены изображения бактериальных клеток в проходящем свете (рис. 2, а), с дифракционно-ограниченными флуоресцентными изображениями FtsZ-структур (рис. 2, б) и их субдифракционными изображениями (метод ЛМ, рис. 2, в). Картинки в последних двух столбцах представляют собой наложение субдифракционных изображений FtsZ-структур на фотографии клеток, полученные в проходящем свете (рис. 2, г), и схематичное изображение структур, формируемых белком FtsZ в клетках *E. coli* в процессе деления (рис. 2, д).

Применение метода ЛМ в сочетании с иммунофлуоресцентным окрашиванием образцов позволило нам реконструировать последовательную реорганизацию структур, формируемых белком FtsZ, на разных стадиях цитокинеза (рис. 2, ряды 1–7). В клетках, которые готовятся к процессу деления, но в которых еще не началось формирование перетяжки, FtsZ локализуется в виде протяженных спиралевидных структур, плавно переходящих в кольцеобразную подмембранную структуру посередине клетки (рис. 2, ряд 1). Постепенно кольцо становится толще, а спиралевидные структуры в левой части клетки пропадают (рис. 2, ряд 2). По-видимому, FtsZ полностью перемещается в область формирующегося кольца. Само кольцо выглядит незамкнутым (рис. 2, ряды 3, 4). При этом в клетке FtsZ формирует наряду с Z-кольцом побочную структуру вблизи одного из полюсов, имеющую форму незамкнутой петли (рис. 2, ряд 4). Формирование такой структуры может привести к образованию дополнительной перетяжки и мини-клетки без нуклеоида. Во время активного формирования перетяжки кольцеобразная структура преобразуется в туго сжатую спираль (рис. 2, ряд 5), в которой хорошо различимы несколько витков. Когда перетяжка полностью сформирована, эта спираль, по-видимому, начинает разбираться, и от нее отсоединяются протяженные изогнутые филаменты FtsZ, распределяющиеся по дочерним клеткам (рис. 2, ряд 6). После того как клетки полностью поделились, но еще не разошлись, ни спиралевидных структур, ни кольца в области бывшей перетяжки уже не наблюдается, при этом хорошо различимы филаменты FtsZ по всей протяженности клеток (рис. 2, ряд 7).

Представляется интересным охарактеризовать структуры, которые формирует FtsZ в бактериях, находящихся на стадии образования перетяжки между дочерними клетками (рис. 3). Эти структуры вытянуты по направлению вдоль оси клетки, имеют ширину от 200 до 400 нм (перпендикулярно оси) и длину до 500 нм (вдоль оси), в них отчетливо наблюдается периодичность с шагом от 80 до 150 нм. Эти структуры, образующиеся в процессе сокращения Z-кольца, напоминают спирали, находящиеся на той или иной стадии сжатия. Таким образом, полученные нами данные поддерживают гипотезу о том, что Z-кольцо представляет собой туго свернутую спираль, состоящую из отдельных изогнутых протофиламентов FtsZ, соединенных друг с другом с помощью вспомогательных белков дивисомы (аппарата деления), и эта спиралевидная структура сжимается в ходе цитокинеза, способствуя формированию перетяжки между дочерними клетками (Erickson et al., 2010).

В данной работе мы наглядно продемонстрировали возможности ЛМ, позволяющие обнаружить особенности организации бактериального цитоскелета, недоступные для дифракционно-ограниченной флуоресцентной микроскопии. Кроме того, ЛМ в сочетании с иммунофлуоресцентным окрашиванием существенно дополняет данные, полученные с использованием флуоресцентных химерных белков, так как каждый из этих подходов в отдельности не позволяет абсолютно достоверно установить свойства исследуемых структур. В первом случае источником артефактов могут служить условия фиксации, манипуляции с клетками в процессе получения образцов, размер комплексов антиген + первое антитело + второе антитело (дополнительное отклонение от места локализации молекулы исследуемого белка до молекулы флуорофора, конъюгированного с молекулой второго антитела, может составлять до 20 нм). Белки слияния в свою очередь вносят различные возмущения в нативные структуры, формируемые исследуемыми белками *in vivo*, благодаря как склонности используемых флуоресцентных белков к димеризации, так и возможному непредсказуемому влиянию двух частей химеры друг на друга. Вероятно, именно артефактом димеризации флуоресцентных частей белка слияния можно объяснить несколько иную картину, наблюдаемую при визуализации структур FtsZ-mEos2 (Fu et al., 2010; Buss et al., 2013a, 2015) в живых клетках *E. coli*. Взаимодополняющее использование обоих подходов дает надежду на получение более объективной информации о FtsZ-структурах в бактериальной клетке.

Использованный нами подход открывает широкие возможности для исследования внутренней организации прокариот и может быть достаточно быстро адаптирован для исследования практически любых белков в клетках разных микроорганизмов. Особенно ценной представляется возможность исследования внутренней организации прокариот, имеющих маленький размер клеток, и для которых пока не разработаны надежные методы манипуляции с генетическим материалом, позволяющие легко получать мутантные штаммы с делецией генов или штаммы, продуцирующие белки слияния. В числе таких микроорганизмов определенно можно назвать микоплазмы (класс Mollicutes). До настоящего времени была выполнена только одна попытка установить локализацию белка FtsZ в микоплазме (*Mycoplasma hominis*) (Вишняков и др., 2009), при этом авторы использовали традиционный метод иммуноэлектронной микроскопии, не по-

звolyающий выполнить полноценную реконструкцию внутриклеточных структур, формируемых исследуемым белком, в бактериях столь маленького размера.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-34-00023).

### Список литературы

- Вишняков И. Е., Борхсениус С. Н., Басовский Ю. И., Левицкий С. А., Лазарев В. Н., Снигиревская Е. С., Комиссарчик Я. Ю. 2009. Локализация белка деления FtsZ в клетках микоплазмы. Цитология. 51 (3) : 247—256. (Vishnyakov I. E., Borchsenius S. N., Basovskii Yu. I., Levitskii S. A., Lazarev V. N., Snigirevskaya E. S., Komissarchik Ya. Yu. 2009. Localization of division protein FtsZ in *Mycoplasma hominis*. Cell Tissue Biol. 3 (3) : 254—262.)
- Belov V. N., Mitronova G. Y., Bossi M. L., Boyarskiy V. P., Hebisch E., Geisler C., Kolmakov K., Wurm C. A., Willig K. I., Hell S. W. 2014. Masked rhodamine dyes of five principal colors revealed by photolysis of a 2-diazo-1-indanone caging group: synthesis, photophysics, and light microscopy applications. Chemistry. 20 : 13 162—13 173.
- Betzig E., Patterson G. H., Sougrat R., Lindwasser O. W., Olenych S., Bonifacino J. S., Davidson M. W., Lippincott-Schwartz J., Hess H. F. 2006. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. Science. 313 : 1642—1645.
- Biteen J. S., Goley E. D., Shapiro L., Moerner W. E. 2012. Three-dimensional super-resolution imaging of the midplane protein FtsZ in live *Caulobacter crescentus* cells using astigmatism. Chemphyschem. 13 : 1007—1012.
- Buss J., Coltharp C., Huang T., Pohlmeyer C., Wang S. C., Hatem C., Xiao J. 2013a. In vivo organization of the FtsZ-ring by ZapA and ZapB revealed by quantitative super-resolution microscopy. Mol. Microbiol. 89 : 1099—1120.
- Buss J., Coltharp C., Shtengel G., Yang X., Hess H., Xiao J. 2015. A multi-layered protein network stabilizes the *Escherichia coli* FtsZ-ring and modulates constriction dynamics. PLoS Genet. 11 : e1005128.
- Buss J., Coltharp C., Xiao J. 2013b. Super-resolution imaging of the bacterial division machinery. J. Vis. Exp. 71 : e50048.
- Collins T. J. 2007. ImageJ for microscopy. Biotechniques. 43 : 25—30.
- Coltharp C., Xiao J. 2012. Superresolution microscopy for microbiology. Cell Microbiol. 14 : 1808—1818.
- Endesfelder U., Heilemann M. 2015. Direct stochastic optical reconstruction microscopy (dSTORM). Methods Mol. Biol. 1251 : 263—276.
- Erickson H. P., Anderson D. E., Osawa M. 2010. FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 74 : 504—528.
- Fu G., Huang T., Buss J., Coltharp C., Hensel Z., Xiao J. 2010. In vivo structure of the *E. coli* FtsZ-ring revealed by photoactivated localization microscopy (PALM). PLoS ONE. 5 (9) : e12682.
- Girish V., Vijayalakshmi A. 2004. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. Indian J. Cancer. 41 : 47.
- Graumann P. L. 2007. Cytoskeletal elements in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 61 : 589—618.
- Henriques R., Lelek M., Fornasiero E. F., Valtorta F., Zimmer C., Mhlanga M. M. 2010. QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ. Nat. Methods. 7 : 339—340.
- Hess S. T., Girirajan T. P., Mason M. D. 2006. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. Biophys. J. 91 : 4258—4272.
- Holden S. J., Pengo T., Meibom K. L., Fernandez Fernandez C., Collier J., Manley S. 2014. High throughput 3D super-resolution microscopy reveals *Caulobacter crescentus* in vivo Z-ring organization. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 111 : 4566—4571.
- Jennings P. C., Cox G. C., Monahan L. G., Harry E. J. 2010. Super-resolution imaging of the bacterial cytokinetic protein FtsZ. Micron. 42 : 336—341.
- Lee S. H., Baday M., Tjioe M., Simonson P. D., Zhang R., Cai E., Selvin P. R. 2012. Using fixed fiducial markers for stage drift correction. Opt. Express. 20 : 12 177—12 183.
- Lutkenhaus J., Pichoff S., Du S. 2012. Bacterial cytokinesis: from Z ring to divisome. Cytoskeleton (Hoboken). 69 : 778—790.
- Ma X., Ehrhardt D. W., Margolin W. 1996. Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 93 : 12 998—13 003.
- McGorty R., Kamiyama D., Huang B. 2013. Active microscope stabilization in three dimensions using image correlation. Opt. Nanoscopy. 2. doi : 10.1186/2192-2853-2-3.
- Mlodzianoski M. J., Schreiner J. M., Callahan S. P., Smolko-va K., Dlaskova A., Santorova J., Jezek P., Bewersdorf J. 2011. Sample drift correction in 3D fluorescence photoactivation localization microscopy. Opt. Express. 19 : 15 009—15 019.
- Monahan L. G., Liew A. T., Bottomley A. L., Harry E. J. 2014. Division site positioning in bacteria: one size does not fit all. Front. Microbiol. 5 : 19. 10.3389/fmicb.2014.00019.
- Osteryoung K. W., Pyke K. A. 2014. Division and dynamic morphology of plastids. Annu. Rev. Plant Biol. 65 : 443—472.
- Ovesny M., Krizek P., Borkovec J., Svindrych Z., Hagen G. M. 2014. ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging. Bioinformatics. 30 : 2389—2390.
- Rust M. J., Bates M., Zhuang X. 2006. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). Nat. Methods. 3 : 793—795.
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J. Y., White D. J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat. Methods. 9 : 676—682.
- Steffen W., Smith D., Simmons R., Sleep J. 2001. Mapping the actin filament with myosin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 98 : 14 949—14 954.
- Strauss M. P., Liew A. T., Turnbull L., Whitchurch C. B., Monahan L. G., Harry E. J. 2012. 3D-SIM super resolution microscopy reveals a bead-like arrangement for FtsZ and the division machinery: implications for triggering cytokinesis. PLoS Biol. 10 : e1001389.
- Thanedar S., Margolin W. 2004. FtsZ exhibits rapid movement and oscillation waves in helix-like patterns in *Escherichia coli*. Curr. Biol. 14 : 1167—1173.
- Wang S., Moffitt J. R., Dempsey G. T., Xie X. S., Zhuang X. 2014. Characterization and development of photoactivatable fluorescent proteins for single-molecule-based superresolution imaging. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 111 : 8452—8457.
- Wang Y., Schnitzbauer J., Hu Z., Li X., Cheng Y., Huang Z.-L., Huang B. 2014. Localization events-based sample drift correction for localization microscopy with redundant cross-correlation algorithm. Opt. Express. 22 : 15 982—15 991.
- Willemsse J., van Wezel G. P. 2009. Imaging of *Streptomyces coelicolor* A3(2) with reduced autofluorescence reveals a novel stage of FtsZ localization. PLoS ONE. 4 : e4242.
- York A. G., Ghitani A., Vaziri A., Davidson M. W., Shroff H. 2011. Confined activation and subdiffraction localization enables whole-cell PALM with genetically expressed probes. Nat. Methods. 8 : 327—333.

NEW INFORMATION ABOUT THE STRUCTURES FORMED BY FtsZ PROTEIN  
IN *ESCHERICHIA COLI* CELLS DURING DIVISION PROCESS OBTAINED  
BY SINGLE-MOLECULE LOCALIZATION MICROSCOPY

A. D. Vedyaykin,<sup>1</sup> I. E. Vishnyakov,<sup>1,2</sup> V. S. Polinovskaya,<sup>1</sup> T. O. Artamonova,<sup>1</sup>  
M. A. Khodorkovskii,<sup>1</sup> A. V. Sabantsev<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, 195251,  
and <sup>2</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;  
\* e-mail: sabantsev.a.v.@gmail.com

FtsZ — a bacterial tubulin homolog — is one of the key bacterial division proteins, forming a contractile Z-ring at the midcell of dividing bacteria. In this work immunofluorescent labeling was used in conjunction with single-molecule localization microscopy (SMLM) to visualize native structures formed by FtsZ protein in *Escherichia coli* cells. This approach allowed the reorganization of FtsZ structures during cytokinesis to be visualized step-by-step. New data was obtained that support the hypothesis that the Z-ring is a spiral structure that constricts during division, assisting the formation of the septum between daughter cells.

**Key words:** single-molecule localization microscopy, sample position stabilization system, *Escherichia coli*, cytokinesis, FtsZ, contractile ring.

---