

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПРОЦЕССА ДЕЛЕНИЯ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПОСЛЕ ИНДУКЦИИ БЕЛКА SulA, ОТВЕЧАЮЩЕГО ЗА ПРЕКРАЩЕНИЕ ЦИТОКИНЕЗА ПРИ SOS-ОТВЕТЕ

© А. Д. Ведяйкин,¹ А. В. Сабанцев,¹ И. Е. Вишняков,^{1,2,*}
Н. Е. Морозова,¹ М. А. Ходорковский¹

¹ С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251,
и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;
* электронный адрес: innvish@gmail.com

SOS-ответ является важным защитным механизмом бактериальной клетки и позволяет микроорганизмам защищать геном и переживать неблагоприятные условия. В последнее время SOS-ответ рассматривается не только как защитный, но и как активный эволюционный механизм: являясь катализатором мутагенеза, он помогает таким образом приспосабливаться к изменяющимся условиям среды (в том числе способствуя формированию устойчивости к антибиотикам). В связи с высокой значимостью данного явления представляется важным изучение процессов, позволяющих бактериальной клетке восстановиться после наступления SOS-ответа. В настоящей работе исследовали восстановление процесса деления клеток бактерии *Escherichia coli* после его нарушения под действием экспрессии белка SOS-ответа SulA. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что клетки способны быстро восстанавливать нормальное деление, при этом главным механизмом правильного позиционирования септы, по-видимому, является механизм нуклеоидной окклюзии. Кроме того, белок FtsZ формирует кольца деления в удлинённой клетке не сразу, а через этап образования промежуточных спиралеобразных полимерных форм.

Ключевые слова: локализационная микроскопия, *Escherichia coli*, цитокинез, FtsZ, кольцо деления, SOS-ответ.

Принятые сокращения: Z-кольца — кольца деления.

Состояние SOS-ответа — защитный механизм, помогающий клеткам бактерий пережить неблагоприятные условия, приводящие к повреждению ДНК (Radman, 1975). В этом состоянии клетки экспрессируют ряд белков, активность которых направлена главным образом на репарацию ДНК (Michel, 2005). Следует отметить, что при SOS-ответе значительно увеличивается частота мутаций как за счет вовлечения ДНК-полимераз, делающих ошибки (Cirz et al., 2005), так и за счет гомологичной рекомбинации. Это позволяет рассматривать данное состояние как один из ключевых факторов формирования устойчивости к антибиотикам (Culyba et al., 2015).

Одним из условий успешной репарации при SOS-ответе является остановка цитокинеза за счет экспрессии белка SulA, связывающегося с ключевым белком бактериального деления FtsZ (Haeusser, Margolin, 2016). При этом происходит истощение пула свободных мономеров FtsZ, вследствие чего эффективная концентрация белка деления (молекул FtsZ, не связанных с белком-ингибитором деления SulA) в цитоплазме падает ниже критического значения, что приводит к ингибированию его полимеризации и блокированию образования колец деления (Z-колец).

Механизмы включения SOS-ответа и остановки деления изучены достаточно хорошо. Однако для того чтобы

выжить, клетке также необходимо возобновить деление после окончания репарации повреждений, и этот процесс изучен в значительно меньшей степени, чем процессы активации и развития SOS-ответа. В частности, нам известно лишь о нескольких работах, в которых авторы анализировали процесс восстановления нормального деления клеток после прекращения воздействия, вызывающего филаментацию (Ishii et al., 2004; Stackhouse et al., 2012).

Чтобы возобновить деление после SOS-ответа, клеткам требуется, во-первых, распределить репарированные хромосомы по всей длине клетки и, во-вторых, сформировав Z-кольца между хромосомами, осуществить септацию. Исследование восстановления процесса деления бактериальной клетки при выходе из SOS-ответа представляется весьма важным, так как успешное возобновление цитокинеза по окончании SOS-ответа играет важную роль в формировании у бактерий устойчивости к антибиотикам (Bos et al., 2015). Тщательное изучение выхода бактериальной клетки из SOS-ответа позволит отыскать новые способы борьбы с бактериальными инфекциями.

В настоящей работе исследовали восстановление процесса деления в клетках *E. coli*, в которых формирование Z-колец останавливали индукцией синтеза белка SulA, вызывающего остановку септации при SOS-ответе. При этом ДНК клеток оставалась неповрежденной, в свя-

зи с чем бактериальные хромосомы изначально были регулярно распределены по всей длине клеток, подвергшихся филаментации. Для экспериментов с белком Sula на основе вектора pBad-HisB сконструировали плазмиду, содержащую ген *sula* под контролем арабинозного промотора, экспрессия которого приводит к филаментации клеток, однако после остановки индукции клетки достаточно быстро возвращаются в нормальное состояние. Восстановление процесса деления анализировали при помощи иммунофлуоресцентной микроскопии с антителами, специфичными к FtsZ, а также при помощи динамической микроскопии живых клеток с визуализацией ДНК при помощи проникающего через мембрану красителя SYTO 9. Мы установили, что формирование активных Z-колец и восстановление процесса септации в удлиненной бактериальной клетке после прекращения индукции Sula происходят асинхронно — вблизи полюсов и в средней части филаментированных клеток. Кроме того, по мере восстановления способности FtsZ к полимеризации сначала формируются спиралевидные структуры и только после этого Z-кольца.

Материал и методика

Бактериальные штаммы и плазмиды. Для экспрессии белка Sula в клетках *E. coli* разработали генетическую конструкцию на основе плазмиды pBad-HisB. Для этого с использованием праймеров Sula-NcoI-For (5'-atttaaCCATGGcatacacttcaggctatgcacat-3') и Sula-KpnI-Rev (5'-atttaaGGTACCcttaatacacaagaattagtgaaatttttagcc-3') амплифицировали фрагмент ДНК *E. coli* Dh5 α , кодирующий полноразмерный целевой белок. Данный фрагмент ДНК встроили в плазмиду pBad-HisB по сайтам рестрикции KpnI и NcoI. Полученной плазмидой трансформировали клетки штамма *E. coli* Dh5 α .

Культивирование и фиксация клеток. Клетки полученного штамма выращивали в течение ночи в жидкой среде LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина при 37 °C и интенсивной аэрации в термошейкере (200 об/мин), после чего инокулят вносили в свежую среду и культивировали до оптической плотности OD₆₀₀ = 0.1. Экспрессию Sula индуцировали добавлением в среду L-арабинозы в концентрации 10 мкМ. Через 1 ч индукцию останавливали следующим образом: бактерии собирали центрифугированием (6000 g в течение 2 мин), супернатант отбирали, а осадок ресуспендировали в свежей среде LB с добавлением антибиотика и 0.4 % глюкозы, после чего бактерии дополнительно культивировали в течение 70 мин. Через равные промежутки времени часть клеток отбирали и фиксировали в среде с добавлением формальдегида и глутарового альдегида, как описано ранее (Vedyaykin et al., 2016).

Подготовка образцов для локализационной микроскопии. После фиксации клетки ресуспендировали в буфере GTE (50 мМ глюкозы, 32.5 мМ Трис и 10 мМ ЭДТА) и закрепляли на покровных стеклах, как описано ранее (Vedyaykin et al., 2016). Клетки пермеабilizировали последовательной обработкой 0.1%-ным раствором Тритона X-100 в PBS (5 мин) и 10 мкг/мл лизоцима в буфере GTE (5 мин) с промежуточной промывкой PBS. После обработки лизоцимом клетки вновь промывали PBS и помещали в блокирующий раствор обезжиренного молока (blotting grade blocker, BioRad, США) в PBS на 30 мин для предотвращения неспецифического связы-

вания антител. Инкубирование с первичными антителами (кроличьи поликлональные антитела к синтетическому пептиду, разработанному на основе известных последовательностей бактериальных белков FtsZ, включая FtsZ *E. coli* K12 (Agrisera, Швеция), в разведении 1 : 200 в блокирующем растворе) осуществляли в течение ночи при 4 °C. После этого клетки тщательно промывали 0.01%-ным раствором Tween-20 в PBS, затем инкубировали 1 ч при комнатной температуре со вторичными антителами (F(ab')₂-фрагменты антител козы к гамма-иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с красителем Alexa 647 (A-21246; Life Technologies, США)). После отмывки от антител при помощи раствора Tween-20 в PBS производили окрашивание ДНК красителем YOYO-1 (конечная концентрация 100 нМ в PBS) в течение 10 мин. Предварительно на слайдах закрепляли пластиковые микросферы, которые при последующей съемке использовали для работы системы активной стабилизации положения образца в микроскопе (Ведяйкин и др., 2015).

Получение изображений. Изображения отдельных клеток получали при помощи установки, основанной на неинвертированном микроскопе AxioImager.Z1 (Carl Zeiss, Германия) и описанной ранее (Ведяйкин и др., 2015). Для съемки образцов использовали высокочувствительную ПЗС-камеру с электронным умножением (AndoriXon897). Сначала снимали выбранное поле в проходящем свете, а также в каналах флуоресценции, соответствующих красителям YOYO-1 и Alexa 647, при этом для возбуждения флуоресценции использовали низкоинтенсивное излучение ртутной лампы и наборы фильтров FilterSet 10 (Carl Zeiss, Германия) для YOYO-1 и LF635/LP-B-00 (Semrock, США) для Alexa 647. Затем снимали серию кадров (от 4000 до 10 000 снимков), содержащих изображения одиночных молекул красителя Alexa 647, при этом для возбуждения флуоресценции использовали высокоинтенсивное излучение диодного лазера с длиной волны 635 нм (плотность мощности в плоскости образца около 1 кВт/см²). При съемке для достижения нужных фотофизических свойств красителя Alexa 647 использовали специальный буфер (PBS-Tris, pH 7.5, 10 % глюкозы, 10 мМ цистеамина, 50 мМ 2-меркаптоэтанола, 2 мМ циклооктатетраена, а также ферментативная система поглощения кислорода (2.5 мМ протокатеховой кислоты и 50 нМ протокатехат 3,4-диоксигеназы)) (Oliver et al., 2013). При съемке использовали программное обеспечение MicroManager (Edelstein et al., 2010), для анализа изображений — пакет ImageJ (Schneider et al., 2012). Для получения изображений по методу локализационной микроскопии использовали плагин ThunderSTORM для программного пакета ImageJ (Ovesny et al., 2014). Для построения изображений брали локализации с интенсивностью не меньше 1000 фотонов и неточностью определения положения, не превышающей 20 нм (Vedyaykin et al., 2016).

Динамическая съемка живых клеток. Для динамической съемки живых бактерий использовали высокочувствительную ПЗС-камеру с электронным умножением Cascade-II (Photometrics, США), а также самостоятельно написанные программы для автоматической съемки, использованные ранее в работе Морозовой и соавторов (Morozova et al., 2016). Для визуализации ДНК использовали краситель SYTO 9 (Thermo Fisher Scientific, США), проникающий в живые клетки. Для обработки изображений также использовали программный пакет ImageJ.

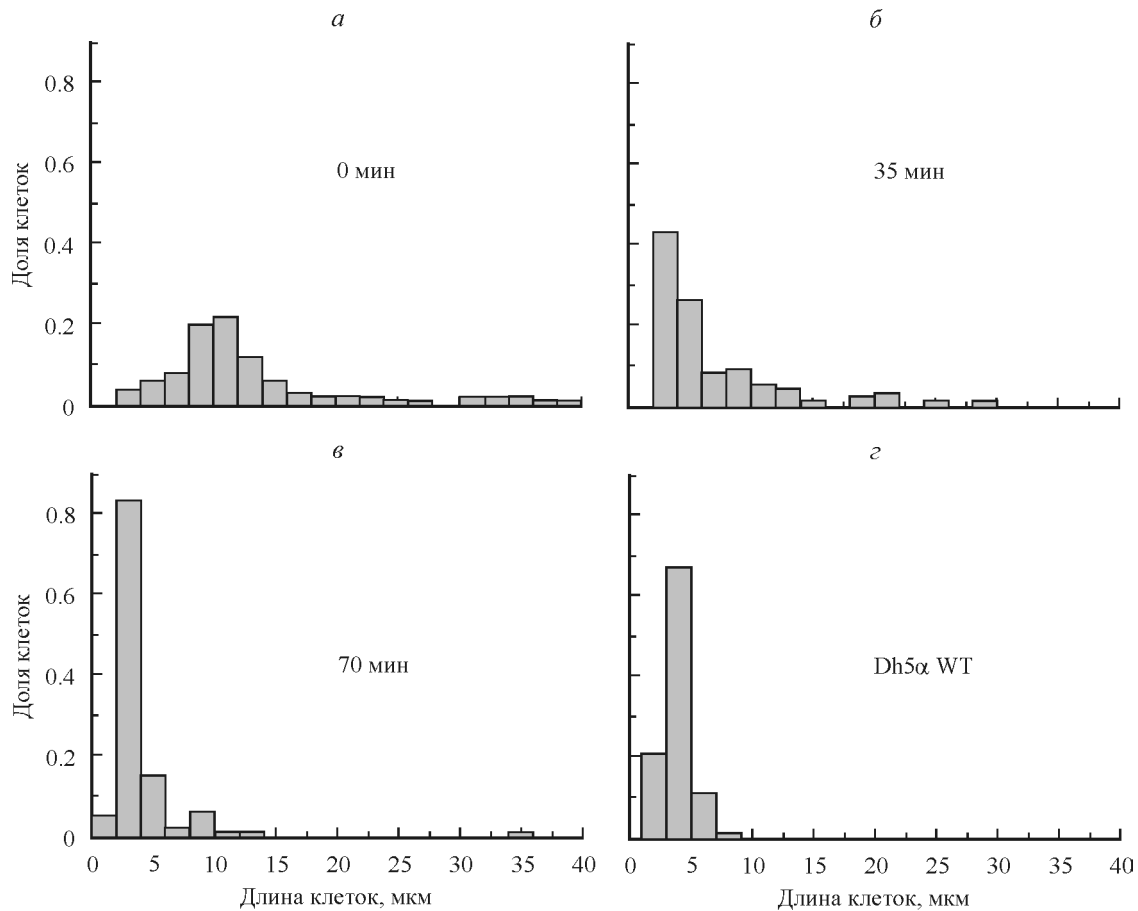


Рис. 1. Распределение клеток в популяции *Escherichia coli* по длине сразу после остановки экспрессии белка SulA (а), через 35 (б) и 70 (в) мин после остановки экспрессии данного белка, а также в отсутствие экспрессии SulA (г).

Результаты и обсуждение

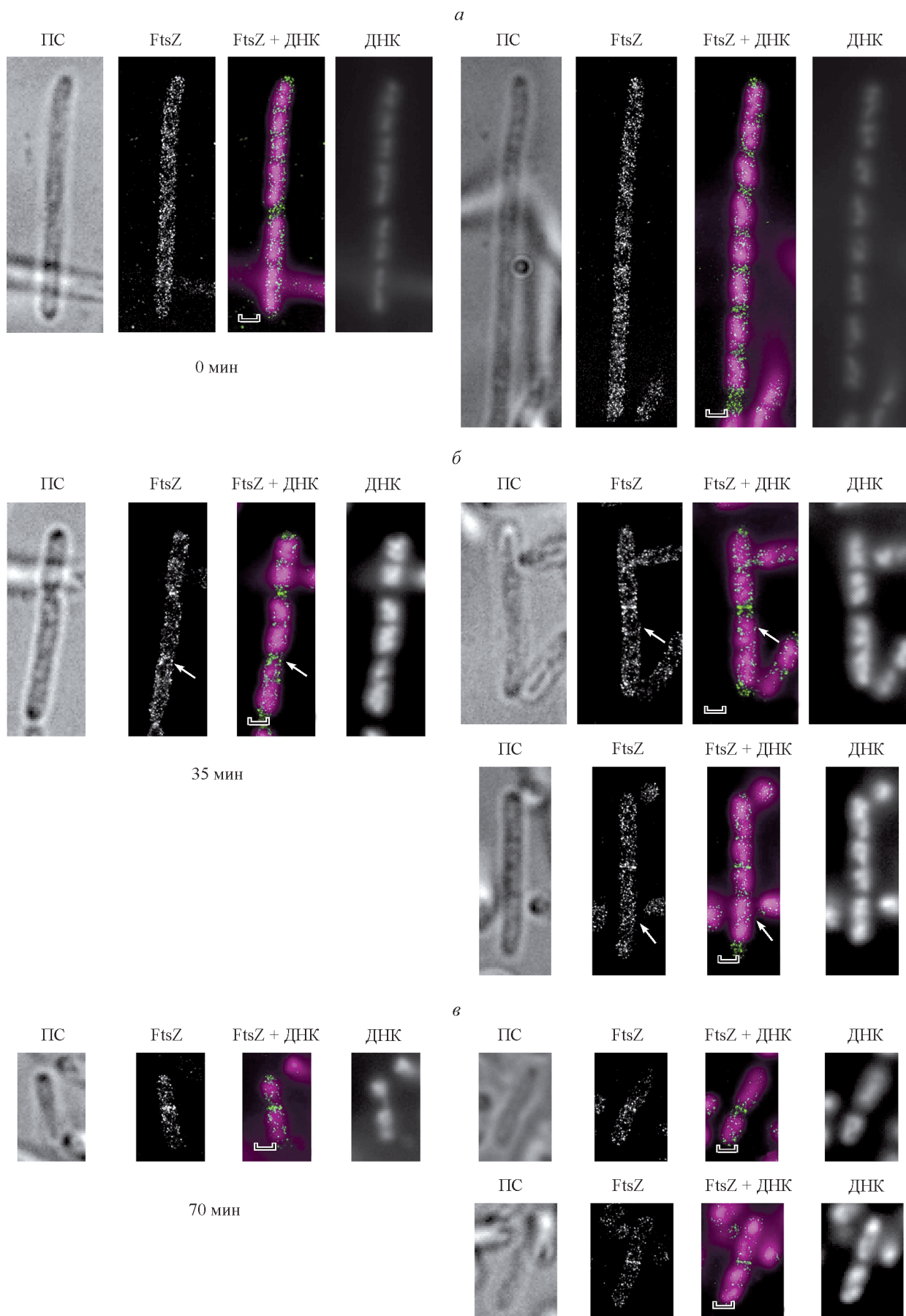
Экспрессия белка SulA приводила к остановке деления и формированию характерных для SOS-ответа филаментированных клеток *E. coli*, однако в отличие от SOS-ответа клетки содержали несколько разделенных нуклеоидов, а не однородную массу ДНК. Таким образом моделировали ситуацию, когда в ходе SOS-ответа клетке удается осуществить репарацию и разделить между собой хромосомы, после чего клетка может приступить к дальнейшему делению. Экспрессия SulA приводила к блокированию образования Z-колец, при этом молекулы FtsZ были распределены по клетке более или менее равномерно, хотя встречались и отдельные элементы, напоминающие спирали и другие полимерные структуры (рис. 2, а). Также FtsZ отчасти демонстрировал инверсную по отношению к ДНК локализацию (иными словами, в промежутках между нуклеоидами наблюдали большую плотность FtsZ, чем в области цитоплазмы, занятой ДНК), что может говорить о сохранении влияния в усло-

виях экспрессии SulA явления нуклеоидной окклюзии (Ortiz et al., 2016). Следует отметить, что подобную инверсную локализацию наблюдали и в клетках в состоянии SOS-ответа (данные не представлены).

После остановки экспрессии SulA большинство филаментированных клеток быстро возвращалось к нормальному состоянию, что наглядно проиллюстрировано изменением гистограммы распределения клеток по длине (рис. 1), а также съемкой клеток в течение длительного времени (рис. 3). По всей видимости, столь быстрое восстановление процесса цитокинеза обеспечивается коротким временем жизни (менее 2 мин) белка SulA, связанным с его деградацией протеазой Lon (Mizusawa, Gottesman, 1983). Через 35 мин после остановки экспрессии SulA значительная часть клеток в популяции приобретает нормальный фенотип, а филаментированные клетки демонстрируют формирование Z-колец и соответственно находятся в процессе септации (рис. 2, б). Стоит отметить, что формирование Z-колец происходило асинхронно, причем деление инициировалось не только вблизи

Рис. 2. Отдельные клетки *Escherichia coli* на разных стадиях восстановления процесса деления после остановки экспрессии белка SulA.

Для каждой клетки приведены изображения в проходящем свете (ПС) и каналах флуоресценции FtsZ (FtsZ), ДНК (ДНК), а также их комбинации (FtsZ + ДНК), при этом фиолетовым цветом выделена ДНК, зеленым — белок FtsZ. У клеток сразу после остановки экспрессии (в точке 0 мин) отсутствуют формирующиеся Z-кольца, при этом различима инверсная локализация FtsZ и ДНК (а). Через 35 мин после завершения индукции SulA (б) многие клетки демонстрируют формирование Z-колец, а также структур, напоминающих спирали (отмечены белыми стрелками). Через 70 мин большинство клеток демонстрирует нормальный фенотип с Z-кольцами, формирующимися между одиночными нуклеоидами (в). Масштабные отрезки — 1 мкм.



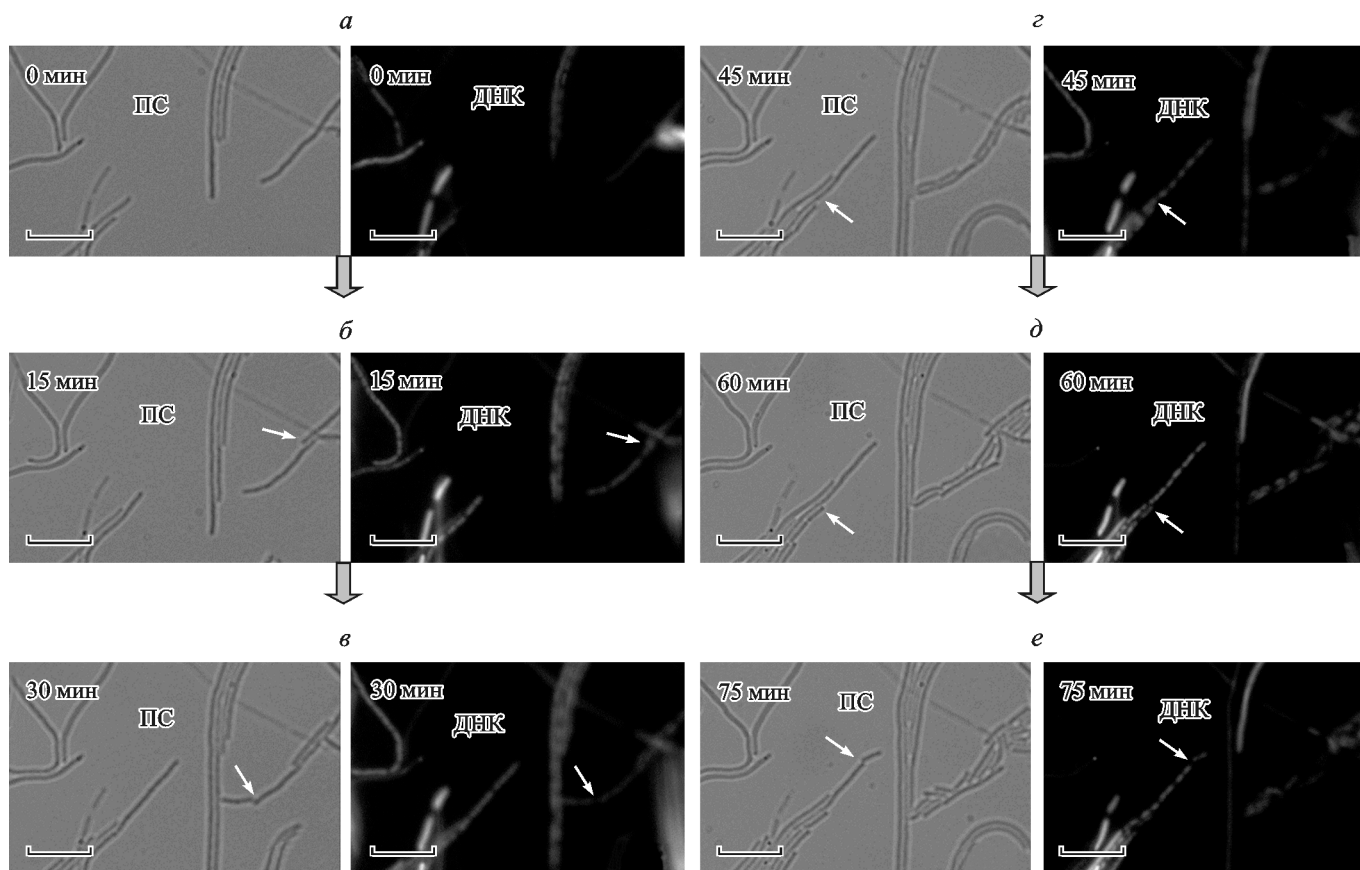


Рис. 3. Восстановление процесса деления в клетках *Escherichia coli* после остановки экспрессии белка SulA.

Приведены последовательные кадры (а—е) с интервалом съемки 15 мин в каналах проходящего света (ПС) и флуоресценции ДНК, окрашенной красителем SYTO-9 (ДНК). Белыми стрелками отмечены случаи успешного деления клеток. Важно подчеркнуть, что при восстановлении процесса деления септообразование происходит как вблизи полюсов (д, е), так и в средней части удлинившихся клеток (б—з).

полюсов, но и в средней части клетки. Полученные данные также свидетельствуют о преимущественном формировании Z-колец между хорошо разделенными в пространстве нуклеоидами (чем больше расстояние между нуклеоидами, тем выше вероятность формирования в этом промежутке Z-кольца), по-видимому за счет явления нуклеоидной окклюзии. Неравномерные промежутки между нуклеоидами наблюдали на всех стадиях индукции SulA. Подобную неравномерность можно объяснить асинхронной сегрегацией нуклеоидов, при которой потенциальные сайты деления — промежутки между нуклеоидами — формируются в разное время. Возможно, это явление носит отчасти случайный характер. Различия в расстояниях между нуклеоидами могут служить причиной асинхронного начала деления филаментированных клеток.

Через 70 мин после окончания экспрессии SulA большинство клеток содержало не более двух нуклеоидов, при этом среднее значение длины клеток оказывалось близким к таковому для нормально делящихся клеток (рис. 1; 2, в), т. е. клетки имели нормальную длину. В то же время сохранялось и небольшое количество удлинённых клеток со множеством нуклеоидов, что свидетельствует о том, что выход из состояния SOS-ответа, по всей видимости, происходит с высокой, но отличной от 100 % эффективностью.

Кроме того, по мере восстановления способности FtsZ к полимеризации сначала наблюдали формирование

промежуточных (спиралевидных) структур (рис. 2, б), а уже потом полноценных Z-колец. Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными при исследовании нормального процесса деления бактериальных клеток (Ведяйкин и др., 2015).

Таким образом, в настоящей работе с использованием методов локализационной микроскопии и иммунофлуоресцентного окрашивания исследовали процесс восстановления нормального деления бактерий *E. coli* после прекращения экспрессии белка SulA, блокирующего деление при SOS-ответе. Нами показано, что в течение 1 ч после остановки экспрессии SulA большинство бактерий восстанавливает нормальный цитокинез, при этом септообразование между сегрегированными нуклеоидами происходит не синхронно, а в первую очередь в местах, где расстояние между ними оказывается большим, чем таковое в остальном пространстве филаментированной клетки. Кроме того, по мере восстановления способности FtsZ к полимеризации наблюдали в первую очередь формирование промежуточных (спиралевидных) полимерных структур и только затем Z-колец, после чего происходила септация.

Настоящее исследование является отправной точкой для изучения механизмов, обеспечивающих восстановление нормального деления филаментированных клеток бактерий. Следующим шагом было бы разумным проанализировать восстановление процессов сегрегации нуклеоидов и септообразования в клетке после полноценно-

го SOS-ответа, вызванного, в частности, воздействием антибиотиков, что представляет, по нашему мнению, значительный интерес, так как данное состояние бактерий связано с возникновением у них резистентности (Bos et al., 2015). С использованием штаммов бактерий с нарушениями в системах позиционирования Z-колец (например, с дефектной системой нуклеоидной окклюзии) можно также проанализировать роль различных систем регуляции септообразования в восстановлении нормального деления после окончания SOS-ответа. Изучение процесса выхода клеток из SOS-ответа может стать важным шагом на пути понимания механизмов, ответственных за формирование устойчивости бактерий к антимикробным препаратам.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-34-00023) с использованием УСУ «Лазерный пинцет» на базе ФГАОУ ВО «СПбПУ».

Список литературы

- Ведяйкин А. Д., Вишняков И. Е., Полиновская В. С., Артамонова Т. О., Ходорковский М. А., Сабанцев А. В. 2015. Новые данные о структурах, формируемых белком FtsZ в клетках *Escherichia coli* в процессе деления, полученные методом локализационной микроскопии. Цитология. 57 (11) : 823—830. (Vedyaykin A. D., Vishnyakov I. E., Polinovskaya V. S., Artamonova T. O., Khodorkovskii M. A., Sabantsev A. V. 2016. New data on structures formed by the FtsZ protein during the cell division process in *Escherichia coli* obtained using the localization microscopy method. Cell Tissue Biol. 10 (1) : 76—83.)
- Bos J., Zhang Q., Vyawahare S., Rogers E., Rosenberg S. M., Austin R. H. 2015. Emergence of antibiotic resistance from multi-nucleated bacterial filaments. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 112 : 178—183.
- Cirz R. T., Chin J. K., Andes D. R., de Crecy-Lagard V., Craig W. A., Romesberg F. E. 2005. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. PLoS Biol. 3 : e176.
- Culyba M. J., Mo C. Y., Kohli R. M. 2015. Targets for combating the evolution of acquired antibiotic resistance. Biochemistry. 54 : 3573—3582.
- Edelstein A., Amodaj N., Hoover K., Vale R., Stuurman N. 2010. Computer control of microscopes using microManager. Curr. Protoc. Mol. Biol. Doi: 10.1002/0471142727.mb1420s92.
- Haeusser D. P., Margolin W. 2016. Splitsville: structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring. Nat. Rev. Microbiol. 14 : 305—319.
- Ishii A., Sato T., Wachi M., Nagai K., Kato C. 2004. Effects of high hydrostatic pressure on bacterial cytoskeleton FtsZ polymers *in vivo* and *in vitro*. Microbiology. 150 : 1965—1972.
- Michel B. 2005. After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. PLoS Biol. 3 : e255.
- Mizusawa S., Gottesman S. 1983. Protein degradation in *Escherichia coli*: the *lon* gene controls the stability of SulA protein. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 80 : 358—362.
- Morozova N., Sabantsev A., Bogdanova E., Fedorova Y., Maitkova A., Vedyaykin A., Rodic A., Djordjevic M., Khodorkovskii M., Severinov K. 2016. Temporal dynamics of methyltransferase and restriction endonuclease accumulation in individual cells after introducing a restriction-modification system. Nucl. Acids Res. 44 : 790—800.
- Olivier N., Keller D., Gönczy P., Manley S. 2013. Resolution doubling in 3D-STORM imaging through improved buffers. PLoS ONE. 8 : e69004.
- Ortiz C., Natale P., Cueto L., Vicente M. 2016. The keepers of the ring: regulators of FtsZ assembly. FEMS Microbiol. Rev. 40 : 57—67.
- 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.
- Radman M. 1975. SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. Basic Life Sci. 5A : 355—367.
- Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat. Methods. 9 : 671—675.
- Stackhouse R. R., Faith N. G., Kaspar C. W., Czuprynski C. J., Wong A. C. 2012. Survival and virulence of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* filaments induced by reduced water activity. Appl. Environ. Microbiol. 78 : 2213—2220.
- Vedyaykin A. D., Vishnyakov I. E., Polinovskaya V. S., Khodorkovskii M. A., Sabantsev A. V. 2016. New insights into FtsZ rearrangements during the cell division of *Escherichia coli* from single-molecule localization microscopy of fixed cells. Microbiology-open. 5 : 378—386.

Поступила 5 VII 2016

RECOVERY OF DIVISION PROCESS IN BACTERIAL CELLS AFTER INDUCTION OF SulA PROTEIN WHICH IS RESPONSIBLE FOR CYTOKINESIS ARREST DURING SOS-RESPONSE

A. D. Vedyaykin,¹ A. V. Sabantsev,¹ I. E. Vishnyakov,^{1,2,*} N. E. Morozova,¹ M. A. Khodorkovskii¹

¹ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, 195251, St. Petersburg;
and ² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064; * e-mail: innvish@gmail.com

SOS-response is an important tool of bacteria intended to protect their genome and thereby allow them to survive under adverse conditions. Recently SOS-response is considered to enhance mutagenesis and thus help bacteria acquire antibiotic resistance. Due to high significance of this phenomena it seems to be important to investigate processes that allow bacteria to survive after SOS-response activation. In current work the recovery of division process of *Escherichia coli* cells after division arrest due to expression of SOS-response protein SulA was studied. Data indicate that cells are able to rapidly restore normal division; also nucleoid occlusion seems to be the main septum positioning mechanism during the process. In the course of recovery FtsZ forms helix-like structures, which then transform into Z-rings.

Key words: single-molecule localization microscopy, *Escherichia coli*, cytokinesis, FtsZ, contractile ring, SOS-response.