

## ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ FtsZ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ МИКОПЛАЗМ НА ПРОЦЕСС ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК *Escherichia Coli*

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

<sup>1</sup> С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, 195251,

и <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

\* электронный адрес: innvish@gmail.com

FtsZ является высококонсервативным белком, выполняющим одну из ключевых ролей в делении клеток большинства прокариот. В настоящее время принято считать, что основная роль FtsZ в клетках изученных микроорганизмов (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и др.) состоит в управлении процессом синтеза клеточной стенки в области будущей септы. В связи с этим присутствие FtsZ в клетках микоплазм, бактерий, лишенных клеточной стенки, выглядит интригующе. В настоящей работе мы исследовали влияние белков FtsZ трех видов микоплазм — *Mycoplasma hominis*, *M. gallisepticum* и *Acholeplasma laidlawii* — на цитокинез *E. coli*. Белки FtsZ оказались способны взаимодействовать с аппаратом деления кишечной палочки, в том числе ингибировать процесс цитокинеза, демонстрируя при этом различные паттерны распределения в клетке. Полученные нами данные поддерживают гипотезу о существенной роли FtsZ в делении клеток микоплазм.

Ключевые слова: деление бактериальной клетки, FtsZ, микоплазмы, *Escherichia coli*, локализационная микроскопия.

Аппарат деления бактерий, иногда именуемый дивисомой, согласно последним данным (Mercier et al., 2014; Coltharp, Xiao, 2016; Hajduk et al., 2016), представляет собой сложное устройство, состоящее из множества компонентов, работа которых скоординирована в пространстве и времени. Ключевым белком бактериального деления является тубулин-подобный белок FtsZ, способный полимеризоваться и формировать на ранней стадии цитокинеза кольцеобразную структуру (Z-кольцо) посередине клетки на месте образования будущей септы между дочерними клетками (Haessler, Margolin, 2016). Правильное позиционирование Z-кольца осуществляется при помощи ряда механизмов. Из них наиболее изученными в клетках модельного микроорганизма *Escherichia coli* являются Min-система (Lee et al., 2016) и нуклеоидная окклюзия (Schumacher, Zeng, 2016). После сборки и правильного позиционирования Z-кольца в состав дивисомы привлекаются десятки других белков, участвующих в процессе формирования септы (Coltharp, Xiao, 2016). Септообразование тесным образом координируется с процессами репликации и сегрегации нуклеоидов, в частности благодаря взаимодействию некоторых компонентов, входящих в состав механизмов, управляющих этими процессами, с белком FtsZ (Hajduk et al., 2016).

Ранее предполагали, что одной из важных ролей белка FtsZ в делении бактериальной клетки может являться генерирование сократительной силы, передающейся на мембрану через якорные белки (Lu et al., 2000; Osawa et al., 2008). Однако в результате компьютерного моделирования было продемонстрировано, что генерируемой

филаментами FtsZ силы воздействия на внутреннюю мембрану клетки недостаточно для противодействия внутреннему тургору и натяжению клеточной стенки (Lan et al., 2007; Allard, Cytrynbaum, 2009; Paez et al., 2009). Более того, анализ накапливающихся экспериментальных данных позволяет некоторым авторам скептически относиться к гипотезе о сократительной силе, развиваемой FtsZ (Daley et al., 2016). В настоящее время исследователи приходят к консенсусу в том, что основная роль FtsZ заключается в привлечении в будущий сайт деления других белков (отвечающих главным образом за синтез пептидогликана); таким образом, FtsZ, вероятно, вовлечен в управление процессом цитокинеза (Coltharp, Xiao, 2016).

В связи с вышесказанным весьма интересно, какую роль играют гомологи FtsZ в клетках микоплазм (класс Mollicutes) — бактерий с ограниченным метаболическим потенциалом и лишенных клеточной стенки. Подробно о микоплазмах см. коллективные монографии: Browning, Citti, 2014; Борхсениус и др., 2016. С одной стороны, как следует из результатов исследований *in vitro* (Paez et al., 2009; Daley et al., 2016), сила, генерируемая филаментами FtsZ, может быть достаточной для воздействия на мембрану — единственную оболочку микоплазм — в области формирующейся перетяжки между дочерними клетками. С другой стороны, у микоплазм не найдено гомологов большинства компонентов бактериальной дивисомы и систем позиционирования Z-кольца, а значит, неясно, каким образом процесс деления микоплазменной клетки скоординирован в пространстве и времени. Более того, у

некоторых микоплазм, геномы которых полностью секвенированы к настоящему времени, не обнаружено и генов, кодирующих как белки FtsZ, так и FtsZ-подобные белки (Glass et al., 2000; Jaffe et al., 2004). В одной из работ (Lluch-Senar et al., 2010) авторы продемонстрировали, что в отсутствие белка FtsZ клетки микоплазмы *Mycoplasma genitalium* сохраняют способность делиться, используя силу, генерируемую аппаратом, обеспечивающим подвижность микроорганизма. Однако такой механизм не может быть универсальным для всех микоплазм, так как остается неясным, каким образом, например, делятся клетки микоплазмы *Ureaplasma parvum*, не имеющей гена *ftsZ* и не обладающей подвижностью (Glass et al., 2000). Возможно, деление микоплазм обеспечивается иными, до настоящего времени неизученными механизмами.

В настоящей работе мы исследовали влияние рекомбинантных белков FtsZ нескольких видов микоплазм — патогенов человека (*Mycoplasma hominis*), животных (*M. gallisepticum*) и растений (*Acholeplasma laidlawii*) — на деление клеток *E. coli*. Для этого на основе экспрессирующего вектора pBAD/HisB были сконструированы плазмиды, содержащие полноразмерные гены *ftsZ* микоплазм, которыми трансформировали клетки штамма *E. coli* Rosetta DE3. Нам удалось показать, что все три микоплазменных белка FtsZ способны влиять на деление клеток *E. coli*, однако локализация этих белков различается. Полученные данные указывают на возможную функциональную активность белков FtsZ в клетках соответствующих микоплазм, а также показывают, что белки FtsZ различных микоплазм по-разному взаимодействуют с компонентами дивисомы *E. coli*.

## Материал и методика

**Штаммы и плазмиды.** В работе использовали следующие штаммы микроорганизмов: *M. hominis* H34, *A. laidlawii* PG8, *M. gallisepticum* A5969 (Коллекция клеточных культур Института цитологии РАН), а также *E. coli* DH5 $\alpha$  и *E. coli* Rosetta DE3 (Invitrogen, США), содержащий плазмиду pRare (необходимую для увеличения экспрессии микоплазменных белков и кодирующую «редкие» тРНК). Для клонирования генов, кодирующих белки FtsZ микоплазм, использовали экспрессирующий вектор pBAD/HisB (Invitrogen, США), содержащий промотор araBAD, который позволяет регулировать уровень экспрессии целевых генов в широких пределах.

**Клонирование генов *ftsZ* микоплазм.** Гены *ftsZ*, кодирующие белки деления FtsZ *M. hominis*, *M. gallisepticum* и *A. laidlawii*, амплифицировали с тотальной ДНК микоплазм, полученной с помощью фенол-хлороформного метода экстракции. Для амплификации использовали следующие праймеры (сайты рестрикции выделены прописными буквами): 5'-tacggtAAGCTTtattttctatgtagccaagaagga-3' и 5'-ttagctAGATCTatggttttgatgaacgatgattaat-3' (FtsZ *A. laidlawii*, сайты рестрикции BglII и HindIII), 5'-attaAGATCTatggsaaaagaattaataatttaaccgg-3' и 5'-gctaAAGCTTtagtgttttaatatctgcaagttcat-3' (FtsZ *M. hominis*, сайты рестрикции BglII и HindIII), 5'-atttaaGAATTtattcgtcttgatccagtagatttaaat-3' и 5'-tatccaCTGCAGctatgttgatcaagaagataaaaacctg-3' (FtsZ *M. gallisepticum*, сайты рестрикции EcoRI и PstI). Амплифицированные фрагменты ДНК микоплазм помещали в сайт множественного клонирования вектора pBAD/HisB таким образом, чтобы при

экспрессии целевых белков на N-конце каждого из них находился гистидиновый таг, позволяющий аффинно очищать продуцируемые белки, а также проводить их иммунофлуоресцентное окрашивание при помощи антител, специфичных к гистидиновому тагу. После стандартных процедур рестрикции и лигирования полученной лигандной смесью трансформировали клетки штамма *E. coli* DH5 $\alpha$  и отбирали клоны, резистентные к ампициллину в концентрации 100 мкг/мл. Далее выделяли плазмиды и подтверждали корректность вставки целевых генов секвенированием. Схема плазмиды, содержащей полноразмерный ген *ftsZ* микоплазмы под арабинозным промотором, представлена на рис. 1 (на примере pBAD/HisB с *ftsZ* *A. laidlawii*). Затем плазмидами, несущими полноразмерные гены *ftsZ* микоплазм, трансформировали клетки штамма *E. coli* Rosetta DE3, содержащего плазмиду pRare, и производили отбор клонов, резистентных к ампициллину (100 мкг/мл) и хлорамфениколу (25 мкг/мл).

**Продукция белков FtsZ микоплазм в клетках *E. coli*.** Клетки *E. coli* Rosetta DE3, содержащие плазмиды с генами, кодирующими FtsZ *M. hominis*, *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* выращивали в течение ночи при 37 °C в жидкой среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл хлорамфеникола без индуктора (L-арабинозы), затем переносили в свежую среду с указанными выше антибиотиками и культивировали при 37 °C до оптической плотности OD<sub>600</sub> ~0.1, после чего добавляли L-арабинозу до конечной концентрации 10 мМ и продолжали культивирование еще около 1 ч до величины OD<sub>600</sub> ~0.5—0.6. Экспрессию белков FtsZ микоплазм клетками штамма *E. coli* Rosetta DE3 подтверждали при помощи иммуноблоттинга. Для этого отбирали по 20 мкл суспензии бактерий из каждого образца, добавляли в стандартный буфер для нанесения образцов белков на ДДС-ПААГ и проводили электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях. На стандартный гель толщиной 1 мм наносили по 10 мкл материала на каждую дорожку. После электрофоретического разделения белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (GE Healthcare, Великобритания) и окрашивали коммерческими моноклональными мышиными антителами к полигистидину (Sigma, США; H1029; разведение 1 : 3000) и кроличьими антителами к конъюгированным с пероксидазой хрена (Sigma, США; A9044; разведение 1 : 20 000) согласно протоколам фирмы-производителя. Визуализацию осуществляли при помощи ChemiDoc (Biorad, США). Отсутствие перекрестного связывания антител к FtsZ *E. coli* с белками FtsZ микоплазм подтвердили аналогичным образом (с помощью иммуноблоттинга), используя в качестве первых антител кроличьи поликлональные антитела к синтетическому пептиду, разработанному на основе известных последовательностей бактериальных белков FtsZ (Agrisera, Швеция; AS10715; разведение 1 : 3000), а в качестве вторых антител — козы антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США; A0545; разведение 1 : 20 000).

**Подготовка клеток для микроскопии.** Клетки *E. coli* Rosetta DE3, содержащие плазмиды с генами, кодирующими FtsZ *M. hominis*, *M. gallisepticum* и *A. laidlawii*, выращенные с добавлением или без добавления индуктора (см. выше), готовили к иммунофлуоресцентному окрашиванию аналогично протоколу, описанному в предыдущей работе (Vedyaykin et al., 2016b) с некоторыми модификациями. Антитела кролика к собственному FtsZ *E. coli* (Agrisera, Швеция; AS10715) исполь-

звали в разведении 1 : 200, антитела мыши к гистидиновому тагу, присутствующему на N-конце продуцируемых белков FtsZ микоплазм (Sigma, США; H1029), — в разведении 1 : 100. В качестве вторичных антител использовали поликлональные антитела козы к антителам кролика либо мыши, конъюгированные с красителями Alexa 555 и Alexa 647 (Invitrogen, США; A-21246, A-21237; Bioss, США; bs-0296G-A555, bs-0295G-A555). Использование пары красителей позволило одновременно окрашивать 2 антигена (собственный FtsZ *E. coli* и FtsZ микоплазм). При этом антитела, меченные красителем Alexa 555, использовали только для традиционной (дифракционно-ограниченной) флуоресцентной визуализации, а антитела, меченные Alexa 647, — как для дифракционно-ограниченной, так и для локализационной микроскопии. Для окрашивания ДНК клетки помещали в раствор красителя YOYO-1 (в концентрации 100 нМ) на 10 мин.

Микроскопия и обработка изображений. Съемку осуществляли с использованием установки, основанной на неинвертированном микроскопе Axiolmager.Z1 (Carl Zeiss, Германия) (Vedyukin et al., 2015). Изображения регистрировали на охлаждаемую ПЗС-камеру с электронным умножением (Andor iXon 897, Великобритания). Для регистрации флуоресценции использовали следующие наборы флуоресцентных фильтров: Filter Set 20 (Carl Zeiss, Германия) для визуализации красителя Alexa 555; LF635/LP-B-000 (Semrock, США) — для Alexa 647; Filter Set 10 (Carl Zeiss, Германия) — для YOYO-1. На время съемки окрашенные клетки помещали в специальный буфер (Olivier et al., 2013). Для записи изображений и управления микроскопом использовали свободно распространяемое программное обеспечение MicroManager (Edelstein et al., 2010). Обработку изображений осуществляли с использованием программного пакета ImageJ (Schneider et al., 2012). Изображения в режиме локализационной микроскопии реконструировали при помощи плагина ThunderSTORM для ImageJ (Ovesny et al., 2014).

## Результаты и обсуждение

Создание штаммов *E. coli*, продуцирующих рекомбинантные белки FtsZ микоплазм. Мы клонировали гены *ftsZ* *A. laidlawii*, *M. hominis* и *M. gallisepticum* в вектор pBAD/HisB (рис. 1), позволяющий регулировать уровень экспрессии целевых генов в широких пределах. Для получения методом ПЦР фрагментов ДНК, содержащих полноразмерные последовательности генов *ftsZ*, из клеток микоплазм выделяли геномную ДНК. Вставку генов *ftsZ* в вектор осуществляли таким образом, чтобы последовательность из шести гистидинов находилась со стороны N-конца полипептидной цепи рекомбинантных FtsZ. Плазмидами, несущими полноразмерные гены *ftsZ* микоплазм, трансформировали клетки *E. coli* Rosetta DE3. Успешную продукцию микоплазменных белков FtsZ в клетках *E. coli* подтверждали с помощью иммуноблоттинга с поликлональными антителами к гистидиновому тагу (рис. 2, а).

Известно, что в клетках *E. coli* высокий уровень продукции как собственного белка деления FtsZ (Lutkenhaus, Addinall, 1997), так и белков FtsZ других бактерий (Beall et al., 1988; Wang, Lutkenhaus, 1996; Kobayashi et al., 1997) может вызывать нарушение процесса цитокинеза и приводить к их гибели. Ранее проблема получения FtsZ

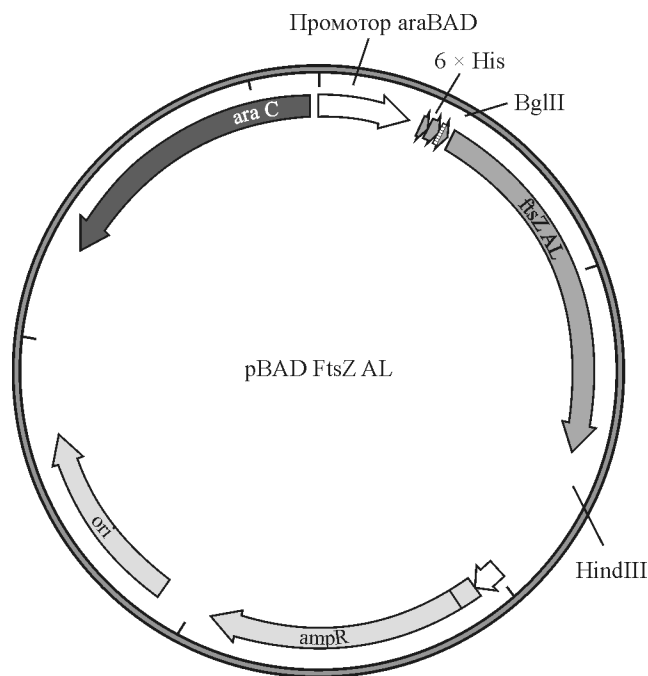


Рис. 1. Схема плазмиды, содержащей ген *ftsZ* микоплазмы под контролем индуцируемого промотора (*araBAD*) на примере вектора pBAD/HisB, в сайт множественного клонирования которого встроены полноразмерный ген *ftsZ* *Acholeplasma laidlawii* (*ftsZ* AL).

На схеме обозначены: *araC* — регуляторный ген арабинозного промотора, 6×His — последовательность из 6 гистидинов (гистидиновый таг), *ori* — точка начала репликации вектора, *ampR* — ген устойчивости к ампициллину, BglII и HindIII — сайты рестрикции, использованные при клонировании гена, кодирующего FtsZ *A. laidlawii*. Схемы векторов, содержащих гены *ftsZ* *Mycoplasma hominis* и *M. gallisepticum*, аналогичны представленной на данном рисунке (за исключением того, что для вставки гена *ftsZ* *M. gallisepticum* в отличие от *ftsZ* *M. hominis* и *A. laidlawii* использовали сайты рестрикции EcoRI и PstI).

*A. laidlawii* в клетках *E. coli* была решена за счет использования низкокопийного вектора pBeloBAC11 (Kukekova et al., 1999). Однако FtsZ *A. laidlawii* при этом нарабатывался в очень небольших количествах, явно недостаточных для его очистки и изучения свойств, и не влиял на морфологию клеток *E. coli*. Таким образом, до настоящего времени было сложно получить большие количества FtsZ *A. laidlawii* и других микоплазм в клетках *E. coli*. Использование плазмид на основе вектора pBAD/HisB позволило нам значительно снизить фоновый уровень экспрессии белков в отсутствие индуктора (для многих экспрессируемых векторов характерен достаточно высокий фоновый уровень экспрессии целевого гена, находящегося под контролем промотора, в результате «подтекания» промотора) и избежать возможного нарушения процесса деления. Таким образом, благодаря pBAD/HisB мы получили возможность экспрессировать полноразмерные белки FtsZ микоплазм в клетках штамма-продуцента *E. coli* Rosetta DE3. В будущем мы планируем получить большие количества белков FtsZ микоплазм для исследования их биохимических свойств.

Влияние экспрессии рекомбинантных белков FtsZ микоплазм на морфологию клеток *E. coli*. При микроскопии клеток *E. coli*, продуцирующих FtsZ микоплазм, было обнаружено изменение их морфологии: во всех трех вариантах (FtsZ *M. hominis*, *M. gallisepticum* и *A. laidlawii*) клетки *E. coli* заметно уд-

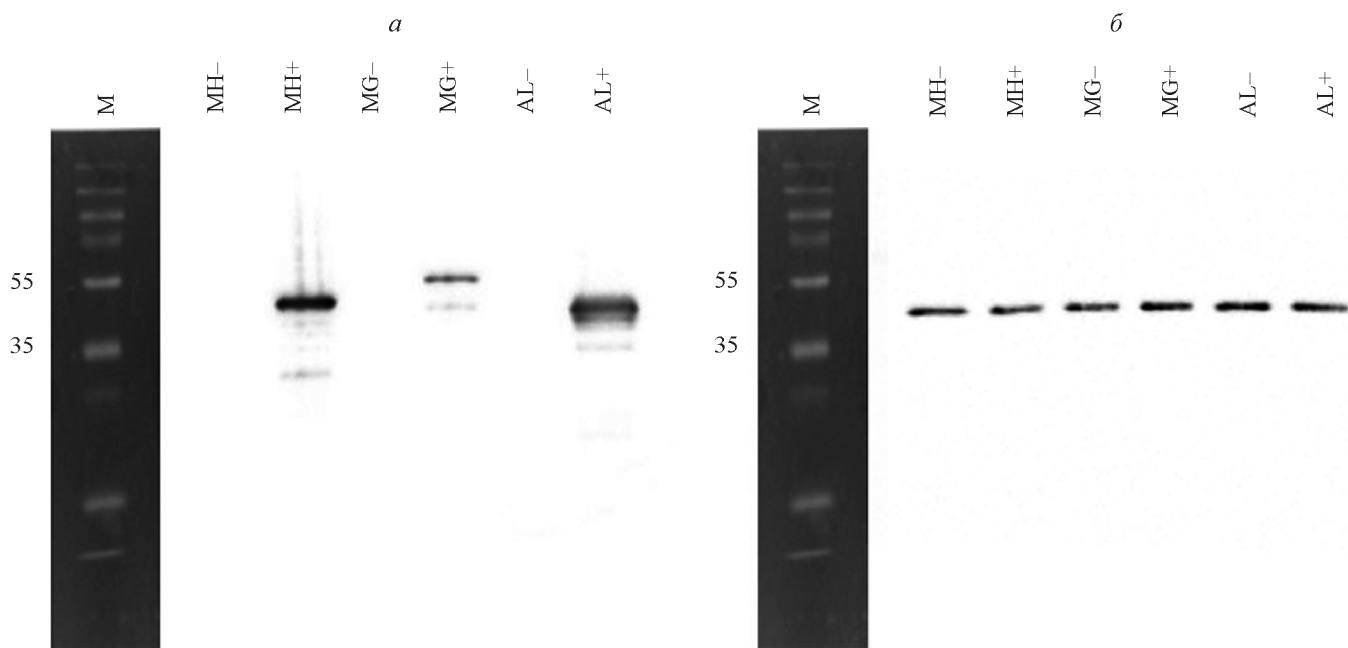


Рис. 2. Подтверждение продукции рекомбинантных белков FtsZ *Mycoplasma hominis*, *M. gallisepticum* и *Acholeplasma laidlawii* клетками *Escherichia coli* Rosetta DE3 (а, окраска антителами мыши к гистидиновому тагу), а также демонстрация отсутствия перекрестного взаимодействия антител кролика к FtsZ *E. coli* с белками FtsZ микоплазм (б).

Экстракты клеток *E. coli*, продуцирующих (+) либо не продуцирующих (-) белки FtsZ микоплазм, обозначены как МН (*M. hominis*), МГ (*M. gallisepticum*) и АЛ (*A. laidlawii*). Молекулярные массы рекомбинантных белков FtsZ, полосы которых визуализированы при помощи антител к гистидиновому тагу (а, дорожки МН+, МГ+ и АЛ+), близки к теоретически рассчитанным массам полноразмерных продуктов генов *ftsZ* соответствующих микоплазм: FtsZ *A. laidlawii* — 42.29 кДа, FtsZ *M. gallisepticum* — 51.17 кДа, FtsZ *M. hominis* — 41.4 кДа. При окраске экстрактов клеток *E. coli*, как содержащих (+), так и не содержащих (-) FtsZ микоплазм, антителами кролика к FtsZ *E. coli* (б) наблюдается отсутствие перекрестного взаимодействия антител с микоплазменными белками: визуализируются только полосы, соответствующие собственному FtsZ кишечной палочки. М — маркеры молекулярных масс, кДа.

линялись (рис. 3, 4), при этом средняя длина клеток в культуре оказалась близкой при продукции FtsZ *M. hominis* и *A. laidlawii*, но значительно отличалась в случае FtsZ *M. gallisepticum* (см. таблицу; рис. 4). Как видно из полученных результатов, экспрессия FtsZ микоплазм в дополнение к собственному белку FtsZ ингибирует или даже блокирует деление клеток *E. coli*. Этот эффект частично напоминает таковой как при сверхэкспрессии собственного белка FtsZ *E. coli* в клетках кишечной палочки (Ma et al., 1996) (однако в популяции отсутствуют мини-клетки), так и при экспрессии чужеродных FtsZ в *E. coli* (Beall et al., 1988; Wang, Lutkenhaus, 1996; Momynaliev et al., 2002). Это может указывать на функциональное сходство белков FtsZ *E. coli* и FtsZ различных видов микоплазм и их потенциальное взаимодействие между собой и (или) с другими компонентами аппарата деления микоплазм.

Локализация белков FtsZ различных видов микоплазм в клетках *E. coli*. Чтобы понять причину нарушения процесса деления клеток *E. coli* при продукции ими микоплазменных белков FtsZ, нами были получены субдифракционные изображения структур, формируемых как FtsZ *M. hominis*, *M. gallisepticum* и *A. laidlawii*, так и собственным FtsZ *E. coli* в клетках кишечной палочки, с помощью метода локализационной микроскопии (SMLM — single-molecule localization microscopy, иногда называемый dSTORM — direct stochastic optical reconstruction microscopy), хорошо зарекомендовавшего себя в наших предыдущих исследованиях (Ведяйкин и др., 2016; Vedyaykin et al., 2015; Vedyaykin et al., 2016a, 2016b). Отсутствие перекрестного взаимодействия антител к белку FtsZ *E. coli* с рекомбинантными

FtsZ микоплазм подтвердили методом иммуноблоттинга (рис. 2, б).

Анализ полученных изображений показал, что FtsZ *M. gallisepticum* демонстрирует колокализацию с собственным FtsZ *E. coli*, однако в целом паттерны их распределения существенным образом отличаются друг от друга. Так, во многих клетках наблюдаются скопления FtsZ *M. gallisepticum* (рис. 4, 5), которые могут указывать как на способность данного белка полимеризоваться в клетках кишечной палочки, так и на образование в клетках *E. coli* телец включения при продукции рекомбинантного белка. В некоторых клетках FtsZ *M. gallisepticum* формирует структуры, напоминающие Z-кольцо, в дополнение к аналогичной структуре, формируемой FtsZ *E. coli* (рис. 4). Следует отметить, что характер локализации FtsZ *E. coli* существенно не изменялся при экспрессии FtsZ *M. gallisepticum*, несмотря на значительное удлинение клеток в популяции в среднем.

FtsZ *A. laidlawii* только в некоторой степени колокализует с собственным FtsZ *E. coli*, демонстрируя при этом в значительной части клеток ярко выраженную полярную локализацию (особенно в клетках на ранней стадии индукции, когда они еще относительно слабо удлинены), накапливаясь, как показывают субдифракционные изображения (рис. 5), вблизи мембраны. Это может указывать на вероятное взаимодействие FtsZ *A. laidlawii* с Min-системой *E. coli*. Предварительные данные, полученные нами при экспрессии FtsZ *A. laidlawii* в нокаутном штамме *E. coli* JW1165-1, у которого отсутствует ген *minC*, подтверждают эту гипотезу (данные не представлены). Интересно отметить, что при более длительной экс-

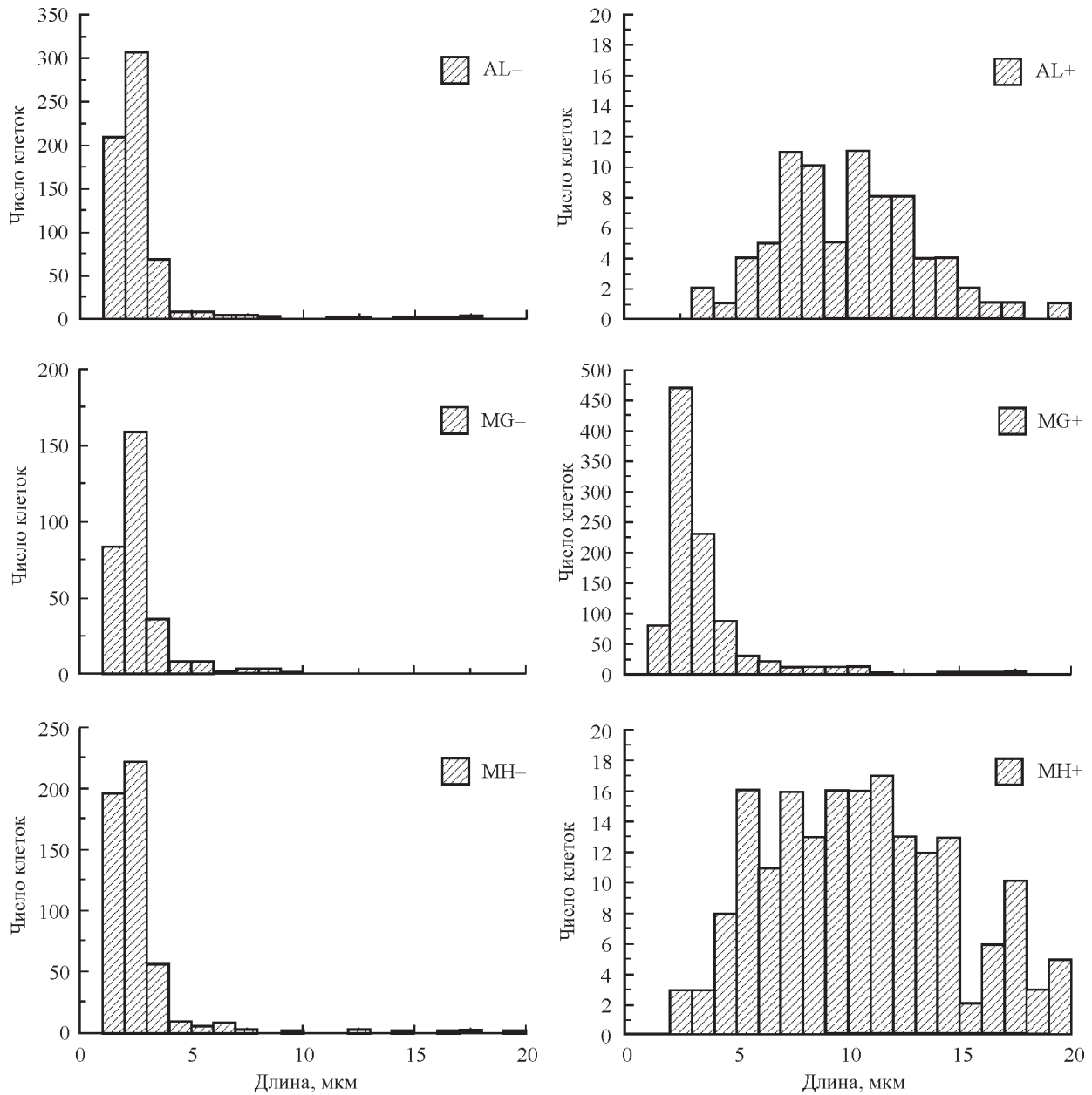


Рис. 3. Влияние экспрессии рекомбинантных белков FtsZ *Acholeplasma laidlawii* (AL), *Mycoplasma gallisepticum* (MG) и *M. hominis* (MH) на распределение клеток *Escherichia coli* Rosetta DE3 по длине в популяции.

Сравнивали клетки *E. coli*, выращенные в отсутствие индуктора (AL-, MG-, MH-) и в присутствии 10 мМ L-арабинозы (AL+, MG+, MH+). Число проанализированных клеток *E. coli* для каждого варианта указано в таблице.

**Влияние экспрессии белков FtsZ *A. laidlawii* (AL), *M. gallisepticum* (MG) и *M. hominis* (MH) на среднюю длину клеток *E. coli* в популяции**

Параметр	AL-	AL+	MG-	MG+	MH-	MH+
L, мкм	2.65	11.41	2.72	4.15	2.68	12.22
SD, мкм	2.12	6.20	2.45	4.54	2.43	8.23
N	622	180	301	1009	503	201

Примечание. L — средняя длина клеток, SD — среднее квадратическое отклонение, N — число проанализированных клеток. Знаки «-» и «+» обозначают отсутствие (без индуктора) либо наличие (индуктор добавлен) продукции клетками *E. coli* рекомбинантных белков FtsZ соответствующих микоплазм.

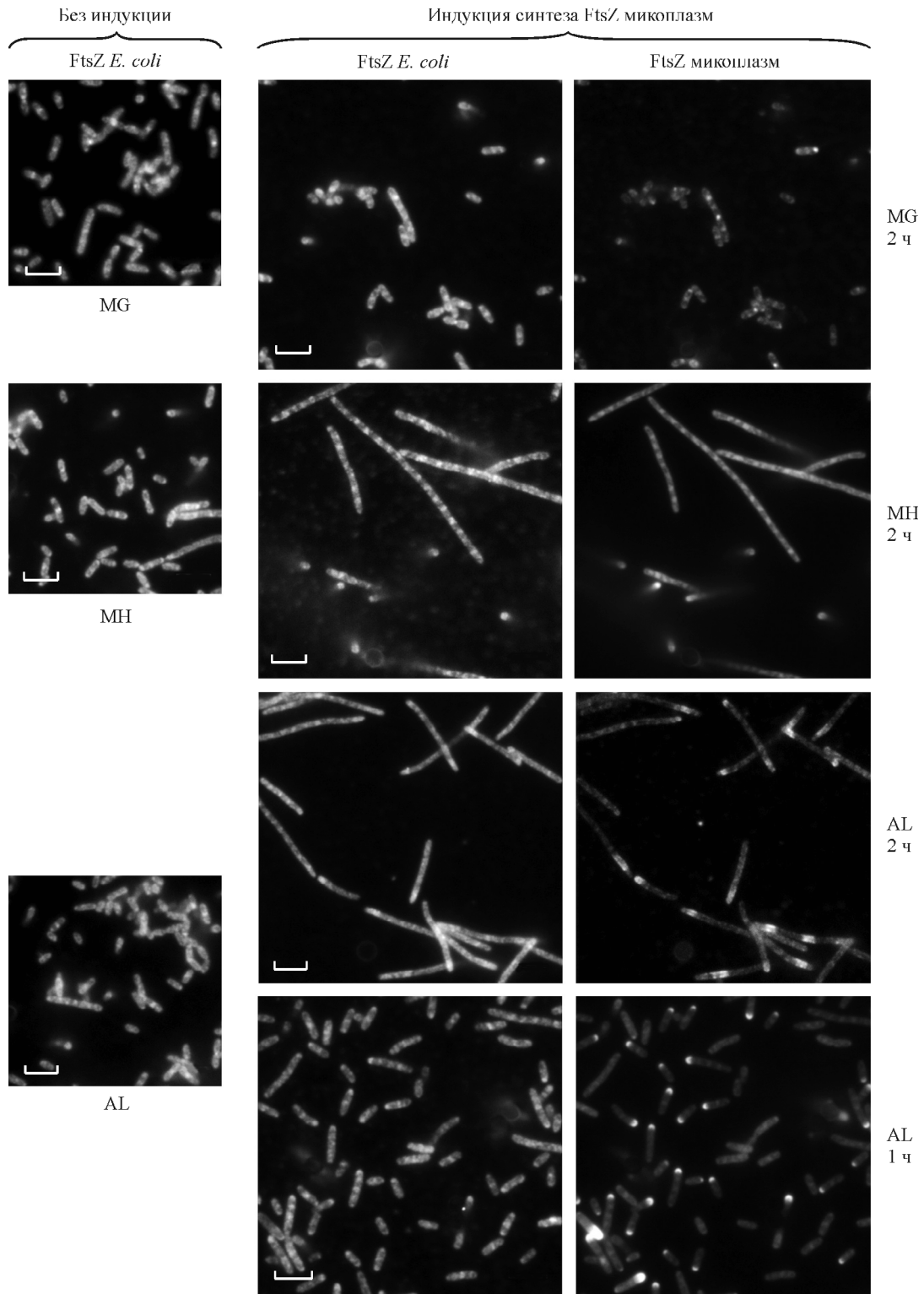


Рис. 4. Влияние экспрессии белков FtsZ *Mycoplasma gallisepticum*, *Acholeplasma laidlawii* и *M. hominis* на морфологию *Escherichia coli* и распределение собственного FtsZ в клетках кишечной палочки.

MG — клетки *E. coli*, содержащие плазмиду с полноразмерным геном *ftsZ* *M. gallisepticum* под индуцибельным промотором; MH — *ftsZ* *M. hominis*; AL — *ftsZ* *A. laidlawii*. Слева (без индукции): флуоресцентные изображения, отражающие морфологию клеток, а также распределение собственного FtsZ в клетках *E. coli*, способных продуцировать микоплазменные белки FtsZ, в отсутствие индуктора. Справа (индукция синтеза FtsZ микоплазм): флуоресцентные изображения собственного FtsZ *E. coli* и рекомбинантных белков FtsZ микоплазм в клетках кишечной палочки, полученные через 1 или 2 ч после добавления в среду культивирования 10 мМ L-арабинозы в качестве индуктора. На рисунке видно, что при продукции FtsZ *M. gallisepticum* морфология *E. coli* изменяется в меньшей степени, чем при продукции FtsZ *M. hominis* или *A. laidlawii*. Кроме того, на более раннем этапе (1 ч) в большинстве клеток *E. coli* рекомбинантный FtsZ *A. laidlawii* демонстрирует ярко выраженную полярную локализацию, затем (2 ч) распределение молекул этого белка в клетках кишечной палочки существенно изменяется. При этом на раннем этапе индукции FtsZ *A. laidlawii* локализация собственного белка FtsZ *E. coli* напоминает локализацию для нормально делящейся клетки (белок визуализируется посередине клетки), впоследствии же часть собственного FtsZ кишечной палочки колокализуется с FtsZ *A. laidlawii*. Масштабные отрезки — 5 мкм.

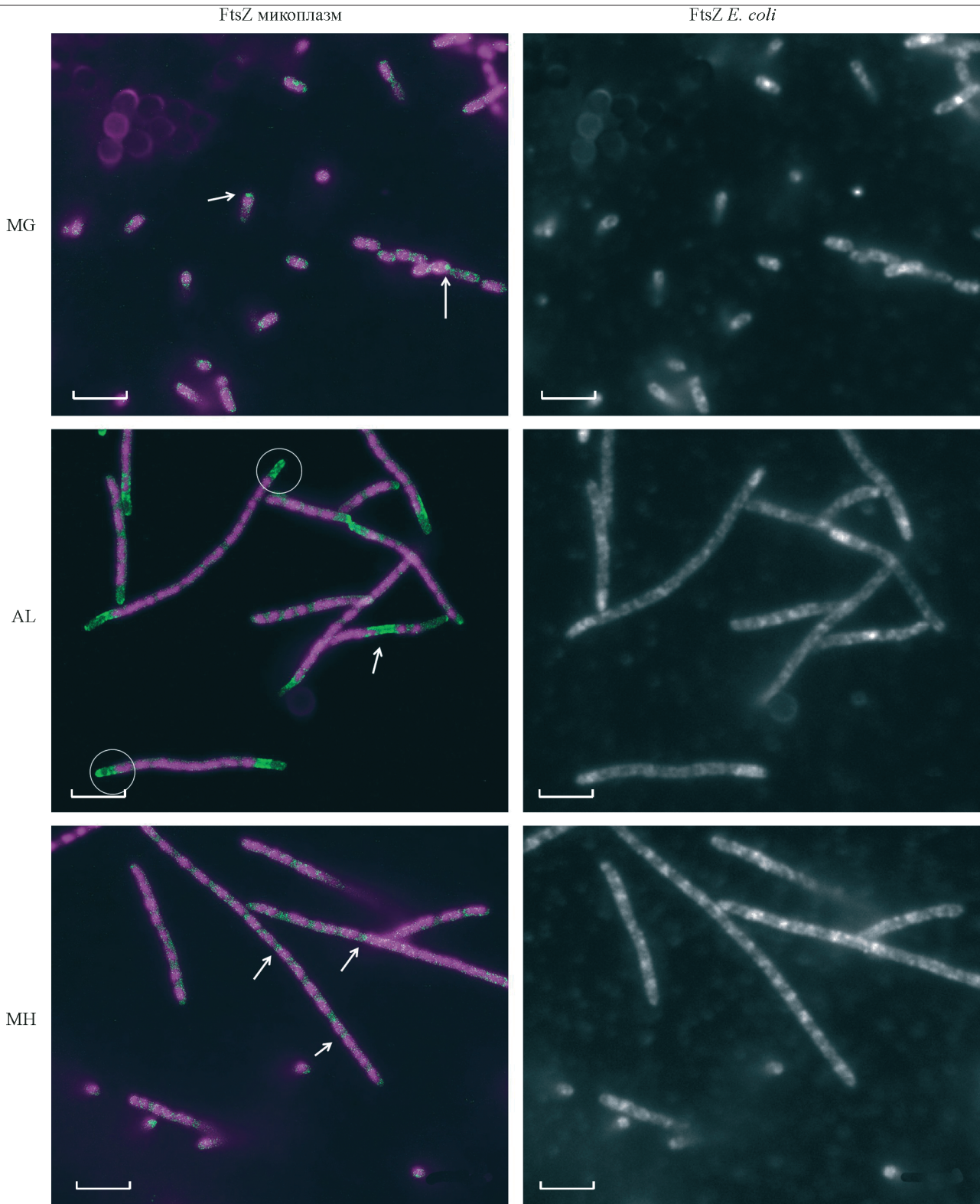


Рис. 5. Характерные примеры локализации рекомбинантных белков FtsZ *Mycoplasma gallisepticum*, *Acholeplasma laidlawii* и *M. hominis* и собственного белка FtsZ в клетках *Escherichia coli*, продуцирующих белки FtsZ соответствующих микоплазм.

Слева — изображения FtsZ микоплазм, полученные в режиме локализационной микроскопии, справа — дифракционно-ограниченные флуоресцентные изображения собственного FtsZ *E. coli* в тех же клетках. Для большей информативности субдифракционные изображения FtsZ микоплазм (зеленый цвет) совмещены с дифракционно-ограниченными флуоресцентными изображениями ДНК (фиолетовый цвет). Ряд MG — клетки *E. coli*, продуцирующие FtsZ *M. gallisepticum*; стрелками обозначены скопления микоплазменного FtsZ, напоминающие локализацию рекомбинантных белков в тельцах включения. Ряд AL — клетки *E. coli*, продуцирующие FtsZ *A. laidlawii*; обведены участки клеток, где FtsZ *A. laidlawii* демонстрирует выраженную полярную локализацию, а стрелкой обозначена область клетки, в которой микоплазменный FtsZ локализуется инверсно по отношению к ДНК в необычно широком промежутке между нуклеоидами. Вблизи полюсов клеток *E. coli* области, в которых локализуется FtsZ *A. laidlawii*, также свободны от ДНК. Ряд MH — клетки *E. coli*, продуцирующие FtsZ *M. hominis*; стрелками обозначены структуры, напоминающие Z-кольца. При сравнении с дифракционно-ограниченными флуоресцентными изображениями FtsZ *E. coli* в тех же клетках видно, что FtsZ *M. hominis* колокализуется с собственным FtsZ, однако при этом белок микоплазмы не имеет выраженной мембранной локализации. Масштабные отрезки — 5 мкм.

прессии FtsZ *A. laidlawii* (2 ч вместо 1) уменьшается число клеток с полярной локализацией, при этом данный белок локализуется (и притом более выражено, чем собственный FtsZ *E. coli*) в необычно широких промежутках между нуклеоидами (рис. 4, 5). Последнее наблюдение позволяет выдвинуть две конкурирующие гипотезы: либо FtsZ *A. laidlawii* локализуется в этих промежутках вследствие взаимодействия с системой нуклеоидной окклюзии (или иных факторов, связанных с пространственным положением нуклеоидов), либо данный белок каким-то образом сам способствует увеличению расстояния между нуклеоидами, в результате чего данные промежутки становятся необычно широкими. Последнее наблюдение указывает на то, что FtsZ *A. laidlawii* может быть способен взаимодействовать с какими-либо компонентами аппарата деления в клетках соответствующей микоплазмы (например, с механизмом, подобным нуклеоидной окклюзии *E. coli*, при наличии такового у микоплазм).

FtsZ *M. hominis* демонстрирует колокализацию с собственным FtsZ *E. coli* (рис. 4) в более значительной степени, нежели FtsZ *A. laidlawii* или FtsZ *M. gallisepticum*. При этом некоторые структуры, формируемые данным белком, напоминают Z-кольца (рис. 4). Следует отметить, что при сравнении субдифракционных изображений собственного FtsZ *E. coli* и FtsZ *M. hominis* в клетках кишечной палочки видно, что FtsZ *M. hominis* в меньшей степени локализуется вблизи мембраны (рис. 5), возможно вследствие более слабого взаимодействия между FtsZ *M. hominis* и якорными белками дивисомы (FtsA, ZipA), если таковое вообще имеет место быть. Колокализация FtsZ *M. hominis* с собственным FtsZ *E. coli* может быть связана как со способностью этих двух белков напрямую взаимодействовать (или даже образовывать гетерогенные полимеры) друг с другом, так и со взаимодействием FtsZ *M. hominis* с другими частями дивисомы *E. coli*, что может указывать на наличие компонентов, гомологичных компонентам дивисомы кишечной палочки в аппарате деления микоплазм.

## Заключение

Основываясь на полученных данных, можно заключить, что белки FtsZ микоплазм *M. gallisepticum*, *A. laidlawii* и *M. hominis* при продукции в клетках *E. coli* влияют на процесс их деления. Результаты, представленные в настоящей работе, существенно расширяют недавно опубликованные нами предварительные данные по взаимодействию микоплазменных белков FtsZ *M. gallisepticum* и FtsZ *A. laidlawii* с аппаратом деления *E. coli* (Vedyaykin et al., 2016a). При этом нельзя исключить вероятность как прямого взаимодействия FtsZ *M. hominis*, *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* с собственным FtsZ *E. coli*, так и взаимодействия рекомбинантных белков FtsZ микоплазм с какими-либо другими компонентами аппарата деления или механизмов позиционирования дивисомы кишечной палочки.

Тем не менее вопрос о функциональной активности и роли белков FtsZ в клетках самих микоплазм в настоящее время остается открытым. Недавно было показано, что FtsZ не является необходимым для выживания микоплазм *M. mycoides* и *M. genitalium* (Lluch-Senar et al., 2010; Hutchison et al., 2016), хотя рост клеток штаммов, нокаутных по *ftsZ*, при этом оказался подавлен. Геномы нескольких видов микоплазм изначально не содержат генов, кодирующих белки FtsZ или даже FtsZ-подобные

белки (Glass et al., 2000; Jaffe et al., 2004). В то же время в случае FtsZ *M. pulmonis* было показано, что белок способен частично замещать собственный FtsZ *E. coli* в клетках кишечной палочки (Osawa, Erickson, 2006), что может указывать на его активную роль и в клетках микоплазмы. Особенно интригующим данный факт представляется в свете того, что сейчас функционирование FtsZ считают сопряженным с синтезом клеточной стенки (Haebusser, Margolin, 2016), при том что в микоплазмах она отсутствует. Нам представляется, что исследование локализации FtsZ в клетках представителей класса Mollicutes с использованием методов иммуноэлектронной и локализационной микроскопии в сочетании с иммунофлуоресцентным окрашиванием, а также сравнительный анализ паттернов их распределения могут пролить свет на роль этих белков в клетках микоплазм.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-07472; конструирование плазмид, продукция белков FtsZ микоплазм клетками *E. coli*, влияние микоплазменных FtsZ на морфологию бактериальных клеток), а также Российского научного фонда (проект 14-34-00023; получение субдифракционных изображений FtsZ микоплазм в клетках *E. coli*). Работа выполнена с использованием УСУ «Лазерный пинцет» на базе ФГАОУ ВО «С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

## Список литературы

- Борхсениус С. Н., Чернова О. А., Чернов В. М., Вишняков И. Е. 2016. Микоплазмы в биологии и медицине начала 21-го века. СПб.: Наука. 333 с. (Borchsenius S. N., Chernova O. A., Chernov V. M., Vishnyakov I. E. 2016. Mycoplasmas in biology and medicine of the early 21st century. St. Petersburg: Nauka. 333 p.)
- Ведяйкин А. Д., Сабанцев А. В., Вишняков И. Е., Морозова Н. Е., Ходорковский М. А. 2016. Восстановление процесса деления в бактериальных клетках после индукции белка SulA, отвечающего за прекращение цитокинеза при SOS-ответе. Цитология. 58(12): 930—935. (Vedyaykin A. D., Sabantsev A. V., Vishnyakov I. E., Morozova N. E., Khodorkovskii M. A. 2017. Recovery of division process in bacterial cells after induction of SulA protein which is responsible for cytokinesis arrest during SOS-response. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 11 (2): 89—94.)
- Allard J. F., Cytrynbaum E. N. 2009. Force generation by a dynamic Z-ring in *Escherichia coli* cell division. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 106: 145—150.
- Beall B., Lowe M., Lutkenhaus J. 1988. Cloning and characterization of *Bacillus subtilis* homologs of *Escherichia coli* cell division genes *ftsZ* and *ftsA*. J. Bacteriol. 170: 4855—4864.
- Browning G. F., Citti C. (eds.). 2014. Mollicutes: molecular biology and pathogenesis. Norfolk, UK: Horizon Scientific Press. 333 p.
- Coltharp C., Xiao J. 2016. Beyond force generation: why is a dynamic ring of FtsZ polymers essential for bacterial cytokinesis? Bioessays. Doi: 10.1002/bies.201600179.
- Daley D. O., Skoglund U., Söderström B. 2016. FtsZ does not initiate membrane constriction at the onset of division. Sci Rep. 6: 33138.
- Edelstein A., Amodaj N., Hoover K., Vale R., Stuurman N. 2010. Computer control of microscopes using µManager. Curr. Protoc. Mol. Biol. Chapter 14: Unit14.20. Doi: 10.1002/0471142727.mb1420s92.
- Glass J. I., Lefkowitz E. J., Glass J. S., Heiner C. R., Chen E. Y., Cassell G. H. 2000. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. Nature. 407: 757—762.
- Haebusser D. P., Margolin W. 2016. Splitsville: structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring. Nat. Rev. Microbiol. 14: 305—319.



- Hajduk I. V., Rodrigues C. D., Harry E. J. 2016. Connecting the dots of the bacterial cell cycle: coordinating chromosome replication and segregation with cell division. *Semin. Cell Develop. Biol.* 53 : 2—9.
- Hutchison C. A., 3rd, Chuang R. Y., Noskov V. N., Assad-Garcia N., Deerinck T. J., Ellisman M. H., Gill J., Kannan K., Karas B. J., Ma L., Pelletier J. F., Qi Z. Q., Richter R. A., Strychalski E. A., Sun L., Suzuki Y., Tsvetanova B., Wise K. S., Smith H. O., Glass J. I., Merryman C., Gibson D. G., Venter J. C. 2016. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science*. 351 : aad6253.
- Jaffe J. D., Stange-Thomann N., Smith C., DeCaprio D., Fisher S., Butler J., Calvo S., Elkins T., Fitzgerald M. G., Hafez N., Kodira C. D., Major J., Wang S., Wilkinson J., Nicol R., Nusbaum C., Birren B., Berg H. C., Church G. M. 2004. The complete genome and proteome of *Mycoplasma mobile*. *Gen. Res.* 14 : 1447—1461.
- Kobayashi M., Asai Y., Hatakeyama K., Kijima N., Wachi M., Nagai K., Yukawa H. 1997. Cloning, sequencing, and characterization of the *ftsZ* gene from coryneform bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236 : 383—388.
- Kukekova A. V., Malinin A. Yu., Ayala J. A., Borchsenius S. N. 1999. Characterization of *Acholeplasma laidlawii ftsZ* gene and its gene product. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262 : 44—49.
- Lan G., Wolgemuth C. W., Sun S. X. 2007. Z-ring force and cell shape during division in rod-like bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104 : 16 110—16 115.
- Lee H. L., Chiang I. C., Liang S. Y., Lee D. Y., Chang G. D., Wang K. Y., Lin S. Y., Shih Y. L. 2016. Quantitative proteomics analysis reveals the min system of *Escherichia coli* modulates reversible protein association with the inner membrane. *Mol. Cell Proteomics.* 15 : 1572—1583.
- Lluch-Senar M., Querol E., Pinol J. 2010. Cell division in a minimal bacterium in the absence of FtsZ. *Mol. Microbiol.* 78 : 278—289.
- Lu C., Reedy M., Erickson H. P. 2000. Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *J. Bacteriol.* 182 : 164—170.
- Lutkenhaus J., Addinall S. 1997. Bacterial cell division and the Z ring. *Ann. Rev. Biochem.* 66 : 93—116.
- 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.
- Mercier R., Kawai Y., Errington J. 2014. General principles for the formation and proliferation of a wall-free (L-form) state in bacteria. *Elife.* 3 : e04629. Doi: 10.7554/eLife.04629.
- Momyaliev K. T., Smirnova O. V., Lazyrev V. N., Akopian T. A., Chelysheva V. V., Ayala J. A., Simankova A. N., Borchsenius S. N., Govorun V. M. 2002. Characterization of the *Mycoplasma hominis* FtsZ gene and its sequence variability in mycoplasma clinical isolates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 : 155—162.
- Olivier N., Keller D., Gonczy P., Manley S. 2013. Resolution doubling in 3D-STORM imaging through improved buffers. *PLoS ONE.* 8(7) : e69004.
- Osawa M., Anderson D. E., Erickson H. P. 2008. Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes. *Science.* 320 : 792—794.
- Osawa M., Erickson H. P. 2006. FtsZ from divergent foreign bacteria can function for cell division in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188 : 7132—7140.
- 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.
- Paez A., Mateos-Gil P., Hörger I., Mingorance J., Rivas G., Vicente M., Vélez M., Tarazona P. 2009. Simple modeling of FtsZ polymers on flat and curved surfaces: correlation with experimental *in vitro* observations. *PMC Biophys.* 2 : 8.
- Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. 2012. NIH image to imagej: 25 years of image analysis. *Nat. Meth.* 9 : 671—675.
- Schumacher M. A., Zeng W. 2016. Structures of the nucleoid occlusion protein SlmA bound to DNA and the C-terminal domain of the cytoskeletal protein FtsZ. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 113 : 4988—4993.
- Vedyaykin A. D., Gorbunov V. V., Sabantsev A. V., Polinovskaya V. S., Vishnyakov I. E., Melnikov A. S., Serdobintsev P. Yu., Khodorkovskii M. A. 2015. Multi-color localization microscopy of fixed cells as a promising tool to study organization of bacterial cytoskeleton. 2nd Int. School and Conference St. Petersburg OPEN on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures (SPbOPEN2015). 643(1/012020) : 1—6.
- Vedyaykin A. D., Sabantsev A. V., Khodorkovskii M. A., Kayumov A. R., Vishnyakov I. E. 2016a. Recombinant FtsZ proteins from Mollicutes interact with *Escherichia coli* division machinery. *BioNanoScience* (online first). Doi: 10.1007/s12668-016-0248-3.
- Vedyaykin A. D., Vishnyakov I. E., Polinovskaya V. S., Khodorkovskii M. A., Sabantsev A. V. 2016b. New insights into FtsZ rearrangements during the cell division of *Escherichia coli* from single-molecule localization microscopy of fixed cells. *Microbiolopen.* 5 : 378—386.
- Wang X., Lutkenhaus J. 1996. Characterization of the *ftsZ* gene from *Mycoplasma pulmonis*, an organism lacking a cell wall. *J. Bacteriol.* 178 : 2314—2319.

Поступила 24 XI 2016

#### INFLUENCE OF FtsZ PROTEINS FROM SOME MYCOPLASMA SPECIES ON THE DIVISION PROCESS IN *Escherichia Coli* CELLS

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

<sup>1</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251, and

<sup>2</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

\* e-mail: innvish@gmail.com, vishnyakov\_ie@spbstu.ru

Being a highly-conserved protein, FtsZ plays one of key roles in the division process of the most prokaryotes. To date, it is assumed that the main FtsZ function in well-studied microorganisms (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, etc.) is the control of cell-wall synthesis in the future septum site. In this context, the fact that FtsZ has been found in mycoplasmas — wall-less bacteria — seems to be intriguing. In this work we studied the effect of FtsZ proteins from three Mycoplasma species (*Mycoplasma hominis*, *M. gallisepticum*, *Acholeplasma laidlawii*) on the cytokinesis of *Escherichia coli*. We have shown that FtsZ proteins are able to interact with *E. coli* division machinery (including the inhibition of the cytokinesis) as well as demonstrate different localization patterns. Our data support the hypothesis of importance of FtsZ proteins for division of mycoplasma cells.

Key words: bacterial cell division, FtsZ, mycoplasma, *Escherichia coli*, single-molecule localization microscopy.