

На правах рукописи

ВЕДЯЙКИН Алексей Дмитриевич

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ FtsZ  
*Escherichia coli* И МИКОПЛАЗМ

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург  
2018

Работа выполнена в Научно-исследовательском комплексе «Нанобиотехнологии» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

- Научный руководитель: **Ходорковский Михаил Алексеевич**  
Кандидат физико-математических наук  
директор НИК «Нанобиотехнологии» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург
- Официальные оппоненты: **Чернов Владислав Моисеевич**  
Доктор биологических наук, профессор, руководитель Казанского института биохимии и биофизики - обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань
- Фисунов Глеб Юрьевич**  
Кандидат биологических наук, заведующий Лабораторией протеомного анализа Федерального Государственного Бюджетного Учреждения «Федеральный Научно-клинический Центр Физико-химической Медицины» Федерального Медико-биологического Агентства России, Москва
- Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «18» октября 2019 года в 12 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.230.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института цитологии Российской академии наук по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте института по адресу <https://www.incras.ru/>.  
Адрес электронной почты: cellbio@incras.ru  
Факс: 8(812)297-35-41

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
кандидат биологических наук

Безбородкина Н.Н.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Данная работа посвящена исследованию свойств белков FtsZ трёх видов бактерий — *Escherichia coli*, *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma gallisepticum*. FtsZ относится к белкам цитоскелета — структурным элементам клеток, которые участвуют в осуществлении жизненно важных функций, таких как поддержание формы клетки, внутриклеточный транспорт, деление и подвижность [1]. FtsZ является жизненно необходимым для многих бактерий, поэтому считается одной из перспективных мишеней для антибактериальных препаратов будущего.

В большинстве изученных бактерий белок FtsZ формирует Z-кольцо, которое служит каркасом для дивисомы — комплекса белков, обеспечивающих деление бактериальной клетки [2]. Несмотря на интенсивное изучение, в настоящий момент существует несколько вопросов, касающихся механизмов работы данного белка, на которые только предстоит ответить. Даже в таком хорошо изученном модельном организме, как *E. coli*, до сих пор неизвестна точная структура Z-кольца: большинство работ свидетельствует в пользу слабо упорядоченного массива протофиламентов, из которых состоит Z-кольцо, в то же время часть работ говорит о том, что протофиламенты в Z-кольце хорошо упорядочены и формируют замкнутое кольцо или спираль [3]. Точная структура Z-кольца имеет принципиальное значение для понимания как механизмов цитокинеза в целом, так и роли белка FtsZ в этом процессе. Например, продолжительное время обсуждается вопрос, вносит ли существенный вклад в цитокинез сократительная сила, которую протофиламенты FtsZ могут генерировать в условиях *in vitro*, или Z-кольцо является лишь каркасом для белков, которые отвечают за синтез клеточной стенки в области деления [4]. Для ответа на этот вопрос важно понимать, как организованы одонитевые филаменты в составе Z-кольца. В данной работе была осуществлена субдифракционная визуализация Z-кольца в *E. coli* при помощи методов флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения, что позволило охарактеризовать структуру Z-кольца с высокой точностью.

У представителей класса *Mollicutes*, часто собирательно называемых микоплазмами, роль белка FtsZ плохо изучена и может существенным образом отличаться от таковой в *E. coli* [5]. Микоплазмы лишены клеточной стенки, с регуляцией синтеза которой связана основная роль белка FtsZ в *E. coli*, кроме того, в редуцированном геноме этих бактерий отсутствует

большинство гомологов известных белков деления [6]. Это делает представителей класса *Mollicutes* интересными с точки зрения концепта «минимальной» клетки, а именно выявления минимального набора белков, обеспечивающих деление клетки. Многие микоплазмы являются важными патогенами (например, *A. laidlawii* является возбудителем фитоплазмозов – заболеваний растений, а *M. gallisepticum* — респираторных заболеваний птиц), борьба с которыми затруднена, потому что арсенал антибиотиков ограничен (например, большая группа антибиотиков, ингибирующих синтез клеточной стенки, по понятным причинам не действует на микоплазмы). Кроме того, в силу ряда причин микоплазмы демонстрируют довольно высокую устойчивость и к другим антибактериальным препаратам. Изучение микоплазм может помочь более эффективно бороться с вызываемыми ими инфекциями, и потому представляет практический интерес.

### Цели и задачи

**Цель работы** — выявление свойств белков FtsZ *Escherichia coli*, *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma gallisepticum*.

**Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:**

1. Анализ структур, формируемых белком FtsZ в фиксированных и живых клетках *E. coli*, при помощи методов флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения.
2. Получение и тестирование поликлональных антител к белкам FtsZ бактерий *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*.
3. Анализ структур, формируемых белками FtsZ видов *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* в клетках *E. coli*, *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*, с использованием иммунофлуоресценции.
4. Получение штамма *M. gallisepticum* с эндогенно-экспрессируемым флуоресцентно-меченым белком FtsZ, визуализация структур, формируемых этим белком.
5. Идентификация белков-партнеров FtsZ в клетках *E. coli*, *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*.

### Научная новизна и теоретическая важность

В данной работе с помощью метода локализационной микроскопии впервые выявлено утолщение Z-кольца в ходе его сокращения в *E. coli*. Этот

результат поддерживает гипотезу о том, что Z-кольцо сокращается за счёт перераспределения протофиламентов FtsZ в его составе, а не за счёт их укорочения или исключения из Z-кольца. Оценены размеры кластеров на изображениях структур FtsZ в норме и при нарушении деления под действием белка SulA. Впервые визуализированы структуры, формируемые белками FtsZ в клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*. Эти структуры существенно отличаются от классического Z-кольца, что может говорить о вовлечении белков FtsZ в отличные от цитокинеза процессы. Впервые были идентифицированы белки - партнеры FtsZ в клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*, среди которых не выявлено гомологов известных белков деления. В то же время, было установлено, что FtsZ микоплазм взаимодействует с белками, входящими в различные метаболические пути, а также с белками, обеспечивающими фолдинг и деградацию полипептидов, трансляцию.

### **Практическая важность**

В клетках большинства хорошо изученных видов бактерий, включая *E. coli*, FtsZ является жизненно необходимым белком, поэтому он рассматривается как перспективная мишень для новых антибактериальных препаратов [7]. В настоящее время описано значительное количество антибактериальных веществ естественного и искусственного происхождения, ингибирующих активность белка FtsZ, причём некоторые из этих веществ демонстрируют ингибирующие концентрации на уровне хороших антибиотиков. В будущем результаты работы могут способствовать созданию новых антибактериальных препаратов.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Z-кольцо, формируемое белком FtsZ в *Escherichia coli*, представляет собой неоднородную структуру и утолщается в процессе цитокинеза.
2. Гомологи FtsZ в клетках *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma gallisepticum* не формируют Z-колец и локализуются иначе, чем FtsZ в клетках *E. coli*.
3. Гомологи FtsZ в клетках *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* взаимодействуют с наборами белков, состав которых значительно отличается от набора белков-партнеров FtsZ *E. coli*.

### **Личный вклад автора**

Автором самостоятельно выполнен основной объем работы. Анализ образцов при помощи масс-спектрометрии осуществляла Артамонова Т.О. в НИК «Нанобиотехнологии» СПбПУ. Эксперименты с использованием электронной микроскопии выполнены Вишняковым И.Е. в Институте Цитологии РАН. Иммунизацию животных осуществлял Иванов В.А. в Институте Цитологии РАН.

### **Апробация работы**

Достоверность результатов работы подтверждается публикациями в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах. Промежуточные результаты работы были доложены на международных и всероссийских конференциях. В ходе выполнения работы опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах, 12 тезисов докладов.

### **Структура и объём работы**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и благодарностей. Работа изложена на 119 страницах машинописного текста, включает 39 рисунков, 7 таблиц. Список цитируемых литературных источников включает 142 наименования.

### **Финансовая поддержка работы**

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 15-04-07472, № 18-04-01074), Российского научного фонда (проекты № 17-74-20065, № 14-34-00023) и государственного задания № 3.8742.2017/8.9.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **Подготовка образцов для иммунофлуоресцентной микроскопии**

Клетки *E. coli* штаммов Dh5 $\alpha$ , Top10 или Rosetta культивировали в среде LB в термошейкере при температуре 37°C с добавлением необходимых антибиотиков. Непосредственно перед экспериментом ночную культуру инокулировали в свежую среду LB, после чего культивировали до оптической плотности OD<sub>600</sub> = 0,5. Фиксацию, пермеабелизацию и иммунофлуоресцентное мечение клеток, а также другие этапы подготовки

образцов осуществляли, как описано ранее [8]. Для большей стабильности флуоресцентного мечения производили постфиксацию образцов посредством добавления 2% об. раствора формальдегида в PBS на 20 мин при комнатной температуре. Для визуализации мембраны добавляли раствор зародышевого агглютинина пшеницы, конъюгированного с красителем Alexa 488, в концентрации 10 мкг/мл в PBS на 10 мин. Для визуализации ДНК — красители YOYO-1 и TOTO-3 (концентрация каждого 100 нМ), аналогично предыдущему предложению.

Клетки *M. gallisepticum* штаммов S6 или A5969 и *A. laidlawii* штамма PG-8a культивировали при температуре 37°C без аэрации в среде Mycoplasma broth base (Oxoid, UK) (или аналогичной среде, собранной самостоятельно из составных компонентов), с добавлением 10% об. лошадиной сыворотки, 5% об. дрожжевого диализата, 1% вес/об. глюкозы, 100 мкг/мл ампициллина, 1:1000 фенолового красного в качестве индикатора. Культивацию осуществляли до середины экспоненциальной фазы, что определяли по изменению цвета индикатора вследствие закисления среды. Фиксацию клеток осуществляли в среде добавлением формальдегида до конечной концентрации 2% об., глутаральдегида — 0,1% вес/об. на 1 ч при комнатной температуре. Затем клетки однократно промывали PBS, после чего для их закрепления в промываемых камерах, подготовленных так же, как в случае фиксированных клеток *E. coli*, проводили центрифугирование камер, наполненных суспензией клеток микоплазм, при 1000 g в течение 5 мин, в результате клетки оседали и закреплялись на поверхности покровного стекла. Для пермеабелизации в промываемую камеру помещали 0,1% об. раствор Triton X-100 в PBS на 5 мин. Для блокирования неспецифического связывания антител клетки инкубировали в 3% об. растворе обезжиренного сухого молока в PBS с добавлением 5% об. лошадиной сыворотки для блокирования иммуноглобулин-связывающих белков в течение 1 ч при комнатной температуре. Первичные антитела добавляли в разведении 1:100 в растворе молока на ночь при 4°C. Промывку, инкубирование со вторичными антителами и окрашивание ДНК осуществляли так же, как в случае фиксированных клеток *E. coli*. Для окрашивания мембраны клетки инкубировали с раствором красителя CellMask green (Life Technologies) в концентрации от 100 до 1000 нМ в PBS в течение 10 мин.

### **Получение и очистка антител**

Для получения поликлональных антител использовали рекомбинантные белки FtsZ *M. gallisepticum* и *A. laidlawii*, аффинно очищенные после их

экспрессии в клетках *E. coli*. Очищенный белок использовали для иммунизации кроликов. Иммунизацию осуществлял В.А. Иванов в ИНЦ РАН по методике, разработанной в Институте цитологии РАН [9] в 3 стадии, в каждой из которых было использовано от 100 до 500 мкг белка. Для выделения иммуноглобулинов, узнающих целевой белок, использовали аффинную очистку за соответствующий белок. Для этого около 1 мг рекомбинантного белка ковалентно пришивали к циан-бром-активированной сефарозе (GE Healthcare) в соответствии с инструкцией производителя, после чего смолу с целевым антигеном в течение ночи инкубировали с сывороткой при 4°C, а затем промывали буфером PBS (3 раза по 10 мл). Антитела элюировали при помощи раствора глицина (100 мМ, pH=2.8), после чего в элюат немедленно добавляли Tris-HCl (pH=8.0) и KCl до конечной концентрации каждого 150 мМ. Для выделения иммуноглобулинов из нормальной сыворотки использовали их очистку с использованием белок-A сефарозы (GE Healthcare) в соответствии с инструкцией изготовителя.

Антитела концентрировали методом диафильтрации и хранили с добавлением 50% об. глицерина и 0,02% вес/об. азида натрия при -20°C. Полученные сыворотки тестировали при помощи иммуноблоттинга с использованием клеточных экстрактов соответствующих микоплазм.

### **Флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения**

Для визуализации структур, формируемых белками FtsZ бактерий *E. coli*, *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*, в данной работе были успешно использованы методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения (главным образом локализационная микроскопия [10]). В промываемые камеры с образцами клеток *E. coli*, *M. gallisepticum* или *A. laidlawii* вносили раствор, предложенный в работе [11]. После этого образцы заклеивали герметиком и помещали в микроскоп, укомплектованный необходимым для осуществления локализационной микроскопии оборудованием, как описано ранее [12]. Для возбуждения флуоресценции красителей Alexa 647 и TOTO-3 в режиме локализационной микроскопии использовали диодный лазер с длиной волны 640 нм, создающий в плоскости образца пятно с плотностью мощности около 1 кВт/см<sup>2</sup>. В режиме локализационной микроскопии снимали от 1000 до 20000 последовательных кадров с изображениями одиночных молекул красителя, которые затем обрабатывали при помощи плагина ThunderSTORM [13] для программного пакета ImageJ [14]. Размер пикселя на реконструированных изображениях составлял 21.6 нм. При реконструкции изображений использовали следующие параметры фильтрации:



Intensity>1000, Uncertainty<10 (Alexa 647, Alexa 555); Intensity>100, Uncertainty<20 (Alexa 488, TOTO-3).

### **Измерение кластеров FtsZ**

Кластерами FtsZ [15-17] считали пятна на субдифракционном изображении, более чем в 2 раза превышающие размер пикселя в реконструированном изображении. Для оценки размеров кластеров использовали измерение профиля интенсивности изображения (вдоль линии толщиной 2 пикселя) вдоль длинной оси кластера (длина кластера), а также перпендикулярно ей (толщина кластера). Профиль интенсивности аппроксимировали гауссианом, после чего полную ширину на половине высоты (FWHM) считали результатом измерения. Для аппроксимации гауссианом использовали плагин для ImageJ FWHM\_Line.ijm, написанный Soon Yew John. Для каждой клетки осуществляли не менее 5 измерений наиболее выраженных кластеров.

### **Иммуноэлектронная микроскопия**

В дополнение к флуоресцентной визуализации белков FtsZ в клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*, в работе был использован метод иммуноэлектронной микроскопии, что позволило более надежно интерпретировать данные, полученные двумя независимыми методами. Электронную микроскопию на микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss) в ИНЦ РАН выполнял Вишняков И.Е. по протоколу, описанному в статье [18].

### **Исследование межбелковых взаимодействий**

Для анализа межбелковых взаимодействий в данной работе были использованы методы ко-иммунопреципитации и со-осаждения.

Для ко-иммунопреципитации смолу, конъюгированную с белком А (Protein A Sepharose 4 Fast Flow, GE), сшивали с тремя типами антител (отдельно): с поликлональными кроличьими антителами к белку FtsZ *A. laidlawii* (AL FtsZ); или с поликлональными кроличьими антителами к белку FtsZ *M. gallisepticum* (MG FtsZ); или с иммуноглобулинами нормальной сыворотки кролика (в качестве отрицательного контроля). Сшивание антител со смолой выполняли по протоколу, описанному ранее в работе [19], с незначительными изменениями. Процесс иммунопреципитации осуществляли следующим образом. Выращенные клетки *E. coli* дважды промывали PBS с добавлением 0,3 М сахарозы, лизировали в буфере PBS с добавлением 1 мг/мл лизоцима (Sigma-Aldrich, UK) и 1 мМ PMSF и обрабатывали ультразвуком (соникатор Sartorius LABSONIC P, параметры:

cycle = 0.25, amplitude = 25%). В случае клеток *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* лизоцим не добавляли, а лизис осуществляли только с использованием ультразвука. После центрифугирования (15 000 g, 10 мин, 4°C) для удаления клеточных остатков и неразрушенных клеток осветленный лизат разбавляли содержащим детергент буфером NET I [50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 150 mM NaCl, 0,1% об. неионного детергента Nonidet P-40, 1 mM ЭДТА] и фильтровали через фильтр 0,22 мкм. Чтобы максимально удалить лошадиную сыворотку, присутствующую в образцах, был включен этап предварительной очистки. Для этого в фильтрованный лизат добавляли 200 мкл суспензии белок-G-сефарозы (Protein G Sepharose 4 Fast Flow, GE Helthcare) и инкубировали в течение 2 ч при 4°C с осторожным перемешиванием. После центрифугирования супернатант добавляли к смоле с белок-A-сефарозой с пришитыми антителами. После 4-часовой инкубации при 4°C смолу три раза промывали буфером NET I, дважды буфером NET II (буфер NET I с 500 mM NaCl) и один раз буфером IP [10 mM Tris / HCl, pH 7,5, 0,1% об. Nonidet P-40]. Связанные с антителами белки элюировали со смолы буфером IE (100 mM глицин, pH 2,4), элюаты концентрировали методом диафильтрации и анализировали при помощи электрофореза в денатурирующих условиях с последующим масс-спектрометрическим анализом выделенных белков, как описано в работе [20]. Некоторые эксперименты проводили с дополнительной стадией сшивания белковых комплексов перед разрушением клеток путем добавления параформальдегида до конечной концентрации 0,4% вес/об. на 1 ч.

Анализ белок-белковых взаимодействий по методу со-осаждения проводили с использованием белков FtsZ с N-концевым стреп-тагом и стрептактин-сефарозы (IBA). Для гетерологической экспрессии белков FtsZ микоплазм в клетках *E. coli* использовали те же генетические конструкции, что и в случае очистки белка (см. ниже). Клетки *E. coli* выращивали в течение ночи при 37°C в жидкой среде LB (100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл хлорамфеникола), затем переносили в свежую среду и культивировали до OD<sub>600</sub> ~ 0,1, после чего добавляли L-арабинозу до конечной концентрации 25 mM и продолжали культивирование в течение примерно 2 ч. Затем клетки переносили в буфер Tris-HCl (50 mM pH = 8,0), содержащий 500 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 мг/мл лизоцима, 1 mM полиметилсульфонилфторида и разрушали ультразвуком. Затем проводили очистку за стреп-таг. Клеточный лизат наносили на колонку со стрептактин-сефарозой с использованием хроматографа Acta FPLC (GE). Конечные элюаты, содержащие FtsZ и белки,

со-осажденные с ними, анализировали, как в случае ко-иммунопреципитации.

Для сравнения с белками-партнерами FtsZ *E. coli* использовали базу данных STRING [21].

### **Оценка концентрации белков FtsZ в клетках микоплазм.**

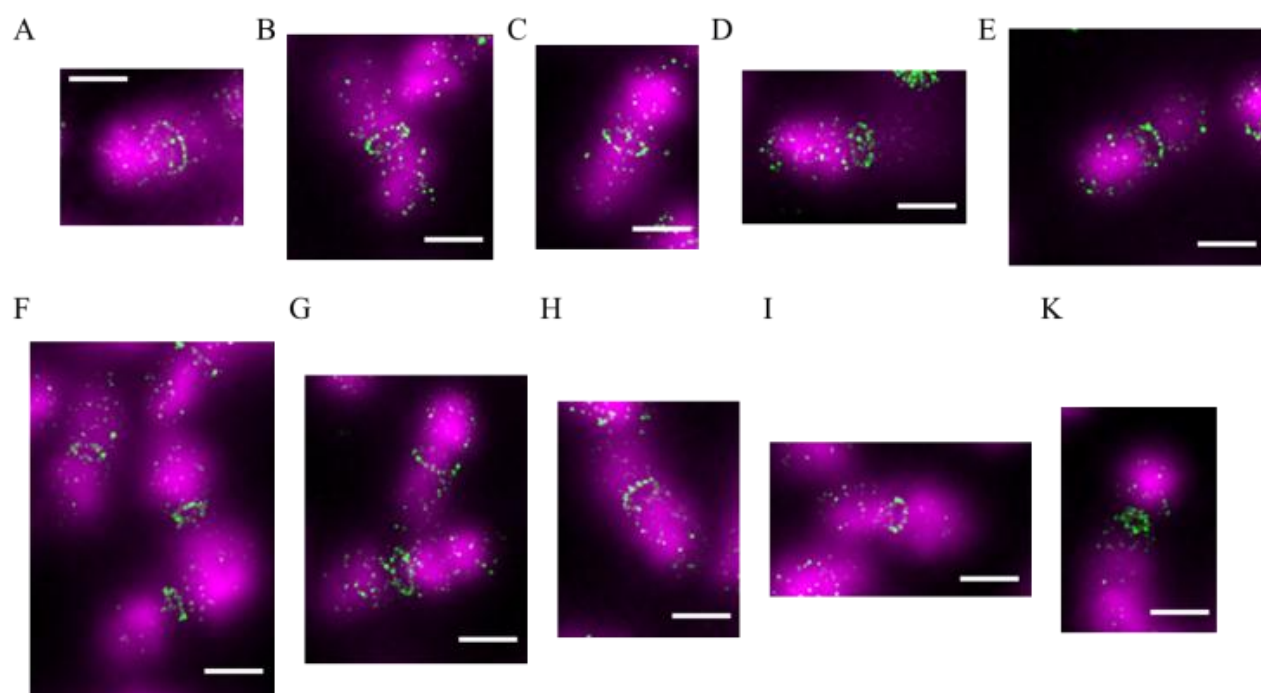
Для измерения концентрации белков FtsZ в клетках *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* использовали метод полуколичественного иммуноблотинга. Количество клеток в среде определяли под микроскопом подсчётом в фиксированном объёме. Лизат от известного количества клеток наносили на одну из дорожек геля, на другие дорожки наносили увеличивающиеся количества очищенного рекомбинантного белка FtsZ в диапазоне от 0,1 до 100 нг белка. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли по стандартному протоколу. В качестве первичных антител использовали антитела к белкам FtsZ микоплазм, полученные в данной работе, в разведении 1:1000, в качестве вторичных — антитела к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена. Хемилюминисценцию наблюдали в растворе, полученном из набора SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate. Измеряли полную интенсивность хемилюминисценции от 1 полосы, соответствующей белку интереса, при этом условия съёмки подбирали таким образом, чтобы не допускать насыщения матрицы гель-документирующей системы по интенсивности. Оценку объёма клеток осуществляли, анализируя изображения, полученные методом электронной микроскопии.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

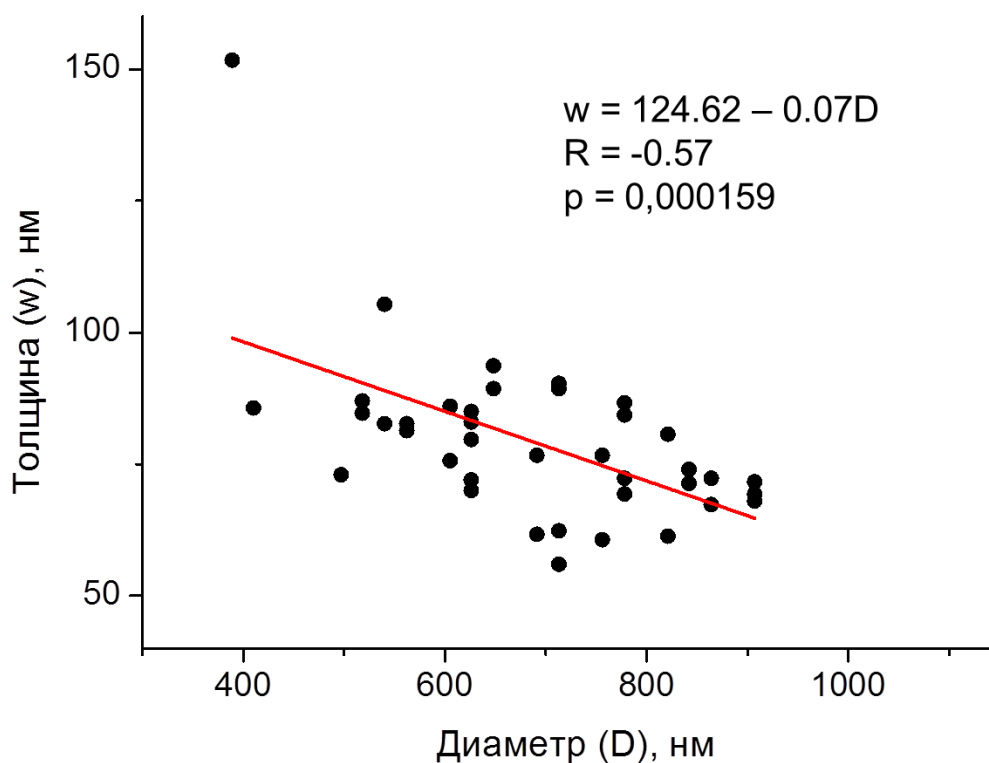
### **Структуры, формируемые FtsZ в клетках *E. coli***

В данной работе метод флуоресцентной локализационной микроскопии позволил визуализировать структуры, формируемые белком FtsZ в клетках *E. coli*, с разрешением около 20 нм (см. Рисунок 1). Высокое разрешение метода позволило показать, что Z-кольцо представляет собой неоднородную структуру, наблюдаемую в виде кластеров. Хорошо известно, что методы иммунофлуоресцентного мечения и локализационной микроскопии могут вносить искусственную зернистость в получаемые изображения [22]. Поэтому только на основании полученных изображений нельзя с уверенностью говорить о том, что наблюдаемые кластеры действительно

являются полимерами или группами полимеров белка FtsZ. Тем не менее, использование различных методов флуоресцентного мечения, в том числе эндогенно-экспрессируемого флуоресцентно-меченого белка FtsZ вместо иммунофлуоресценции, подтвердило высокую неоднородность Z-кольца [23], что хорошо согласуется с литературными данными [24-26]. На основании вышесказанного, с высокой долей вероятности можно сделать вывод о том, что кластеры, наблюдаемые на полученных нами изображениях, не являются артефактом, привнесенным методами визуализации. Напротив, по-видимому, эти кластеры отражают реальные структуры (полимеры или, скорее, группы полимеров), формируемые белком FtsZ в бактериальной клетке. На основании полученных изображений нам удалось оценить размеры кластеров FtsZ *E. coli*: средняя длина кластеров составила  $108 \pm 41$  (среднее значение  $\pm$  среднеквадратическое отклонение) нм, а средняя толщина —  $63 \pm 12$  нм. Кроме того, было показано, что Z-кольцо утолщается в процессе цитокинеза (см. Рисунок 2) [27].



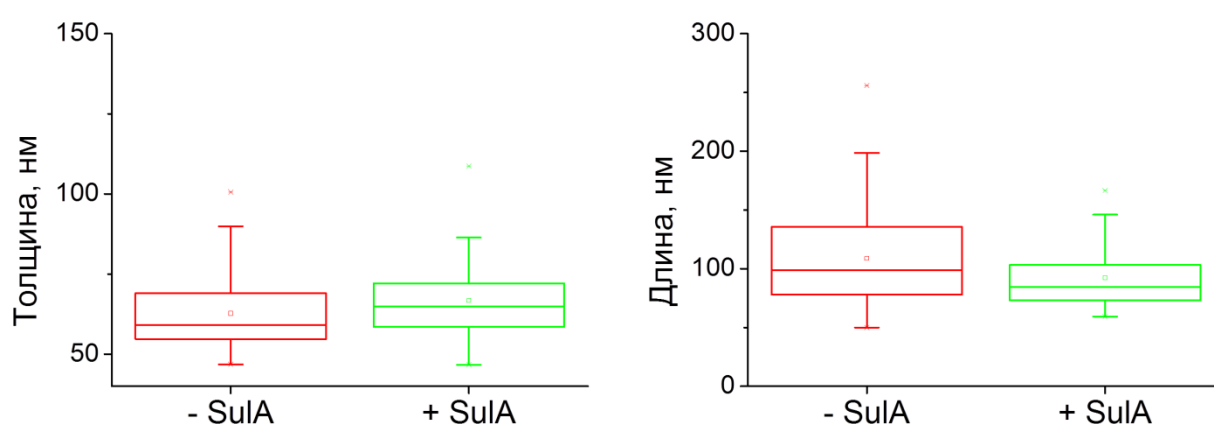
**Рисунок 1.** Изображения структур, формируемых белком FtsZ в клетках *E. coli*, полученные при помощи локализационной микроскопии и иммунофлуоресценции (зелёный цвет, краситель Alexa 647) с дополнительной дифракционно-ограниченной визуализацией ДНК (фиолетовый, краситель YOYO-1)



**Рисунок 2.** Зависимость толщины ( $w$ ) Z-кольца от его диаметра ( $D$ ) на основании анализа изображений, полученных в режиме локализационной микроскопии. Черные круги – экспериментальные точки, красная линия – линейная аппроксимация экспериментальных данных. Каждая экспериментальная точка соответствует результату измерения диаметра и средней толщины Z-кольца в одной из клеток. Над графиком приведены результаты линейной регрессии: зависимость  $w$  ( $D$ ), коэффициент корреляции  $R$ , а также  $p$ -значение, характеризующее уровень значимости наблюдаемого эффекта

При SOS-ответе — стрессовом состоянии бактериальной клетки, возникающем при повреждении ДНК — происходит блокирование деления за счёт накопления в клетке белка SulA — ингибитора белка FtsZ [28]. В настоящее время считается, что SulA блокирует деление за счёт связывания с мономерами FtsZ, что снижает эффективную концентрацию последнего в клетке ниже критического значения, что в свою очередь приводит к разборке полимеров [29]. Результаты нашей работы позволяют предположить, что при блокировании деления вследствие накопления в клетках белка SulA не происходит полной разборки структур FtsZ. Анализ субдифракционных изображений показал, что средние размеры кластеров белка FtsZ при блокировании деления практически не отличаются от таковых в случае нормального деления (см. Рисунок 3). Данное наблюдение противоречит

указанному выше механизму блокирования деления и согласуется с полученными нами ранее данными о том, что при SOS-ответе FtsZ формирует выраженные упорядоченные структуры, в частности, спиралевидные [12]. По-видимому, полимеризация FtsZ является необходимым, но не достаточным условием для образования Z-колец. Так как данные об указанном выше механизме блокирования деления белком SulA получены в основном в условиях *in vitro*, представляется необходимым в будущем дополнительно проверить применимость этого механизма для ситуации *in vivo*, для чего важно, в частности, измерить концентрацию белка SulA в клетках в состоянии SOS-ответа.



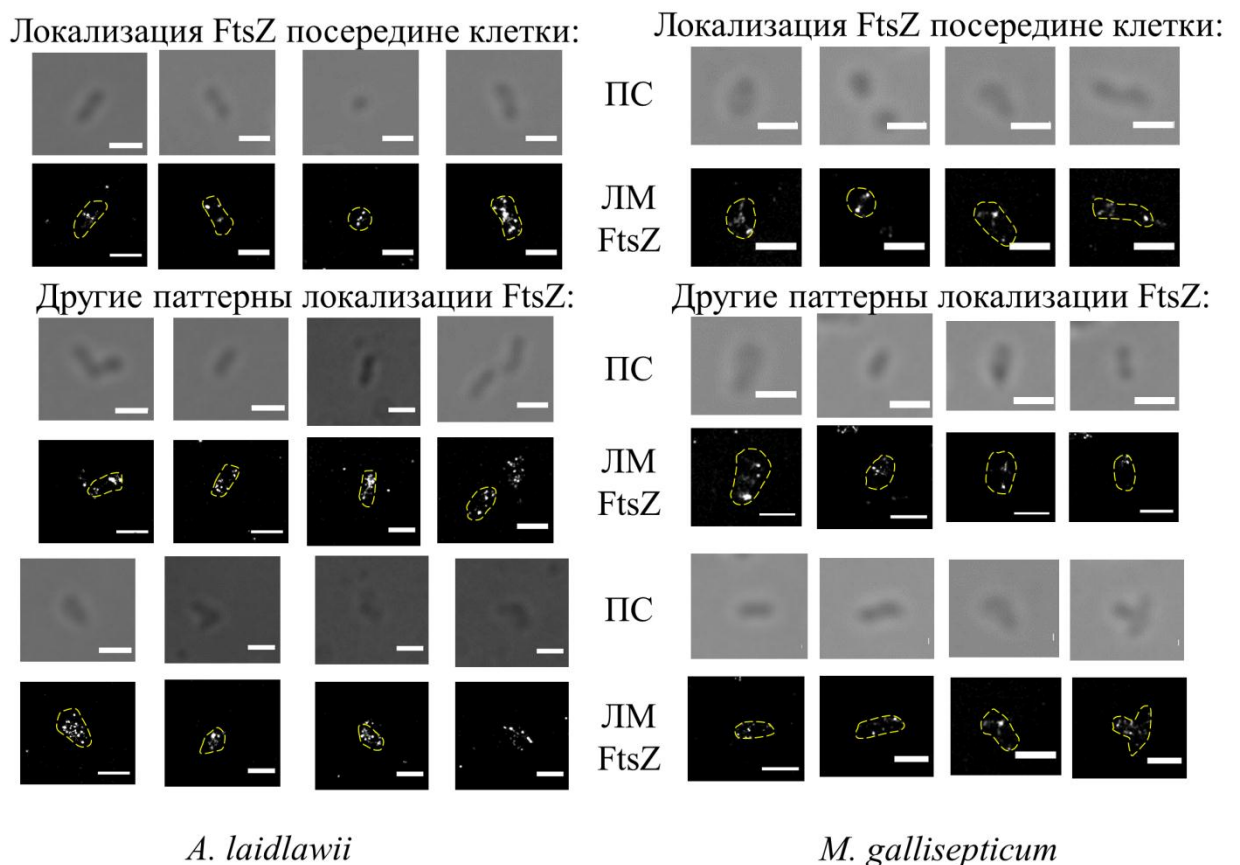
**Рисунок 3.** Размеры кластеров FtsZ при нормальном делении клеток *E. coli* и при нарушении деления в результате накопления белка SulA. «- SulA» – в условиях нормального деления, «+ SulA» – в результате экспрессии белка-ингибитора SulA. Представлены диаграммы «ящик с усами». На диаграммах верхняя и нижняя границы прямоугольника («ящика») соответствуют перцентилям 25% и 75%, концы отрезков, выходящих из прямоугольника («усы») — перцентилям 5% и 75%. Внутри прямоугольника кружок обозначает среднее значение, горизонтальная черта — медиану. Крестиками обозначены экстремальные значения

### Структуры, формируемые FtsZ в клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*

Согласно полученным нами данным, поведение белков FtsZ в клетках двух видов микоплазм — *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* — значительно отличается от поведения FtsZ в бактериях, демонстрирующих «классическое» деление с формированием Z-кольца. FtsZ в клетках микоплазм не формирует Z-кольца (см. Рисунок 4). Результаты, полученные другим методом — иммуноэлектронной микроскопией — подтверждают это (см. Рисунок 5). На

обоих рисунках приведена только часть характерных вариантов локализации FtsZ, что не отражает частоту встречаемости различных вариантов. Лишь в отдельных клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* наблюдается локализация FtsZ посередине клеток, а в подавляющем большинстве клеток – отсутствие выраженной локализации. В большинстве случаев FtsZ распределен по клетке неравномерно, в виде кластеров.

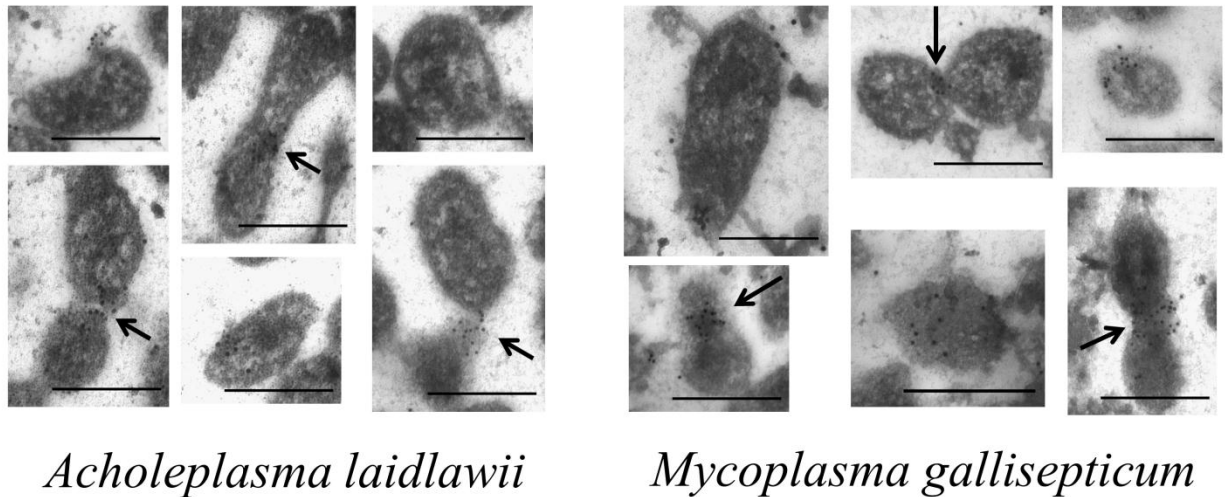
Были проанализированы размеры кластеров на изображениях структур, формируемых белками FtsZ в клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*. Сравнение этих размеров с таковыми в случае FtsZ *E. coli* показало их сходство (см. Рисунок 6), что может говорить о формировании белком FtsZ полимерных структур в клетках микоплазм, аналогичных FtsZ *E. coli*, хотя в будущем требуется независимое подтверждение с проведением соответствующих экспериментов в условиях *in vitro*.



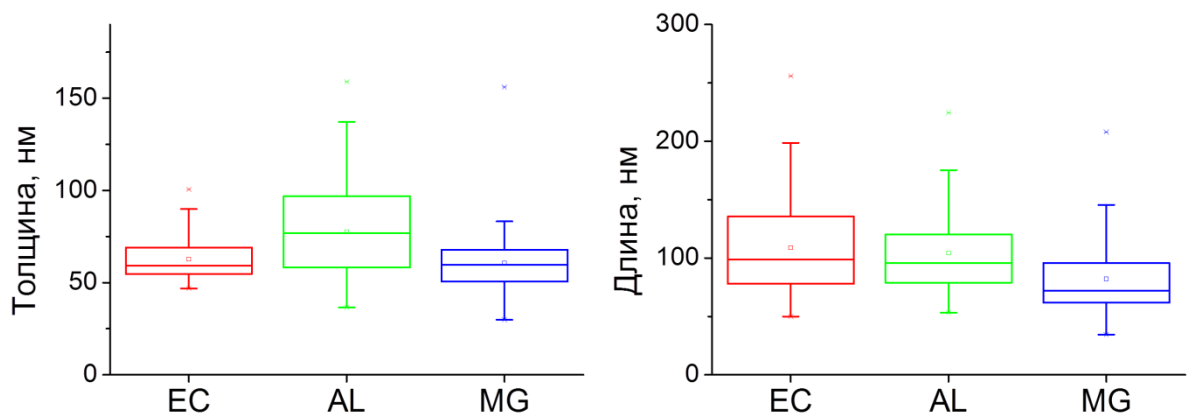
**Рисунок 4.** Изображения структур, формируемых белком FtsZ в клетках *A. laidlawii* (слева) и *M. gallisepticum* (справа), полученные методом локализационной микроскопии в сочетании с иммунофлуоресценцией. Приведены изображения клеток с локализацией FtsZ посередине клетки (сверху), а также с другими паттернами локализации белка FtsZ (внизу). ЛМ



FtsZ — изображение FtsZ, полученное методом локализационной микроскопии; ПС — изображение в проходящем свете. Жёлтыми пунктирными линиями отмечены приблизительные границы клеток. Шкала соответствует 1 мкм



**Рисунок 5.** Изображения клеток *A. laidlawii* (слева) и *M. gallisepticum* (справа), полученные методом иммуно-электронной микроскопии с использованием антител к белкам FtsZ микоплазм. Стрелками отмечены клетки с локализацией белка FtsZ в области перетяжки. Шкала – 500 нм

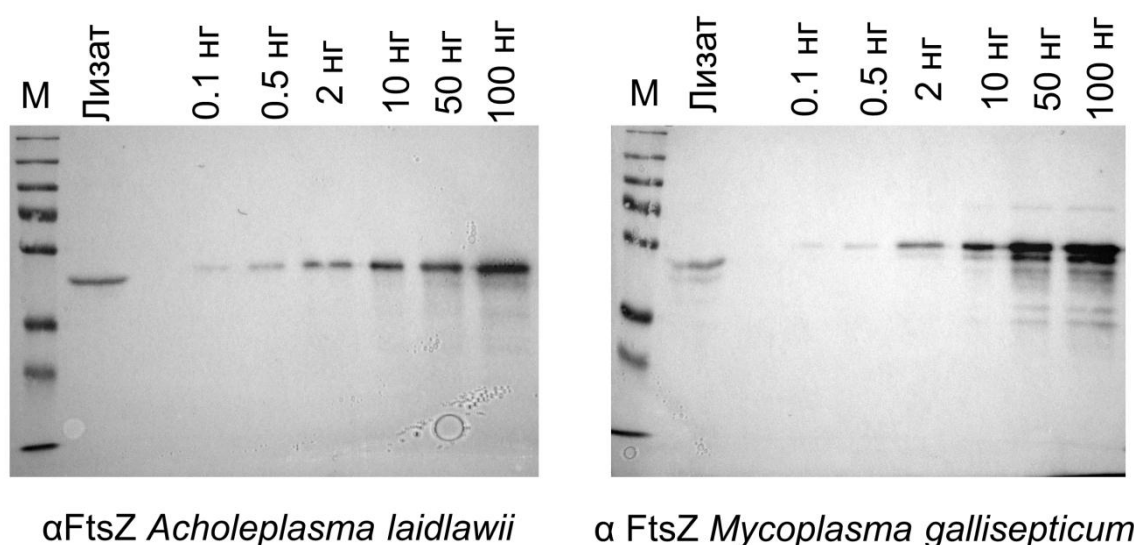


**Рисунок 6.** Сравнение размеров кластеров FtsZ, наблюдаемых в клетках бактерий *E. coli*, *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*. EC - *E. coli*, AL - *A. laidlawii*, MG - *M. gallisepticum*

### Оценка концентрации FtsZ в клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*



Оценка концентрации FtsZ (см. Рисунок 7) показала, что в клетках *A. laidlawii* находится примерно 600 молекул FtsZ на клетку (средняя концентрация 12 мкМ), а в клетках *M. gallisepticum* — примерно 100 молекул FtsZ (средняя концентрация 3 мкМ). Оба значения хорошо соотносятся с измеренной концентрацией FtsZ в клетках *E. coli* (3-10 мкМ). Так как критические концентрации для обоих белков неизвестны, то можно сравнить полученные значения только с критической концентрацией для FtsZ *E. coli* (1-2 мкМ). Полученный результат поддерживает предположение о том, что эти белки полимеризуются в клетках микоплазм, в случае если их критическая концентрация сравнима с указанным выше значением.



**Рисунок 7.** Оценка концентрации белка FtsZ в клетках видов *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* с помощью полуколичественного иммуноблотинга. М – маркер молекулярного веса (PageRuler Plus). Слева направо – клеточный лизат от известного количества клеток и возрастающие количества очищенного белка FtsZ

#### **Межбелковые взаимодействия с участием FtsZ в клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum***

В работе были также идентифицированы белки-партнеры белков FtsZ *A. laidlawii* и *M. gallisepticum*. Среди них были обнаружены белки, вовлеченные в метаболические пути, опосредующие трансляцию, фолдинг и деградацию белков, однако показать взаимодействие FtsZ микоплазм с предполагаемыми белками деления не удалось (Таблицы 1–3). Гомологов белков деления среди партнеров FtsZ обнаружено не было, что, впрочем, не

исключает того, что взаимодействие с такими белками всё же может существовать. Набор выявленных белков-партнеров FtsZ микоплазм существенно отличается от известного по литературным данным набора партнеров FtsZ *E. coli*. Только один белок является партнером всех трёх белков – фактор элонгации EFTu.

**Таблица 1.** Белки *A. laidlawii*, взаимодействующие с белком FtsZ *A. laidlawii* по данным со-осаждения за стреп-таг. MW — молекулярная масса

Название	MW, Да	Идентификатор
Bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	95048	WP_012242134.1
Molecular chaperone DnaK	65643	WP_012242499.1
Dihydrolipoyllysine acetyltransferase	57225	WP_012243236.1

**Таблица 2.** Белки *A. laidlawii*, взаимодействующие с белком FtsZ *A. laidlawii* по данным ко-иммунопреципитации. MW — молекулярная масса

Название	MW, Да	Идентификатор
Hsp20/alpha crystallin family protein, IbpA	16054	WP_012242373.1
Formate C-acetyltransferase	84730	WP_012242002.1
Elongation factor Tu	42860	WP_012242145.1
Elongation factor G	76350	WP_012242144.1
XRE family transcriptional regulator	23390	WP_012242530.1
Molecular chaperone DnaK	65690	WP_012242499.1
Endopeptidase La	86710	WP_012242485.1
Phytoene desaturase	56910	WP_012243338.1
ABC transporter ATP-binding protein	25210	WP_012243340.1

**Таблица 3.** Белки *M. gallisepticum*, взаимодействующие с белком FtsZ *M. gallisepticum* по данным ко-иммунопреципитации. MW — молекулярная масса

Название	MW, Да	Идентификатор
Lipoprotein A	81912	WP_011883657.1
Elongation factor Tu	43130	WP_014885939.1
ATP synthase B/B' CF(0)	52090	WP_023893658.1
DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	145080	WP_011884029.1
ABC-type oligopeptide transport solute binding protein OppA	118770	WP_011884746.1

## ВЫВОДЫ

1. Z-кольцо *Escherichia coli* представляет собой неоднородную структуру, наблюдаемую в виде кластеров белка FtsZ, средняя длина и толщина которых составляют  $108 \pm 41$  и  $63 \pm 12$  нм соответственно. Z-кольцо *E. coli* утолщается в ходе его сокращения в процессе цитокинеза, при этом средняя длина кластера FtsZ увеличивается.
2. При нарушении деления в результате экспрессии белка-ингибитора SulA *E. coli* не происходит значительного уменьшения размеров кластеров FtsZ.
3. В клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* белок FtsZ не формирует классическое Z-кольцо. В некоторых клетках FtsZ локализуется посередине клетки, тогда как в других клетках наблюдается относительно равномерное распределение FtsZ по клетке.
4. Кластеры FtsZ, наблюдаемые в клетках *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma gallisepticum*, имеют размеры, сопоставимые с размерами кластеров FtsZ *E. coli*.
5. Концентрация FtsZ в клетках *A. laidlawii* и *M. gallisepticum* сравнима с таковой в клетках *E. coli*.
6. Белки FtsZ *M. gallisepticum* и *A. laidlawii* взаимодействуют с белками, участвующими в клеточном метаболизме, фолдинге и деградации белков, но взаимодействие FtsZ микоплазм с гомологами известных белков деления выявить не удалось.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в научных журналах:

1. Ведяйкин А.Д., Полиновская В.С., Сабанцев А.В., Ходорковский М.А., Борхсениус С.Н., Вишняков И.Е. Влияние рекомбинантных белков FtsZ некоторых видов микоплазм на процесс деления клеток *Escherichia coli*. Цитология. 2017. Т. 59. № 5. С. 328-336.
2. Ведяйкин А.Д., Сабанцев А.В., Вишняков И.Е., Морозова Н.Е., Ходорковский М.А. Восстановление процесса деления в бактериальных клетках после индукции белка SulA, отвечающего за прекращение цитокинеза при SOS-ответе. Цитология. 2016. Т. 58. № 12. С. 930-935.

3. Ведяйкин А.Д., Вишняков И.Е., Полиновская В.С., Артамонова Т.О., Ходорковский М.А., Сабанцев А.В. Новые данные о структурах, формируемых белком FtsZ в клетках *Escherichia coli* в процессе деления, полученные методом локализационной микроскопии. Цитология. 2015. Т. 57. № 11. С. 823-830.
4. Vedyaykin A.D., Sabantsev A.V., Khodorkovskii M.A., Kayumov A.R., Vishnyakov I.E. Recombinant FtsZ Proteins from Mollicutes Interact with *Escherichia coli* Division Machinery. Bionanoscience. 2016. Т. 6. № 4. С. 443-446.
5. Vedyaykin A.D., Vishnyakov I.E., Polinovskaya V.S., Khodorkovskii M.A., Sabantsev A.V. New insights into FtsZ rearrangements during the cell division of *Escherichia coli* from single-molecule localization microscopy of fixed cells. MicrobiologyOpen. 2016. Т. 5. № 3. С. 378-386.

#### **Материалы конференций:**

1. Ponomareva E.V., Vishnyakov I.E., Morozova N.E., Polinovskaya V.S., Khodorkovskii M.A., Vedyaykin A.D. Super-resolution microscopy of living bacterial cells. В сборнике тезисов: Journal of Physics: Conference Series. 2017. Т. 917. С. 042014. 4th International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures "Saint Petersburg OPEN 2017". 3–6 April 2017, Saint-Petersburg, Russian Federation
2. Полиновская В.С., Ведяйкин А.Д., Вишняков И.Е., Сабанцев А.В., Ходорковский М.А. Визуализация белка деления микоплазм FtsZ при помощи флуоресцентной локализационной микроскопии. В сборнике: Неделя науки СПбПУ. Материалы научной конференции с международным участием. Лучшие доклады. 2016. С. 126-129.
3. Vedyaykin A.D., Sabantsev A.V., Morozova N.E., Polinovskaya V.S., Khodorkovskii M.A., Vishnyakov I.E. 3D super-resolution microscopy of bacterial division machinery. В сборнике тезисов: Journal of Physics: Conference Series. 2016. Т. 741. № 1. С. 012066. 3rd International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures (Saint Petersburg OPEN 2016). 28–30 March 2016, St. Petersburg, Russia
4. Vedyaykin A.D., Gorbunov V.V., Sabantsev A.V., Polinovskaya V.S., Melnikov A.S., Serdobintsev P.Y., Khodorkovskii M.A., Vishnyakov I.E. Multi-color localization microscopy of fixed cells as a promising tool to study organization of bacterial cytoskeleton. В сборнике тезисов: Journal of Physics: Conference Series. 2015. Т. 643. № 1. С. 012020. 2nd International School and Conference Saint-Petersburg OPEN on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures (SPbOPEN2015) 6–8 April 2015, St. Petersburg, Russia

5. Vishnyakov I.E., Vedyaykin A.D., Khodorkovskii M.A., Borchsenius S.N. The identification of a protein involved in formation of cytoskeleton-like structures in *Mycoplasma gallisepticum* cells. В сборнике тезисов: The FEBS Congress 2017 - Jerusalem, Israel, 2017.
6. Vedyaykin A.D., Vishnyakov I.E., Sabantsev A.V., Morozova N.E., Khodorkovskii M.A. Super-resolution fluorescence microscopy for investigation of bacterial cytoskeleton. В сборнике тезисов: Конференция ADFLIM, Россия, Сочи, Дагомыс, 4–8 октября 2016 г., 2016.
7. Ведяйкин А.Д., Полиновская В.С., Вишняков И.Е., Ходорковский М.А.. Субдифракционная микроскопия структур, формируемых белками FtsZ микоплазм. В сборнике тезисов: Вторая российская конференция с международным участием «Физика — наукам о жизни», Санкт-Петербург, 18–22 сентября 2017 г., 2017.
8. Полиновская В.С., Ведяйкин А.Д., Дробышева А.В., Иванов В.А., Вишняков И.Е.. Поиск белков-партнеров белка деления FtsZ в клетках *Mycoplasma gallisepticum* и *Acholeplasma laidlawii*. Сборник тезисов VI Молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН. 25–27 апреля 2018, Санкт-Петербург, Россия.
9. Vedyaykin A.D., Sabantsev A.V., Polinovskaya V.S., Pobegalov G.E., Khodorkovskii M.A., Vishnyakov I.E.. Multicolor super-resolution microscopy as a tool to study bacterial division machinery. В сборнике тезисов: EMBO|EMBL Symposium: Seeing is Believing at EMBL Heidelberg. 05—10.10.2015.
10. Vedyaykin A.D., Sabantsev A.V., Vishnyakov I.E., Morozova N. E., Polinovskaya V.S., Khodorkovskii M.A. Super-resolution microscopy utilized for investigation of bacterial cytoskeleton. В сборнике тезисов: EMBO Workshop: Bacterial cell division: Orchestrating the ring cycle. 14–17.09.2016. Prague, Czech Republic.
11. Polinovskaya V.S., Vedyaykin A.D., Vishnyakov I.E., Ivanov V.A., Khodorkovskii M.A. Super-resolution microscopy of Mollicutes cells. В сборнике тезисов: Journal of Physics: Conference Series. 2018. 1038, p. 012029. International Conference PhysicA.SPb/2017. 24–26 October 2017, Saint-Petersburg, Russian Federation.
12. Ведяйкин А.Д., Сабанцев А.В., Вишняков И.Е., Полиновская В.С., Ходорковский М.А. Изучение механизмов деления бактерий с использованием флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения. В сборнике тезисов: Зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии. 29 февраля - 5 марта 2016 года, Рощино, Россия.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит весь коллектив НИК «НаноБио», в особенности Егора Побегалова, Таню Зюбко и Анатолия Арсениева за интересное общение в стенах лаборатории и вне их. Спасибо Яне Федоровой, Маше Соколовой и Маше Якуниной за помощь в проведении моих первых «пипеточных» экспериментов, а также множество ценных рекомендаций, Иннокентию Вишнякову за помощь и плодотворное сотрудничество, а также за очень внимательное чтение диссертации, Татьяне Олеговне Артамоновой за помощь в проведении масс-спектрометрии, Вадиму Александровичу Иванову за иммунизацию кроликов, Сергею Вадимовичу Мурашову за практическую помощь, Константину Викторовичу Северинову за помощь в доступе к статьям, а также полезные и вредные советы, Елене Пономарёвой за оптимизм и за рисунки, Мише Метелеву, Гарольду Эриксону и Мигелю Висенте за предоставленные для работы штаммы. Спасибо всем тем, кого я забыл здесь поблагодарить!

Благодарю своих учителей и преподавателей, в особенности Наталью Викторовну Щемелеву, Ирину Динаровну Кан, Алексея Николаевича Скворцова, Надежду Константиновну Краснову, Александра Эпаминондовича Фотиади, Сергея Николаевича Гуляева, Игоря Михайловича Рогова, Платона Александровича Карасёва за то, что вложили в меня много знаний и частичку себя.

Благодарю своих родителей, а также родных и близких за поддержку и любовь!

Наконец, я хотел бы поблагодарить 3-х людей, без которых я вряд ли дошёл бы до написания этого документа.

Михаила Алексеевича Ходорковского благодарю за то, что наша лаборатория живёт и развивается, несмотря на обстоятельства и неприятности. Спасибо большое за возможность заниматься любимым делом! И за то, что всегда можно получить ценный совет!

Наталию Морозову благодарю за любовь, терпение и поддержку, за искренность, мотивацию, радость, за то, что ты – моя гордость и отрада!

Отдельное спасибо Антону Сабанцеву, за то, что заинтересовал, научил, а также за интересное общение!

Также благодарю Вас, что прочитали мою работу!

## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. Dyer. Tubulin and its prokaryotic homologue FtsZ: a structural and functional comparison. // *Sci Prog*, 2009. 92(Pt 2): p. 113-37.
2. D.P. Haeusser, W. Margolin. Splitsville: structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring. // *Nat Rev Microbiol*, 2016. 14(5): p. 305-19.
3. J. Lutkenhaus, S. Du. E. coli Cell Cycle Machinery. // *Subcell Biochem*, 2017. 84: p. 27-65.
4. H.P. Erickson, M. Osawa. FtsZ Constriction Force - Curved Protofilaments Bending Membranes. // *Subcell Biochem*, 2017. 84: p. 139-160.
5. M. Lluch-Senar, E. Querol, J. Pinol. Cell division in a minimal bacterium in the absence of ftsZ. // *Mol Microbiol*, 2010. 78(2): p. 278-89.
6. С.Н. Борхсениус, О.А. Чернова, В.М. Чернов, И.Е. Вишняков, *Микоплазмы в биологии и медицине начала XXI века*. 2016, СПб: Наука.
7. D. Panda, D. Bhattacharya, Q.H. Gao, P.M. Oza, H.Y. Lin, B. Hawkins, D.E. Hibbs, P.W. Groundwater. Identification of agents targeting FtsZ assembly. // *Future Med Chem*, 2016. 8(10): p. 1111-32.
8. A.D. Vedyaykin, I.E. Vishnyakov, V.S. Polinovskaya, M.A. Khodorkovskii, A.V. Sabantsev. New insights into FtsZ rearrangements during the cell division of *Escherichia coli* from single-molecule localization microscopy of fixed cells. // *Microbiologyopen*, 2016. 5(3): p. 378-86.
9. V.A. Ivanov, V.J. Fel. On Some Similarity between Membrane-Antigens of the Cell of Zajdela Hepatoma and Liver of Rats Subjected to a Single 4-Dimethylaminoazobenzene Injection. // *Neoplasma*, 1980. 27(6): p. 745-750.
10. E. Betzig, G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacino, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H.F. Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. // *Science*, 2006. 313(5793): p. 1642-5.
11. N. Olivier, D. Keller, P. Gonczy, S. Manley. Resolution doubling in 3D-STORM imaging through improved buffers. // *PLoS One*, 2013. 8(7): p. e69004.
12. A.D. Vedyaykin, A.V. Sabantsev, I.E. Vishnyakov, S.N. Borchsenius, Y.V. Fedorova, A.S. Melnikov, P.Y. Serdobintsev, M.A. Khodorkovskii. Localization microscopy study of FtsZ structures in *E. coli* cells during SOS-response. // 1st International School and Conference Saint-Petersburg Open 2014 on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures, 2014. 541.
13. M. Ovesny, P. Krizek, J. Borkovec, Z. Svindrych, G.M. Hagen. ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging. // *Bioinformatics*, 2014. 30(16): p. 2389-90.
14. C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. // *Nat Methods*, 2012. 9(7): p. 671-5.
15. M. Jacq, V. Adam, D. Bourgeois, C. Moriscot, A.-M. Di Guilmi, T. Vernet, C. Morlot. Remodeling of the Z-Ring Nanostructure during the *Streptococcus pneumoniae* Cell Cycle Revealed by Photoactivated Localization Microscopy. // *mBio*, 2015. 6(4): p. e01108-15.



16. R. Liu, Y. Liu, S. Liu, Y. Wang, K. Li, N. Li, D. Xu, Q. Zeng. Three-Dimensional Superresolution Imaging of the FtsZ Ring during Cell Division of the Cyanobacterium *Prochlorococcus*. // *mBio*, 2017. 8(6): p. e00657-17.
17. B. Söderström, A. Badrutdinov, H. Chan, U. Skoglund. Cell shape-independent FtsZ dynamics in synthetically remodeled bacterial cells. // *Nature Communications*, 2018. 9(1): p. 4323.
18. I.E. Vishnyakov, S.A. Levitskii, V.A. Manuvera, V.N. Lazarev, J.A. Ayala, V.A. Ivanov, E.S. Snigirevskaya, Y.Y. Komissarchik, S.N. Borchsenius. The identification and characterization of IbpA, a novel alpha-crystallin-type heat shock protein from mycoplasma. // *Cell Stress Chaperones*, 2012. 17(2): p. 171-80.
19. A. Kayumov, A. Heinrich, K. Fedorova, O. Ilinskaya, K. Forchhammer. Interaction of the general transcription factor TnrA with the PII-like protein GlnK and glutamine synthetase in *Bacillus subtilis*. // *FEBS J*, 2011. 278(10): p. 1779-89.
20. D. Lavysh, M. Sokolova, L. Minakhin, M. Yakunina, T. Artamonova, S. Kozyavkin, K.S. Makarova, E.V. Koonin, K. Severinov. The genome of AR9, a giant transducing *Bacillus* phage encoding two multisubunit RNA polymerases. // *Virology*, 2016. 495: p. 185-96.
21. *STRING Database*. 2018 [cited 2018 20.12.2018]; Available from: <https://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=wVLMpYbocQGN>.
22. A. Burgert, S. Letschert, S. Doose, M. Sauer. Artifacts in single-molecule localization microscopy. // *Histochemistry and Cell Biology*, 2015. 144(2): p. 123-131.
23. E.V. Ponomareva, I.E. Vishnyakov, N.E. Morozova, V.S. Polinovskaya, M.A. Khodorkovskii, A.D. Vedyaykin. Super-resolution microscopy of living bacterial cells. // 4th International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures (Saint Petersburg Open 2017), 2017. 917.
24. J. Buss, C. Coltharp, T. Huang, C. Pohlmeier, S.C. Wang, C. Hatem, J. Xiao. In vivo organization of the FtsZ-ring by ZapA and ZapB revealed by quantitative super-resolution microscopy. // *Mol Microbiol*, 2013. 89(6): p. 1099-120.
25. J. Buss, C. Coltharp, G. Shtengel, X. Yang, H. Hess, J. Xiao. A multi-layered protein network stabilizes the *Escherichia coli* FtsZ-ring and modulates constriction dynamics. // *PLoS Genet*, 2015. 11(4): p. e1005128.
26. M. Jacq, V. Adam, D. Bourgeois, C. Moriscot, A.M. Di Guilmi, T. Vernet, C. Morlot. Remodeling of the Z-Ring Nanostructure during the *Streptococcus pneumoniae* Cell Cycle Revealed by Photoactivated Localization Microscopy. // *MBio*, 2015. 6(4).
27. A.D. Vedyaykin, I.E. Vishnyakov, V.S. Polinovskaya, M.A. Khodorkovskii, A.V. Sabantsev. New insights into FtsZ rearrangements during the cell division of *Escherichia coli* from single-molecule localization microscopy of fixed cells. // *Microbiologyopen*, 2016. 5(3): p. 378-386.
28. J.F. Lutkenhaus. Coupling of DNA replication and cell division: sulB is an allele of ftsZ. // *J Bacteriol*, 1983. 154(3): p. 1339-46.
29. Y. Chen, S.L. Milam, H.P. Erickson. SulA inhibits assembly of FtsZ by a simple sequestration mechanism. // *Biochemistry*, 2012. 51(14): p. 3100-9.