

УДК [579.6:576.348].086.3

**Расулов М.М.<sup>1</sup>, Снисаренко Т.А.<sup>2</sup>, Кизликов И.Г.<sup>1</sup>**<sup>1</sup> ГНЦ РФ «ГосНИИ химии и технологии

элементоорганических соединений», г. Москва

<sup>2</sup> Московский государственный областной университет

## ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЦИТОСКЕЛЕТА БАКТЕРИЙ (ОБЗОР)

*Аннотация.* В обзорной статье приведены сведения о современном состоянии исследований по визуализации строения бактерий. Показаны преимущества и недостатки оптических ловушек. Так, до сих пор отсутствуют однозначные данные о структурах, формируемых белком FtsZ в клетках микоплазм. Иммуноэлектронная микроскопия не смогла дать однозначный ответ на этот вопрос, в связи с этим использование локализационной микроскопии для исследования этих структур должно принести уникальные данные и расширить наше понимание функционирования FtsZ в клетках микоплазм. Поэтому метод иммунофлуоресцентной локализационной микроскопии прокариотических клеток откроет совершенно новые возможности для исследования структуры прокариотических организмов, использование генной инженерии применительно к которым затруднено (как в случае с микоплазмами), с субдифракционным разрешением. Этот метод впоследствии может быть применен к различным организмам и структурам в них.

*Ключевые слова:* микоплазма, цитоскелет, клеточные мембраны, локализационная микроскопия.

**M. Rasulov<sup>1</sup>, T. Snisarenko<sup>2</sup>, I. Kyzlikov<sup>1</sup>**<sup>1</sup> State Scientific Center of the Russian Federation "State Research Institute for Chemistry and Technology of Organoelement Compounds" (Moscow, Russia)<sup>2</sup> Moscow State Regional University (Moscow, Russia)

## STUDY OF POSSIBILITY OF BACTERIA CYTOSKELETON IMAGING (REVIEW)

*Abstract.* The review presents the data on the state of the art of bacteria structure imaging. Advantages and drawbacks of optical traps are demonstrated. Thus, till now unambiguous data on the structures formed by FtsZ albumin in mycoplasma cells have been absent. Immunoelectron microscopy could not give a definite answer to this question. Therefore an employment of microscopy to study the localization of these structures should bring unique data and expand our understanding of FtsZ functioning in mycoplasma cells. Consequently, immunofluorescence localization microscopy of procariotic cells will open entirely new possibilities to investigate the structure of procariotic organisms, for which the application of genetic engineering is hindered (as in the case of mycoplasmas), with sub-diffraction resolution. In the future this method may be applied to various organisms and their structures.

*Keywords:* mycoplasma, cytoskeleton, cell membranes, localization microscopy.

Бактерии *Mycoplasma hominis* не имеют клеточной стенки и являются одним из самых малых по размеру и объему генома живых организмов, известных науке. Они являются облигатными клеточными паразитами и способны вызывать целый ряд заболеваний у человека, среди которых артрит [10; 30], менингит [21; 36-37], простатит [7] и другие [13; 16; 35]. Микоплазменная инфекция часто является причиной послеоперационных осложнений [20; 39], а в некоторых случаях может приводить и к смертельному исходу [24]. Также микоплазмы часто являются причиной воспалительных заболеваний мочеполовой системы [40] и могут являться причиной репродуктивных проблем, в том числе бесплодия [1; 29]. Кроме того, имеются данные о том, что микоплазмы могут вызывать злокачественное перерождение клеток, в том числе приводящее к раку простаты [3; 26-27; 31], а также придавать раковым клеткам устойчивость к химиотерапии [18]. При этом отсутствие клеточной стенки делает микоплазмы невосприимчивыми к целому ряду антибиотиков.

Понимание молекулярных механизмов функционирования клеток *Mycoplasma hominis*, в том числе процесса деления и поддержания формы клетки, может позволить найти мишени для создания новых антибиотиков, эффективных против этих бактерий. Кроме того, такое исследование имеет безусловный фундаментальный интерес, так как микоплазмы являются наиболее простым организмом, известным на сегодняшний день, в связи с чем они являются идеальным объектом для исследования наиболее фундаментальных клеточных процессов,

в том числе деления и поддержания формы клетки. Инфекция эукариотических клеток микоплазмами также представляет серьезную проблему при их культивировании в научных лабораториях по всему миру, снижая качество получаемых результатов и приводя к артефактам [2; 34]. Более полное понимание жизнедеятельности этих бактерий приблизит решение и этой проблемы.

Долгое время считалось, что бактериальные клетки не имеют цитоскелета. Однако в начале 1990-х гг. эта точка зрения была поставлена под сомнение, когда гомологи тубулина (белки FtsZ) были найдены у целого ряда бактерий [4; 5]. Эти белки, подобно тубулинам эукариот, в присутствии ГТФ оказались способны к полимеризации *in vitro* с образованием филаментов [25]. Было показано, что белки FtsZ формируют кольцевую структуру (Z-кольцо), играющую ключевую роль в делении прокариотических клеток [23]. Гены FtsZ найдены у представителей всех групп эубактерий, включая микоплазмы (Mollicutes), у нескольких архебактерий (Archaea), а также в хлоропластах растений [6]. Однако при этом обнаружены и исключения. Например, гены FtsZ не выявлены в полностью секвенированных геномах внутриклеточного паразита *Chlamydia trachomatis* [33], архебактерии *Aeropyrum pernix* [19] и уrogenитальной микоплазмы *Ureaplasma urealyticum* (parvum) [11]. Основная функция белка FtsZ в клетке – участие в цитокинезе [5]. Предполагают, что кольцо сжатия, или Z-кольцо, в делящихся клетках бактерий формируется за счет полимеризации FtsZ. В связи с отсутствием у микоплазм клеточной

стенки поддержание формы клетки также является чрезвычайно важной задачей, ключевую роль в решении которой может играть белок FtsZ. Данный белок может в связи с этим служить чрезвычайно перспективной мишенью для создания специфических ингибиторов и, соответственно, новых антибиотиков. В связи с этим структуры, формируемые белком FtsZв клетках *M. hominis* на различных стадиях клеточного цикла, представляют большой фундаментальный и практический интерес.

Оптическая ловушка эффективно используется в экспериментах по исследованию механических свойств мембран. Известно, что при прикладывании достаточной силы из мембраны можно вытянуть так называемую мембранную тубулярную структуру (МТС) – тонкую мембранную трубку цилиндрической формы. Первые эксперименты по втягиванию МТС проводились на искусственно созданных человеком фосфолипидных везикулах и позволяли измерять вязкость липидного бислоя мембраны [38].

Использование оптической ловушки в качестве главного инструмента измерений позволило с высокой точностью измерять силу, необходимую для вытягивания трубки из мембраны. Для создания мембранной ТС, в экспериментах к внешней мембране клетки за счет специфического или неспецифического взаимодействия прикрепляется микросфера, которая захватывается лазером оптической ловушки. Затем, за счет силы, генерируемой лазером, микросфера отделяется от клетки, оттягивая за собой липидный мембранный бислой, в результате чего между шариком и клеткой вытягивается тон-

кая мембранная трубка – МТС. За счет детектирования смещения микросферы из ловушки измеряется сила, действующую на микросферу со стороны МТС (силу натяжения МТС). Зависимость силы от удлинения МТС носит линейный характер для прокариотических клеток, а для эукариотических обладает пиком в начале удлинения, а затем падает до постоянного значения, по мере удлинения мембранной трубки [14; 17].

Такие мембранные трубки, помимо искусственно созданных мембранных пузырьков, также были успешно извлечены из живых эукариотических клеток (красные клетки крови [15], нейронные конусы роста [8] и наружные волосковые клетки внутреннего уха [22]), и прокариотических клеток (*E.coli*) [17]. Механические свойства клеточных мембран играют важную роль во многих клеточных процессах, среди которых деление, движение [9], эндо- и экзоцитоз [28], реакция на осмотический стресс [32] и другие. Кроме того, исследователям удалось связать изменения натяжения мембраны с такими важными с практической точки зрения процессами, как дифференциация стволовых клеток и развитие способности к метастазированию у раковых клеток [12]. В связи с этим биофизика клеточных мембран является чрезвычайно перспективной областью исследований как с фундаментальной, так и с практической точек зрения.

Разработана методика измерения механических свойств клеточных мембран при помощи оптической ловушки за счет образования МТС. Эта методика позволяет измерять натяжение и вязкость мембраны, однако она может быть существенно улучшена за счет

измерения жесткости мембраны на изгиб. Как показывают теоретические выкладки [14], этот параметр может быть получен исходя из радиуса МТС. Однако разрешение оптического микроскопа не позволяет напрямую измерить этот параметр (радиус МТС составляет не более 300 нм), в связи с чем требуются специальные методы его оценки. Для этого могут быть использованы изображения МТС в режиме дифференциального интерференционного контраста (ДИК), в котором интенсивность изображения определяется градиентом оптической толщины образца.

Характер метода ДИК не позволяет отличить изменения интенсивности, связанные с поглощением света и градиентом оптической плотности, однако эта информация может быть получена из изображения объекта в режиме светлого поля. Кроме того, поглощение МТС пренебрежимо мало в связи с малыми размерами и низким коэффициентом поглощения. Для осуществления подобных количественных измерений необходимо осуществить калибровку, для чего используют микросферы из полистирола и стекла различных размеров. В ходе работ будет создан алгоритм обработки изображений объекта, позволяющий определить оптическую толщину объекта. Имеющиеся в литературе данные позволяют сделать обоснованные предположения о коэффициенте преломления вещества, составляющего МТС, что позволит оценить по оптической толщине истинную толщину МТС и сделать выводы о жесткости клеточной мембраны на изгиб. Разработка такого метода будет полезна не только при исследовании искусственно сформированных МТС, но и также

при исследовании естественных мембранных образований.

До сих пор отсутствуют однозначные данные о структурах, формируемых белком FtsZ в клетках микоплазм. Иммуноэлектронная микроскопия не смогла дать однозначный ответ на этот вопрос, в связи с этим использование локализационной микроскопии для исследования этих структур должно принести уникальные данные и расширить наше понимание функционирования FtsZ в клетках микоплазм.

Кроме того, метод иммунофлуоресцентной локализационной микроскопии прокариотических клеток, откроет совершенно новые возможности для исследования структуры прокариотических организмов, использование генной инженерии применительно к которым затруднено (как в случае с микоплазмами), с субдифракционным разрешением. Этот метод впоследствии может быть применен к различным организмам и структурам в них, для этого необходимо лишь получение соответствующих первичных антител.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Akhvlediani L. Prevalence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealiticum* in pregnant and women with reproductive problems // *Georgian Med. News.* – 2012. – Vol. 208-209. – P. 59-63.
2. Aldecoa-Otalora E. Unexpected presence of mycoplasma probes on human microarrays / E. Aldecoa-Otalora, W.B. Langdon, P. Cunningham et al. // *Biotechniques.* – 2009. – Vol. 47(6). – P. 1013-5.
3. Barykova Y.A. Association of *Mycoplasma hominis* infection with prostate cancer / Y.A. Barykova, D.Y. Logunov, M.M. Shmarov et al. // *Oncotarget.* – 2011. – Vol. 2(4). – P. 289-97.

4. Beall B., Lutkenhaus J. FtsZ in *Bacillus subtilis* is required for vegetative septation and for asymmetric septation during sporulation // *Genes Dev.* – 1991. – Vol. 5(3). – P. 447-55.
5. Bi E.F., Lutkenhaus J. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli* // *Nature.* – 1991. – Vol. 354(6349). – P. 161-164.
6. Bramhill D. Bacterial cell division // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 1997. – Vol. 13. – P. 395-424.
7. Brunner H., Weidner W., Schiefer H.G. Studies on the role of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in prostatitis // *J. Infect. Dis.* – 1983. – Vol. 147(5). – P. 807-13.
8. Dai J., Sheetz M.P. Axon membrane flows from the growth cone to the cell body // *Cell.* – 1995. – Vol. 83(5). – P. 693-701.
9. Dai J., Sheetz M.P. Mechanical properties of neuronal growth cone membranes studied by tether formation with laser optical tweezers // *Biophys. J.* – 1995. – Vol. 68(3). – P. 988-96.
10. Galimard S. Severe postoperative *Mycoplasma hominis* arthritis revealing hypogammaglobulinemia / S. Galimard, V. Zeller, N. Desplaces et al. // *Med. Mal. Infect.* – 2012. – Vol. 42(7). – P. 328-30.
11. Glass J.I. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum* / J.I. Glass, E.J. Lefkowitz, J.S. Glass et al. // *Nature.* – 2000. – Vol. 407(6805). – P. 757-62.
12. Guck J. Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence / J. Guck, S. Schinkinger, B. Lincoln et al. // *Biophys. J.* – 2005. – Vol. 88(5). – P. 3689-98.
13. Henao-Martinez A.F. *Mycoplasma hominis* brain abscess presenting after a head trauma: a case report / A.F. Henao-Martinez, H. Young, J.J. Nardi-Korver et al. // *J. Med. Case Rep.* – 2012. – Vol. 6(1). – P. 253.
14. Hochmuth F.M. Deformation and flow of membrane into tethers extracted from neuronal growth cones / F.M. Hochmuth, J.Y. Shao, J. Dai et al. // *Biophys. J.* – 1996. – Vol. 70(1). – P. 358-69.
15. Hochmuth R.M., Marcus W.D. Membrane tethers formed from blood cells with available area and determination of their adhesion energy // *Biophys. J.* – 2002. – Vol. 82(6). – P. 2964-9.
16. Jamil H.A. Late-onset prosthetic valve endocarditis caused by *Mycoplasma hominis*, diagnosed using broad-range bacterial PCR / H.A. Jamil, J.A. Sandoe, D. Gascoyne-Binzi et al. // *J. Med. Microbiol.* – 2012. – Vol. 61(Pt. 2). – P. 300-301.
17. Jauffred L., Callisen T.H., Oddershede L.B. Visco-elastic membrane tethers extracted from *Escherichia coli* by optical tweezers // *Biophys. J.* – 2007. – Vol. 93(11). – P. 4068-75.
18. Jette L. Resistance of colorectal cancer cells to 5-FUdR and 5-FU caused by *Mycoplasma* infection / L. Jette, S. Bissoon-Haqqani, B. Le Francois et al. // *Anticancer Res.* – 2008. – Vol. 28(4B). – P. 2175-80.
19. Kawarabayasi Y. Complete genome sequence of an aerobic hyperthermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1 / Y. Kawarabayasi, Y. Hino, H. Horikawa et al. // *DNA Res.* – 1999. – Vol. 6(2). – P. 83-101, 145-52.
20. Koshiba H. Hematoma and abscess formation caused by *Mycoplasma hominis* following cesarean section / H. Koshiba, A. Koshiba, Y. Daimon et al. // *Int. J. Womens Health.* – 2011. – № 3. – P. 15-18.
21. Lee E.H. Diagnosis and antimicrobial therapy of *Mycoplasma hominis* meningitis in adults / E.H. Lee, H.L. Winter, J.M. van Dijl et al. // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2012. – Vol. 302(7-8). – P. 289-92.
22. Li Z. Membrane tether formation from outer hair cells with optical tweezers / Z. Li, B. Anvari, M. Takashima et al. // *Biophys. J.* – 2002. – Vol. 82(3). – P. 1386-95.

23. Lutkenhaus J., Addinall S.G. Bacterial cell division and the Z ring // *Annu. Rev. Biochem.* – 1997. – Vol. 66. – P. 93-116.
24. MacKenzie C.R. Fatal outcome of a disseminated dual infection with drug-resistant *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma parvum* originating from a septic arthritis in an immunocompromised patient / C.R. MacKenzie, N. Nischik, R. Kram et al. // *Int. J. Infect. Dis.* – 2010. – 14 Suppl 1. – P. e307-309.
25. Mukherjee A., Lutkenhaus J. Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments // *J. Bacteriol.* – 1994. – Vol. 176(9). – P. 2754-8.
26. Namiki K. Persistent exposure to *Mycoplasma* induces malignant transformation of human prostate cells / K. Namiki, S. Goodison, S. Porvasnik et al. // *PLoS One.* – 2009. – Vol. 4(9). – P. e6872.
27. Ning J.Y., Shou C.C. *Mycoplasma* infection and cancer // *Ai Zheng.* – 2004. – Vol. 23(5). – P. 602-604.
28. Raucher D., Sheetz M.P. Membrane expansion increases endocytosis rate during mitosis // *J. Cell Biol.* – 1999. – Vol. 144(3). – P. 497-506.
29. Salmeri M. Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infection in unselected infertile men / M. Salmeri, D. Valenti, S. La Vignera et al. // *J. Chemother.* – 2012. – Vol. 24(2). – P. 81-86.
30. Sato H. Hypogammaglobulinemic patient with polyarthritis mimicking rheumatoid arthritis finally diagnosed as septic arthritis caused by *Mycoplasma hominis* / H. Sato, N. Iino, R. Ohashi et al. // *Intern. Med.* – 2012. – Vol. 51(4). – P. 425-429.
31. Scaggiante B. Prostate-tumor-inducing gene-1 analysis in human prostate cancer cells and tissue in relation to *Mycoplasma* infection / B. Scaggiante, S. Bonin, L. Cristiano et al. // *Cancer Invest.* – 2008. – Vol. 26(8). – P. 800-808.
32. Sinha B. Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae / B. Sinha, D. Koster, R. Ruez et al. // *Cell.* – 2011. – Vol. 144(3). – P. 402-13.
33. Stephens R.S. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis* / R.S. Stephens, S. Kalman, C. Lammel et al. // *Science.* – 1998. – Vol. 282(5389). – P. 754-759.
34. Uphoff C.C., Drexler H.G. Eradication of *Mycoplasma* contaminations // *Methods Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 946. – P. 15-26.
35. Vuorinen S., Tuuminen T. *Mycoplasma hominis* may cause soft tissue infections // *Duodecim.* – 2011. – Vol. 127(24). – P. 2661-5.
36. Watson L. *Mycoplasma hominis* Meningitis in a 24 Week Premature Neonate: Case Report and Short Literature Review / L. Watson, Y.M. Pang, S. Mitchell et al. // *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* – 2008. – Vol.13(4). – P. 251-254.
37. Watt K.M. Pharmacokinetics of moxifloxacin in an infant with *Mycoplasma hominis* meningitis / K.M. Watt, M.M. Massaro, B. Smith et al. // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2012. – Vol. 31(2). – P. 197-199.
38. Waugh R.E. Surface viscosity measurements from large bilayer vesicle tether formation. II. Experiments // *Biophys. J.* – 1982. – Vol. 38(1). – P. 29-37.
39. Yamaguchi M. Abscess formation due to *Mycoplasma hominis* infection after cesarean section / M. Yamaguchi, A. Kikuchi, K. Ohkusu et al. // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* – 2009. – Vol. 35(3). – P. 593-596.
40. Zhu C. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in Chinese women with genital infectious diseases / C. Zhu, J. Liu, Y. Ling et al. // *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* – 2012. – Vol. 78(3). – P. 406-407.