

ИНКАПСУЛИНЫ: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Обзор

© 2023 Н.С. Чмелюк^{1,2}, В.В. Ода¹, А.Н. Габашвили¹, М.А. Абакумов^{1,2*}

¹ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»,
119049 Москва, Россия; электронная почта: abakumov1988@gmail.com

² ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Минздрава России, 117977 Москва, Россия

Поступила в редакцию 16.09.2022

После доработки 04.11.2022

Принята к публикации 07.11.2022

В 1994 году был обнаружен новый класс прокариотических компартментов, получивших собирательное название «инкапсулины» или «нанокompартменты». Белки-протомеры оболочек инкапсулинов самоорганизуются с образованием икосаэдрических структур различных диаметров (24–42 нм). Внутри оболочек нанокompартментов могут быть инкапсулированы один или несколько грузовых белков, разнообразных по своим функциям. Кроме того, в нанокompартменты могут быть загружены ненативные грузовые белки, а поверхности оболочек возможно модифицировать при помощи различных соединений, что позволяет создавать системы направленной доставки препаратов, метки для оптической и МРТ-визуализации, а также использовать инкапсулины в качестве биореакторов. В настоящем обзоре описывается ряд подходов к применению инкапсулинов в различных областях науки, включая биомедицину и нанобиотехнологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: инкапсулины, самоорганизация, наноконтэйнерные системы, направленная доставка, генетические метки, отслеживание клеток.

DOI: 10.31857/S0320972523010037, EDN: PBIQDI

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что для поддержания гомеостаза у млекопитающих используются различные механизмы: например, транспорт железа в клетках осуществляется трансферринами, а его накопление, в том числе для защиты от оксидативного стресса, происходит за счет ферритинов; Na/K-АТФаза контролирует количество ионов натрия и калия внутри клетки. Практически все реакции в живых организмах протекают при участии различных ферментов, которые могут содержать в себе ионы таких металлов, как Fe, Zn, Cu и др., однако количество этих металлов в организме невелико, а их сильный избыток или недостаток при изменяющихся внешних факторах может приводить к разным тяжелым,

часто необратимым последствиям. Главными «депо» для избытка солей тяжелых металлов являются кровеносное русло и печень. Прокариотические клетки обычно лишены мембранных компартментов, характерных для эукариот, но вместо этого содержат множество белковых компартментов, способных накапливать большое количество молекул. Впервые особые белковые нанокompартменты, позднее названные инкапсулинами, были обнаружены в 1994 году в надосадочной жидкости культуры бактерий штамма *Brevibacterium linens*, проявлявших бактериостатическую активность в отношении различных штаммов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* и *Listeria* [1]. Впоследствии подобные белковые комплексы были идентифицированы в надосадочной жид-

Принятые сокращения: Bfr – бактериоферритин; CLP – пептид загрузки; DHFR – дигидрофолатредуктаза; DyP – пероксидаза, обесцвечивающая краситель; eMIONs – магнитные наночастицы оксида железа, продуцируемые инкапсулином; FLP – ферритиноподобный белок; FolB – фермент, отвечающий за синтез фолиевой кислоты; IMEF – железоминерализующий инкапсулин-ассоциированный белок Firmicute; miniSOG – мини-генератор синглетного кислорода; OVA – овалбумин; T – триангуляционное число.

* Адресат для корреспонденции.

кости культур *Mycobacterium tuberculosis* (*Мyc. tuberculosis*) [2] и *Thermotoga maritima* [3], причем оказалось, что эти структуры содержат в себе протеолитические ферменты. В ходе ряда исследований инкапсулины были обнаружены также у бактерий *Mycobacterium leprae*, *Streptomyces* и позднее — у *Quasibacillus thermotolerans* [4–9]. Однако в последующих исследованиях протеолитическая активность не была подтверждена, и на сегодняшний день считается, что инкапсулины выполняют по большей степени структурную функцию [10]. В середине 2000-х годов было установлено, что наблюдаемые структуры с высокой молекулярной массой представляют собой белковые капсидоподобные комплексы [10–12].

С течением времени исследования нанокompартментов были продолжены. Часть исследований была направлена на поиск новых белковых компартментов и изучение их свойств, а также выяснение физиологической роли инкапсулинов и их грузовых белков в естественном бактериальном «контексте». Другие работы были посвящены применению таких структур в качестве биореакторов, систем доставки препаратов, а также эндогенных меток [13–20]. Биоинформационный анализ секвенированных геномов позволил выявить тысячи систем нанокompартментов как в бактериях, так и в археях с огромным разнообразием грузовых белков [19, 21–24]. Позднее на основании

проведенных исследований была создана база данных бактериальных микрокомпартментов, включающая в себя также описание и различные характеристики инкапсулинов [25].

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ОБОЛОЧКИ НАНОКОМПАРТМЕНТОВ

Оболочки инкапсулинов представляют собой икосаэдрические (12 вершин, 20 граней, 30 ребер) комплексы, образующиеся путем самосборки белков-протомеров, гомологичных по своей структуре gp5 — основному капсидному белку фага НК97 [26]. Как и в случае вирусных капсидов, белки оболочки инкапсулинов могут собираться в икосаэдры различных размеров. На сегодняшний день известно 3 различных типа инкапсулинов, которые характеризуют с помощью триангуляционного числа (Т), представляющего собой частное от деления числа протомеров в оболочке инкапсулина на 60 [27]. Например, инкапсулинами с $T = 1$ являются *T. maritima* [10], *Мyc. tuberculosis* [22] и *Rhodococcus jostii* [21] (диаметр оболочки 20–24 нм, оболочка состоит из 60 идентичных субъединиц белка-протомера). В качестве примера инкапсулинов с $T = 3$ можно привести нанокompартменты бактерий *Pyrococcus furiosus* [12], *Kuenenia stuttgartiensis* [28, 29] и *Mycobacterium xanthus*

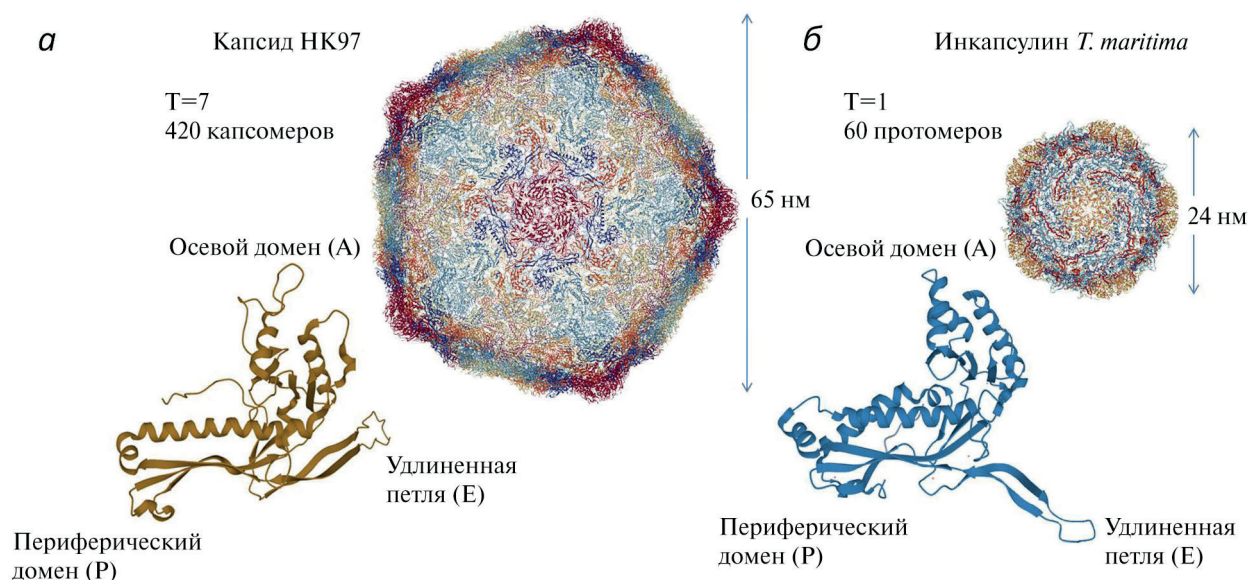


Рис. 1. Структура белкового капсида бактериофага НК97 (а). Капсид имеет диаметр 65 нм и состоит из 420 белковых-капсомеров (PDB-ID 2FT1). Ниже приведена структура отдельного капсомера (gp5). Структура оболочки инкапсулина бактерии *T. maritima* (б). Инкапсулин *T. maritima* образован 60 идентичными белками-протомерами, диаметр белковой оболочки составляет 24 нм (PDB-ID 3DKT). Ниже приведено строение белка-протомера оболочки инкапсулина *T. maritima*. Как в структуре белка-протомера оболочки инкапсулина, так и в структуре капсомера gp5 имеется 3 консервативных домена: периферический домен (Р), осевой домен (А) и удлиненная петля (Е)

(*Myx. xanthus*) [23] (диаметр оболочки 30–32 нм, 180 протомеров). Наконец, самыми крупными инкапсулинами, обнаруженными на сегодняшний день, являются инкапсулины бактерии *Q. thermotolerans* с $T = 4$ (диаметр оболочки 42 нм, 240 протомеров) [30].

В структуре белка-протомера оболочки инкапсулина, подобно капсомеру gp5 фага НК97, имеется 3 консервативных домена. Первым является периферический домен (Р), содержащий несколько α -спиралей и β -складок, второй — осевой домен (А), который также имеет несколько α -спиралей и β -складок и образует ось симметрии пятого порядка, и, наконец, третий — удлинённая петля (Е), которая важна для сборки инкапсулина и определяет симметрию всего комплекса [4, 10, 13, 27, 30]. Из рис. 1 хорошо видно, насколько гомологично строение капсомера фага НК97 (рис. 1, а) и белка-протомера оболочки инкапсулина *T. maritima* (рис. 1, б).

Однако несмотря на высокую структурную гомологию протомеров инкапсулинов и капсомеров фага НК97, гомология аминокислотных последовательностей в этих белках невелика. Таким образом, согласно классификации базы данных семейств белковых доменов Pfam, инкапсулины и НК97 являются членами одного и того же клана (CL0373), но разделяются на отдельные семейства (инкапсулины относятся к семейству PF04454, а бактериофаг НК97 — к PF05065) [31].

В местах соединения протомеров оболочек нанокompартментов имеются множественные поры, диаметр которых составляет 3–7 Å [10, 12]. Поры, вероятно, служат барьером проницаемости для более крупных молекул, позволяя проходить через оболочку небольшим молекулам и ионам. Например, низкомолекулярные субстраты инкапсулированных ферментов, такие как перекись водорода или двухвалентное железо, способны проходить через оболочку, в то время как белки и другие крупные молекулы — нет [16, 17, 21, 24]. В инкапсулинах присутствуют грузовые белки, обладающие каталитической функцией, что может указывать на избирательность транспорта субстрата через оболочку [10], при этом транспорт будет зависеть от типа инкапсулированного фермента [32]. Считается, что наиболее вероятные транспортные каналы расположены вдоль пор, образующихся в местах соединения пяти протомеров (так называемые 5-fold pores), поскольку эти поры являются самыми крупными [10, 30].

Недавно было показано, что поры могут различаться по своим электростатиче-

ским свойствам. Например, в инкапсулинах *T. maritima* поры в местах соединения пяти протомеров состоят из пяти остатков гистидина и имеют положительный заряд, а поры в местах соединения трех протомеров состоят из трех остатков фенилаланина и не имеют заряда [33]. А в инкапсулинах *Q. thermotolerans* все поры имеют отрицательный заряд, что позволяет транспортировать положительно заряженные субстраты [30]. Кроме того, известно, что внутренняя поверхность оболочки инкапсулина имеет много отрицательно заряженных аминокислотных остатков, что указывает на существование определенного пути к ферритиноподобному белку (FLP, ferritin-like protein) для ионов железа после попадания в инкапсулин [34].

Поры инкапсулина *Synechococcus elongatus* (*Syn. elongatus*) отличаются от *T. maritima* и имеют положительно заряженные аминокислотные остатки снаружи [32]. Это, возможно, некая адаптация, позволяющая транспортировать отрицательно заряженный депротонированный субстрат (L-цистеин). Поры инкапсулинов *Mycobacterium smegmatis* также имеют положительно заряженные гистидины, что позволяет селективно пропускать внутрь отрицательно заряженные субстраты для своего грузового белка — фермента пероксидазы [34].

Поры в оболочках инкапсулинов могут иметь не только различные заряды, но и разные конформации. Существует интересная работа, в которой были обнаружены две конформации пор у инкапсулина *Haliangium ochraceum*: закрытые и открытые [35]. Это позволяет предположить, что поры могут реагировать на внешние раздражители.

Также известно, что размер пор может быть искусственно увеличен. Например, в одном из исследований была описана возможность увеличения пор в оболочке инкапсулина *T. maritima* с 3 до 11 Å, то есть в 3,7 раза [36]. Авторы работы исследовали влияние аминокислотных замен и делеций в петле, формирующей пору в местах соединения пяти белков-протомеров, на структурную целостность оболочки инкапсулина. В инкапсулине *T. maritima* такая петля состоит из 13 а.о. Авторами было создано несколько мутантных штаммов *T. maritima*, имеющих различные замены и/или делеции аминокислот в этой петле. Согласно полученным данным, самым оптимальным мутантом оказался штамм с делецией 7 а.о. в петле. Диаметр пор в оболочке такого инкапсулина увеличился до 11 Å, при этом целостность оболочки не нарушилась.

ГРУЗОВЫЕ БЕЛКИ ИНКАПСУЛИНОВ

Впервые понимание механизма инкапсуляции грузового белка возникло при изучении кристаллической структуры инкапсулина *T. maritima*. Методом рентгеновской кристаллографии было установлено наличие небольшого количества дополнительной электронной плотности, относящейся к гидрофобному карману на люминальной поверхности оболочки инкапсулина, что соответствовало короткой (около 10 а.о.) С-концевой последовательности FLP, обнаруженной рядом с геном оболочки инкапсулина в геноме *T. maritima* [10]. Методом биоинформационного анализа было установлено, что эта С-концевая последовательность сохраняется у разных видов бактерий, в которых гены грузового белка и гены оболочки инкапсулина находятся вместе в предполагаемом опероне. Примеры таких «предсказанных» грузовых белков включают: FLP, DyP (пероксидаза, обесцвечивающая краситель, Dye-decolorizing peroxidase), гемеритрин и руберитрин [10, 19].

Было показано, что эта С-концевая последовательность, в дальнейшем названная пептидом загрузки (cargo loading peptide (CLP)), является достаточной для инкапсуляции грузового белка в оболочку нанокompартмента (рис. 2, а). Последовательность, кодирующая CLP, может находиться как на 3'-конце, так и на 5'-конце гена, кодирующего грузовой белок. Удаление последовательности CLP нарушает инкапсуляцию грузового белка, в то время как слияние CLP с С-концом гетерологичных белков, таких как зеленый флуоресцентный белок или люци-

фераза, приводит к их загрузке [10, 14, 16, 17, 19, 22]. Однако существуют альтернативные модели, описывающие взаимодействие между грузовыми белками и белками оболочки инкапсулина. В некоторых случаях, как, например, в инкапсулинах *P. furiosus*, CLP отсутствует, однако ген, кодирующий оболочку, слит с геном, кодирующим грузовой белок, в результате чего образуется один полипептид (рис. 2, б) [12]. В инкапсулинах, обнаруженных у бактерий типа Firmicute существует одна особенность: загрузка грузовых белков может происходить и через С-конец, и через N-конец CLP. Такой нанокompартмент содержит 2 грузовых белка: С-конец CLP связан с железоминерализующим инкапсулин-ассоциированным белком Firmicute IMEF (iron-mineralizing encapsulin-associated Firmicute protein), участвующим в минерализации железа, а депонирующий железо белок ферредоксин – с N-концом CLP [19].

Известно, что в одну оболочку нанокompартмента может быть инкапсулировано несколько грузовых белков. Например, показано, что в инкапсулинах бактерий *Myx. xanthus* присутствует 3 разных грузовых белка: EncB, EncC и EncD [23], а у *Myc. tuberculosis* присутствуют белки: Mt-DyP, Mt-BfrB (бактериоферритин) и Mt-FolB (фермент биосинтеза фолиевой кислоты) [22].

Еще одним важным вопросом, связанным с загрузкой, является доля, занимаемая грузовым белком в нанокompартменте. Каждый белок-протомер оболочки в инкапсулине имеет сайт связывания с CLP, но, очевидно, что количество груза ограничено объемом оболочки. При этом важно понимать, что стехиометрия

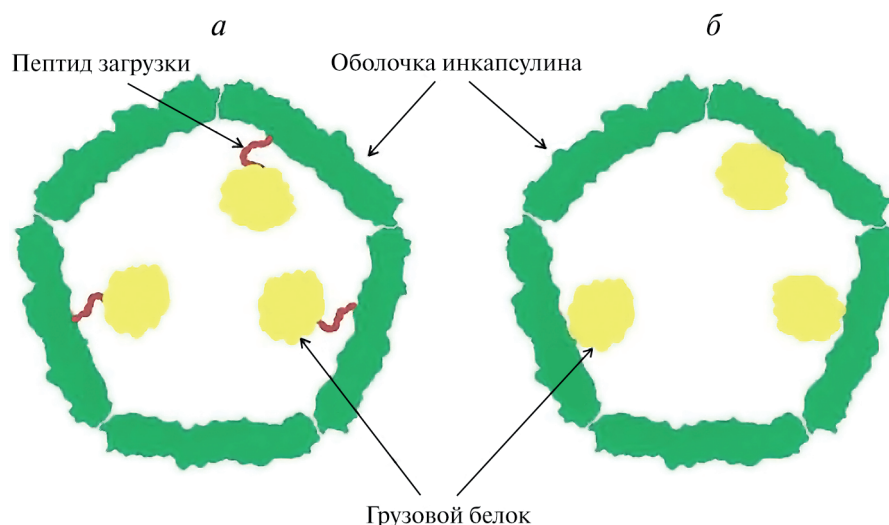


Рис. 2. Грузовой белок может быть инкапсулирован в оболочку нанокompартмента посредством пептида загрузки (а). В некоторых случаях ген, кодирующий грузовой белок, и ген, кодирующий оболочку инкапсулина, слиты, что сводит на нет необходимость в пептиде загрузки (б)

зависит не только от размера оболочки инкапсулина, но и от состояния олигомеризации грузового(ых) белка(ов). Работы по моделированию показали, что из-за возникновения стерических затруднений невозможно достичь соотношения груза и белка-протомера более, чем 1 : 1 [10]. В качестве примера здесь можно привести нанокompартмент *B. linens*, грузовым белком которого является уже упомянутый выше фермент DyP, собирающийся в гексамер

(тример димеров) диаметром 89 Å. Было предсказано, что стерические затруднения ограничат загрузку одним таким гексамером на нанокompартмент [10], а измерения методом нативной масс-спектрометрии подтвердили наличие 6 мономеров DyP в нанокompартменте с $T = 1$, что дает соотношение грузового белка к белку-протомеру 1 : 10 [37]. В таблице приведены данные о загрузке различных грузовых белков в нанокompартменты.

Загрузка нативных грузовых белков в различных инкапсулиновых системах

Инкапсулин (количество протомеров)	Грузовой белок (количество субъединиц)	Число загруженных субъединиц	Соотношение загруженного белка к количеству протомеров*	Метод оценки	Источники
<i>Rhodococcus jostii</i> (60)	DyP (6)	6	1 : 8,6**	спектроскопия в видимом диапазоне	[21]
<i>Brevibacterium linens</i> (60)	DyP (6)	6	1 : 10	нативная МС	[37]
		6	1 : 10	крио-ЭМ	[38]
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (60)	DyP (6)	6	1 : 10	ЭМ	[39]
		6 и 12	1 : 10 и 1 : 5	крио-ЭМ	[40]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (60)	DyP (6)	6	1 : 10	ЭМ	[22]
	FolB (4 или 8)	4 или 8	1 : 15 или 1 : 7,5		
	BfrB (24)	24	1 : 2		
<i>Pyrococcus furiosus</i> (180)	FLP (10)	180	1 : 1	—	[12]
<i>Thermotog maritima</i> (60)	FLP (10)	30, 40 и 50	1 : 2, 1 : 1,5 и 1 : 1,2	крио-ЭМ	[41]
<i>Haliangium ochraceum</i> (60)	FLP (10)	40	1 : 1,2	крио-ЭМ	[35]
<i>Mycococcus xanthus</i> (180)	EncB EncC EncD	36 EncB 92 EncC 47 EncD	1 : 1	SDS-PAGE	[23]
		86 ± 3 EncB 93 ± 9 EncC 50 ± 15 EncD	1 : 1		[42]
<i>Quasibacillus thermotolerans</i> (240)	IMEF (2)	240	1 : 1	SDS-PAGE	
		84	1 : 2,9	крио-ЭМ	[30]
<i>Bacillaceae bacterium</i> (180)	IMEF (2)	150	1 : 1,2	SDS-PAGE	[4]
	Fd (1)	10	1 : 18		
<i>Synechococcus elongatus</i> (60)	CyD (2)	1 или 2	1 : 30 или 1 : 15	крио-ЭМ	[32]

Примечание. Fd — ферродоксин; CyD — цистеиндисульфураса, ЭМ — электронная микроскопия, МС — масс-спектрометрия.

* Загрузку определяют как соотношение между количеством мономерных единиц грузового белка и количеством протомеров инкапсулиновой оболочки.

** Загрузка груза путем разборки и сборки инкапсулиновой оболочки в кислых условиях.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ НАНОКОМПАРТМЕНТОВ

О том, какую роль инкапсулины играют в процессах метаболизма бактерий и архей, известно не так много. На сегодняшний день наиболее информативные результаты получены в исследованиях инкапсулинов, содержащих FLP. Данные позволяют предположить, что нанокompартменты способны депонировать железо, снижая оксидативный стресс — ярким примером здесь являются бактерии *Q. thermotolerans*, в геноме которых отсутствуют ферритины [27]. В другой работе при исследовании клеток *Мух. xanthus* в условиях аминокислотного голодания было обнаружено, что экспрессия генов протомера оболочки инкапсулина (EncA) и трех его грузовых белков FLP (EncB, EncC и EncD) значительно повышалась [23]. Авторы выдвинули гипотезу о том, что инкапсулин может выступать в роли вторичной ферритиноподобной системы, имеющей большую емкость, и способной накапливать железо во время стресса при вынужденной «голодовке» или секвестрировать железо во время оксидативного стресса. Когда двухвалентное железо (Fe^{2+}) подвергается воздействию активных форм кислорода, происходит реакция Фентона, в которой Fe^{2+} окисляется до Fe^{3+} с образованием побочного продукта — гидроксильного радикала [43, 44], ферритины же защищают клетки от токсического действия, обусловленного этим продуктом. Например, в работе McNugh et al. [23] было продемонстрировано, что мутантный штамм *Мух. xanthus* с делецией в последовательности генов, кодирующих оболочки инкапсулинов, оказался более чувствителен к добавлению перекиси водорода, по сравнению с *Мух. xanthus* дикого типа. В условиях оксидативного стресса, вызванного инкубацией бактерий с 0,5 мМ раствором перекиси водорода в течение 6 часов, жизнеспособность мутантного штамма *Мух. xanthus* оказалась существенно ниже по сравнению с жизнеспособностью *Мух. xanthus* дикого типа (25% и 75% жизнеспособных бактерий соответственно). Такое же свойство есть и у *Мус. tuberculosis* [22]: каждый из трех грузовых белков, о которых уже было сказано ранее (BfrB, FolB и Dyp), в инкапсулинах *Мус. tuberculosis* обладает антиоксидантной активностью [45–48].

В дополнение к потенциальной роли в снижении оксидативного стресса, Dyp-содержащие инкапсулины также участвуют в катаболизме [21]. Например, мутантный штамм

бактерии *R. jostii* RNA1 с делецией гена, кодирующего Dyp, не способен к деградации лигнина [49], в то время как в бактериях штамма дикого типа катаболизм лигнина происходит активно. Исследования также показали, что активность комплекса инкапсулин-DypB в отношении деградации нитрированного лигнина в 8 раз выше по сравнению с неинкапсулированным ферментом DypB [21]. Увеличение ферментативной активности при инкапсуляции позволяет предположить, что нанокompартмент может действовать либо путем стабилизации грузового белка, либо путем увеличения локальной концентрации субстрата для фермента, тем самым усиливая ферментативную реакцию [50].

Например, предполагается, что для выполнения ферментативной функции такого грузового белка, как Dyp, инкапсуляция не требуется [10]. Однако наблюдения подтверждают гипотезу о том, что инкапсуляция позволяет увеличить стабильность и/или продолжительность жизни грузовых белков, например, путем повышения устойчивости к протеазам. К примеру, инкапсулины *T. maritima* крайне устойчивы к воздействию высокой температуры и денатурации [10, 17], а инкапсулины *B. linens* стабильны в крайне широком диапазоне pH [38]. Подобно капсидам вирусных фагов, оболочки нанокompартментов демонстрируют минимальную деградацию после обработки неспецифическими протеазами [16, 17]. Резистентность к протеазам также распространяется и на грузовые белки, например, люцифераза светлячка, упакованная в инкапсулины *Rhodococcus erythropolis* N771, не подвергалась деградации после обработки трипсином, в то время как неинкапсулированная люцифераза полностью деградировала [16].

Инкапсулины часто обнаруживаются в супернатанте бактериальной культуры [1, 2, 21], в связи с чем была выдвинута гипотеза, что нанокompартменты являются продуктом бактериальной секреции. Это было частично подтверждено в ходе наблюдения за локализацией инкапсулинов на мембранах клеток [2], однако такая локализация наблюдается далеко не у всех прокариот, например, нанокompартменты *Streptomyces griseus* находятся в цитоплазме [9]. Помимо этого, не существует известного механизма секреции интактного 24–42-нм белкового комплекса [51]. Принимая во внимание крайне высокие химическую стабильность и устойчивость к протеазам, более вероятно предположить, что инкапсулины накапливаются в надосадочной жидкости культуры после лизиса клеток [52].

ПРИМЕНЕНИЕ НАНОКОМПАРТМЕНТОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Суммируя все вышесказанное, инкапсулины — это особые белковые наночастицы, имеющие два основных преимущества. Во-первых, как и все наночастицы, инкапсулины обладают развитой поверхностью ($S_{уд.} \gg V_{уд.}$) и, что самое главное, имеют две поверхности — внутреннюю и внешнюю поверхности оболочки инкапсулина. Во-вторых, инкапсулины кодируются генетически (т.е. происходит их биосинтез) и поэтому могут быть получены в биологических системах со 100%-ной воспроизводимостью, чего нельзя достичь никакими физическими или химическими методами синтеза наночастиц любых составов. В отличие от химического и физического синтеза биосинтез более экономичен и, что немаловажно, безопасен для окружающей среды, поскольку в процессе биосинтеза не образуется токсичных побочных продуктов, которые необходимо утилизировать специальным образом.

Инкапсулины в качестве платформы для доставки лекарств. Известно, что за последнее десятилетие было разработано большое количество наноразмерных систем направленной доставки на основе мицелл [53, 54], липосом [55], неорганических [56] и полимерных [57] наночастиц, а также белковых компартментов [58, 59]. Все эти частицы с загруженными на них препаратами используются с целью увеличить эффективность доставки, уровень накопления препаратов в сравнении с неинкапсулированными лекарственными средствами, время циркуляции в кровотоке и снизить количество побочных эффектов [60]. Помимо этого, препараты для направленной доставки могут сыграть свою роль и в диагностике заболеваний путем взаимодействия со специфическими молекулярными мишенями, экспрессирующимися при той или иной патологии. Как уже упоминалось выше, инкапсулины — это крайне стабильные и прочные структуры, что позволяет применять их в качестве платформы для решения различных задач биомедицины.

Например, в одном из исследований [13] инкапсулины *T. maritima* были использованы в качестве системы направленной доставки зондов с флуорофором и терапевтического препарата. Оболочки нанокompартментов были модифицированы путем добавления на них SP94-пептида, специфически связывающегося с белком GRP78 (Glucose-regulated protein, 78 кДа), избыточно экспрессированным в различных опухолевых клетках, в том числе

в клетках линии HepG2 [61, 62]. Белок оболочки *T. maritima* (Encap) содержит два остатка цистеина (C123 и C197), C123 расположен на внешней поверхности Encap, что позволяет конъюгировать пептид SP94 и флуоресцентную метку (флуоресцеин) на поверхность оболочки инкапсулина. Таким образом, получившееся «наноустройство» было способно специфически связываться с клетками HepG2 и визуализировать их за счет присутствия флуорофора (рис. 3, а). В дальнейшем было показано, что в полученную конструкцию может быть загружен альдоксорубин (6-малеимидокапроил) гидразон из доксорубина, являющийся пролекарством и высвобождающийся при кислом pH внутри опухолевых клеток. Также была установлена дозозависимая цитотоксичность препарата в отношении клеток HepG2.

В работе Putri et al. [38] было обнаружено, что инкапсулины *B. linens*, загруженные TFP (teal fluorescent protein, бирюзовый флуоресцентный белок), успешно захватывались макрофагами мыши J774 в культуре *in vitro*, что приводило к флуоресценции клеток. При этом инкапсулины оставались в цитоплазме макрофагов и не попадали в ядро. Авторы работы отмечают, что выбранный модельный грузовой белок с флуоресцентными свойствами возможно заменить на терапевтический агент и использовать для его доставки технологию на основе инкапсулинов.

В одном из исследований [63] в оболочки инкапсулинов *T. maritima* был загружен биологический фотосенсибилизатор miniSOG (мини-генератор синглетного кислорода, mini-Singlet Oxygen Generator) путем слияния CLP с C-концом белка miniSOG. Получившийся фоточувствительный нанореактор был назван Enc-mSOG. Авторами была проведена оценка образования активных форм кислорода в клетках рака легкого A549 после облучения синим лазером. Предварительно клетки были инкубированы со свободным miniSOG либо с Enc-mSOG в течение 7 часов. В качестве контроля использовали клетки без добавления фотосенсибилизатора. Исследование показало, что наибольший уровень активных форм кислорода после облучения синим лазером наблюдался в клетках, инкубированных с Enc-mSOG [63]. Подобные системы были получены для направленной терапии HER2 положительной карциномы молочной железы [64]. В данной работе авторы также использовали в качестве платформы генетически кодируемую оболочку инкапсулина *T. maritima*, содержащую внутри себя фотосенсибилизатор miniSOG, за счет слияния C-конца белка с CLP. Поверхность

инкапсулина была насыщена DARPin9.29 (Designed Ankyrin repeat protein), способным селективно связываться с рецептором эпидермального фактора роста 2 (HER2), избыточно экспрессированным на поверхности клеток карциномы молочной железы. DARPin9.29 был клонирован в рамке считывания с геном инкапсулина *T. maritima* для получения слитого белка TmEnc-DARPin-STII. Полученная система показала высокую активность по отношению к выбранной модели рака и низкую специфичность по отношению к контрольным клеткам, не имеющим на своей поверхности белок HER2. Авторы исследования показали, что модифицированные инкапсулины способны специфически связываться с клетками линии SK-BR-3 (аденокарцинома молочной железы человека), интернализироваться внутрь и доставлять, таким образом, в клетки инкапсулированную форму miniSOG. После облучения клеток SK-BR-3 синим светом, авторы отмечают существенное снижение жизнеспособности клеток (до 48%), обусловленное действием miniSOG. Примечательно, что в качестве контрольных клеток в вышеописанной работе использовали мезенхимные стволовые клетки человека, и подобного драматического снижения жизнеспособности отмечено не было. Главным преимуществом данной системы является принципиальная возможность создания действующего препарата на основе инкапсулина из одной плазмиды, в которой были закодированы все три составляющие: носитель (оболочка инкапсулина), вектор (DARPin9.29) для доставки и действующее вещество (miniSOG).

Системы доставки на основе инкапсулинов также нашли применение в иммунотерапии рака. Например, в одном из исследований [18] инкапсулины *T. maritima* использовали в качестве наноконтейнеров для доставки к дендритным клеткам антигена (OT-1-пептида), представляющего собой эпитоп белка OVA (овальбумин). Презентация OT-1-пептида дендритными клетками приводит к активации Т-клеточного иммунного ответа с образованием OT-1-специфических цитотоксических CD8 Т-лимфоцитов. У мышей, на *in vivo* модели подкожных опухолей, полученных путем имплантации трансгенных клеток меланомы мыши B16 с экспрессией OT-1 (B16-OVA), было продемонстрировано, что вакцинация мышей при помощи инкапсулинов, содержащих OT-1, существенно препятствовала развитию опухолей. Кроме того, было показано, что опухоли обширно инфильтрированы CD8 Т-клетками.

Кроме того, было продемонстрировано что инкапсулины *T. maritima* могут быть ге-

нетически модифицированы таким образом, чтобы экспрессировать на своей поверхности пептид, связывающий Fc-домен IgG (IgG Fc domain-binding peptide; FcBP) [65], имеющий высокую аффинность к Fc-фрагменту иммуноглобулина G кролика [66]. При помощи методов поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени и пьезоэлектрического микровзвешивания было показано, что FcBP действительно присутствует на внешней поверхности инкапсулина и доступен для связывания Fc IgG кролика. Полученная векторная конструкция была способна специфически связываться с клетками линии SCC-7 (плоскоклеточная карцинома мыши). Moon et al. [65] предполагают, что полученная конструкция может быть использована в качестве наноплатформы при разработке многофункциональной системы для тераностики плоскоклеточной карциномы.

Также было показано, что поверхность оболочки инкапсулина бактерии *R. erythropolis* N771, о которой уже шла речь выше, может быть успешно покрыта полиэтиленгликолем (ПЭГ). Хорошо известно, что ПЭГ является биосовместимым модификатором носителей лекарственных средств. Его присутствие затрудняет распознавание носителей клетками моноцитарно-макрофагальной системы, а также снижает агрегацию. Кроме того, авторы исследования показали, что ПЭГилирование не препятствует самосборке нанокompартмента [20].

Инкапсулины в качестве платформы для создания вакцин. Ни для кого не секрет, что разработка новых безопасных вакцин является одной из важнейших задач человечества. Инкапсулины благодаря их возможности одновременного синтеза как протомеров инкапсулина, так и других белков могут быть важной платформой для создания вакцин. Например, имеется интересная работа, посвященная использованию инкапсулинов *T. maritima* в качестве носителя эктодомена белка M2 вируса гриппа А (M2e-эпитоп) [67] (рис. 3, б). Белок M2 формирует ионные каналы на поверхности вириона и является необходимым для транспорта вирусных рибонуклеопротеиновых комплексов в цитоплазму клетки-носителя. Его аминокислотная последовательность крайне консервативна, а иммуногенность в процессе природной инфекции достаточно низка [68]. Эти свойства делают M2e хорошим кандидатом для создания вакцины широкого спектра действия. В работе было продемонстрировано присутствие специфических антител к M2e-эпитопу в сыворотке мышей после иммунизации полученными конструкциями.

Инкапсуляция флуорофоров. Фотопереключаемые флуорофоры и, в частности, спиропираны представляют собой важный инструмент, применяемый в микроскопии сверхвысокого разрешения. Сам процесс фотопереключения метки необходим для того, чтобы стало возможным картирование флуоресцентных точек, достигающееся путем стохастической активации некоторого количества флуорофоров в определенный момент времени, в то время как остальные флуорофоры «выключены». Затем изображения сверхвысокого разрешения могут быть реконструированы из множества таких полученных флуоресцентных изображений. Кроме того, возможность «включения» и «выключения» флуоресценции может оказаться полезной, чтобы избежать перекрытия флуоресцентных сигналов в присутствии различных меченых структур. Инкапсулины могут быть модифицированы с помощью фотопереключаемых флуорофоров [69], в частности, инкапсулин *B. linens* был модифицирован по карбодиимидному методу флуорофорами на основе спиропиранов — органических соединений, обладающих фотохромными свойствами. При облучении ультрафиолетовым и видимым светом спиропираны способны обратимо переключаться между своим флуоресцентным фотоизомером мероцианином и безызлучательным изомером, что позволяет «включать» и «выключать» флуоресценцию [70] (рис. 3, в). Очень важным здесь является то, что инкапсулины сохраняли свою структурную целостность как минимум в течение 5 циклов фотопереключения.

Накопление неорганических наночастиц в инкапсулинах. Особо стоит отметить возможность контролируемой «разборки» инкапсулинов на белковые субъединицы при добавлении кислоты с загрузкой грузового белка интереса за счет аффинности к тем или иным белковым последовательностям оболочки с последующим восстановлением структуры нанокompартмента при возвращении pH к нейтральному. Таким образом, возможно загружать в оболочку инкапсулина молекулы/частицы, размер которых превышает диаметр пор. Интересным примером является работа Künzle et al. [71], где авторы выбрали в качестве груза наночастицы золота диаметром 13 ± 1 нм, покрытые бромидом (11-меркаптоундецил)-N,N,N-триметиламмония. Данные наночастицы были загружены в оболочку инкапсулинов *T. maritima* при помощи частичной замены стабилизирующего наночастицы лиганда на CLP, упомянутый ранее. Подобный подход потенциально может быть применен в фототермальной терапии опухо-

лей, требующей введения стабильных и биосовместимых наночастиц золота в область интереса с последующим облучением требуемой длиной волны и гибелью опухолевых клеток, более чувствительных к повышению температуры по сравнению со здоровыми клетками.

Инкапсулиновые системы, способные к биоминерализации железа, могут быть применены в магнито-гипертермической терапии (МГТ). В работе Zhang et al. [72] инкапсулины бактерии *Myc. xanthus* были использованы для синтеза магнитных наночастиц, получивших название eMIONs (encapsulin-produced magnetic iron oxide nanoparticles, магнитные наночастицы оксида железа, продуцируемые инкапсулином). Было показано, что частицы являются моодисперсными, устойчивыми к экстремальным значениям pH и расщеплению протеазами. При воздействии переменного магнитного поля eMIONs эффективно поглощали магнитную энергию, что привело к выраженному повышению температуры *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, eMIONs способны разлагать H_2O_2 с образованием O_2 , тем самым вызывая специфическую гибель опухолевых клеток из-за повышенной концентрации H_2O_2 в них. Учитывая высокую проникающую способность магнитных полей, eMIONs являются перспективным терапевтическим средством для лечения солидных опухолей.

Помимо наночастиц оксида железа, нанокompартменты способны синтезировать наночастицы серебра. Например, инкапсулины *T. maritima* использовались в качестве платформы для получения моодисперсных наночастиц серебра со средним диаметром 13,5 нм [19].

Стоит отметить, что способность инкапсулинов накапливать в себе ионы металлов может быть использована для очистки воды. Известно, что, например, Zn^{2+} в значительной степени выбрасывается в воду во многих отраслях промышленности и представляет серьезную угрозу для окружающей среды. Wang et al. [73] предложили систему, состоящую из модифицированных бактерий *Escherichia coli*, имеющих в своем геноме ген, кодирующий инкапсулин cEnc *Candidatus Brocadia fulgida*, который может накапливать и восстанавливать ионы цинка. Полученные результаты позволяют обеспечить эффективную стратегию повышения толерантности бактерий к токсичным металлам для восстановления Zn^{2+} , что в перспективе может быть использовано для восстановления окружающей среды.

Инкапсулины в качестве генетически кодируемых меток. Помимо накопления неорганических наночастиц для понижения концентрации

металлов вне оболочки инкапсулина, нельзя не отметить блок работ, посвященных отслеживанию клеток при помощи МРТ за счет накопления железосодержащих инкапсулинов в клетках эукариот. На данный момент существует два основных подхода, применяющихся для мечения клеток. Первым подходом является прямое мечение, при котором экзогенные метки добавляются в ростовую среду к клеткам на этапе культивирования. При этом в качестве меток могут быть использованы магнитные наночастицы, радиоизотопы, а также низкомолекулярные флуорофоры [74, 75]. Второй подход основан на введении в геном клеток генетических последовательностей, кодирующих эндогенные метки, такие как люцифераза или флуоресцентные белки [76]. Для оптического мониторинга с использованием первого подхода в качестве меток чаще всего применяют квантовые точки и флуорофоры [77, 78], для ОФЭКТ (однофотонная эмиссионная компьютерная томография) и ПЭТ (позитронно-эмиссионная томография) — радионуклиды, для МРТ — суперпарамагнитные частицы (СМЧ) оксида железа [79–84]. Важным недостатком здесь является то, что в процессе деления клеток накопление метки будет уменьшаться, и интенсивность сигнала снизится, в силу чего мечение с использованием экзогенных агентов не вполне подходит для длительного мониторинга клеток.

При проведении исследований, требующих длительного отслеживания клеток после введения, применяют не прямое специфическое мечение с использованием репортерных генов. Чаще всего это гены, кодирующие флуоресцентные белки [85–93] или люциферазу светлячка [94]. Для таких методов, как ОФЭКТ и ПЭТ, также существуют свои генетические метки, а именно магнитно-резонансные репортерные гены, продуцирующие внутриклеточные металлопротеины, такие как трансферрин, ферритин, тирозиназа [95]. Как уже было упомянуто выше, некоторые инкапсулиновые системы способны депонировать железо. Это свойство позволяет использовать нанокompартменты в качестве генетически кодируемых меток для МРТ-визуализации клеток. Существует ряд исследований, посвященных гетерологичной экспрессии генов, кодирующих инкапсулиновые системы, в клетках млекопитающих. Так, в работе Sigmund et al. [42] методом транзитрной котрансфекции в клетках линии НЕК293Т была достигнута экспрессия генов инкапсулинов *Q. thermotolerans* и *Мух. xanthus*. Трансфекция клеток производилась плазмидными ДНК, кодирующими оболочку инкапсулина, его гру-

зовой белок, представляющий собой фермент феррооксидазу, а также переносчик железа, необходимый для более эффективного транспорта железа в клетки. Через 24 часа после трансфекции к клеткам добавляли сульфат аммония железа, являющийся источником двухвалентного железа, окисляемого феррооксидазой с образованием магнитных наночастиц внутри инкапсулинов (рис. 3, г). В случае инкапсулина *Q. thermotolerans* криоэлектронная микроскопия показала, что в клетках его оболочка самоорганизуется в нанокompартменты с икосаэдрической симметрией $T = 4$ и диаметром ~ 42 нм. Кроме того, было установлено, что нативный грузовой белок сохраняет свою феррооксидазную активность, что позволяет эффективно биоминерализовать железо. В частности, показано, что ферритиноподобный грузовой белок *Мух. xanthus* был способен минерализовать до 30 000 атомов железа на нанокompартмент, что примерно на порядок больше того количества, которое может депонироваться в ферритинах.

В другом исследовании [96] было продемонстрировано, что в инкапсулины *Мух. xanthus* могут быть загружены сразу два грузовых белка: флуоресцентный РAmCherry и ферритиноподобный белок В. Авторы работы также показали, что клетки НЕК293Т, экспрессирующие инкапсулины, настолько хорошо накапливают железо, что успешно поддаются магнитной сортировке на коммерческих сортировочных колонках (порядка 5% от исходной популяции клеток) и даже могут быть обнаружены *in vivo* методом МРТ при введении в головной мозг крысы. Стоит отметить, что, в отличие от экзогенных меток на основе наночастиц оксида железа, наночастицы, образующиеся в инкапсулинах, не выбрасываются клетками, а, следовательно, и не фагоцитируются соседними клетками, например клетками микроглии. Это существенное преимущество, позволяющее избежать искажения МР-сигнала с течением времени, а также ошибок в интерпретации результатов исследования. Гетерологичная транзитрная экспрессия генов инкапсулинов может быть достигнута не только в клетках линии НЕК293Т, но и в других клеточных линиях, например, в клетках гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 [97].

Кроме того, имеются работы, в которых показана возможность получения стабильных клеточных линий, содержащих инкапсулиновые системы, депонирующие железо. Например, было показано, что мезенхимальные стволовые клетки человека способны стабильно экспрессировать гены инкапсулина *Мух. xanthus* [98], а клетки карциномы молоч-

ной железы мыши 4T1 — гены инкапсулина *Q. thermotolerans* [99]. И в первом, и во втором случае было показано, что наличие такой генетической метки не влияло на жизнеспособность и пролиферацию клеток, а время релаксации T2 для генетически модифицированных клеток, содержащих инкапсулины, было ниже по сравнению с контрольными клетками, что позволяло детектировать клетки методом МРТ. Это очень важное преимущество, выгодно выделяющее инкапсулины на фоне остальных меток, которые часто оказываются токсичны и способны влиять на пролиферацию клеток. Помимо этого, в упомянутых работах было показано, что формирование наночастиц в инкапсулинах протекало достаточно быстро и занимало около 24 часов, в противоположность получению наночастиц методом химического синтеза, который очень часто может занимать несколько дней с учетом выделения, очистки и функционализации поверхности, после чего

частицы еще должны быть охарактеризованы, а их токсичность должна быть протестирована на клеточной линии, чтобы убедиться в безопасности их применения [100].

Инкапсулины как биореакторы. Еще одним способом применения инкапсулинов является их использование в качестве биореакторов. Известно, что тонкий химический синтез может быть проведен при помощи различных ферментов, что позволяет сильно упростить условия проведения реакции. Огромное количество реакций в химии и химической промышленности протекает в присутствии катализаторов, а сами катализаторы для гетерофазных систем представляют собой различные мелкодисперсные частицы или же наносятся на пористый носитель для увеличения эффективности процесса. В одной из работ в качестве такого носителя были использованы инкапсулины *T. maritima*, а «нанесение» катализатора осуществлялось при помощи связывания необходимых ферментов

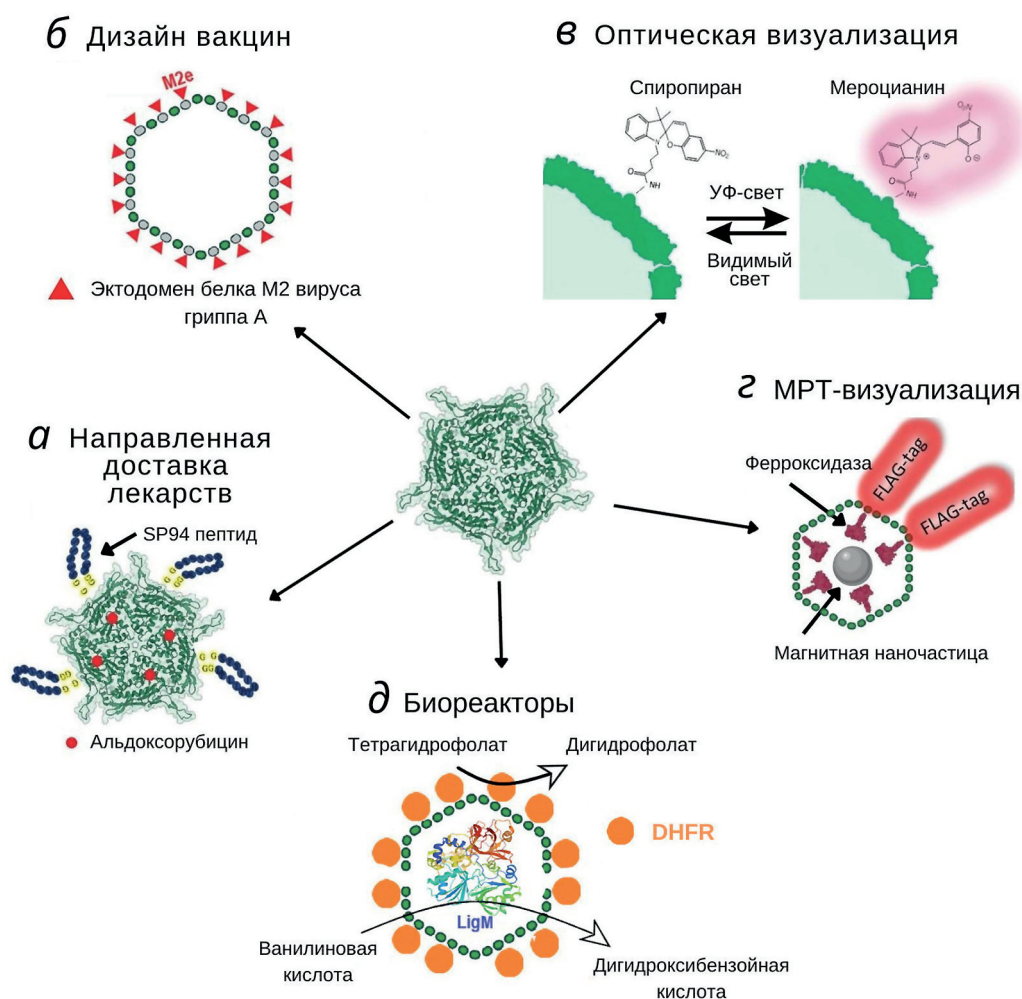


Рис. 3. Использование инкапсулинов для решения различных биотехнологических задач: а — наноконтейнерные системы для адресной доставки лекарств; б — новые типы вакцин; в — фотопереключаемые метки; з — генетически кодируемые метки для МРТ-визуализации; д — биосинтез при помощи инкапсулированных ферментов

с поверхностями (внутренней и внешней) белкового компартмента. Инкапсулины на основе *T. maritima* были сконструированы следующим образом: на внешней оболочке при помощи технологии SpyCatcher/SpyTag C-конец протомера был конъюгирован с фибронектином FbaB58, а затем последовательно связан с N-концом дигидрофолатредуктазы *E. coli* (DHFR), а внутрь инкапсулина был загружен тетрагидрофолат-зависимый фермент (деметилаза LigM). На оболочке инкапсулина удалось ковалентно связать порядка 60 копий DHFR (рис. 3, д).

Тетрагидрофолат, продуцируемый на внешней оболочке при помощи DHFR, был способен управлять деметилированием арильного субстрата, полученного из лигнина, упакованными деметилазами. Было показано, что последующее введение делеции, увеличивающей поры в оболочке инкапсулина, усиливает обмен метаболитов. Таким образом, такая конструкция на основе инкапсулина функционирует со скоростью, эквивалентной скорости двух ферментов, свободно диспергированных в растворе [101].

Благодаря своему внутреннему размеру белковые компартменты являются превосходной имитацией замкнутого внутриклеточного окружения и позволяют изучать кинетику ферментов в более естественных условиях [102, 103]. Было показано, что в оболочку инкапсулина *R. erythropolis* могут быть загружены такие белки, как GFP и люцифераза светлячка (Luc), не являющиеся нативными для этого бактериального штамма [16]. При этом GFP сохранял способность флуоресцировать, а люцифераза проявляла ферментативную активность в отношении своего субстрата, люциферина. Подобное исследование было проведено с инкапсулинами *B. linens*. C-Концевая последовательность нативного грузового белка DyP была слита с C-концом TFP [104]. После подтверждения структурной целостности изолированных нанокомпарментов было определено, что в среднем в одном инкапсулине содержится 12 молекул TFP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несомненно, инкапсулины на данный момент остаются относительно новым объектом исследований, не все свойства и их изначальное предназначение в прокариотах определены и изучены. Однако практическое применение инкапсулинов в области биотехнологии становится все более многообещающим. Такие свойства нанокомпарментов, как небольшой

размер и возможность функционализации поверхности для селективного взаимодействия со специфическими белками, позволяют создавать различные системы направленной доставки препаратов или меток. Инкапсулины могут выступать в роли нанореакторов, что позволяет получать очень гомологичные друг другу наночастицы или же использовать этот эффект для устранения ионов металлов из окружающей среды. Также инкапсулины могут быть платформой для конъюгации с различными ферментами, что позволяет изучать их кинетику в естественных условиях. Инкапсулиновые системы, биоминерализующие железо с образованием магнитных наночастиц, могут быть использованы в качестве контрастных агентов для МРТ при мониторинге распространения клеток в организме.

Проводя сравнение инкапсулинов с другими наночастицами, использующимися в биотехнологии, немаловажным преимуществом первых, на наш взгляд, является высокая воспроизводимость биосинтеза инкапсулинов в клетках. Будь то прокариотические клетки или же эукариотические — синтез инкапсулинов имеет генетическую основу, в то время как химический синтез представляет собой крайне многофакторный процесс, успех которого зависит от чистоты и качества реактивов, выбранных методик т.д. Если более подробно остановиться именно на магнитных наночастицах, использующихся для мониторинга клеток методом МРТ, то здесь наночастицы, образующиеся в инкапсулинах, проигрывают экзогенным магнитным меткам в интенсивности создаваемого ими МР-сигнала. Однако экзогенные магнитные наночастицы обладают существенным недостатком. Дело в том, что наночастицы железа, захватываемые клетками на этапе культивирования, могут выбрасываться после введения клеток в ткани и в дальнейшем захватываться другими клетками, например макрофагами, что будет приводить к искажению МР-сигнала и затруднять локализацию введенных клеток. Еще одним важным недостатком наночастиц, получаемых методами химического синтеза, является их токсичность в отношении различных клеточных культур, особенно это касается первичных культур стволовых клеток. Помимо магнитных наночастиц, существуют также генетически кодируемые метки для МРТ, например, метки на основе ферритинов, но подобные метки проигрывают железозапасающим инкапсулинам в емкости (ферритин способен накопить около 3000 атомов железа, в то время как инкапсулин *Q. thermotolerans* — на порядок больше). Другим

вопросом, касающимся применения различных наноконтейнерных систем на основе инкапсулинов, является их возможная иммуногенность *in vivo*. Предполагается, что частично эта проблема может быть решена путем покрытия инкапсулинов ПЭГом. В настоящее время *in vivo* оценки иммуногенности инкапсулинов, выделенных из бактерий или эукариотических клеток, не было проведено, однако было показано, что уже упомянутые в настоящем обзоре злокачественные клетки карциномы молочной железы мыши 4T1, стабильно экспрессирующие гены инкапсулиновой системы *Q. thermotolerans*, успешно формировали подкожные опухоли после имплантации иммунокомпетентным мышам, а динамика роста этих опухолей не отличалась от динамики роста опухолей, полученных из клеток 4T1, не содержащих каких-либо трансгенов.

Несмотря на вышеописанные недостатки, инкапсулины уже сейчас показали себя инте-

ресной альтернативой конвенциональным наноплатформам. С каждым годом открываются новые типы инкапсулинов у различных штаммов бактерий и архей, в свете чего дальнейшее исследование этих структур и их свойств видится весьма перспективным для широкого круга биомедицинских задач.

Вклад авторов. Н.С. Чмелюк, В.В. Ода — написание текста, подготовка иллюстраций; А.Н. Габашвили, М.А. Абакумов — редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-00096).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Valdes-Stauber, N., and Scherer, S. (1994) Isolation and characterization of linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3809-3814, doi: 10.1128/aem.60.10.3809-3814.1994.
2. Rosenkrands, I., Rasmussen, P. B., Carnio, M., Jacobsen, S., Theisen, M., et al. (1998) Identification and characterization of a 29-kilodalton protein from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate recognized by mouse memory effector cells, *Infect. Immun.*, **66**, 2728-2735, doi: 10.1128/iai.66.6.2728-2735.1998.
3. Hicks, P. M., Rinker, K. D., Baker, J. R., and Kelly, R. M. (1998) Homomultimeric protease in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* has structural and amino acid sequence homology to bacteriocins in mesophilic bacteria, *FEBS Lett.*, **440**, 393-398, doi: 10.1016/S0014-5793(98)01451-3.
4. Giessen, T. W., and Silver, P. A. (2017) Widespread distribution of encapsulin nanocompartments reveals functional diversity, *Nat. Microbiol.*, **2**, 17029, doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.29.
5. Winter, N., Triccas, J. A., Rivoire, B., Pessolani, M. C. V., Eiglmeier, K., et al. (1995) Characterization of the gene encoding the immunodominant 35 kDa protein of *Mycobacterium leprae*, *Mol. Microbiol.*, **16**, 865-876, doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02314.x.
6. Triccas, J. A., Roche, P. W., Winter, N., Feng, C. G., Ruth Butlin, C., et al. (1996) A 35-kilodalton protein is a major target of the human immune response to *Mycobacterium leprae*, *Infect. Immun.*, **64**, 5171-5177, doi: 10.1128/iai.64.12.5171-5177.1996.
7. Kawamoto, S., Watanabe, M., Saito, N., Hesketh, A., Vachalova, K., et al. (2001) Molecular and functional analyses of the gene (*eshA*) encoding the 52-kilodalton protein of *Streptomyces coelicolor* A3(2) required for antibiotic production, *J. Bacteriol.*, **183**, 6009-6016, doi: 10.1128/JB.183.20.6009-6016.2001.
8. Kwak, J., McCue, L. A., Trezianka, K., and Kendrick, K. E. (2001) Identification and characterization of a developmentally regulated protein, EshA, required for sporogenic hyphal branches in *Streptomyces griseus*, *J. Bacteriol.*, **183**, 3004-3015, doi: 10.1128/JB.183.10.3004-3015.2001.
9. Saito, N., Matsubara, K., Watanabe, M., Kato, F., and Ochi, K. (2003) Genetic and biochemical characterization of EshA, a protein that forms large multimers and affects developmental processes in *Streptomyces griseus*, *J. Biol. Chem.*, **278**, 5902-5911, doi: 10.1074/jbc.M208564200.
10. Sutter, M., Boehringer, D., Gutmann, S., Günther, S., Prangishvili, D., et al. (2008) Structural basis of enzyme encapsulation into a bacterial nanocompartment, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 939-947, doi: 10.1038/nsmb.1473.
11. Namba, K., Hagiwara, K., Tanaka, H., Nakaishi, Y., Chong, K. T., et al. (2005) Expression and molecular characterization of spherical particles derived from the genome of the hyperthermophilic euryarchaeote *Pyrococcus furiosus*, *J. Biochem.*, **138**, 193-199, doi: 10.1093/jb/mvi111.
12. Akita, F., Chong, K. T., Tanaka, H., Yamashita, E., Miyazaki, N., et al. (2007) The crystal structure

- of a virus-like particle from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* provides insight into the evolution of viruses, *J. Mol. Biol.*, **368**, 1469-1483, doi: 10.1016/j.jmb.2007.02.075.
13. Moon, H., Lee, J., Min, J., and Kang, S. (2014) Developing genetically engineered encapsulin protein cage nanoparticles as a targeted delivery nanoplatform, *Biomacromolecules*, **15**, 3794-3801, doi: 10.1021/bm501066m.
 14. Rurup, W. F., Snijder, J., Koay, M. S. T., Heck, A. J. R., and Cornelissen, J. J. L. M. (2014) Self-sorting of foreign proteins in a bacterial nanocompartment, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 3828-3832, doi: 10.1021/ja410891c.
 15. Snijder, J., Van De Waterbeemd, M., Damoc, E., Denisov, E., Grinfeld, D., et al. (2014) Defining the stoichiometry and cargo load of viral and bacterial nanoparticles by orbitrap mass spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 7295-7299, doi: 10.1021/ja502616y.
 16. Tamura, A., Fukutani, Y., Takami, T., Fujii, M., Nakaguchi, Y., et al. (2015) Packaging guest proteins into the encapsulin nanocompartment from *Rhodococcus erythropolis* N771, *Biotechnol. Bioeng.*, **112**, 13-20, doi: 10.1002/bit.25322.
 17. Cassidy-Amstutz, C., Oltrogge, L., Going, C. C., Lee, A., Teng, P., et al. (2016) Identification of a minimal peptide tag for *in vivo* and *in vitro* loading of encapsulin, *Biochemistry*, **55**, 3461-3468, doi: 10.1021/acs.biochem.6b00294.
 18. Choi, B., Moon, H., Hong, S. J., Shin, C., Do, Y., et al. (2016) Effective delivery of antigen-encapsulin nanoparticle fusions to dendritic cells leads to antigen-specific cytotoxic T cell activation and tumor rejection, *ACS Nano*, **10**, 7339-7350, doi: 10.1021/acsnano.5b08084.
 19. Giessen, T. W., and Silver, P. A. (2016) Converting a natural protein compartment into a nanofactory for the size-constrained synthesis of antimicrobial silver nanoparticles, *ACS Synth. Biol.*, **5**, 1497-1504, doi: 10.1021/acssynbio.6b00117.
 20. Sonotaki, S., Takami, T., Noguchi, K., Odaka, M., Yohda, M., et al. (2017) Successful PEGylation of hollow encapsulin nanoparticles from: *Rhodococcus erythropolis* N771 without affecting their disassembly and reassembly properties, *Biomater. Sci.*, **5**, 1082-1089, doi: 10.1039/c7bm00207f.
 21. Rahmanpour, R., and Bugg, T. D. H. (2013) Assembly *in vitro* of *Rhodococcus jostii* RHA1 encapsulin and peroxidase DypB to form a nanocompartment, *FEBS J.*, **280**, 2097-2104, doi: 10.1111/febs.12234.
 22. Contreras, H., Joens, M. S., McMath, L. M., Le, V. P., Tullius, M. V., et al. (2014) Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* nanocompartment and its potential cargo proteins, *J. Biol. Chem.*, **289**, 18279-18289, doi: 10.1074/jbc.M114.570119.
 23. McHugh, C. A., Fontana, J., Nemecek, D., Cheng, N., Aksyuk, A. A., et al. (2014) A virus capsid-like nanocompartment that stores iron and protects bacteria from oxidative stress, *EMBO J.*, **33**, 1896-1911, doi: 10.15252/embj.201488566.
 24. He, D., Hughes, S., Vanden-Hehir, S., Georgiev, A., Altenbach, K., et al. (2016) Structural characterization of encapsulated ferritin provides insight into iron storage in bacterial nanocompartments, *Elife*, **5**, e18972, doi: 10.7554/eLife.18972.
 25. Ochoa, J. M., Bair, K., Holton, T., Bobik, T. A., and Yeates, T. O. (2021) MCPdb: The bacterial microcompartment database, *PLoS One*, **16**, e0248269, doi: 10.1371/journal.pone.0248269.
 26. Wikoff, W. R., Liljas, L., Duda, R. L., Tsuruta, H., Hendrix, R. W., et al. (2000) Topologically linked protein rings in the bacteriophage HK97 capsid, *Science*, **289**, 2129-2133, doi: 10.1126/science.289.5487.2129.
 27. Caspar, D. L., and Klug, A. (1962) Physical principles in the construction of regular viruses, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **27**, 1-24, doi: 10.1101/SQB.1962.027.001.005.
 28. Almeida, A. V., Carvalho, A. J., and Pereira, A. S. (2021) Encapsulin nanocages: protein encapsulation and iron sequestration, *Coord. Chem. Rev.*, **448**, 214188, doi: 10.1016/j.ccr.2021.214188.
 29. Tracey, J. C., Coronado, M., Giessen, T. W., Lau, M. C. Y., Silver, P. A., et al. (2019) The discovery of twenty-eight new encapsulin sequences, including three in anammox bacteria, *Sci. Rep.*, **9**, 20122, doi: 10.1038/s41598-019-56533-5.
 30. Giessen, T. W., Orlando, B. J., Verdegaal, A. A., Chambers, M. G., Gardener, J., et al. (2019) Large protein organelles form a new iron sequestration system with high storage capacity, *Elife*, **8**, e46070, doi: 10.7554/eLife.46070.
 31. El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., et al. (2019) The Pfam protein families database in 2019, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D427-D432, doi: 10.1093/nar/gky995.
 32. Nichols, R. J., LaFrance, B., Phillips, N. R., Radford, D. R., Oltrogge, L. M., et al. (2021) Discovery and characterization of a novel family of prokaryotic nanocompartments involved in sulfur metabolism, *Elife*, **10**, e59288, doi: 10.7554/eLife.59288.
 33. Wiryaman, T., and Toor, N. (2021) Cryo-EM structure of a thermostable bacterial nanocompartment, *IUCrJ*, **8**, 342-350, doi: 10.1107/S2052252521001949.
 34. Wiryaman, T., and Toor, N. (2022) Recent advances in the structural biology of encapsulin bacterial nanocompartments, *J. Struct. Biol. X*, **6**, 100062, doi: 10.1016/j.yjsbx.2022.100062.
 35. Ross, J., McIver, Z., Lambert, T., Piergentili, C., Bird, J. E., et al. (2022) Pore dynamics and asymmetric cargo loading in an encapsulin nanocompartment, *Sci. Adv.*, **8**, eabj4461, doi: 10.1126/sciadv.abj4461.
 36. Williams, E. M., Jung, S. M., Coffman, J. L., and Lutz, S. (2018) Pore engineering for enhanced mass transport

- in encapsulin nanocompartments, *ACS Synth. Biol.*, **7**, 2514-2517, doi: 10.1021/acssynbio.8b00295.
37. Snijder, J., Kononova, O., Barbu, I. M., Uetrecht, C., Rurup, W. F., et al. (2016) Assembly and mechanical properties of the cargo-free and cargo-loaded bacterial nanocompartment encapsulin, *Biomacromolecules*, **17**, 2522-2529, doi: 10.1021/acs.biomac.6b00469.
 38. Putri, R. M., Allende-Ballester, C., Luque, D., Klem, R., Rousou, K. A., et al. (2017) Structural characterization of native and modified encapsulins as nanoplatforms for *in vitro* catalysis and cellular uptake, *ACS Nano*, **11**, 12796-12804, doi: 10.1021/acsnano.7b07669.
 39. Kyrkiewicz, A. M., and Woodward, J. D. (2020) Shotgun EM of mycobacterial protein complexes during stationary phase stress, *Curr. Res. Struct. Biol.*, **2**, 204-212, doi: 10.1016/j.crstbi.2020.09.002.
 40. Tang, Y., Mu, A., Zhang, Y., Zhou, S., Wang, W., et al. (2021) Cryo-EM structure of *Mycobacterium smegmatis* DyP-loaded encapsulin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **118**, e2025658118, doi: 10.1073/pnas.2025658118.
 41. LaFrance, B. J., Cassidy-Amstutz, C., Nichols, R. J., Oltrogge, L. M., Nogales, E., et al. (2021) The encapsulin from *Thermotoga maritima* is a flavoprotein with a symmetry matched ferritin-like cargo protein, *Sci. Rep.*, **11**, 22810, doi: 10.1038/s41598-021-01932-w.
 42. Sigmund, F., Pettinger, S., Kube, M., Schneider, F., Schifferer, M., et al. (2019) Iron-sequestering nanocompartments as multiplexed electron microscopy gene reporters, *ACS Nano*, **13**, 8114-8123, doi: 10.1021/acsnano.9b03140.
 43. Imlay, J. A., Chin, S. M., and Linn, S. (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the fenton reaction *in vivo* and *in vitro*, *Science*, **240**, 640-642, doi: 10.1126/science.2834821.
 44. Andrews, S. C. (1998) Iron storage in bacteria, *Adv. Microb. Physiol.*, **40**, 281-351, doi: 10.1038/279015a0.
 45. Goulding, C. W., Apostol, M. I., Sawaya, M. R., Phillips, M., Parseghian, A., et al. (2005) Regulation by oligomerization in a mycobacterial folate biosynthetic enzyme, *J. Mol. Biol.*, **349**, 61-72, doi: 10.1016/j.jmb.2005.03.023.
 46. Sugano, Y., Muramatsu, R., Ichianagi, A., Sato, T., and Shoda, M. (2007) DyP, a unique dye-decolorizing peroxidase, represents a novel heme peroxidase family: ASP171 replaces the distal histidine of classical peroxidases, *J. Biol. Chem.*, **282**, 36652-36658, doi: 10.1074/jbc.M706996200.
 47. Pandey, R., and Rodriguez, G. M. (2012) A ferritin mutant of *Mycobacterium tuberculosis* is highly susceptible to killing by antibiotics and is unable to establish a chronic infection in mice, *Infect. Immun.*, **80**, 3650-3659, doi: 10.1128/IAI.00229-12.
 48. Reddy, P. V., Puri, R. V., Khera, A., and Tyagi, A. K. (2012) Iron storage proteins are essential for the survival and pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* in THP-1 macrophages and the guinea pig model of infection, *J. Bacteriol.*, **194**, 567-575, doi: 10.1128/JB.05553-11.
 49. Ahmad, M., Roberts, J. N., Hardiman, E. M., Singh, R., Eltis, L. D., et al. (2011) Identification of DyPB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase, *Biochemistry*, **50**, 5096-5107, doi: 10.1021/bi101892z.
 50. Bobik, T. A., Lehman, B. P., and Yeates, T. O. (2015) Bacterial microcompartments: widespread prokaryotic organelles for isolation and optimization of metabolic pathways, *Mol. Microbiol.*, **98**, 193-207, doi: 10.1111/mmi.13117.
 51. Green, E. R., and Mecsas, J. (2016) Bacterial secretion systems: an overview, *Microbiol. Spectr.*, **4**, doi: 10.1128/microbiolspec.vmbf-0012-2015.
 52. Wang, P., Robert, L., Pelletier, J., Dang, W. L., Taddei, F., et al. (2010) Robust growth of *Escherichia coli*, *Curr. Biol.*, **20**, 1099-1103, doi: 10.1016/j.cub.2010.04.045.
 53. Gong, J., Chen, M., Zheng, Y., Wang, S., and Wang, Y. (2012) Polymeric micelles drug delivery system in oncology, *J. Control. Release*, **159**, 312-323, doi: 10.1016/j.jconrel.2011.12.012.
 54. Rösler, A., Vandermeulen, G. W. M., and Klok, H. A. (2012) Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers, **53**, 95-108, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.026.
 55. Allen, T. M., and Cullis, P. R. (2013) Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**, 36-48, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.037.
 56. Wang, A. Z., Langer, R., and Farokhzad, O. C. (2012) Nanoparticle delivery of cancer drugs, *Annu. Rev. Med.*, **63**, 185-198, doi: 10.1146/annurev-med-040210-162544.
 57. Haag, R., and Kratz, F. (2006, February 13) Polymer therapeutics: Concepts and applications, *Angew. Chemie Int. Ed.*, **45**, 1198-215, doi: 10.1002/anie.200502113.
 58. Ma, Y., Nolte, R. J. M., and Cornelissen, J. J. L. M. (2012) Virus-based nanocarriers for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 811-825, doi: 10.1016/j.addr.2012.01.005.
 59. MaHam, A., Tang, Z., Wu, H., Wang, J., and Lin, Y. (2009) Protein-based nanomedicine platforms for drug delivery, *Small*, **5**, 1706-1721, doi: 10.1002/sml.200801602.
 60. Brigger, I., Dubernet, C., and Couvreur, P. (2002) Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 631-651, doi: 10.1016/S0169-409X(02)00044-3.
 61. Toita, R., Murata, M., Tabata, S., Abe, K., Narahara, S., et al. (2012) Development of human hepatocellular carcinoma cell-targeted protein cages, *Bioconjug. Chem.*, **23**, 1494-1501, doi: 10.1021/bc300015f.
 62. Toita, R., Murata, M., Abe, K., Narahara, S., Piao, J. S., et al. (2013) A nanocarrier based on a genetically engineered protein cage to deliver doxorubicin to human hepatocellular carcinoma cells, *Chem. Commun.*, **49**, 7442-7444, doi: 10.1039/c3cc44508a.

63. Diaz, D., Vidal, X., Sunna, A., and Care, A. (2021) Bioengineering a light-responsive encapsulin nano-reactor: a potential tool for *in vitro* photodynamic therapy, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **13**, 7977-7986, doi: 10.1021/acsami.0c21141.
64. Van de Steen, A., Khalife, R., Colant, N., Mustafa Khan, H., Deveikis, M., et al. (2021) Bioengineering bacterial encapsulin nanocompartments as targeted drug delivery system, *Synth. Syst. Biotechnol.*, **6**, 231-241, doi: 10.1016/j.synbio.2021.09.001.
65. Moon, H., Lee, J., Kim, H., Heo, S., Min, J., et al. (2014) Genetically engineering encapsulin protein cage nanoparticle as a SCC-7 cell targeting optical nanoprobe, *Biomater. Res.*, **18**, 21, doi: 10.1186/2055-7124-18-21.
66. Jung, Y., Kang, H. J., Lee, J. M., Jung, S. O., Yun, W. S., et al. (2008) Controlled antibody immobilization onto immunoanalytical platforms by synthetic peptide, *Anal. Biochem.*, **374**, 99-105, doi: 10.1016/j.ab.2007.10.022.
67. Lagoutte, P., Mignon, C., Stadthagen, G., Potisopon, S., Donnat, S., et al. (2018) Simultaneous surface display and cargo loading of encapsulin nanocompartments and their use for rational vaccine design, *Vaccine*, **36**, 3622-3628, doi: 10.1016/j.vaccine.2018.05.034.
68. Cho, K. J., Schepens, B., Seok, J. H., Kim, S., Roose, K., et al. (2015) Structure of the extracellular domain of matrix protein 2 of influenza A virus in complex with a protective monoclonal antibody, *J. Virol.*, **89**, 3700-3711, doi: 10.1128/jvi.02576-14.
69. Putri, R. M., Fredy, J. W., Cornelissen, J. J. L. M., Koay, M. S. T., and Katsonis, N. (2016) Labelling bacterial nanocages with photo-switchable fluorophores, *ChemPhysChem*, **17**, 1815-1818, doi: 10.1002/cphc.201600013.
70. Klajn, R. (2014) Spiropyran-based dynamic materials, *Chem. Soc. Rev.*, **43**, 148-184, doi: 10.1039/c3cs60181a.
71. Künzle, M., Mangler, J., Lach, M., and Beck, T. (2018) Peptide-directed encapsulation of inorganic nanoparticles into protein containers, *Nanoscale*, **10**, 22917-22926, doi: 10.1039/c8nr06236f.
72. Zhang, Y., Wang, X., Chu, C., Zhou, Z., Chen, B., et al. (2020) Genetically engineered magnetic nanocages for cancer magneto-catalytic theranostics, *Nat. Commun.*, **11**, 5421, doi: 10.1038/s41467-020-19061-9.
73. Wang, Q., Zhou, Y.-M., Xing, C.-Y., Li, W.-C., Shen, Y., et al. (2022) Encapsulins from *Ca. Brocadia fulgida*: An effective tool to enhance the tolerance of engineered bacteria (pET-28a-cEnc) to Zn²⁺, *J. Hazard. Mater.*, **435**, 128954, doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.128954.
74. Kim, T., Momin, E., Choi, J., Yuan, K., Zaidi, H., et al. (2011) Mesoporous silica-coated hollow manganese oxide nanoparticles as positive T1 contrast agents for labeling and MRI tracking of adipose-derived mesenchymal stem cells, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 2955-2961, doi: 10.1021/ja1084095.
75. Di Corato, R., Gazeau, F., Le Visage, C., Fayol, D., Levitz, P., et al. (2013) High-resolution cellular MRI: gadolinium and iron oxide nanoparticles for in-depth dual-cell imaging of engineered tissue constructs, *ACS Nano*, **7**, 7500-7512, doi: 10.1021/nn401095p.
76. Schrepfer, S., Deuse, T., Reichenspurner, H., Fischbein, M. P., Robbins, R. C., et al. (2007) Stem cell transplantation: the lung barrier, *Transplant. Proc.*, **39**, 573-576, doi: 10.1016/j.transproceed.2006.12.019.
77. Michalet, X., Pinaud, F. F., Bentolila, L. A., Tsay, J. M., Doose, S., et al. (2005) Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics, *Science*, **307**, 538-544, doi: 10.1126/science.1104274.
78. Kalchenko, V., Shvitiel, S., Malina, V., Lapid, K., Haramati, S., et al. (2006) Use of lipophilic near-infrared dye in whole-body optical imaging of hematopoietic cell homing, *J. Biomed. Opt.*, **11**, 050507, doi: 10.1117/1.2364903.
79. Himes, N., Min, J. Y., Lee, R., Brown, C., Shea, J., et al. (2004) *In vivo* MRI of embryonic stem cells in a mouse model of myocardial infarction, *Magn. Reson. Med.*, **52**, 1214-1219, doi: 10.1002/mrm.20220.
80. Arbab, A. S., Bashaw, L. A., Miller, B. R., Jordan, E. K., Bulte, J. W. M., et al. (2003) Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques, *Transplantation*, **76**, 1123-1130, doi: 10.1097/01.TP.0000089237.39220.83.
81. Frank, J. A., Miller, B. R., Arbab, A. S., Zywicke, H. A., Jordan, E. K., et al. (2003) Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents, *Radiology*, **228**, 480-487, doi: 10.1148/radiol.2281020638.
82. Bos, C., Delmas, Y., Desmoulière, A., Solanilla, A., Hauger, O., et al. (2004) *In vivo* MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver, *Radiology*, **233**, 781-789, doi: 10.1148/radiol.2333031714.
83. Di Tucci, A. A., Matta, G., Deplano, S., Gabbas, A., Depau, C., et al. (2008) Myocardial iron overload assessment by T2* magnetic resonance imaging in adult transfusion dependent patients with acquired anemias, *Haematologica*, **93**, 1385-1388, doi: 10.3324/haematol.12759.
84. Ittrich, H., Lange, C., Tögel, F., Zander, A. R., Dahnke, H., et al. (2007) *In vivo* magnetic resonance imaging of iron oxide-labeled, arterially-injected mesenchymal stem cells in kidneys of rats with acute ischemic kidney injury: detection and monitoring at 3T, *J. Magn. Reson. Imaging*, **25**, 1179-1191, doi: 10.1002/jmri.20925.
85. Massoud, T. F., and Gambhir, S. S. (2003) Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light, *Genes Dev.*, **17**, 545-580, doi: 10.1101/gad.1047403.
86. Wu, J. C., Tseng, J. R., and Gambhir, S. S. (2004) Molecular imaging of cardiovascular gene prod-

- ucts, *J. Nucl. Cardiol.*, **11**, 491-505, doi: 10.1016/j.nuclcard.2004.04.004.
87. Contag, C. H., Jenkins, D., Contag, P. R., and Negrin, R. S. (2000) Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease *in vivo*, *Neoplasia*, **2**, 41-52, doi: 10.1038/sj.neo.7900079.
 88. Herschman, H. R. (2004) Noninvasive imaging of reporter gene expression in living subjects, *Adv. Cancer Res.*, **92**, 29-80, doi: 10.1016/S0065-230X(04)92003-9.
 89. Inubushi, M., and Tamaki, N. (2007) Radionuclide reporter gene imaging for cardiac gene therapy, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **34 Suppl 1**, S27-S33, doi: 10.1007/s00259-007-0438-x.
 90. Joo, H. K., and Chung, J. K. (2008) Molecular-genetic imaging based on reporter gene expression, *J. Nucl. Med.*, **49 Suppl 2**, 164S-179S, doi: 10.2967/jnumed.107.045955.
 91. Gambhir, S. S., Barrio, J. R., Phelps, M. E., Iyer, M., Namavari, M., et al. (1999) Imaging adenoviral-directed reporter gene expression in living animals with positron emission tomography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2333-2338, doi: 10.1073/pnas.96.5.2333.
 92. Phelps, M. E. (2000) Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 9226-9233, doi: 10.1073/pnas.97.16.9226.
 93. Zhang, S. J., and Wu, J. C. (2007) Comparison of imaging techniques for tracking cardiac stem cell therapy, *J. Nucl. Med.*, **48**, 1916-1919, doi: 10.2967/jnumed.107.043299.
 94. Okada, S., Ishii, K., Yamane, J., Iwanami, A., Ikegami, T., et al. (2005) *In vivo* imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury, *FASEB J.*, **19**, 1839-1841, doi: 10.1096/fj.05-4082fje.
 95. Gilad, A. A., Winnard, P. T., van Zijl, P. C. M., and Bulte, J. W. M. (2007) Developing MR reporter genes: promises and pitfalls, *NMR Biomed.*, **20**, 275-290, doi: 10.1002/nbm.1134.
 96. Sigmund, F., Massner, C., Erdmann, P., Stelzl, A., Rolbieski, H., et al. (2018) Bacterial encapsulins as orthogonal compartments for mammalian cell engineering, *Nat. Commun.*, **9**, 1990, doi: 10.1038/s41467-018-04227-3.
 97. Efremova, M. V., Bodea, S.-V., Sigmund, F., Semkina, A., Westmeyer, G. G., et al. (2021) Genetically encoded self-assembling iron oxide nanoparticles as a possible platform for cancer-cell tracking., *Pharmaceutics*, **13**, 397, doi: 10.3390/pharmaceutics13030397.
 98. Gabashvili, A. N., Vodopyanov, S. S., Chmelyuk, N. S., Sarkisova, V. A., Fedotov, K. A., et al. (2021) Encapsulin based self-assembling iron-containing protein nanoparticles for stem cells MRI visualization., *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12275, doi: 10.3390/ijms22212275.
 99. Gabashvili, A. N., Efremova, M. V., Vodopyanov, S. S., Chmelyuk, N. S., Oda, V. V., et al. (2022) New approach to non-invasive tumor model monitoring via self-assemble iron containing protein nanocompartments, *Nanomaterials*, **12**, 1657, doi: 10.3390/nano12101657.
 100. Roy, N., Gaur, A., Jain, A., Bhattacharya, S., and Rani, V. (2013) Green synthesis of silver nanoparticles: an approach to overcome toxicity, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **36**, 807-812, doi: 10.1016/j.etap.2013.07.005.
 101. Jenkins, M. C., and Lutz, S. (2021) Encapsulin nanocompartments as versatile scaffolds for the development of artificial metabolons, *ACS Synth. Biol.*, **10**, 857-869, doi: 10.1021/acssynbio.0c00636.
 102. Maity, B., Fujita, K., and Ueno, T. (2015) Use of the confined spaces of apo-ferritin and virus capsids as nanoreactors for catalytic reactions, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **25**, 88-97, doi: 10.1016/j.cbpa.2014.12.026.
 103. Safont-Sempere, M. M., Fernández, G., and Würthner, F. (2011) Self-sorting phenomena in complex supramolecular systems, *Chem. Rev.*, **111**, 5784-5814, doi: 10.1021/cr100357h.
 104. Ai, H. W., Henderson, J. N., Remington, S. J., and Campbell, R. E. (2006) Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of *Clavularia* cyan fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging, *Biochem. J.*, **400**, 531-540, doi: 10.1042/BJ20060874.

ENCAPSULINS: STRUCTURE, PROPERTIES, APPLICATION IN BIOTECHNOLOGY

Review

N. S. Chmelyuk^{1,2}, V. V. Oda¹, A. N. Gabashvili¹, and M. A. Abakumov^{1,2*}

¹ National Research Technological University "MISiS",
119049 Moscow, Russia; E-mail: abakumov1988@gmail.com

² Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov
of the Ministry of Health of the Russian Federation, 117977 Moscow, Russia

In 1994 a new class of prokaryotic compartments was discovered, collectively called “encapsulins” or “nanocompartments”. Encapsulin shell protomer proteins self-assemble to form icosahedral structures of various diameters (24–42 nm). Inside of nanocompartments shells, one or several cargo proteins, diverse in their functions, can be encapsulated. In addition, non-native cargo proteins can be loaded into nanocompartments, and shell surfaces can be modified via various compounds, which makes it possible to create targeted drug delivery systems, labels for optical and MRI imaging, and to use encapsulins as bioreactors. This review describes a number of approaches to the application of encapsulins in various fields of science, including biomedicine and nanobiotechnologies.

Keywords: encapsulins, self-organization, nanocontainer systems, targeted delivery, genetic tags, cell tracking