
ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА
БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УДК: 573.1

АРХИТЕКТУРА НУКЛЕОИДА В ПОКОЯЩИХСЯ
КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

© 2021 г. Ю. Ф. Крупянский*

Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова
Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: yufk@chph.ras.ru

Поступила в редакцию 12.05.2020;
после доработки 25.09.2020;
принята в печать 20.10.2020

В обзоре приведены результаты экспериментальных исследований изучения структуры конденсированной ДНК в нуклеоиде покоящихся клеток бактерий *Escherichia coli* (*E. coli*), возникающих при стрессе голодания. Конформация ДНК изучалась с помощью дифракции синхротронного излучения и просвечивающей электронной микроскопии. Проведенная впервые серия дифракционных экспериментов свидетельствует о наличии периодической упорядоченной организации (скорее всего, нанокристаллической) ДНК с ДНК-ассоциированными белками во всех изученных объектах, подвергнутых стрессу голодания: бактерии *E. coli*, споры и бактерии *Bacillus Cereus*, мицелиальные грибы *Umbelopsis ramanniana*. Просвечивающая электронная микроскопия позволила извлечь более тонкую визуальную информацию о типе конденсации ДНК в нуклеоиде бактерии *E. coli*. В результате исследований с помощью ПЭМ удалось найти внутриклеточные нанокристаллические, жидкокристаллические и свернутые нуклеосомоподобные структуры ДНК. Доля специфической структуры зависит от штамма и условий культивирования. Свернутая нуклеосомоподобная структура наблюдалась и описана в оригинальных исследованиях авторов впервые. Электронно-микроскопические исследования не визуализируют ДНК напрямую, поэтому предполагаемая конформация ДНК является гипотетической. Для получения четкой картины структуры ДНК во внутриклеточных кристаллах изучены кристаллы *in vitro* с помощью рентгеновской макромолекулярной кристаллографии и электронно-микроскопических исследований. Электронно-микроскопические исследования позволили, в отличие от дифракционных экспериментов, увидеть следы ДНК в тонких (2D) ДНК–Dps кристаллах. Предложена гипотетическая модель конформации ДНК во внутриклеточных нанокристаллах. Приведенные экспериментальные результаты позволили визуализировать структуры нижнего иерархического уровня компактизации ДНК в нуклеоиде покоящихся клеток.

Ключевые слова: ДНК, бактерия *Escherichia coli*, архитектура нуклеоида, растущая клетка, фрактальная глобула, ДНК-связанные белки, стресс голодания, белок Dps, покоящаяся клетка, взаимодействие Dps–ДНК, внутриклеточная нанокристаллизация, жидкокристаллические структуры, свернутая нуклеосомоподобная структура, синхротронное излучение, электронная микроскопия и томография.

DOI: 10.31857/S0207401X21030079

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии *Escherichia coli* (*E. coli*), как и другие микроорганизмы, находятся в постоянно меняющихся условиях окружающей среды. Изменения параметров среды воспринимаются ими как стресс. В ответ на любые стрессовые воздействия клетки *E. coli* включают универсальные наследственные стратегии адаптации, основанные на структурных, биохимических и генетических перестройках, позволяющих сохранить часть популяции и выжить в любых неблагоприятных условиях. В первую очередь эти стратегии направлены на защиту генетического материала клетки — ге-

нома. Особый интерес представляет универсальная адаптивная стратегия микроорганизмов на стресс голодания, поскольку она часто совпадает с устойчивостью патогенных бактерий к антибиотикам. Устойчивость к антибиотикам на сегодняшний день является одной из важнейших медицинских проблем в мире.

Исследования, проведенные в последние десятилетия, показали, что конденсированная ДНК в нуклеоиде имеет иерархическую структуру, состоящую из трех уровней структурной организации. Низший уровень обеспечивается взаимодействием ДНК с ДНК-связывающими белками. На

промежуточном уровне ДНК образует сверхспиральные петли. На мегамасштабе ДНК образует шесть пространственно-организованных макромоменов с четкой территориальной организацией, как у фрактальной глобулы, на которые разделен бактериальный нуклеоид. По мере роста бактерии переходят из экспоненциальной фазы роста в стационарную, в которой начинается нехватка питательных веществ для роста (голодание). В поздней стационарной фазе решающим для конформации ДНК (архитектуры нуклеоида) становится взаимодействие ДНК с ДНК-связывающим белком Dps. При стрессе голодания поддержание упорядоченности динамическим способом невозможно и бактерии задействуют другой, энергонезависимый механизм поддержания упорядоченности и защиты ДНК — создание устойчивых молекулярных структур, как в неживой природе.

В обзоре представлены оригинальные результаты и данные литературных источников по экспериментальным исследованиям структурной организации ДНК в нуклеоиде бактерии *E. coli* (архитектуры нуклеоида), полученные с помощью дифракции синхротронного излучения и методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) при действии на бактерию стресса голодания. Обсуждаются изменения в архитектуре нуклеоида при переходе от активно растущих к покоящимся клеткам, образующимся при стрессе голодания. Для лучшего понимания происходящих изменений рассматривается архитектура нуклеоида в активно растущей клетке. Описаны последние методические успехи в визуализации и томографии клеток на наноуровне с помощью синхротронного излучения и методов электронной микроскопии, позволяющие облегчить визуализацию архитектуры нуклеоида с высоким разрешением.

1. КЛЕТКИ *ESCHERICHIA COLI*. НУКЛЕОИД. КОНДЕНСАЦИЯ ДНК

Escherichia coli или кишечная палочка — широко распространенная грамотрицательная бактерия. Она является одним из важнейших и изученных инструментов биологической науки. С ней связаны крупнейшие события в истории биологии, от открытия ДНК до новейших достижений геномной инженерии [1].

Бактериальная геномная ДНК и ассоциированные с ней белки (NAP) расположены в клетке в сильно конденсированной и функционально организованной форме в нуклеоиде. Вопрос о том, каким образом трехмерная (3D) структура генома определяет функцию клетки является основным для биологии клетки. Дезоксирибонуклеиновая

кислота — длинный, сильно заряженный гетерополимер. В разбавленном растворе при термодинамическом равновесии хромосомная ДНК бактерии *E. coli* образует стохастический клубок [2] объемом около 500 мкм^3 (рис. 1а). Объем нуклеоида бактерии *E. coli*, где располагается ДНК в клетке, не превышает 1 мкм^3 . Для того чтобы разместиться в нуклеоиде, нужна дополнительная конденсация ДНК [3]. Кроме этого, конденсированная в нуклеоиде ДНК (хромосома) должна быть функциональной и способной осуществлять такие процессы как репликация, рекомбинация, сегрегация и транскрипция. Структура бактериального нуклеоида с высоким разрешением еще ждет своего определения. Однако пять десятилетий исследований, начавшихся в 1971 г. [4], показали, что конденсированная ДНК в нуклеоиде имеет иерархическую структуру и что конденсация ДНК имеет некоторое сходство с фолдингом (самоорганизацией) белка [5]. Можно выделить следующие уровни структурной организации компактной бактериальной ДНК [6–8].

1) 1-й, самый низкий уровень структурной организации обеспечивается взаимодействием ДНК-ассоциированных гистоноподобных белков (NAP) с ДНК. На малом масштабе (~ 1 килобайт пар оснований (п.о.)) ДНК-ассоциированные белки (NAP) изгибают ДНК, образуют мостики, петли ДНК, обволакивают (wrapping) ДНК.

2) 2-й уровень — промежуточный уровень структурной организации компактной бактериальной ДНК. На этом уровне (масштаб ~ 10 килобайт п.о.) ДНК образует плектонемичные сверхспиральные петли.

3) На 3-ем, самом высоком уровне структурной организации компактной ДНК (мегамасштаб $\sim 10^6$ п.о.) образуется шесть пространственно-организованных доменов (макромоменов), на которые разделена бактериальная хромосома (рис. 1б). Они образуются плектонемичными сверхспирализованными петлями. Между макромоменами взаимодействий почти нет. Практически все физические взаимодействия осуществляются между сайтами ДНК в одном и том же макродомене. Различные длинные и короткие связи ДНК–ДНК, сформировавшиеся между макромоменами, способствуют не только конденсации, но и функционированию ДНК. Форма нуклеоида представляет собой эллипсоид (рис. 1б).

2. ДНК-АССОЦИИРОВАННЫЕ БЕЛКИ (NAP)

ДНК-ассоциированные белки (NAP) играют определяющую роль в структурной организации компактной ДНК нижнего, 1-го уровня. Бактерии

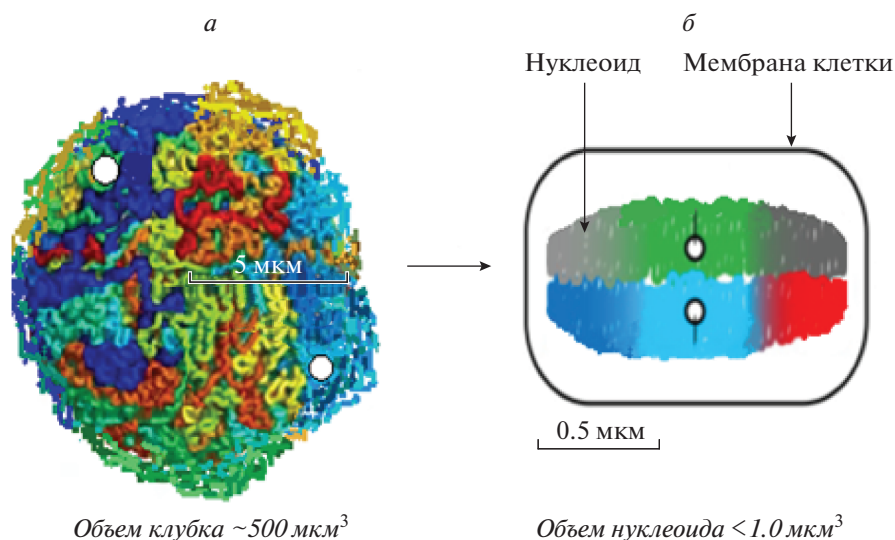


Рис. 1. Образование нуклеоида бактерии *E. coli*: *a* — образование стохастического клубка ДНК *E. coli* при тепловом равновесии в растворе; *б* — организация нуклеоида экспоненциально растущей клетки *E. coli*. Геномная ДНК конденсирована в ~ 1000 раз по сравнению с клубком и пространственно организована. Нуклеоид *E. coli* состоит из шести пространственных доменов, раскрашенных разными цветами

(прокариоты) не имеют гистонов (как у эукариот), но они также обладают группой ДНК-ассоциированных белков (NAP), которые функционально аналогичны гистонам. Белки NAP многочисленны и составляют значительную долю белкового компонента нуклеоида [9]. Молекулярные механизмы того, как NAP конденсируют ДНК *in vivo*, не выяснены, однако на основании обширных исследований *in vitro* можно сделать вывод, что NAP участвуют в конденсации хромосомы с помощью упомянутых выше механизмов структурной организации компактной бактериальной ДНК 1-го уровня, т.е. ДНК-ассоциированные белки изгибают ДНК, образуют мостики, петли ДНК, обволакивают (wrapping) ДНК, образуют группы между соседними или отдаленными сегментами ДНК. Взаимодействие NAP с ДНК подробно рассмотрено в [6]. У бактерии *E. coli* идентифицировано

не менее 12 NAP [10]. Упомянем наиболее изученные NAP: HU, IHF, H-NS, Fis, а также очень важный для понимания изложенных в статье дальнейших результатов белок Dps. Количество этих белков в фазе роста и стационарной фазе приведено в табл. 1.

3. ФРАКТАЛЬНАЯ ГЛОБУЛА КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ОПИСАНИЯ КРУПНОМАСШТАБНОЙ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА

Фрактальная (или складчатая) глобула — это укладка в особое, компактное полимерное состояние, которое возникает при конденсации полимера в результате топологических ограничений, препятствующих одной области цепи перейти в другую. Это долгоживущее промежуточное состояние введено в 1988 г. А. Гроссбергом и соавт. [11]. Экспериментальное исследование свойств про-

Таблица 1. Свойства и количество основных нуклеоид-связанных белков *E. coli*

Белок	Молекулярная масса, kDa	Нативная функциональная единица	Количество в фазе роста	Количество в стационарной фазе
HU α и HU β	~ 9	Гомо- и гетеродимер	55000 (23)	30000 (12.5)
IHF α и IHF β	~ 11	гетеродимер	12000 (5)	55000 (23)
H-NS	~ 15	гомодимер	20000 (8)	15000 (6)
Fis	~ 11	гомодимер	60000 (25)	не обнаружено
Dps	~ 19	додекамер	6000 (0.4)	180000 (12.5)

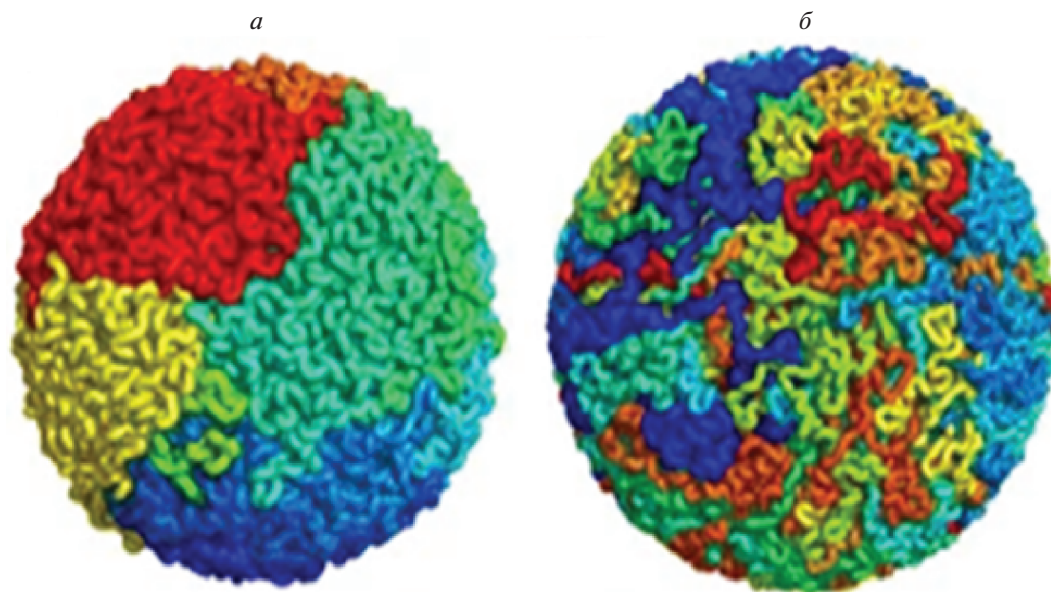


Рис. 2. Конформации фрактальной (а) и равновесной (б) глобул. Фрактальная глобула имеет четкую территориальную организацию, которая сильно контрастирует со смешением, наблюдаемым в равновесной глобуле.

странственной организации хроматина в ядре клетки человека с использованием набора новых методов молекулярной биологии, сокращенно называемых 3С (Chromosome Conformation Capture) и Hi-C (High-throughput C) привлекли внимание к фрактальной глобуле, как к структурной модели хроматина на крупном масштабе ~ 10 Мб [12, 13].

В указанных работах [11, 13] молекула ДНК рассматривалась как свободно-сочлененная цепь, каждый сегмент которой состоял из 2–2.5 тысяч пар оснований ДНК. В этом случае ДНК размером 10 Мб может быть смоделирована как цепочка из 4000–5000 свободно-сочлененных сегментов. Такая цепочка может образовать случайный клубок либо, если притяжение между мономерами преобладает над отталкиванием, — равновесную глобулу [2, 3].

Согласно де Жену [14], коллапс длинного полимера из-за топологических ограничений происходит с образованием складок все увеличивающихся размеров. В первую очередь появляются мелкие складки. Это приводит к образованию эффективно более толстого складчатого полимера, который затем сам образует уже более крупные складки и т. д. [11]. Авторы работы [11] продемонстрировали, что этот процесс должен приводить к образованию долгоживущего состояния, которое они назвали складчатой (впоследствии ее стали называть фрактальной) глобулой. Они предположили, что такая глобула характеризуется иерархией складок, образуя самоподобную структуру [11]. Эти складки возникают из-за топологических ограни-

чений: поскольку каждая достаточно длинная цепочка испытывает такие ограничения, они возникают из-за взаимодействия с другими частями полимера [15].

На рис. 2 показаны конформации фрактальной (а) и равновесной (б) глобулы. Фрактальная глобула имеет поразительную территориальную организацию цепочки, которая сильно контрастирует с перемешанной организацией цепочки, наблюдаемой в равновесной глобуле. Хромосомные контакты в клетках человека были охарактеризованы с помощью экспериментов Hi-C [12]. При сравнении с экспериментом оказалось, что фрактальная глобула — единственный ансамбль конформаций, который согласуется с экспериментальной вероятностью контактов в диапазоне расстояний до 10 Мб (подробнее см. в [13]). Было решено, что фрактальная глобула достаточно хорошо описывает свойства хромосомы человека на мегамасштабах или 3-м уровне структурной организации ДНК. Поэтому фрактальная глобула была предложена в качестве модели сворачивания ДНК внутри клетки на крупном масштабе.

Фрактальная глобула обладает несколькими важными свойствами, которые делают ее привлекательным способом организации хроматина. У фрактальной глобулы нет узлов. Динамика раскрытия хроматина в незаузленной конформации фрактальной глобулы очень сильно отличается от динамики раскрытия ДНК в чрезвычайно запутанной конформации равновесной глобулы [13]. На рис. 3а и б показано флуктуационное откры-

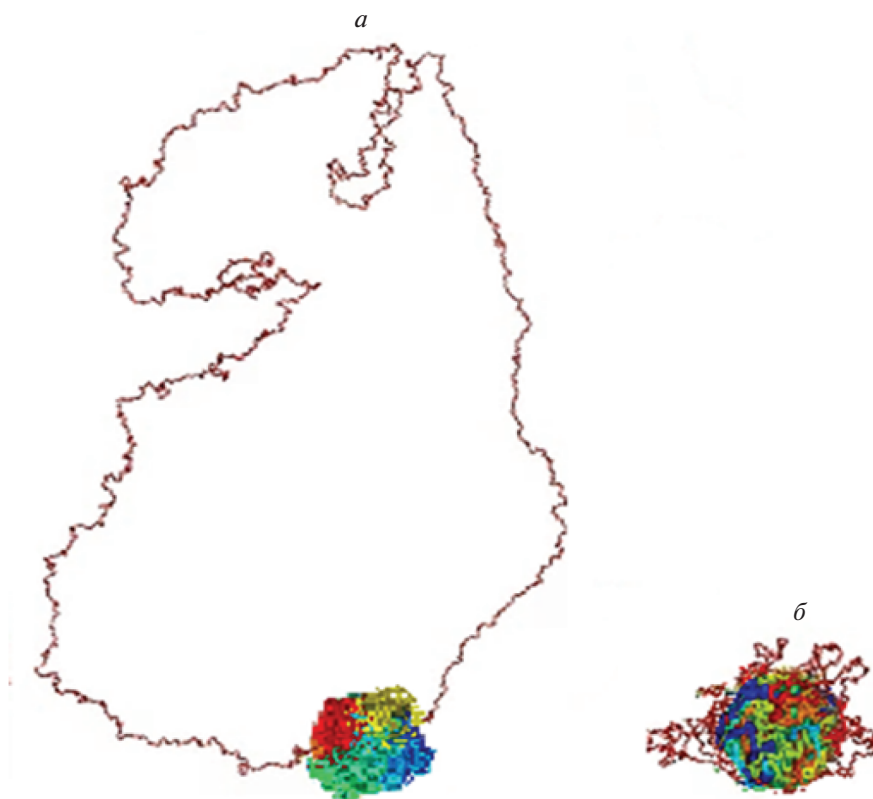


Рис. 3. Открытие петли, которая является либо частью фрактальной глобулы (*а*), либо равновесной (*б*). Глобулы из 32000 мономеров свернуты за счет парных взаимодействий притяжения [13]. Далее взаимодействия притяжения для области из 3000 мономеров были удалены, что позволило области раскрыться из-за энтропии цепи. Во фрактальной глобуле область раскрывается, образуя большую петлю (*а*). Эта же область в равновесной глобуле (*б*) не открылась из-за перепутывания цепи.

тие области размером около 3 Мб в двух глобулах — складчатой и равновесной. Для осуществления функции нужен легкий доступ к каждому кусочку цепочки ДНК. Очевидно преимущество модели, описываемой фрактальной глобулой, поскольку эта глобулярная структура позволяет практически безболезненно открыть любую петлю ДНК, открывая доступ к любому сайту ДНК (рис. 3*а*). В модели хроматина, описываемого равновесной глобулой, заузленная цепочка ДНК не позволяет открыть петлю достаточного размера и доступ к сайтам ДНК ограничен (рис. 3*б*).

Отметим следующее. Экспериментальных данных по исследованию организации бактериальной хромосомы существенно меньше, чем данных по исследованию организации хроматина человека в ядре клетки. Однако можно предположить, что бактериальный нуклеоид на мегамасштабе (рис. 1*б*) будет иметь четко очерченную территориальную организацию цепочки и складчатый механизм сворачивания, как и фрактальная глобула.

4. РОСТ БАКТЕРИЙ. БЕЛОК Dps

Бактериальный рост — это деление клетки бактерии на две дочерние клетки. Если не происходит мутационного события, полученные дочерние клетки генетически идентичны исходной клетке. Динамику роста бактериальной популяции подразделяют на четыре фазы [16]. Первая фаза роста называется лаг-фазой; это — период медленного роста, когда клетки адаптируются к среде, богатой питательными веществами, и готовятся к быстрому росту. Во время лаг-фазы происходит интенсивный синтез белков. За лаг-фазой следует логарифмическая или экспоненциальная фаза, во время которой происходит быстрый экспоненциальный рост популяции. В ходе экспоненциальной фазы питательные вещества потребляются с максимальной скоростью до тех пор, пока одно из необходимых соединений не кончится и не начнет подавлять рост. Третья фаза роста называется стационарной, она начинается при нехватке питательных веществ для быстрого роста. Скорость метаболизма падает, и клетки начинают расщеплять белки, не являющиеся строго не-

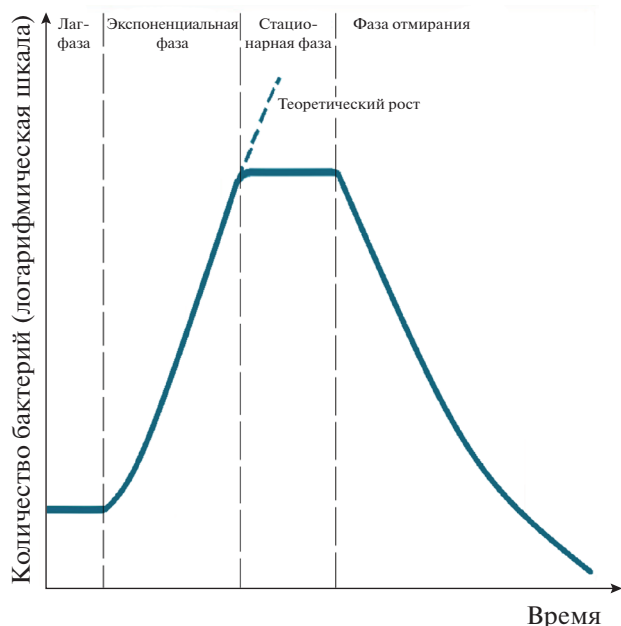


Рис. 4. Динамика роста бактерий как логарифмическая функция, где количество бактерий на мл среды зависит от времени.

обходимыми. Финальная фаза роста — фаза отмирания, при которой запас питательных веществ исчерпывается и бактерии погибают. В экспоненциальной фазе роста начинает меняться относительное содержание ДНК-ассоциированных гистонотипных белков (NAP). Например, если в фазе роста содержание белка Dps (DNA-binding protein of starved cells) составляет около 6000 белков на клетку, то в стационарной и в поздней стационарной фазе содержание Dps становится подавляющим по сравнению с другими белками — 180000–200000 белков на клетку (табл. 1). В поздней стационарной фазе решающим для конформации ДНК (архитектуры бактериального нуклеоида) становится взаимодействие ДНК с Dps. Белок Dps играет регулируемую и защитную роль в клетках *E. coli* [17–20]. При голодании Dps очень активен и может сильно изменять

структуру бактериальной ДНК. Его структура [21] и взаимодействие с ДНК недавно были изучены *in vitro* [21, 22] и *in silico* [23, 24]. Dps представляет собой додекамер и состоит из 12 идентичных цепей [21]. Структура депонирована в Protein Data Bank (PDB) — 1dps.pdb.

5. ПОКОЯЩИЕСЯ КЛЕТКИ. СТРЕСС ГОЛОДАНИЯ. СТРУКТУРНЫЙ ОТВЕТ НА СТРЕСС

Микроорганизмы в естественных условиях находятся в постоянно изменяющихся условиях окружающей среды. Изменения параметров среды воспринимаются как стресс. В ответ на любые стрессовые воздействия клетки микроорганизмов включают универсальные наследственные стратегии адаптации, основанные на структурных, биохимических и генетических перестройках, позволяющих сохранить часть популяции и выжить в любых неблагоприятных условиях. В первую очередь эти стратегии направлены на защиту генетического материала клетки (ДНК) [25, 26].

При стрессе голодания поддержание упорядоченности динамическим способом становится невозможным (практически отсутствует метаболизм) и бактерии задействуют другой, энергонезависимый механизм поддержания упорядоченности и защиты жизненно важных структур (ДНК) — создание устойчивых молекулярных структур, как в неживой природе [27]. Клетки становятся покоящимися. Большинство клеток (до 99.98%) в долгое время голодающих популяциях подвергаются автолизу (см. рис. 4 и табл. 2). Остальные клетки развиваются в покоящиеся формы, которые существенно отличаются по структурной организации от растущих клеток [28].

Для покоящихся клеток можно ожидать обнаружения совершенно новых структур конденсированной ДНК по сравнению с активно растущими клетками. Одним из механизмов структурного ответа на стресс голодания является внутриклеточная нано(био)кристаллизация ДНК с Dps (см. разд. 6 и 7). Механизм нано(био)кристалли-

Таблица 2. Количество выживших клеток при стрессе голодания

Количество выживших клеток штамма *E. coli* Top10/pBAD-DPS (КОЕ/мл)

6 ч		24 ч		48 ч		2 мес		7 мес	
$1.9 \cdot 10^9$	$4.0 \cdot 10^9$	$1.4 \cdot 10^9$	$3.6 \cdot 10^9$	$7.4 \cdot 10^8$	$1.8 \cdot 10^9$	$5.3 \cdot 10^7$	$2.5 \cdot 10^7$	$2.9 \cdot 10^7$	$6.9 \cdot 10^6$
+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
индукция	индукция	индукция	индукция	индукция	индукция	индукция	индукция	индукция	индукция

Примечание: процедура приготовления образцов описана в оригинальных работах [28–30, 43].

зации ДНК обеспечивает защиту ДНК от повреждений и потенциальную способность возобновления метаболической активности бактериальных клеток в свежей среде. Другие виды структурного ответа на стресс голодания изложены в разд. 9.

6. ИЗУЧЕНИЕ ПОКОЯЩИХСЯ КЛЕТОК. ДИФРАКЦИЯ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Рентгеноструктурный анализ (РСА) — самый дорогой и трудоемкий экспериментальный метод, применяемый в молекулярной биологии. В качестве источника излучения в рентгеновском диапазоне часто применяют синхротронное излучение. Для визуализации структуры биологических объектов используются последние достижения в биологии, химии, физике и математике. В экспериментах на синхротроне ESRF-EBS (Гренобль, Франция) пучок рентгеновского излучения имел длину волны $\lambda = 1.6799 \text{ \AA}$, плоский детектор PILATUS 6M располагался на расстоянии 95 см за образцом по ходу пучка. Измерения проводились при температуре 100 К. Образец представляет собой ансамбль клеток. Предполагается, что под действием стресса в клетках бактерий происходит нано(био)кристаллизация ДНК [29, 30]; размеры нанокристаллов находятся в пределах 200–400 нм [31, 32]. Внутриклеточные нанокристаллы ДНК располагаются под произвольными углами к падающему пучку. Рассеянное излучение собирается на плоском детекторе. Случайная ориентированность кристаллитов в образце приводит к образованию гладких дифракционных колец вокруг оси, задаваемой направлением падения пучка, в отличие от дискретных точек, наблюдаемых при рассеянии на монокристалле. Угол между осью, задаваемой падающим пучком, и дифракционным кольцом называется углом рассеяния и обозначается как 2θ . Соответственно, “период кристаллической структуры”, отвечающий данному углу рассеяния, вычисляется как

$$d = \frac{\lambda}{2 \sin \theta}.$$

Наличие в образце периодических структур с периодом d приводит в эксперименте к повышенной интенсивности рассеяния I , соответствующей данному периоду кристаллической структуры. Исследование картин рассеяния от бактериальных клеток (и грибов), содержащих внутриклеточные нано(био)кристаллы, позволяет определить характерные пространственные периоды в этих кристаллах и высказать предположения об их структуре.

Были проведены эксперименты по измерению рассеяния синхротронного излучения на образцах, содержащих клетки бактерий *E. coli* штамма BL21-Gold (DE3), трансформированного плазмидой pET-Dps и подвергнутого индукции повышенной экспрессии белка Dps [28–30]. Для популяции клеток под действием стресса голодания были зарегистрированы дифракционные картины, показанные на рис. 5 (врезка). С целью детального анализа этих данных построены графики зависимости интенсивности рассеяния I от угла рассеяния 2θ с помощью усреднения 2D дифракционных картин по азимутальному углу. Обнаружены зоны повышенной интенсивности с периодами кристаллической структуры приблизительно 90 и 45 Å в отличие от контрольных образцов клеток, где областей повышенной интенсивности замечено не было. Подробно изучение образца бактерий *E. coli* рассмотрено в работах [29, 30]. Первый широкий пик на графике лежит в области 90–93 Å. Диаметр Dps додекамера — около 90 Å, поэтому этот пик может соответствовать расстоянию между слоями Dps. Второй пик на разрешении около 45 Å может соответствовать второму порядку дифракции Dps–Dps или расстояниям ДНК–ДНК в плотно упакованном ансамбле ДНК [33].

Исследованы образцы, содержащие голодающую культуру гриба *Umbelopsis ramanniana* ВКМФ-582, в котором преобладали мицелиальные клетки. На рис. 6 приведены дифракционные данные для образца гриба (врезка), а также угловая зависимость интенсивности рассеяния. На дифрактограмме отчетливо видна область колец повышенной интенсивности, которая начинается с углов, соответствующих периоду кристаллической структуры 27–28 Å, и заканчивающаяся очень заметным кольцом повышенной интенсивности, соответствующим периоду 55 Å. При уменьшении угла рассеяния интенсивность монотонно растет.

Приведенные на рис. 5 и 6 первые результаты дифракционных экспериментов свидетельствуют о наличии периодической упорядоченной организации (скорее всего, нанокристаллической) нуклеоида бактерий с указанными выше периодами. Голодающие, обезвоженные мицелиальные клетки гриба *Umbelopsis ramanniana*, видимо, также образуют упорядоченные (нанокристаллические) структуры, о чем свидетельствуют зоны повышенной интенсивности рассеяния с периодами от 27–28 до 55 Å. Серия пиков в области, соответствующей этим значениям периодов кристаллической структуры, отражает образование ряда ДНК–белковых и липид–белковых упорядоченных образований с непрерывно меняющимся характерным размером межплоскостных расстояний. Интерпретация полученных данных требу-

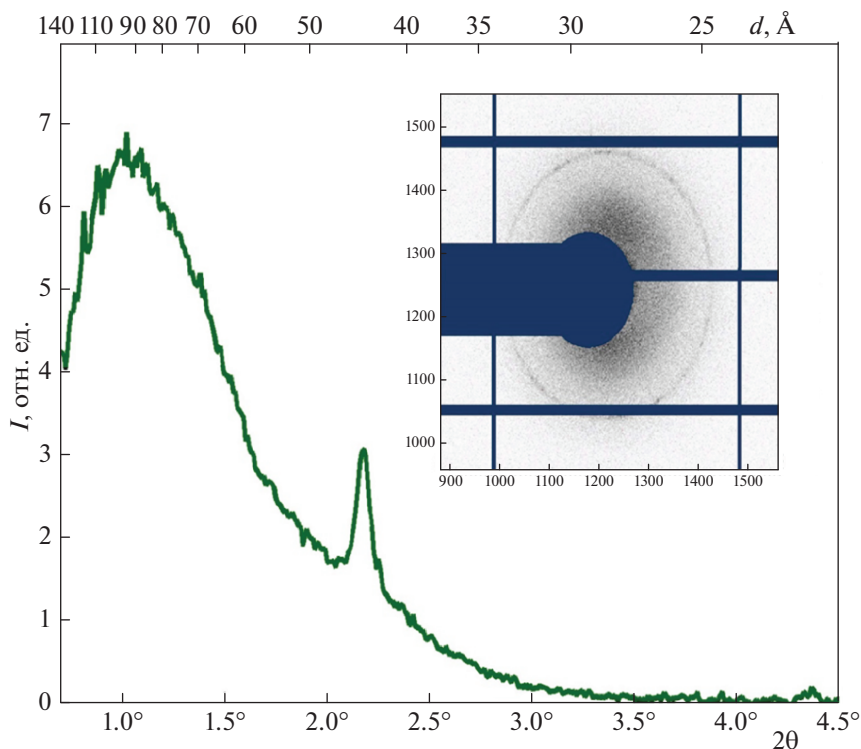


Рис 5. Зависимость интенсивности рассеяния от угла 2θ для образца штамма BL21-Gold(DE3) голодающих бактерий *E. coli*. На вставке изображена дифракционная картина для этого образца.

ет дополнения и углубления в ходе дальнейших исследований, которые будут продолжены как с помощью дифракционных экспериментов на синхротроне, малоуглового рентгеновского рассеяния, так и посредством просвечивающей электронной микроскопии.

7. ИЗУЧЕНИЕ ПОКОЯЩИХСЯ КЛЕТОК. ПРОСВЕЧИВАЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Электронно-микроскопические исследования, наряду с методами рентгеноструктурного анализа — лучшие инструменты структурной биологии. Они позволяют визуализировать структуру конденсированной в нуклеоиде ДНК. Ниже приведены результаты исследований, полученные на сверхтонких срезах с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 (Jeol, Япония) с ускоряющим напряжением 200 кВ. Томограммы получали на полутолстых (300–400 нм) срезах. Аналитическую электронную микроскопию (энергодисперсионные рентгеновские спектры (ЭДС) и элементный анализ) проводили на аналитическом просвечивающем электронном микроскопе JEM-2100 (Jeol, Япония).

Электронная микроскопия и электронно-микроскопическая томография позволили до-

биться существенного прогресса в визуализации упорядоченных ДНК–Dps образований *in vivo*. В стационарной фазе при 24-часовом стрессе голодания ДНК образует тороидальные структуры (рис. 7а). Для тороидов, возникающих в клетках *E. coli*, данные методы позволили определить форму и размеры тороидальных структур (внешний диаметр около 150 нм и внутренний диаметр около 50 нм (рис. 7а) [32]. Далее (при 36-часовом стрессе голодания) наряду с тороидальными структурами появляются кристаллические структуры ДНК–Dps (рис. 7б и в). Это позволило авторам предположить, что тороиды играют роль подложки для последующего образования кристаллов ДНК–Dps. Авторами [32] выдвинута гипотеза о том, что ДНК локализована между гексагонально упакованными слоями Dps в кристалле (рис. 7г). Это означает, что характерное расстояние между цепочками ДНК–ДНК будет около 90, а не 45 Å, как предполагалось в разд. 6.

На рис. 8а приведены результаты просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) экспоненциально растущей клетки. Темные частицы обозначают рибосомы. Место, свободное от рибосом, содержит хроматин [32]. На рис. 8б представлены результаты ПЭМ для клетки, испытывавшей стресс 48-часового голодания. Тороидальные

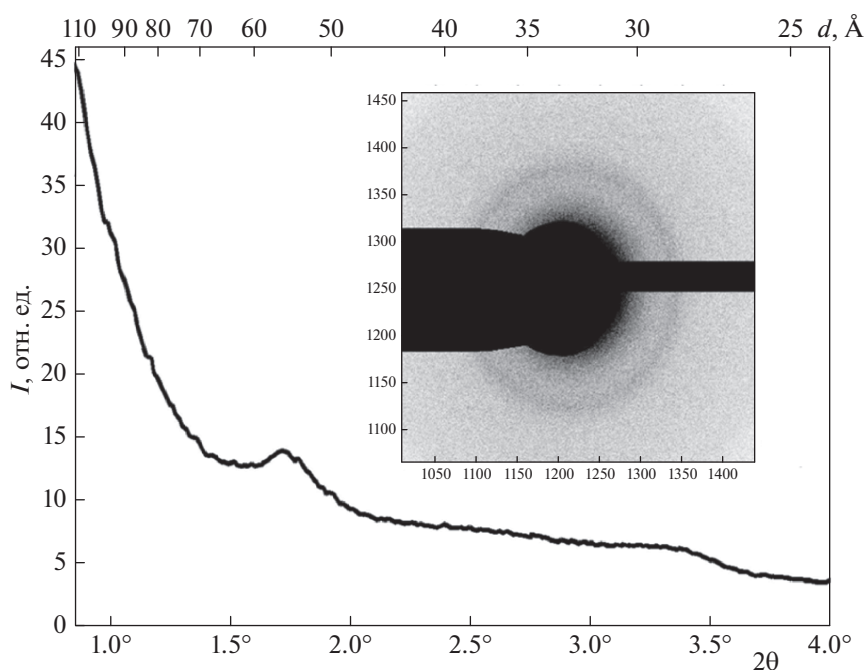


Рис. 6. Зависимость интенсивности рассеяния от угла 2θ для образца штамма ВКМ F-582 с голодающей культурой гриба *Umbelopsis ramanniana*. В образце преобладают мицелиальные клетки. На вставке изображена дифракционная картина для этого образца.

структуры исчезают, наблюдаются достаточно большие кристаллы ДНК–Dps [32]. На рис. 8в показан срез томограммы клетки с нанокристаллической структурой. На врезке рис. 8в представлен результат фурье-анализа области клетки, очерченной белой каймой. Результат фурье-анализа свидетельствует о наличии нанокристалла в этой области клетки [28]. Отфильтрованное изображение кристалла ДНК–Dps представлено на рис. 8г. На вставке к рисунку представлен профиль интенсивности электронной плотности вдоль белой линии основного изображения. Черным выделены плотности, видимо, соответствующие межслойным цепям ДНК [28]. Вопрос о точной локализации и форме укладки ДНК в нанокристаллах в комплексе с Dps остается открытым. Приведенные результаты электронно-микроскопических исследований не визуализируют ДНК напрямую, поэтому предполагаемая конформация ДНК в нанокристаллах является гипотетической, к тому же она находится в противоречии с простой интерпретацией данных по дифракции (см. разд. 6).

8. КОНДЕНСАЦИЯ ДНК *in vitro*. ИЗУЧЕНИЕ МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМ

Экспериментальные данные, полученные с помощью дифракции синхротронного излучения и методом ПЭМ, не согласованы друг с другом

полностью и не дают четкого ответа на вопрос о конформации ДНК в нанокристаллических областях клетки. Для того чтобы найти ответ на этот вопрос, было решено действовать следующим образом. Мы предположили, что комплексы ДНК–Dps легко образуют кристаллы *in vitro* и что конформация ДНК в этих кристаллах идентична конформации ДНК во внутриклеточных кристаллах. Для изучения конформации ДНК в кристаллах *in vitro* были выбраны две методики: рентгеновская кристаллография, использующая в качестве источника синхротронное излучение, и электронно-микроскопические исследования.

Сначала опишем результаты, полученные методом макромолекулярной кристаллографии. Для проведения экспериментов были синтезированы кристаллические комплексы ДНК (длиной, равной 3000 п.о.) с белком Dps. Синтезированные кристаллы оказались маленькими $\approx 3\text{--}7$ мкм. Синтезированные малые монокристаллы плохо отражали излучение, обладали низкой симметрией и неизвестной пространственной группой. Поэтому автоматическая обработка данных, хорошо работающая в случае больших кристаллов, в данном случае оказалась unsuccessful. Автоматическая обработка данных для синтезированных кристаллов выдала шесть пространственных групп, более или менее описывающих экспериментальные данные. Вот почему основной зада-

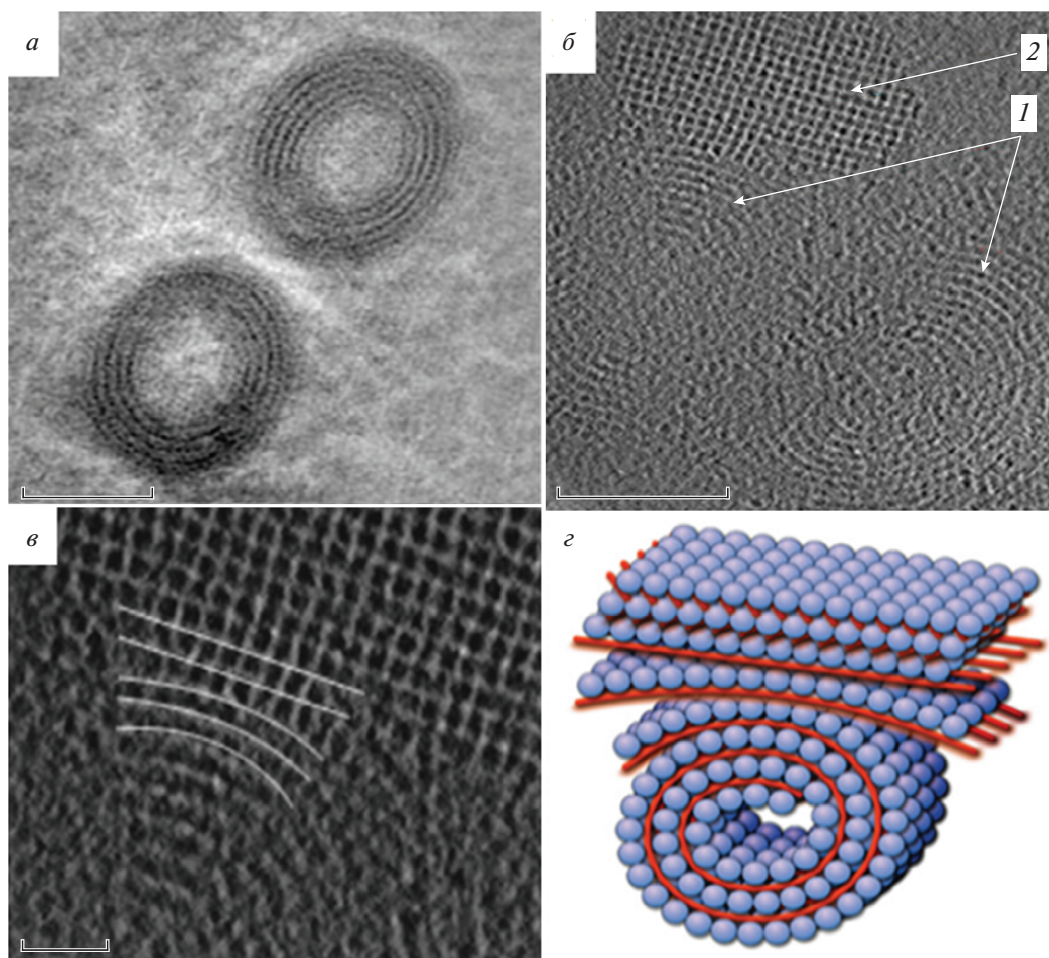


Рис. 7. ПЭМ-изображения. Последовательная внутриклеточная кристаллизация ДНК–Dps в клетках *E. coli* при стрессе голодания: *а* – при 24-часовом голодании (образование тороидов); *б* – при 36-часовом голодании – структуры ДНК (красные стрелки 1) в непосредственной близости от растущего кристалла ДНК–Dps (синяя стрелка 2); *в* – сильно увеличенная область из рис. 7б, показывающая рост кристаллов (белые линии). Масштаб – 100 (*а*, *б*) и 25 нм (*в*); *г* – модель внутриклеточной сборки ДНК–Dps изображает первоначально сформированную тороидальную структуру, которая действует как шаблон для кристалла ДНК–Dps (взято с разрешения из [32]).

чей стала задача определения пространственной группы кристалла. Для продвижения дальше и определения пространственной группы пришлось объединять общие рефлексы от разных малых монокристаллов. Первым шагом стало определение кластера, состоящего из наиболее изоморфных монокристалльных данных. Для выбора удобного набора данных и для их объединения применили иерархический кластерный анализ. Программа ccCluster [34] была использована для объединения данных (рис. 9). Оказалось, что объединение данных, принадлежащих группе P1, наиболее успешно. Эта группа показана на рис. 9 и выделена штриховой линией. Порог для группы в 0.65 означает, что средняя корреляция между этими 255 наборами (из 324 общего набора) данных равна 0.75. Объединение этих данных с помощью

программы XSCALE обеспечивает 98%-ную полноту данных с достаточно хорошей статистикой.

Таким образом, несмотря на малость размеров монокристаллов, низкую симметрию (P1), относительно большие параметры решетки и слабые рефлексы, программные комплексы Mesh&Collect и ccCluster позволили определить структуру белка Dps [35] (в процессе определения структуры оказалось, что ДНК не образовала комплекс ДНК–Dps, вышла из кристалла). Электронная плотность белка Dps с разрешением в 2.0 Å представлена на рис. 10. Структура депонирована в Protein Data Bank – ID: 6QVX [35].

Переходим к электронно-микроскопическим исследованиям. Для проведения электронно-микроскопических исследований *in vitro* были выраще-

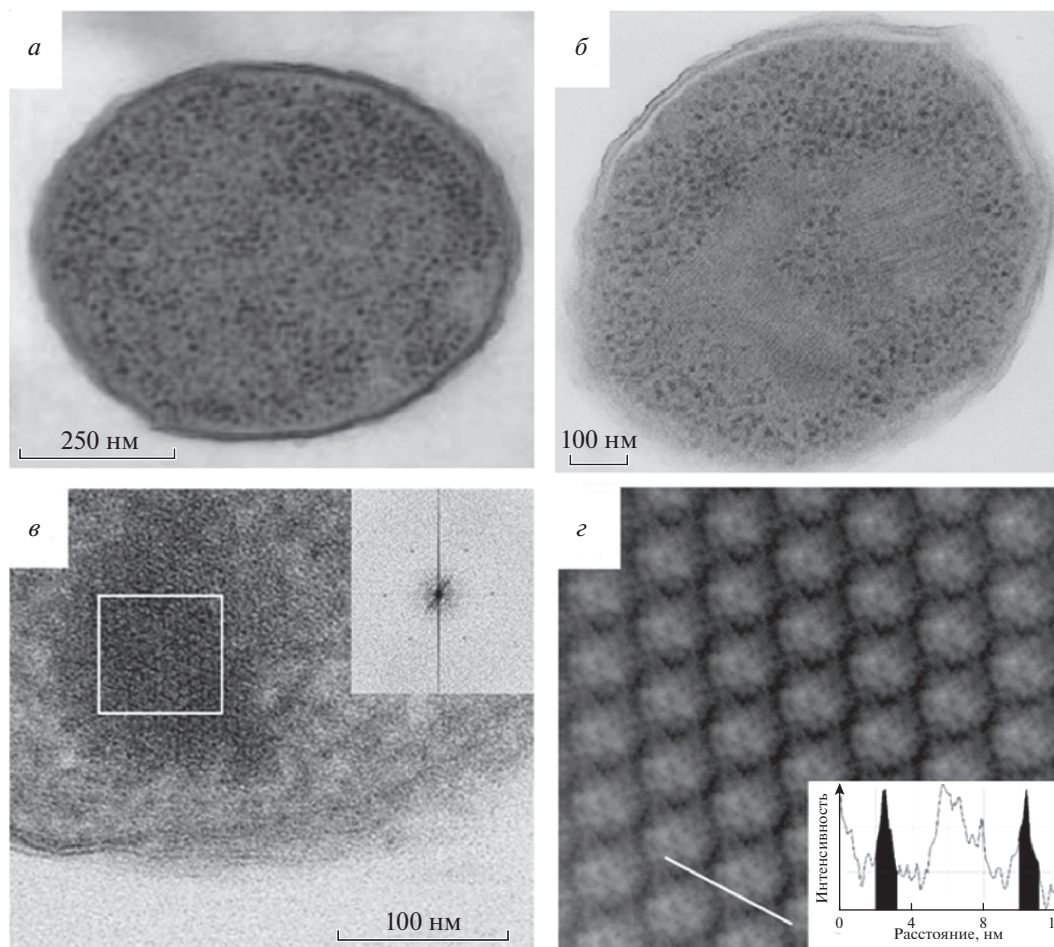


Рис. 8. Изображения ПЭМ для клеток *E. coli*: *a* — экспоненциально растущие клетки *E. coli*; темные частицы — рибосомы; пространство, свободное от рибосом, содержит ДНК; *б* — клетка *E. coli* после 48 ч голодания, выявляющая плотно упакованные кристаллы ДНК–Dps (взято с разрешения из [32]); *в* — полутолстый срез томограммы клетки *E. coli* с нанокристаллической структурой, на вставке — преобразование Фурье области в белой рамке; *г* — отфильтрованное изображение кристалла ДНК–Dps, на вставке — профиль интенсивности вдоль белой линии на основном изображении, черным цветом выделены плотности, соответствующие межслойным цепям ДНК.

ны тонкие монокристаллические комплексы из небольшой ДНК (длиной 165 п.о.) с белком Dps. Были изучены проекционные структуры кристаллов Dps–Dps и Dps–ДНК [36]. На рис. 11*а* изображены отфильтрованные изображения 2D кристаллов Dps; на этом же рисунке изображен профиль интенсивности вдоль белой линии, указанной на левом изображении. На рис. 11*б* изображены кристаллы ДНК–Dps, образованные в присутствии ионов EDTA и Zn^{2+} . Справа — профиль интенсивности вдоль белой линии на отфильтрованном изображении кристалла. При сравнении рис. 11*а* и *б* видны отчетливые изменения в интенсивностях Dps–Dps и ДНК–Dps. Стрелка указывает на повышенную плотность в основном канале между молекулами Dps; звездочками отмечена повышенная плотность во вспомогательных каналах.

Возможные варианты расположения ДНК относительно Dps показаны на рис. 12 [36]. Отметим, что данная модель практически идентична модели, приведенной в [32] (рис. 7*г*). Электронно-микроскопические исследования позволяют увидеть следы ДНК в тонких (2D) ДНК–Dps кристаллах. Чтобы объяснить противоречие с данными РСА на массивных монокристаллах, мы предположили, что тонкие (2D) ДНК–Dps кристаллы имеют увеличенную по сравнению с массивным кристаллом постоянную решетки, поэтому в тонких кристаллах есть пространство для ДНК. Однако изучение кристаллов *in vitro* не оправдало ожиданий. Четкого ответа о конформации ДНК в монокристаллах ДНК–Dps получить не удалось. Остаются лишь гипотетические, к тому же не самосогласованные

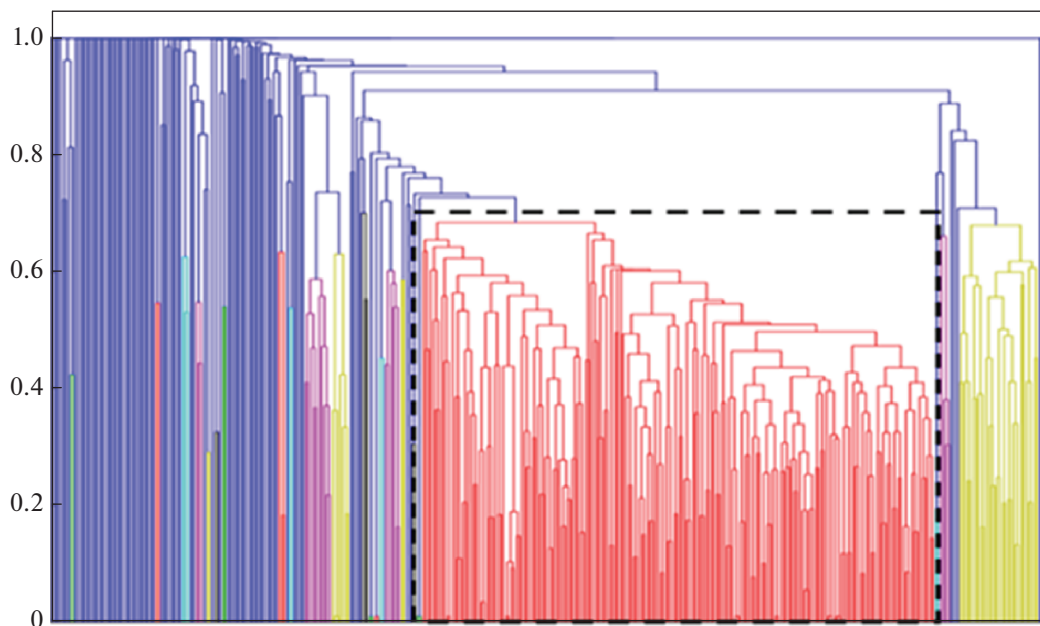


Рис 9. Иерархическая дендрограмма демонстрирует объединение наборов данных от 374 малых монокристаллов с использованием программы ccCluster [34]. Показано наиболее успешное объединение данных, принадлежащих группе P1. Эта группа данных выделена штриховой линией. Она представляет собой кластер с порогом в 0.65, содержащий 255 наборов данных.

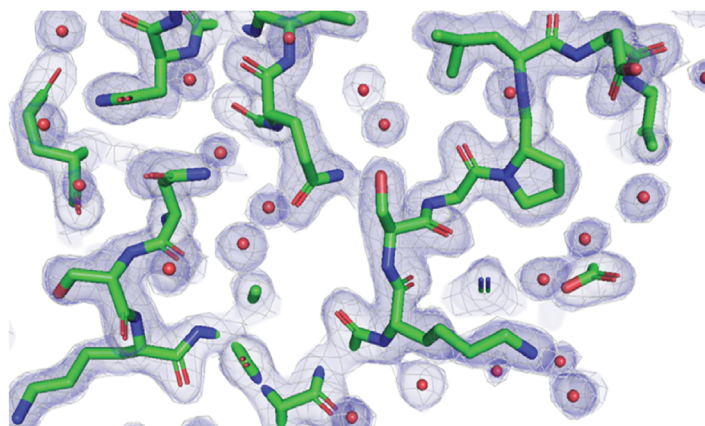


Рис. 10. Карта электронной плотности для структуры Dps, депонированной в Protein Data Bank – ID: 6QVX [35].

модели. Данные РСА и ПЭМ дают различные результаты.

9. РАЗЛИЧНЫЕ ВИДЫ КОНДЕНСАЦИИ ДНК В ПОКОЯЩИХСЯ КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ

До сих пор был рассмотрен один из основных механизмов структурного ответа, каким является внутриклеточная нано(био)кристаллизация ДНК с Dps. В этом разделе рассмотрим другие конденсированные состояния ДНК в клетке. Заметим,

что конденсация ДНК в нуклеоиде бактерий является промежуточным инженерным решением между практически свободной от белка упаковки ДНК в вирусах и определяемой белками-гистонами упаковки ДНК в эукариотах [37].

Несколько слов об упаковке ДНК в вирусах. В работе [38] с помощью криоэлектронной микроскопии была определена упаковка ДНК в вирусах-бактериофагах ф6. Оказалось, что в вирусе-бактериофаге ф6 двойная спираль ДНК (dsDNA) хранится внутри капсида в виде катушки, которая

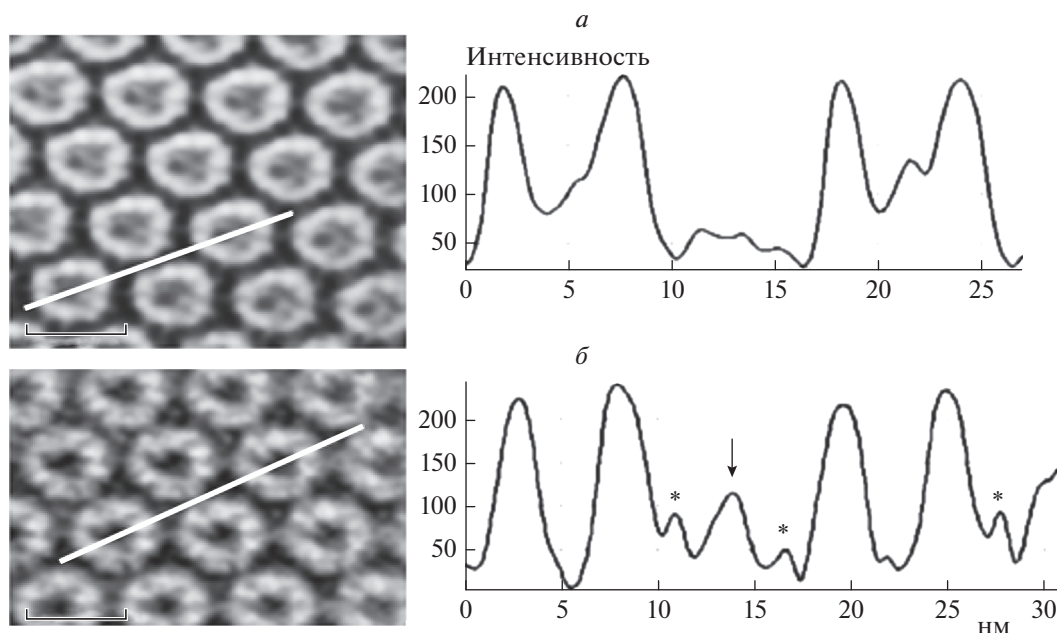


Рис. 11. Проекционные структуры кристаллов Dps–Dps и Dps–ДНК; *a* – фильтрованное изображение 2D кристаллов Dps (слева); профиль интенсивности вдоль белой линии на левом изображении (справа); *б* – Dps–ДНК (кристаллы, образованные в присутствии ионов EDTA и Zn^{2+}) (слева); профиль интенсивности вдоль белой линии на отфильтрованном изображении кристаллов (справа); стрелка – повышенная плотность в основном канале между молекулами Dps; звездочки – повышенная плотность во вспомогательных каналах; масштаб – 10 нм.

имеет различные типы намотки, приводящие к различным типам жидкокристаллической упаковки. Упаковки могут меняться от гексагональной к холестерической и изотропной на разных этапах функционирования бактериофага ф6.

Перейдем к покоящимся бактериальным клеткам [39]. Примечательно, что жидкокристаллические структуры были обнаружены во всех популяциях клеток *E. coli*: как с геном *dps*, так и без гена *dps* (Dps-null), т.е. в отсутствие белка Dps в клетке. В некоторых клетках ДНК имеет вид холестерического жидкого кристалла (рис. 13*a* и *в*). Упаковка ДНК в жидкокристаллической фазе снижает доступность молекул ДНК к различным повреждающим факторам, включая облучение, окислители и нуклеазы [27]. Клетка на рис. 13*б* обладает изотропным жидкокристаллическим типом конденсации ДНК [38, 40]. ДНК в клетке на рис. 13*в* имеет отчетливо выраженный холестерический порядок [27] (клетка без гена *dps* (Dps-null)). ДНК расположена в виде вложенных дуг, характерных для холестерической фазы; рибосомы выглядят как темные частицы и находятся на периферии клетки. Небольшое, по сравнению с фосфором (P), количество серы (S) (рис. 13*г*) отражает малое, в сравнении с ДНК, количество Dps в жидкокристаллической фазе на рис. 13*б*. Отметим, что жидкокристаллический тип конденсации ДНК –

это единственный случай (кроме тороидов ДНК), для которого легко визуализировать ДНК в покоящейся клетке (особенно для штамма Dps-null), поскольку белка Dps либо мало (рис. 13*a*, *б*), либо он вообще отсутствует (рис. 13*в*).

Особый интерес представляет третий тип упорядоченной структуры, обнаруженный в покоящихся клетках *E. coli* впервые [28]: свернутая нуклеосомоподобная структура. Во всех изученных популяциях (кроме мутанта Dps-null) как с избыточной продукцией Dps, так и без нее, цитоплазма от 5 до 25% клеток наполнена множеством сферических структур (рис. 14*a*, *б* и *в*) со средним диаметром 30 нм. Такие структуры чаще присутствуют в клетках, выросших на синтетической среде (см. табл. 3). Томографические исследования (рис. 14*г*) наглядно продемонстрировали, что эти структуры не являются тороидами, описанными ранее [32, 41, 42] (см. рис. 7*a*), но представляют собой почти сферические образования. Вспоминая, что бактериальный нуклеоид представляет собой промежуточное инженерное решение между свободной от белка упаковкой ДНК в вирусах и определяемой белками-гистонами упаковкой ДНК в эукариотах [37], данный тип конденсации ДНК был назван нами “свернутой нуклеосомоподобной” структурой [28]. Таблица 3 отражает тенденцию (в процентах от общего коли-

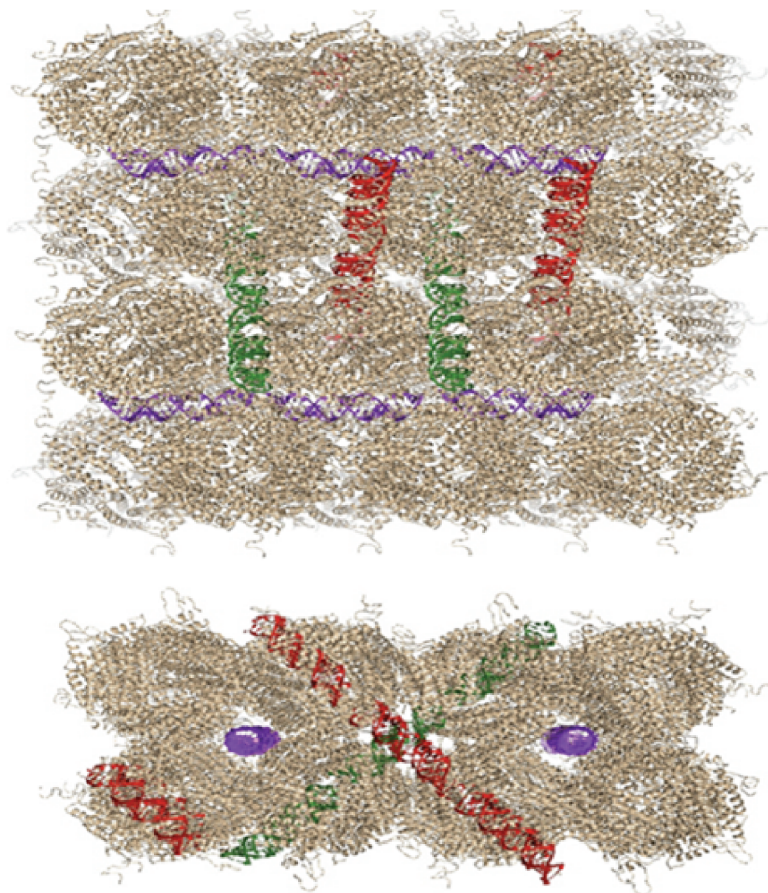


Рис. 12. Возможные варианты расположения ДНК–Dps: а – вид сверху, б – вид сбоку.

чества клеток) образования определенной структуры конденсированной ДНК для клеток определенного штамма и условий роста после длительного голодания.

Элементный анализ показал, что сферические агрегаты действительно содержат S (сера) и P (фосфор) пики, указывающие на присутствие ассоциатов ДНК–Dps [28]. В бактериальных клетках сферические образования молекул Dps (см. рис. 15) могут действовать аналогично гистонам, на которые накручивается ДНК (гистоноподобное поведение). ДНК может также проходить сквозь сферические образования бусинок Dps, образуя “бусины на нитке” (рис. 15). Для противодействия внешним стрессовым факторам эти образования должны располагаться на бактериальной ДНК достаточно плотно. Кроме того, как и в случае эукариотических клеток, где нуклеосомы сворачиваются, чтобы образовать фибриллы, которые, складываясь дальше, образуют хроматин хромосомы, “бусины на нити” могут путем

множественного складывания образовать компактную структуру, похожую на складчатую глобулу (рис. 15). Схематическое изображение образования свернутой нуклеосомоподобной структуры представлено на рис. 15. Внешние молекулы Dps могут налипать на глобулу и дополнительно защищать ДНК [28, 43].

10. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В обзоре представлены оригинальные и литературные данные по изучению архитектуры нуклеоида покоящихся клеток, полученные с помощью дифракции синхротронного излучения и методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Результаты дифракционных экспериментов свидетельствуют о наличии периодической упорядоченной организации (скорее всего, нанокристаллической) нуклеоида бактерий во всех изученных объектах, подвергнутых стрессу голодания: бактерии *E. coli*, споры и бактерии *Ba-*

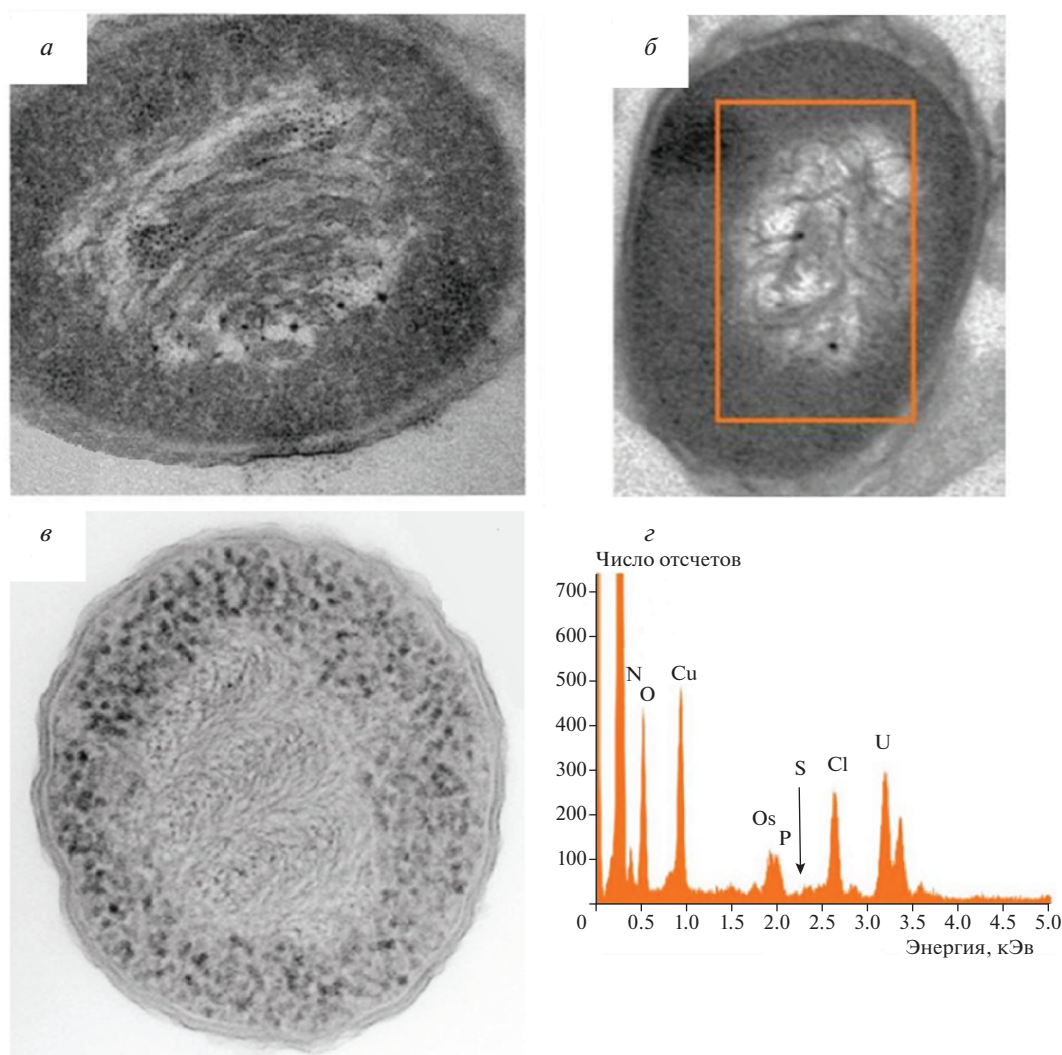


Рис. 13. Жидкокристаллические ансамбли ДНК–Dps в покоящихся клетках *E. coli*: *а* – штамм Top10/pBAD-DPS (среда M9, индуцированная продукцией Dps в фазе линейного роста, возраст – 7 мес); *б* – штамм BL21-Gold (DE3)/pET-DPS в тех же условиях, что и в случае *а*; *в* – голодающие клетки *E. coli* (мутант Dps-null, т.е. белки Dps отсутствуют), видна холестерическая жидкокристаллическая фаза ДНК: ДНК (в виде вложенных дуг, характерных для холестерической фазы) и рибосомы, которые выглядят как темные частицы на периферии клетки, четко разделены по фазам; *г* – спектр ЭДС образца штамма из области рис. 13*б*, ограниченной прямоугольником. Отчетливо видно, что содержание фосфора Р сильно превышает содержание серы S.

cillus cereus (результаты не представлены (см. [29])), мицелиальный гриб *Umbelopsis ramanniana*.

Более тонкую визуальную информацию о типе конденсации ДНК в нуклеоиде бактерий дает просвечивающая электронная микроскопия. В результате исследований с помощью ПЭМ удалось показать, что нет единого способа конденсации ДНК в популяции покоящихся клеток *E. coli*. В эксперименте наблюдались внутриклеточные нанокристаллические, жидкокристаллические и свернутые нуклеосомоподобные структуры ДНК (табл. 3). Доля специфической структуры зависит от штамма и условий культивирования. Сверну-

тая нуклеосомоподобная структура наблюдалась и описана в первый раз в оригинальных исследованиях авторов [28, 43]. Конформация ДНК хорошо визуализируется в жидкокристаллических структурах, где нет экранирования ДНК белком Dps. В нанокристаллических и свернутых нуклеосомоподобных структурах ДНК визуализируется плохо, белок Dps не только снижает доступность молекул ДНК к различным повреждающим факторам, включая облучение, окислители и нуклеазы [27], но и мешает визуализации ДНК. На рис. 8*г* и 11*б* видны скорее следы ДНК, чем сама ДНК. ДНК не визуализируется с помощью ПЭМ и в растущей

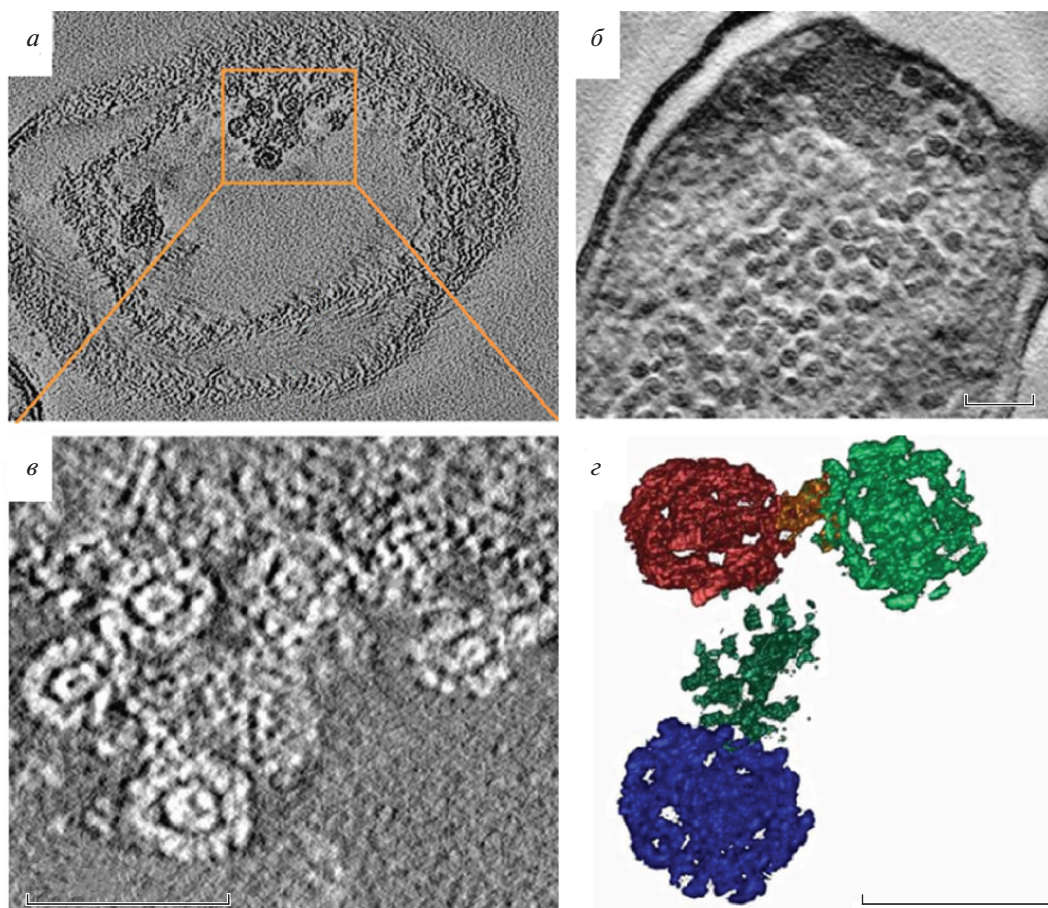


Рис. 14. Свернутая нуклеосомоподобная структура ДНК–Dps в покоящихся клетках *E. coli*: *a* – томограмма клетки *E. coli* штамм Top10/pBAD-DPS (среда M9, без индукции производства Dps, возраст – 7 мес, масштаб – 500 нм); *б* – томограмма клетки *E. coli*, штамм BL21-Gold (DE3)/pET-DPS (среда M9, с индуцированной продукцией Dps в фазе линейного роста, возраст – 7 мес, масштаб – 100 нм); *в* – выделенная область на рис. 14а с большим увеличением, масштаб – 50 нм; *г* – трехмерная реконструкция сферических ассоциатов Dps, масштаб – 30 нм.

клетке (см. рис. 8а). Известно лишь, что пространство, свободное от рибосом, содержит бактериальную хромосому [32].

Первые разделы обзора посвящены результатам пятидесятилетнего экспериментального изучения архитектуры нуклеоида бактерий, находящихся в стадии активного экспоненциального роста. Эти исследования не могли дать и не дали сведения с хорошим пространственным разрешением о структуре нуклеоида [6]. Однако они показали, что конденсированная ДНК в нуклеоиде имеет иерархическую структуру [6–8]. Иерархическая структурная организация компактной ДНК имеет три уровня. Первый уровень структурной организации обеспечивается взаимодействием ДНК-ассоциированных белков (NAP) с ДНК. На втором уровне структурной организации бактериальной ДНК образуются плектонемичные сверхспиральные петли ДНК. На мегамасштабе

ДНК образует шесть пространственно-организованных доменов (макродоменов) с четкой территориальной организацией, как у фрактальной глобулы, на которые разделен бактериальный нуклеоид.

При переходе от активно растущих к покоящимся клеткам, образующимся при стрессе голодания, ситуация радикально меняется. Химия и структура живых систем поддерживаются исключительно энергозависимым динамическим порядком [27, 44]. В растущей клетке (наличие метаболизма) упорядоченность поддерживается динамическим способом. При стрессе голодания поддерживать упорядоченность динамическим способом становится невозможным (практическое отсутствие метаболизма) и бактерии задействуют другой, энергонезависимый механизм поддержания упорядоченности и защиты жизненно важных структур (ДНК) – создание устойчивых молекулярных структур, как в неживой природе [27]. Клетки становятся покоящими-

Таблица 3. Различные типы конденсированного состояния ассоциата ДНК–Dps в изучаемых покоящихся клетках *E. coli*

Описание образца			Тип конденсированной структуры, % от нахождения в клетке			
Штамм <i>E. coli</i>	Условия культивации		нанокристаллическая	жидкокристаллическая	свернутая нуклеосомоподобная структура	структура не определена
	среда роста	оверэкспрессия Dps				
K-12 MG1655 Δdps	LB	–	0	73 ± 6	0	27 ± 3
K-12 MG1655	M9	–	47 ± 4	31 ± 2	13 ± 2	9 ± 1
Top 10	LB	–	69 ± 6	20 ± 2	4 ± 1	7 ± 1
Top10/pBAD-DPS	LB	–	71 ± 6	16 ± 1	5 ± 1	8 ± 1
	M9	–	26 ± 2	50 ± 4	14 ± 1	10 ± 1
	LB	+	78 ± 6	8 ± 1	5 ± 1	9 ± 1
	M9	+	32 ± 2	36 ± 3	21 ± 1	11 ± 1
BL21-Gold(DE3)/pET-DPS	M9	+	50 ± 4	23 ± 2	17 ± 1	10 ± 1

Примечание: процедура приготовления различных штаммов *E. coli* и условия культивации описаны в оригинальных работах [28–30, 43].

ся. Изменения в окружающей среде должны влиять на архитектуру нуклеоида. Поэтому мы ожидали обнаружить в покоящихся клетках совершенно новые, по сравнению с растущими клетками, устойчивые молекулярные структуры, подобные тем, что встречаются в неживой природе. В эксперименте действительно обнаружены три вида стабильной конденсации ДНК в покоящихся клетках *E. coli*, отличные от компактной структуры ДНК в растущих клетках. Первые два вида: нанокристаллическая и жидкокристаллическая структуры типичны для неживой природы (рис. 7, 8, 13). Третий вид: свернутая, нуклеосомоподобная структура может быть результатом сложного взаимодействия и множественного сворачивания длинных молекул ДНК вокруг додекамеров Dps и их ассоциатов (рис. 14 и 15). Таким образом, новые структуры в покоящихся клетках были обнаружены [22, 27–32]. Изменения в окружающей среде повлияли на архитектуру нуклеоида. Однако эти изменения, скорее всего, не затрагивают саму иерархию структуры ДНК в нуклеоиде. Возникает вопрос, структуры какого уровня наблюдались в описанных экспериментах и приведены на рис. 7, 8, 13, 14? Можно ли обнаружить структуры вто-

рого (промежуточного) и третьего (макродомены) уровней компактизации методами, какие использованы в данной работе? Суперспираль ДНК (второй уровень компактизации), например, визуализирована не была. Возможно, это связано с точностью визуализации ДНК используемыми методами. Возможно, суперспирали ДНК в покоящихся формах клеток перерождаются в обычные линейные ДНК. В данной работе методом ПЭМ изучена структура ДНК, находящаяся в тонких 2D-срезах. Изучение тонких 2D-срезов, конечно, недостаточно, чтобы описать объемную 3D-структуру нуклеоида клетки. Методом ПЭМ, использованным в работе, видимо, можно визуализировать лишь структуры, принадлежащие нижнему, первому уровню компактизации ДНК.

С помощью синхротронного излучения извлекается информация о структуре целой клетки, однако эта информация бедна; она говорит лишь о наличии или отсутствии упорядочения в клетке, позволяет грубо оценить размеры нанокристаллов. Затрагивают ли обнаруженные нанокристаллы макродомены? На все эти многочисленные вопросы исследования, приведенные в обзоре, не дают ответа.

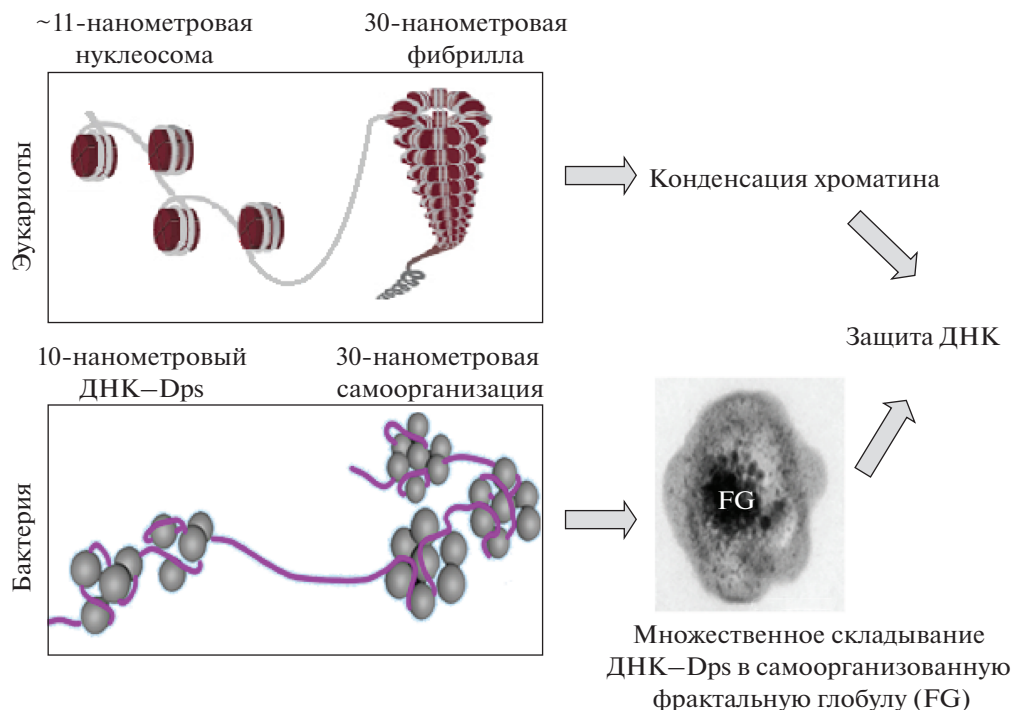


Рис. 15. Сравнение схем компактизации ДНК в прокариотических и эукариотических клетках. Верхняя схема — нуклеосомы эукариот (гистоновые белки, обернутые ДНК) складываются в 30-нанометровые фибриллы, которые, в свою очередь, складываются, образуя волокна и хроматин, защищая ДНК от внешних факторов. Нижняя схема — прокариоты не имеют гистонов, но ДНК обвивается вокруг молекул Dps или проходит через ассоциаты белков Dps, чтобы сначала сформировать “бусины на нити”, которые затем могут складываться в сферические агрегаты размером 30 нм в диаметре и, далее, путем множественного складывания, переходит в глобулу ДНК–Dps — структуру, которая эффективно защищает нуклеоидную ДНК от внешних воздействий.

11. ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

XX век был веком рентгеноструктурного анализа. С помощью рентгеноструктурного анализа определена структура многих молекул, в том числе макромолекул белков и ДНК. Все молекулы, которые можно было закристаллизовать в сравнительно большие кристаллы, исследованы и их структура определена. Однако, как мы видели в разд. 8, для макромолекул, образующих кристаллы размерами в несколько микрон, определение структуры уже представляет трудную задачу. Сейчас на первое место выходят исследования структур некристаллических объектов: вирусов и клеток. Последние достижения в методике визуализации дают надежду, что путь к трехмерной (3D) визуализации архитектуры нуклеоида *in vivo* с высоким разрешением будет пройден в обозримое время. Методы визуализации и томографии на наноуровне, используемые на синхротроне ESRF-EBS (Гренобль, Франция) позволяют количественно оценивать 3D-структуру и элементный состав образцов в их естественном состоянии [45]. С помощью флуоресцентной спектроскопии и томографии на наноуровне

можно изучать 3D-распределение фосфора Р и, следовательно, ДНК по всей клетке [46]. К сожалению, пространственное разрешение этого метода не превышает в настоящий момент 20 нм. Развитие метода визуализации на наноуровне ведет к созданию рентгеновского микроскопа. Пока это — картина будущего, но исследователи в данной области уже сейчас вместо термина “рентгеновская дифракция” употребляют термин “рентгеновская микроскопия” [45, 46].

Быстро развиваются методы электронной микроскопии. В них начинают использовать замораживание образцов под высоким давлением для сохранения естественной структуры. Такие образцы можно разделить на замороженные гидратированные срезы и анализировать их с помощью криоэлектронной микроскопии [47]. Срезы можно также изготавливать сфокусированным ионным пучком, после чего (срез за срезом) визуализировать архитектуру клетки в трех измерениях (3D) [48]. В работе [49] для визуализации хроматина *in situ* был использован улучшенный метод обнаружения ДНК (с помощью флуоресцентного красителя), который получил название “томография

ChromEM” или ChromEMT. Метод ChromEMT позволил определить структуру и трехмерную (3D) организацию нитей хроматина, организацию крупномасштабных (мегабазных) доменов и митотических хромосом.

Очевидно, что наибольшие успехи принесет сочетание методов, использующих синхротронное излучение и электронную микроскопию. Описанные выше методические успехи облегчат в ближайшем будущем визуализацию архитектуры нуклеоида с высоким разрешением. Сначала это будет сделано для активно растущей клетки. Далее будет дан ответ на один из наиболее интересных вопросов – каким образом внешняя среда (например, стресс голодания) влияет на 3D-архитектуру нуклеоида.

Автор приносит искреннюю благодарность своим постоянным соавторам Н.Г. Лойко, В.В. Коваленко, О.С. Соколовой, А.В. Моисеенко, К.Б. Терешкиной, Г.И. Эль-Регистан, Э.В. Терешкину, А.Н. Попову за большой вклад в совместное развитие данного направления исследований, И.В. Гордеевой за большую помощь при оформлении рукописи.

Автор благодарит за финансовую поддержку Министерство науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание № 0082-2019-0015, в рамках которого был написан этот обзор).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Циммер К. Микрокосм: *E. coli* и новая наука о жизни / Пер. с англ. М.: Альпина нон-фикшн, 2013.
2. Grosberg A.Y., Khokhlov A.R. Statistical physics of macromolecules. New York: AIP, 1994.
3. Bloomfield V.A. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1996. V. 6. P. 334.
4. Stonington O.G., Pettijohn D.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1971. V. 68. № 1. P. 6.
5. Крупянский Ю.Ф., Гольданский В.И. // УФН. 2002. Т. 172. № 11. С. 1247.
6. Verma S.C., Qian Z., Adhya S.L. // PLoS. Genet. 2019. V. 15. № 12. e1008456
7. Trun N., Marko J. // Amer. Soc. Microbiol. News. 1998. V. 64. № 5. P. 276.
8. Valens M., Penaud S., Rossignol M., Cornet F., Boccard F. // EMBO J. 2004. V. 23. № 21. P. 4330.
9. Talukder A., Ishihama A. // Science China Life Sciences. 2015. V. 58. № 9. P. 902.
10. Azam T.A., Ishihama A. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274(46). P. 33105.
11. Grosberg A.Y., Nechaev S.K., Shakhnovich E.I. // J. Phys. France. 1988. V. 49. № 11. P. 2095.
12. Lieberman-Aiden E., Van Berkum N.L., Williams L. et al. // Science. 2009. V. 326. P. 289.
13. Mirny L.A. // Chromosome Res. 2011. V. 19. P. 37.
14. Gennes P.G.D. Scaling concepts in polymer physics. Ithaca: Cornell University Press, 1979.
15. Khokhlov A.R., Nechaev S.K. // Phys. Lett. A. 1985. V. 112. P. 156.
16. Zwietering M.H., Jongenburger I., Rombouts F.M., van't Riet K. // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. № 6. P. 1875.
17. Chiancone E. // Front. Biosci. 2010. V. 15. P. 122.
18. De Martino M., Ershov D., van den Berg P.J., Tans S.J., Meyer A.S. // J. Bacteriol. 2016. V. 198. P. 1662.
19. Almiron M., Link A.J., Furlong D., Kolter R. // Genes Dev. 1992. V. 6. P. 2646.
20. Calhoun L.N., Kwon Y.M. // J. Appl. Microbiol. 2011. V. 110. P. 375.
21. Grant R.A., Filman D.J., Finkel S.E., Kolter R., Hogle J.M. // Nat. Struct. Biol. 1998. V. 5. P. 294.
22. Frenkiel-Krispin D., Minsky A. // J. Struct. Biol. 2006. V. 156. P. 311.
23. Tereshkin E., Tereshkina K., Loiko N., Chulichkov A., Kovalenko V., Krupyanskii Y. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2019. V. 37. P. 2600.
24. Tereshkin E.V., Tereshkina K.B., Kovalenko V.V., Loiko N.G., Krupyanskii Yu.F. // Russ. J. Phys. Chem. B. 2019. V. 13. № 5. P. 769.
25. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005.
26. Ткаченко А.Г. Молекулярные механизмы стрессовых ответов у микроорганизмов. Екатеринбург: Уро РАН, 2012.
27. Minsky A., Shimoni E., Frenkiel-Krispin D. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2002. V. 3. P. 50.
28. Loiko N., Danilova Y., Moiseenko A. et al. // PLOS ONE. 2020. V. 15. № 10. e0231562.
29. Krupyanskii Y.F., Loiko N.G., Sinitsyn D.O., Tereshkina K.B., Tereshkin E.V., Frolov I.A. et al. // Crystallogr. Rep. 2018. V. 63. P. 594.
30. Sinitsyn D.O., Loiko N.G., Gularyan S.K., Stepanov A.S., Tereshkina K.B., Chulichkov A.L. et al. // Russ. J. Phys. Chem. B. 2017. V. 11. P. 833.
31. Wolf S.G., Frenkiel D., Arad T., Finkel S.E., Kolter R., Minsky A. // Nature. 1999. V. 400. P. 83.
32. Frenkiel-Krispin D., Ben-Avraham I., Englander J., Shimoni E., Wolf S.G., Minsky A. // Mol. Microbiol. 2004. V. 51. P. 395.
33. Reich Z., Wachtel E., Minsky A. // Science. 1994. V. 264. № 5164. P. 1460
34. Santoni G., Zander U., Muellet-Dieckmann Ch., Leonard G., Popov A. // J. Appl. Crystallogr. 2017. V. 50. P. 1844.
35. Kovalenko V., Popov A., Santoni G., Loiko N., Tereshkina K., Tereshkin E., Krupyanskii Y. // Acta Crystallogr. 2020. V. 76. P. 568.
36. Moiseenko A., Loiko N., Tereshkina K., Danilova Y., Kovalenko V., Chertkov O., Feofanov A.V., Krupyanskii Y.F., Sokolova O.S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2019. V. 517. № 3. P. 463.

37. *Teif V.B., Bohinc K.* // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2011. V. 105. P. 208.
38. *Ilca S.L., Sun X., El Omari K., Kotecha A., de Haas F., DiMaio F. et al.* // Nature. 2019. V. 570. P. 252.
39. *Loiko N.G., Suzina N.E., Soina V.S., Smirnova T.A., Zubasheva M.V., Azizbekyan R.R. et al.* // Microbiology. 2017. P. 703.
40. *Speir J.A., Johnson J.E.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 2012. V. 22. P. 65.
41. *Blinov V.N., Golo V.L., Krupyanskii Y.* // Nanostuctures. Math. Phys. Model. 2015. V. 12. P. 5.
42. *Vasilevskaya V.V., Khokhlov A.R., Kidoaki S., Yoshikawa K.* // Biopolymers. 1997. V. 41. P. 51.
43. *Loiko N., Danilova Y., Moiseenko A., Kovalenko V., Tereshkina K., El-Registan G.I., Sokolova O.S., Krupyanskii Y.F.* // bioRxiv Cell Biology. 2020.
44. *Шрёдингер Э.* Что такое жизнь с точки зрения физики? М.: РИМИС, 2009.
45. *Procopio A., Malucelli E., Pacureanu A. et al.* // ACS Cent. Sci. 2019. V. 5. P. 1449.
46. *Santos S., Yang Y., Rosa M. et al.* // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 17217.
47. *Vanhecke D., Graber W., Studer D.* // Methods Cell Biol. 2008. V. 88. P. 151.
48. *Narayan K., Subramaniam S.* // Nat. Methods. 2015. V. 12. № 11. P. 1021.
49. *Ou H.D., Phan S., Deerinck T.J., Thor A., Ellisman M.H., O'Shea C.C.* // Science. 2017. V. 357(6349). eaag0025