

===== К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ АКАДЕМИКА В.И. ГОЛЬДАНСКОГО =====

УДК 573.7; 577.3; 577.1; 577.15

КОНДЕНСАЦИЯ ДНК В БАКТЕРИЯХ

© 2023 г. Ю. Ф. Крупянский^{1*}, А. А. Генералова¹, В. В. Коваленко¹, Н. Г. Лойко^{1, 2},
Э. В. Терешкин¹, А. В. Моисеенко^{1, 3}, К. Б. Терешкина¹, О. С. Соколова³, А. Н. Попов⁴

¹Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук,
Москва, Россия

²Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук,
Москва, Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴European Synchrotron Radiation Facility, 71, avenue des Martyrs, CS 40220, 38043 Grenoble Cedex 9, France

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

Поступила в редакцию 11.01.2023;

после доработки 18.01.2023;

принята в печать 20.01.2023

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) организована в нуклеоиде активно растущей клетки иерархически — с тремя уровнями компактизации ДНК. Нижний уровень (малый масштаб ≥ 1 Кбайт пар оснований) обеспечивается взаимодействием со связанными с ДНК белками. Активно растущие клетки поддерживают динамический, далекий от равновесия порядок благодаря метаболизму. При переходе клеток в покоящееся состояние (практически полное отсутствие метаболизма) обычные биохимические способы защиты ДНК перестают работать, и клетки, адаптируясь к новым условиям, вынуждены использовать физические механизмы защиты ДНК. Проведено изучение структуры ДНК в нуклеоиде покоящихся клеток, образующихся при стрессе голодания, с помощью методов дифракции синхротронного излучения и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Экспериментальные результаты позволили визуализировать структуру нижнего иерархического уровня компактизации ДНК в нуклеоиде покоящихся клеток. Впервые проведенная серия дифракционных экспериментов свидетельствует о наличии периодической упорядоченной организации ДНК во всех изученных бактериях. Метод ПЭМ позволил извлечь тонкую визуальную информацию о типе конденсации ДНК в нуклеоиде бактерии *Escherichia coli* (*E. coli*). Обнаружены внутриклеточные нанокристаллические, жидкокристаллические и свернутые нуклеосомоподобные структуры ДНК. Свернутая нуклеосомоподобная структура наблюдалась впервые, она является результатом множественного сворачивания длинных молекул ДНК вокруг связывающего ДНК белка голодающих клеток (Dps) и его ассоциатов. Обнаруженные нами различные типы конденсированного состояния ДНК в изучаемых покоящихся клетках *E. coli* (гетерогенность конденсации ДНК) дают дополнительные аргументы в пользу концепции, рассматривающей микробную популяцию как многоклеточный организм. Проведено изучение изменений в архитектуре ДНК под влиянием химического аналога аутоиндуктора анабиоза 4-гексилрезорцина (4-ГР). Рост концентрации 4-ГР индуцирует переход части клеток популяции в анабиотическое покоящееся состояние, а затем — и в мумифицированное состояние. Проведенные исследования структуры ДНК в анабиотическом и мумифицированном состояниях показывают спектроскопическую идентичность структуры ДНК в покоящемся анабиотическом состоянии и в покоящемся состоянии, образующемся при стрессе голодания. Исследования структуры ДНК в мумифицированном состоянии показывают сильное отличие последней от структуры ДНК в анабиотическом состоянии.

Ключевые слова: дезоксирибонуклеиновая кислота, бактерия *Escherichia coli*, стресс голодания, внутриклеточные структуры — нанокристаллическая, жидкокристаллическая, свернутая нуклеосомоподобная, аутоиндуктор анабиоза, 4-гексилрезорцин, анабиотическое и мумифицированное состояние.

DOI: 10.31857/S0207401X23060067, EDN: UILPBU

ВВЕДЕНИЕ

В 1974–1975 гг. В.И. Гольданский, 100-летию со дня рождения которого посвящена данная статья, организовал в Отделе строения вещества ИХФ АН СССР семинары по динамическим и

функциональным свойствам белков, на которых выступали проф. Г.И. Лихтенштейн из Черногловки и чл.-корр. академии наук (ныне — академик) А.Б. Рубин из МГУ. Оба доклада произвели большое впечатление. В.И. Гольданский выступил после докладов и заявил, что в Отделе строе-

ния вещества ИХФ надо начинать заниматься биологическими системами. Начиная с этого времени как минимум четверть широчайших научных интересов Виталия Иосифовича была связана с работами по динамике белков. Для многих, включая одного из авторов данной статьи (Ю.Ф. Крупянский), началась эпоха изучения динамики белка — чрезвычайно нужного и перспективного направления исследований. Его зарубежные коллеги в это время думали так же. Работы по динамике белков стали основной темой зарождающегося сотрудничества с Институтом проф. Р. Мессбауэра в Мюнхене и с группой из Иллинойского университета, возглавляемой членом Национальной академии наук США Г. Фрауэнфельдером (подробнее см.: Крупянский Ю.Ф. // Вестн. РАН. 2023. Т. 93. № 6.). Нобелевский лауреат Р. Мессбауэр и Г. Фрауэнфельдер пришли к пониманию перспективности изучения биологических систем, работая еще в области ядерной физики, так же как и В.И. Гольданский. К 1975 году у Виталия Иосифовича установилось тесное сотрудничество с Институтом Е-15 Мюнхенского технического университета, где велись лучшие работы по применению эффекта Мессбауэра. С этого года начали проводиться традиционные двусторонние семинары СССР — ФРГ в области мессбауэровской спектроскопии. Научный уровень этих семинаров был чрезвычайно высоким: съезжались лучшие ученые не только из этих двух стран, но и гости из США и других развитых стран. Наши работы по динамике белков сразу привлекли внимание высокой научной общественности, сначала ученых, занимающихся эффектом Мессбауэра, а затем и биофизиков. Все это привело к тому, что в 1991 году в Черноголовке состоялся семинар СССР — США, который назывался “Белки и стекла”. Название выбрано было специально, чтобы показать, что в результате самоорганизации белки могут оказываться в локальных (а не глобальном) минимумах энергии. Как в то время, так и частично сейчас это абсолютно не очевидно. Сопредседателями семинара были Г. Фрауэнфельдер и В.И. Гольданский. Семинар стал большим событием в отечественной биофизике и химической физике биологических систем. Фрауэнфельдер привез с собой выдающуюся команду из США — многих лучших на то время американских биофизиков. С нашей стороны присутствовал весь цвет Советской биофизики что, в конце концов, для нее плохо кончилось, так как более половины участников этого семинара из СССР вскоре оказались надолго в США или других странах. Наступила перестройка и тяжелые для отечественной науки времена.

Один из авторов данной статьи (Ю.Ф. Крупянский) далее исследовал возможность изучения структурно-динамических свойств биологических систем с помощью фемтосекундных рент-

геновских лазеров на свободных электронах (XFEL), а затем перешел к изучению конденсации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в бактериальных клетках. Этой темой наша группа из Отдела строения вещества занимается с 2016 г. В настоящей работе изложены основные результаты, полученные группой за это время.

Бактериальная геномная ДНК, взаимодействия со связанными с ДНК белками (NAP — nucleoid-associated proteins), располагается в конденсированной и функционально организованной форме в нуклеоиде клетки. Пять десятилетий интенсивных исследований показали [1, 2], что ДНК организована в нуклеоиде активно растущей клетки *Escherichia coli* (*E. coli*) иерархически — с тремя уровнями компактизации [2, 3].

Изменения параметров окружающей среды воспринимаются микроорганизмами как стресс. В ответ на стрессовые воздействия клетки бактерии *E. coli* [4, 5] включают наследственные стратегии адаптации, основанные на структурных, биохимических и генетических перестройках, позволяющие сохранить часть популяции и выжить в неблагоприятных условиях. Все стратегии направлены на защиту генетического материала клетки (ДНК) [5].

В активно растущих клетках, как и в других живых системах благодаря метаболизму поддерживается динамический, далекий от равновесия порядок [6]. По мере перехода клеток в покоящееся состояние (практически полное отсутствие метаболизма) обычные биохимические способы защиты ДНК перестают работать и клетки, адаптируясь к новым условиям, вынуждены использовать физические механизмы защиты ДНК (плотную упаковку ДНК, наноразмерную кристаллизацию ДНК с белками и т.д.).

В данной работе приведены результаты экспериментальных исследований структурной организации ДНК в покоящихся клетках бактерии *E. coli* с помощью методов дифракции синхротронного излучения и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Приведены результаты молекулярно-динамического моделирования взаимодействия ДНК с NAP.

В разд. I обсуждается структура конденсированной ДНК в активно растущей клетке. В разд. II приведены результаты экспериментальных исследований структурной организации ДНК в покоящихся клетках при воздействии на культуру бактерий стресса голодания. Обсуждаются изменения в структуре конденсированной ДНК при переходе от активно растущих к покоящимся клеткам.

При действии на культуру клеток химического аналога аутоиндуктора анабиоза 4-гексилрезорцина (4-ГР) клетки переходят сначала в анабиотическое покоящееся состояние (практически

полное отсутствие метаболизма), а при дальнейшем увеличении концентрации 4-ГР — в мумифицированное состояние (полное отсутствие метаболизма при сохранении формы). В разд. III рассматриваются результаты экспериментальных исследований структурной организации ДНК для анабиотических и мумифицированных клеток.

В разд. IV проведено обсуждение полученных результатов и делаются основные выводы, которые следуют из анализа оригинальных экспериментальных результатов и литературных данных. В разд. V приведены перспективы исследований. Обсуждаются последние литературные методические успехи в наноуровневых визуализации и томографии клеток с помощью синхротронного излучения и электронной микроскопии, которые позволят в обозримом будущем определять архитектуру нуклеоида с высоким разрешением как в активно растущих, так и в покоящихся бактериях.

1. КОНДЕНСАЦИЯ ДНК В АКТИВНО РАСТУЩЕЙ КЛЕТКЕ

1. 1. Конденсация ДНК

Дезоксирибонуклеиновая кислота — длинный, сильно заряженный гетерополимер. В разбавленном растворе ДНК бактерии *E. coli* образует стохастический клубок объемом около 500 мкм^3 [2, 7, 8]. Бактерия *E. coli* — широко распространенная грамотрицательная бактерия, являющаяся одним из важнейших инструментов биологической науки [9]. В этом смысле она представляет собой аналог атома водорода для микробиологии. Бактериальная геномная ДНК и ассоциированные с ней белки (NAP) расположены в клетке в сильно конденсированной и функционально организованной форме в нуклеоиде [2]. Объем нуклеоида *E. coli*, где располагается ДНК в клетке, не превышает 1 мкм^3 . Для размещения в нуклеоиде ДНК должна быть сильно компактизованной [8]. Кроме того, конденсированная в нуклеоиде ДНК должна быть функциональной, способной осуществлять такие процессы, как репликация, рекомбинация, сегрегация и транскрипция. Структура бактериального нуклеоида с высоким разрешением еще не определена. Исследования, начавшиеся в 1971 г., показали, что конденсированная ДНК в нуклеоиде имеет иерархическую структуру и что конденсация ДНК имеет некоторое сходство с самоорганизацией (фолдингом) белка [8, 10–12]. Новые методы молекулярной биологии, сокращенно называемые 3С (chromosome conformation capture) и Hi-C (high-throughput technique to capture chromatin conformation) [13–15], применяемые для изучения структурной организации ДНК в клетке, позволили выделить три уровня структурной организации компактной бактериальной ДНК [2]. Низший уровень (малый масштаб $\sim 1 \text{ Кбайт}$ пар

оснований (п.о.)) обеспечивается взаимодействием ДНК с белками, связывающими ДНК. На промежуточном уровне (средний масштаб $\sim 10 \text{ Кбайт}$ п.о.) ДНК образует сверхспиральные петли. На самом высоком уровне (мега масштаб $\sim 10^6$ п.о.) ДНК образует шесть пространственно организованных макродоменов с четкой территориальной организацией, на которые разделен бактериальный нуклеоид.

1. 2. Фрактальная (складчатая) глобула

Согласно изложенному в работе [16], коллапс длинного полимера из-за топологических ограничений происходит с образованием складок все увеличивающихся размеров. Авторы работы [17] продемонстрировали, что этот процесс должен приводить к образованию долгоживущего промежуточного состояния, которое они назвали складчатой глобулой (впоследствии ее стали называть фрактальной). Было предположено, что такая глобула характеризуется иерархией складок, образуя самоподобную структуру [17]. Экспериментальное исследование свойств пространственной организации хроматина в ядре клетки человека с использованием методов 3С и Hi-C привлекло внимание к фрактальной глобуле как к структурной модели хроматина на мегамишштабе $\sim 10 \text{ Мбайт}$ [18].

Фрактальная глобула обладает несколькими важными свойствами, которые делают ее привлекательным способом организации хроматина. Перечислим два таких свойства.

1. 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 [19]. В силу того, что она практически не заузлена, любая область фрактальной глобулы может легко и быстро разворачиваться, становясь доступной для транскрипционных и других белковых механизмов клетки.

2. 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 метода Hi-C. Сравнение с экспериментом показывает, что фрактальная глобула на качественном уровне описывает свойства хромосомы человека на мегамишштабах (3-м уровне структурной организации ДНК). Эти два свойства фрактальной глобулы позволили предложить ее в качестве модели сворачивания ДНК внутри клетки на мегамишштабе.

После “триумфального шествия” модели фрактальной глобулы как крупномасштабной упаковки ДНК в хроматине в 2011–2014 гг. стали

появляться экспериментальные данные, ставящие под сомнение это утверждение. Выяснилось, что эксперименты по малоугловому рассеянию нейтронов (МУРН) способны подтвердить или опровергнуть справедливость той или иной модели, построенной для описания крупномасштабной структуры хроматина. [20]. Интенсивность рассеяния нейтронов на ядрах эритроцитов описывается степенной функцией. Эксперименты по МУРН на хроматине определяют показатель степени равным трем или близким к нему [20], что противоречит модели складчатой (фрактальной) глобулы и фактически отрицает ее как лучшую модель для описания крупномасштабной структуры хроматина в ядре клетки. Для складчатой глобулы показатель степени должен бы быть равен четырем.

Отметим еще одно очень важное свойство фрактальной глобулы. В этой модели структура конденсированной ДНК не отвечает глобальному минимуму энергии энергетического ландшафта сворачивания ДНК. Структура конденсированной ДНК соответствует долгоживущему промежуточному, частично равновесному состоянию, поэтому можно ожидать, что ДНК в различных клетках бактериальной колонии может конденсироваться различно. Структура ДНК в каждой клетке может отличаться от структуры ДНК в соседних клетках. Ансамбль клеток оказывается гетерогенным. Этот факт согласуется с известным в микробиологии утверждением, что для бактериальной многоклеточной системы характерна физиологическая и морфологическая гетерогенность входящих в нее клеток [4]. (О гетерогенности упаковки ДНК в различных клетках подробнее см. данные, приведенные в конце разд. II).

Поразительная территориальная организация и возможность любой области глобулы быстро и легко разворачиваться делает модели, устроенные по типу модели фрактальной глобулы, одними из самых привлекательных моделей крупномасштабной упаковки ДНК в клетке, к тому же качественно совпадающей со многими (но не со всеми) экспериментальными исследованиями.

II. СТРУКТУРА КОНДЕНСИРОВАННОЙ ДНК ПРИ СТРЕССЕ ГОЛОДАНИЯ

II. 1. Бактериальный рост

Бактериальный рост — это деление клетки бактерии на две дочерние клетки. Дочерние клетки генетически идентичны исходной клетке. Динамику роста бактериальной популяции подразделяют на четыре фазы [21]. Первая фаза роста называется лаг-фазой, далее следует экспоненциальная фаза, во время которой происходит быстрый экспоненциальный рост популяции. В ходе экспоненциальной фазы питательные веще-

ства потребляются с максимальной скоростью до тех пор, пока одно из необходимых соединений не закончится и не начнет подавлять рост. Третья фаза роста называется стационарной, она начинается при нехватке питательных веществ для быстрого роста. Скорость метаболизма падает, клетки начинают расщеплять белки, не являющиеся строго необходимыми. В этой фазе клетки начинают испытывать стресс голодания. В ответ на стресс голодания клетки микроорганизмов включают наследственные стратегии адаптации, позволяющие сохранить часть популяции и выжить в любых неблагоприятных условиях. Эти стратегии направлены на защиту генетического материала клетки (ДНК) [5]. Если стресс голодания сохраняется, то происходит либо образование покоящихся форм, характеризующихся практически полным отсутствием метаболизма (обмена с внешней средой), либо гибель клеток. Большинство клеток (до 99.98%) в голодающих долгое время популяциях гибнут. Остальные клетки (0.02%) развиваются в покоящиеся формы [4, 22].

II. 2. Смена модели упорядочения. Образование покоящихся клеток

В классическом труде “Что такое жизнь с точки зрения физики?” Э. Шредингер [23] пишет, что жизнь представляет собой непрерывную борьбу против стремления к состоянию термодинамического равновесия с максимальной энтропией, что тождественно равно смерти. Живые системы поддерживают упорядоченное, далекое от равновесия состояние, питаясь химическими соединениями. Метаболизм (обмен с внешней средой) — источник динамического порядка. Если прекращается метаболизм, то термодинамического равновесия избежать нельзя.

По мере перехода клеток в покоящееся состояние (практически полное отсутствие метаболизма) обычные биохимические способы защиты ДНК перестают работать. Клетки, адаптируясь к новым условиям, вынуждены использовать физические механизмы защиты ДНК (плотную упаковку ДНК, наноуровневую кристаллизацию ДНК с белками и т.д.). Эти адаптационные механизмы нужны для выживания клеток. При наступлении благоприятных условий выжившие клетки снова перейдут к нормальной жизни.

При стрессе голодания поддержание упорядоченности динамическим способом становится невозможным (клеточные процессы становятся неэффективными, метаболизм почти отсутствует); бактерии задействуют другой, энергонезависимый механизм поддержания упорядоченности и защиты жизненно важных структур (ДНК) — создание устойчивых молекулярных структур, как в неживой природе [6]. Выжившие с помо-

щью физических механизмов защиты ДНК клетки становятся покоящимися.

Для покоящихся клеток можно ожидать совершенно новых структур (новой архитектуры ДНК) по сравнению с растущими клетками. Экспериментальному изучению структурной организации конденсированной ДНК в покоящихся клетках (стресс голодания) посвящены следующие разделы.

II. 3. ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

II. 3.1. Бактериальные штаммы, генетически модифицированные штаммы, реагенты

В наших экспериментах использовались следующие бактериальные штаммы *E. coli*: 1 – K-12 MG 1655, дикий штамм; 2 – K-12 MG1655 Δ dps, мутант Dps-ноль; 3 – Top10, дикий штамм; 4 – Top10/pBAD-DPS, мутант с оверэкспрессией белка Dps (Dps – DNA-binding protein from starved cells, связывающий ДНК белок из голодающих клеток); 5 – BL21-Gold(DE3)/pET-DPS, мутант с оверэкспрессией белка Dps. Штаммы бактерий 1 и 2 получены в Институте биофизики клетки ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических наук РАН”, Россия. Штаммы бактерий 3–5 были предоставлены проф. В.Н. Лазаревым из Лаборатории генной инженерии ФНИКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия (подробнее о бактериальных штаммах см. оригинальные публикации [22, 24, 25]).

Все реагенты приобретены у компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури) или VWR (Солон, Огайо, США), если не указано иное (подробнее см. оригинальные публикации [22, 24]). Процедура получения генетически модифицированных штаммов бактерии *E. coli* подробно описана в работах [24, 25]. Процесс накопления рекомбинантного белка DPS подробно описан в работе [25].

II. 3.2. Приготовление покоящихся клеток *E. coli* для различных штаммов

K-12 MG1655. Бактерии выращивали в течение 24 ч при 28°C и встряхивании (140 об/мин) в колбах объемом 250 мл, содержащих 50 мл модифицированной среды M9.

Top10, K-12 MG1655 Δ dps. Бактерии выращивали в течение 24 ч при 28°C и встряхивании (140 об/мин) в колбах объемом 250 мл, содержащих 50 мл среды LB.

Top10/pBAD-DPS. Бактерии выращивали в течение 24 ч при 28°C и встряхивании (140 об/мин) в колбах объемом 250 мл, содержащих 50 мл среды LB или модифицированной среды M9, дополненной ампициллином с концентрацией 150 мкг/мл.

BL21-Gold(DE3)/pET-DPS. Бактерии выращивали в течение 24 ч при 28°C и встряхивании (140 об/мин) в колбах объемом 250 мл, содержащих 50 мл модифицированной среды M9, дополненной 150 мкг/мл ампициллина с пониженным содержанием аммонийного азота. Клетки всех штаммов выдерживались при температуре 21°C.

II. 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

II. 4.1. Дифракции синхротронного излучения

Рентгеноструктурный анализ (РСА) – самый дорогой и трудоемкий экспериментальный метод, применяемый в химической физике биологических систем. В качестве источника излучения в рентгеновском диапазоне часто применяют синхротронное излучение, особенно для изучения малых кристаллов (с размерами от мкм до нм) и неупорядоченных объектов, таких как вирусы и клетки. Для визуализации структуры неупорядоченных биологических объектов используются последние достижения в биологии, химии, физике и математике.

В проведенных экспериментах на станции ID23-1 синхротрона ESRF (Гренобль, Франция) пучок рентгеновского излучения имел длину волны $\lambda = 1.6799 \text{ \AA}$, ширину апертуры – 10 мкм; время экспозиции для каждой дифракционной картины составляло 5 с, плоский детектор PILATUS 6M располагался на расстоянии 95 см за образцом по ходу пучка. Измерения проводили при температуре 100 K.

Схема эксперимента аналогична схеме двумерной порошковой дифракции с плоским детектором. Образец представляет собой ансамбль клеток бактерий. Перед использованием препараты наносили на специальную криопетлю. Для простоты будем полагать, что под действием стресса в клетках бактерий происходит кристаллизация конденсированной ДНК, размеры нанокристаллов находятся в пределах 200–400 нм [6]. Нанокристаллы нуклеоида вместе с клетками бактерий 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, образованной падающим пучком, в отличие от дискретных точек, наблюдаемых при рассеянии на монокристалле. Угол между осью, образованной падающим пучком и дифракционным кольцом, называется углом рассеяния и обозначается как 2θ . Вектор рассеяния $\mathbf{q}$ определяется следующим образом:

$$\mathbf{q} = 4\pi \sin \theta / \lambda. \quad (1)$$

Соответственно, “период кристаллической структуры” или разрешение, отвечающее данному углу рассеяния, вычисляется как

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

Наличие в образце периодических структур с периодом d приводит в эксперименте к повышенной интенсивности рассеяния, соответствующей данному периоду кристаллической структуры. Таким образом, исследование картин рассеяния на бактериальных клетках, позволит определить характерные пространственные периоды упорядоченных структур, возникающих в исследуемой системе.

II. 4.2. Просвечивающая электронная микроскопия

Ультратонкие срезы исследовали в просвечивающих электронных микроскопах JEM1011 и JEM-2100 фирмы Jeol (Japan) при ускоряющих напряжениях 80 и 200 кВ, соответственно, и увеличении 13000–21000 $\times$. Изображения регистрировали ПЗС-камерами (ПЗС – прибор с зарядовой связью) Ultrascan 1000XP и ES500W (Gatan, USA). Томограммы получали из полутолстых (300–400 нм) срезов с помощью программного обеспечения Jeol Tomography (Jeol, Japan). Угол наклона гониометра колеблется от -60° до $+60^\circ$ (с постоянным шагом в 1°). Серия изображений была совмещена с помощью Gatan Digital Micrograph (Gatan, USA), а затем восстановлена с помощью алгоритма обратной проекции в IMOD4.9. Трехмерные субтомограммы визуализировали в пакете UCSF Chimera. (Подробнее см. в [24].)

II. 4.3. Аналитическая электронная микроскопия

В этом методе использовали аналитический просвечивающий электронный микроскоп JEM-2100 (Jeol, Japan), оснащенный детектором светлого поля (STEM) для сканирующей просвечивающей электронной микроскопии (Jeol, Japan), детектором темного поля (HAADF) с большим углом наклона (Gatan, USA), кремниевым дрейфовым детектором X-Max площадью 80 мм² (Oxford Instruments, Great Britan) и энергетическим фильтром GIF Quantum ER (Gatan, USA). Сбор спектров энергодисперсионного рентгеновского излучения (EDX) и элементный анализ проводили в программе INCA (Oxford Instruments, Great Britan). (Подробнее см. в [24].)

II. 5. Структурный ответ на стресс. Экспериментальные результаты

Одним из механизмов структурного ответа на стресс голодания является внутриклеточная кристаллизация ДНК со связывающим ДНК белком Dps с образованием нанокристаллов. Кристаллизация ДНК обеспечивает физическую защиту ДНК (благодаря плотной упаковке ДНК с белком в нанокристалле) от повреждений и потенциальную способность возобновления метаболической активности бактериальных клеток в свежей среде.

Другие виды структурного ответа на стресс голодания изложены ниже в разд. II. 6.4.

II. 5.1. Дифракция синхротронного излучения

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 [26, 27], показывают наличие дифракционных картин вида, изображенного на вставке рис. 1.

С целью детального анализа этих данных построены зависимости интенсивности рассеяния от угла рассеяния 2θ с помощью усреднения дифракционных 2D-картин по азимутальному углу. Обнаружены зоны повышенной интенсивности с периодами кристаллической структуры, равными приблизительно 90 и 45 Å, в отличие от контрольных образцов клеток, где областей повышенной интенсивности замечено не было (подробнее см. [26, 27]). Первый, широкий пик лежит в области $d = 90\text{--}93$ Å. Диаметр Dps додекамера равен ≈ 90 Å, поэтому этот пик может соответствовать расстоянию между слоями Dps. Второй пик при $d = 45$ Å может соответствовать второму порядку дифракции кристалла Dps–Dps или расстояниям между цепочками ДНК–ДНК в плотно упакованном ансамбле ДНК [27].

Приведенные на рис. 1 результаты дифракционных экспериментов свидетельствуют о наличии периодической упорядоченной организации (скорее всего, нанокристаллической) в нуклеоиде бактерий с указанными выше периодами.

II. 5.2. Просвечивающая электронная микроскопия

На рис. 2а показан срез томограммы клетки с нанокристаллической структурой. На вставке рис. 2а представлен результат фурье-анализа нанокристаллической области клетки, очерченной белой каймой. Результат фурье-анализа свидетельствует о наличии нанокристалла в этой области клетки [22]. Отфильтрованный кристалл ДНК–Dps изображен на рис. 2б. На вставке к этому рисунку изображен профиль интенсивности электронной плотности вдоль белой линии основного изображения. Черным цветом выделены плотности, видимо, соответствующие межслойным цепям ДНК [22]. Авторами работы [28] выдвинута гипотеза о том, что ДНК локализована между гексагонально упакованными слоями Dps в кристалле. Это означает, что характерное расстояние между цепочками ДНК–ДНК будет около 90 Å, а не 45 Å, как предполагалось в разд. II. 5.1. Вопрос о точной локализации и форме укладки ДНК в нанокристаллах в комплексе с Dps остается открытым. В электронно-микроскопических

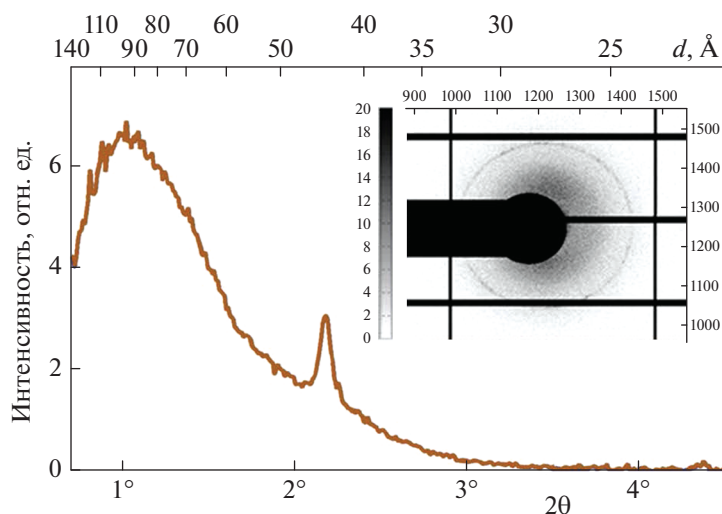


Рис. 1. Зависимость интенсивности рассеяния от угла 2θ для образца штамма BL21-Gold(DE3) голодающих бактерий *E. coli*. На вставке изображена дифракционная картина для этого образца.

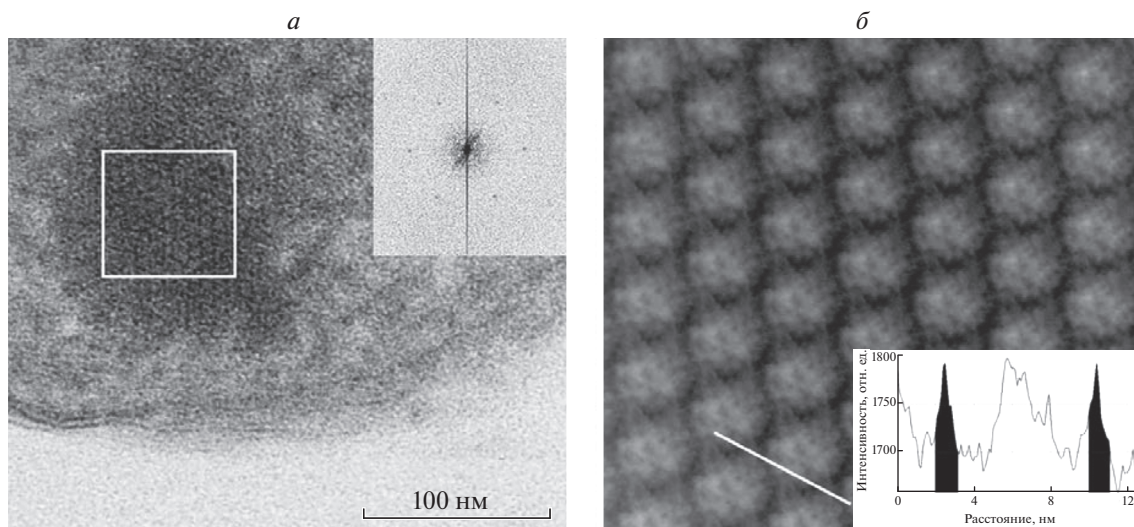


Рис. 2. *a* — Томограммы клетки (на вставке представлен результат фурье анализа нанокристаллической области клетки, очерченной белой каймой); *б* — отфильтрованный кристалл ДНК–Dps.

исследованиях ДНК напрямую не видна, поэтому предполагаемая конформация ДНК в нанокристаллах является гипотетической, к тому же она не подтверждается данными по дифракции (см. разд. II.5.1.).

II. 5.3. Конденсация ДНК *in vitro*. Модельные системы

Экспериментальные данные, полученные с помощью методов дифракции синхротронного излучения и ПЭМ, не полностью согласованы

друг с другом и не дают 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, в которой в качестве

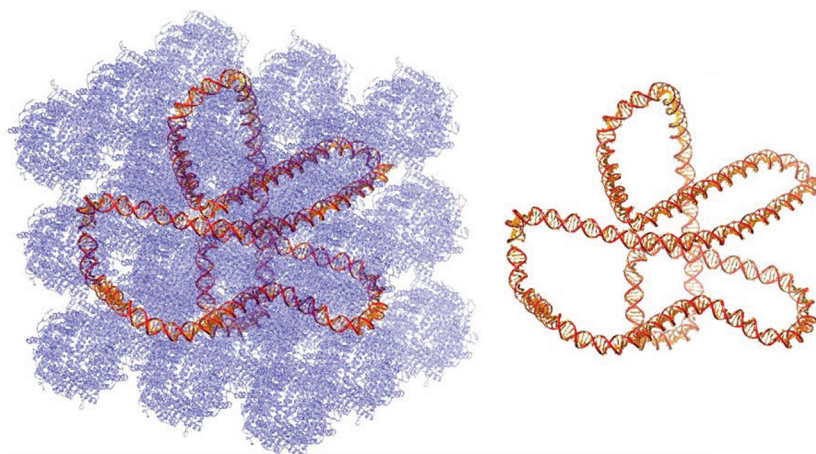


Рис. 3. 3D-кристаллы белка Dps бактерии *E. coli*. Участок 3D-кристалла Dps с изогнутой нитью ДНК внутри каналов — слева; конформация ДНК внутри кристалла — справа.

источника используется синхротронное излучение [29], и электронная микроскопия [30].

Кратко опишем результаты, полученные методом макромолекулярной кристаллографии. Несмотря на малость размеров монокристаллов, низкую симметрию, относительно большие параметры решетки и слабые рефлексы, программные комплексы Mesh & Collect и ccCluster позволили определить структуру белка Dps [29] (оказалось, что ДНК, видимо, не образует упорядоченные структуры в комплексе ДНК–Dps, и поэтому не видна (подробно см. ниже)). Структура депонирована в Protein Data Bank как 6QVX [29].

Для электронно-микроскопических исследований *in vitro* были выращены тонкие монокристаллические комплексы из небольшой ДНК (длиной 165 п.о.) с белком Dps. Были изучены проекционные структуры кристаллов Dps–Dps и Dps–ДНК [30]. Электронно-микроскопические исследования позволяют увидеть следы ДНК в тонких (2D) кристаллах ДНК–Dps. Чтобы объяснить противоречие с данными рентгеновской дифракции на массивных кристаллах, мы предположили, что тонкие 2D-кристаллы ДНК–Dps имеют увеличенную по сравнению с массивным кристаллом постоянную решетки, поэтому в тонких кристаллах есть пространство для ДНК.

Было проведено молекулярно-динамическое моделирование, с помощью которого изучались многослойные кристаллы белка Dps [30–33] и конденсация ДНК в трехмерных (3D) кристаллах. В многослойных 3D-кристаллах белка Dps за счет шарообразной формы его молекул формируются многочисленные каналы. Предположительно, в эти каналы может укладываться ДНК. Скорее всего, кристалл ДНК–Dps образуется постепенно, поэтому ДНК внутри кристалла располагает-

ся нелинейно, изгибаясь и проходя через каналы различных направлений. Для проверки этой гипотезы была построена модель участка геномной ДНК бактерии *E. coli* (513 п.о., ген *dps*). На основании проведенных молекулярно-динамических расчетов показано, что кристаллы белка Dps остаются стабильными в присутствии ДНК (рис. 3).

Образование изгибов ДНК внутри кристаллов ДНК–Dps не нарушает структуру ДНК. Это означает, что ДНК в кристаллах Dps может располагаться неупорядоченно, а не только так, как предложено в работ [28].

Таким образом, 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 несамосогласованные модели. Данные РСА и ПЭМ пока дают противоречивые, на первый взгляд, результаты. Возможно, что ДНК в кристаллах Dps располагается неупорядоченно.

II. 5.4. Альтернативные виды конденсации ДНК в покоящихся клетках

Рассмотрим другие конденсированные состояния ДНК в клетке в дополнение к внутриклеточной кристаллизации ДНК с Dps. Нами обнаружены в покоящихся клетках бактерии *E. coli* три типа новых (по сравнению с растущими клетками) конденсированных структур ДНК–Dps. Это *нанокристаллические* структуры ДНК (см. разд. II.5.1. и II.5.2.), *жидкокристаллические* структуры ДНК и *свернутые нуклеосомоподобные* структуры ДНК (см. рис. 4а, б и в соответственно).

Энергодисперсионная спектроскопия (EDS) использовалась для обнаружения и позиционирования нужных элементов в выбранных обла-

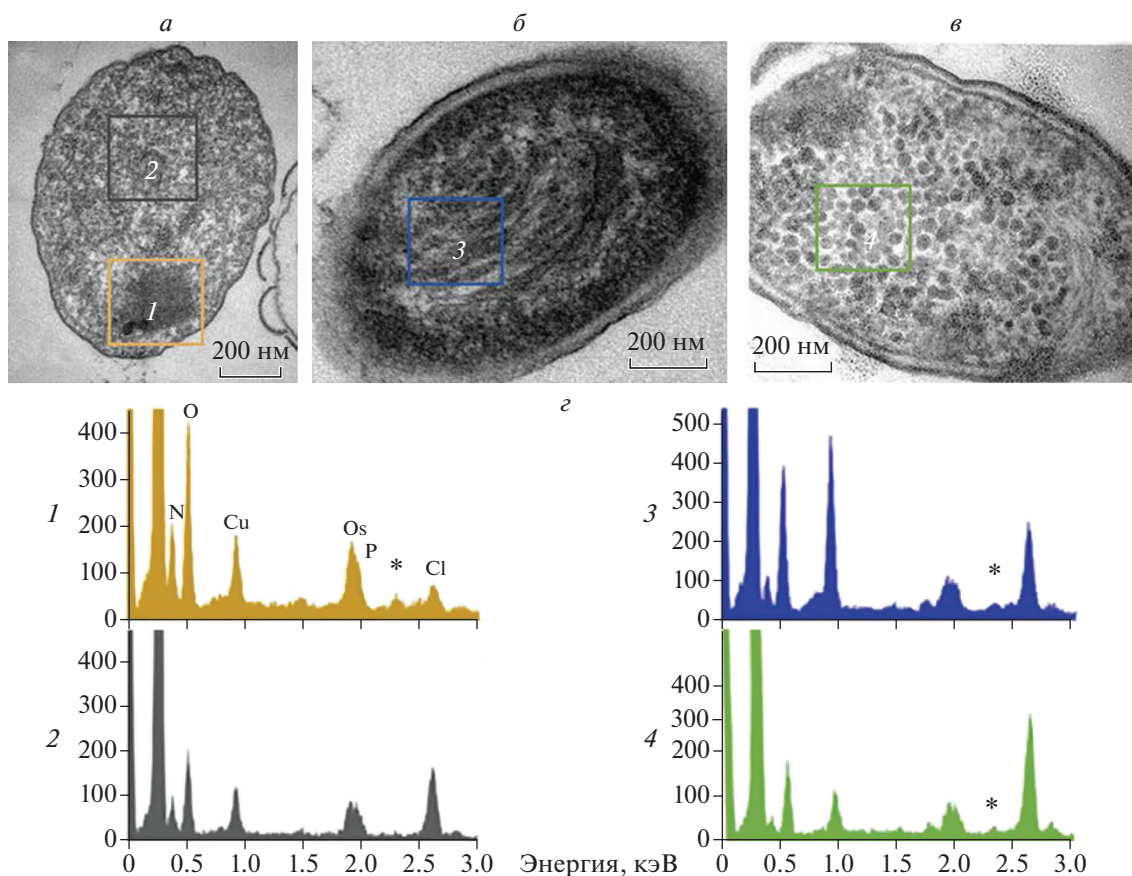


Рис. 4. Три типа конденсированных структур ДНК—Dps, обнаруженных в покоящихся клетках *E. coli*, голодающих в течение 7 мес: *а* — нанокристаллический; *б* — жидкокристаллический, *в* — свернутый нуклеосомоподобный тип; *г* — спектры ЭДС из выбранных областей (отмеченных цветными рамками на рис. *а–в*). Звездочкой отмечены положения пика S.

стях клетки. Например, пик K_{α} (2.307 кэВ) серы отражает существование связывающего ДНК белка Dps (каждый белок Dps содержит 48 метионинов), а пик K_{α} (2.013 кэВ) соответствует фосфору в ДНК. Одновременное присутствие обоих пиков на спектрах структуры показывают образование комплекса ДНК—Dps.

Репрезентативные EDS-спектры представлены на рис. 4г. Относительный атомный состав различных областей образцов пропорционален интенсивности пиков EDS.

Примечательно, что жидкокристаллические структуры (рис. 5) были обнаружены в покоящихся бактериальных клетках *E. coli* [22] во всех их популяциях: как с геном *dps*, так и без него (Dps-null), т.е. в отсутствие белка Dps в клетке.

В некоторых клетках структура конденсированной ДНК напоминает холестерический жидкий кристалл [22]. Плотная упаковка ДНК в жидкокристаллической фазе снижает доступность молекул ДНК к различным повреждающим факторам, включая облучение, окислители и нукле-

азы [6]. Отметим, что жидкокристаллический тип конденсации ДНК — это единственный случай (кроме тороидов ДНК), когда легко напрямую увидеть молекулы ДНК в конденсированной структуре.

Особый интерес представляет третий тип упорядоченной структуры, обнаруженный впервые в работе [22] в покоящихся клетках *E. coli*: свернутая нуклеосомоподобная структура (см. рис. 6). 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. 4в, рис. 6) со средним диаметром, равным 30 нм. Томографические исследования (рис. 6) продемонстрировали, что эти структуры не являются тороидами, описанными ранее [6, 34, 35], но представляют собой почти сферические образования. По аналогии с укладкой ДНК в эукариотах данный тип конденсации ДНК был назван нами “свернутой нуклеосомоподобной” структурой [22].

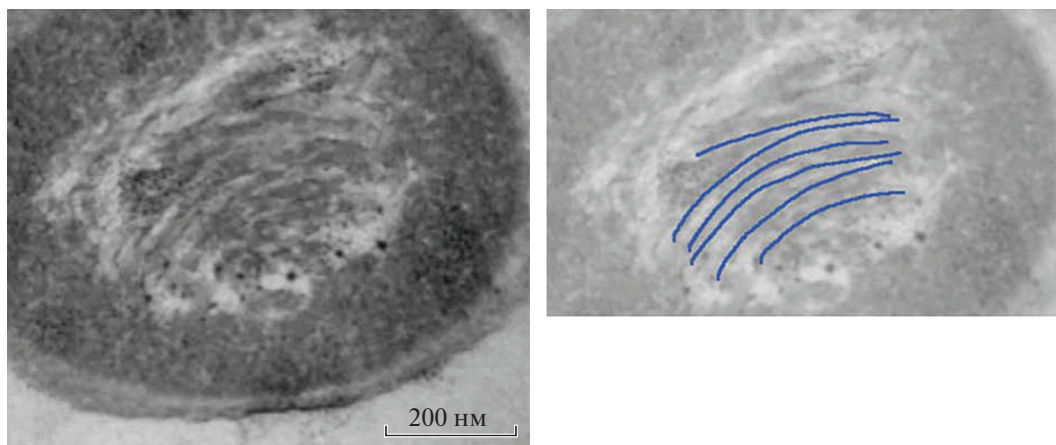


Рис. 5. Жидкокристаллический ансамбль ДНК–Dps в покоящейся клетке *E. Coli*, штамма Top10/pBAD-DPS. На правом рисунке изображена схема расположения ДНК в клетке.

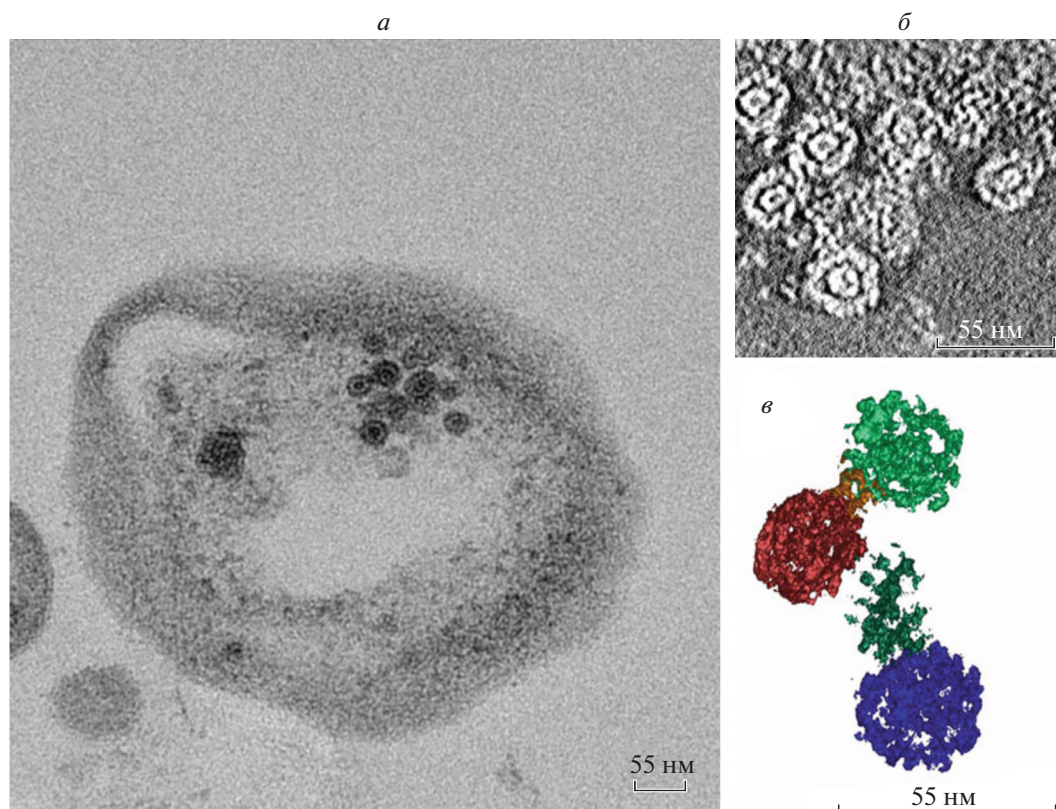


Рис. 6. Морфология свернутой нуклеосомоподобной структуры ДНК–Dps в покоящихся клетках *E. coli*: *a* — изображение клетки; *б* — срез томограммы, выявляющий сферические ассоциаты Dps; *в* — 3D-модель сферических ассоциатов.

Элементный анализ показывает (рис. 4), что в спектре сферических агрегатов действительно присутствуют пики серы и фосфора, указывающие на присутствие ассоциатов ДНК–Dps [22]. В бактериальных клетках сферические образования молекул Dps (см. рис. 7) могут действовать анало-

гично гистонам, на которые накручивается ДНК (гистоноподобное поведение).

Макромолекулы ДНК могут также проходить сквозь сферические образования бусинок Dps, образуя “бусинки на нитке” (рис. 7). Для противодействия внешним стрессовым факторам эти

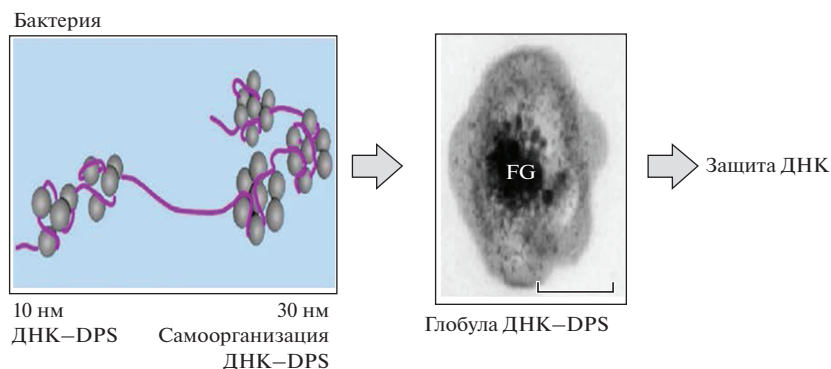


Рис. 7. Схематическое образование свернутой нуклеосомоподобной структуры.

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, бусинки на нити могут, путем множественного складывания образовывать компактную структуру, похожую на складчатую глобулу. Схематическое изображение образования свернутой нуклеосомоподобной структуры можно увидеть на рис. 7. Внешние молекулы Dps могут налипать на глобулу и дополнительно защищать ДНК [22, 36].

II. 5.5. О гетерогенности конденсации ДНК в покоящихся клетках *E. coli*

Существует давнее противоречие между представлениями о бактериальной многоклеточной системе как о совокупности одинаковых одноклеточных бактерий, идентичных друг другу и не взаимодействующих друг с другом, и о бактериальной культуре, рассматривающей микробную популяцию как многоклеточный организм. В последнем случае все клетки неидентичны друг другу, для них характерна физиологическая и морфологическая гетерогенность. Клетки взаимодействуют друг с другом в пределах организма. (Подробнее см. в работах [4, 37, 38].) Обнаруженные нами различные типы конденсированного состояния ДНК (см. табл. 1 в работе [11].) в изучаемых покоящихся клетках *E. coli* (или гетерогенность конденсации ДНК) дают дополнительные аргументы в пользу концепции, рассматривающей микробную популяцию как многоклеточный организм. Кроме того, данное наблюдение говорит в пользу вывода о том, что структура конденсированной ДНК соответствует долгоживущему промежуточному, частично (не полностью) равновесному состоянию. Данное наблюдение также свидетельствует в пользу того, что конденсация

ДНК происходит в клетке по механизму, близкому к механизму образования складчатой (фрактальной) глобулы.

Таким образом, мы ожидали обнаружить новые структуры конденсированной ДНК в покоящихся клетках при стрессе голодания по сравнению с активно растущими клетками. Новые структуры конденсированной ДНК были действительно обнаружены. Это *нанокристаллическая, жидкокристаллическая и свернутая нуклеосомоподобная* структура конденсированной ДНК в покоящихся клетках *E. coli*.

III. ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОГО АНАЛОГА АУТОИНДУКТОРА АНАБИОЗА 4-ГЕКСИЛРЕЗОРЦИНА НА СТРУКТУРУ КОНДЕНСИРОВАННОЙ ДНК

В этом разделе будем рассматривать структуру конденсированной ДНК в клетках под действием другого, отличного от голодания, вида стресса — действия химического аналога аутоиндуктора анабиоза 4-гексилрезорцина (4-ГР). В ряде работ показано, что введение 4-ГР в концентрации до 10^{-4} М в культуру растущих клеток приводит к остановке деления последних и преждевременному их переводу в стационарную фазу [4]. Дальнейшее повышение концентрации 4-ГР в клеточной культуре инициирует переход клеток в покоящееся анабиотическое (практически полное отсутствие метаболизма) состояние, напоминающее покоящееся состояние клеток при стрессе голодания. Под анабиозом будем понимать приостановку жизнедеятельности клетки с последующим ее восстановлением при благоприятных условиях [4].

При дальнейшем повышении концентрации вносимого в клеточную суспензию 4-ГР число жизнеспособных клеток резко падает. При концентрациях выше 10^{-3} М действие 4-ГР вызывает полную

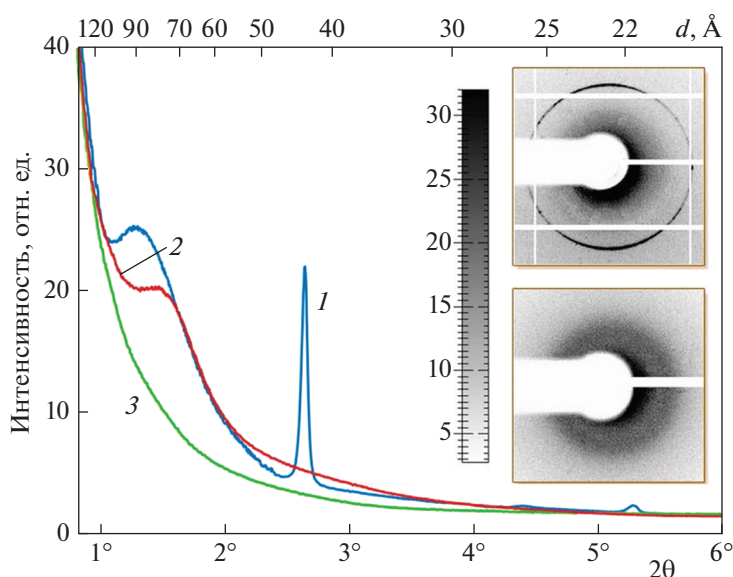


Рис. 8. Зависимость интенсивности рассеяния от угла 2θ для клеток *E. coli* штамма BL21Gold (DE3). В стационарной фазе роста добавлялся 4-ГР в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М — анабиотическое состояние клетки (кривая 1, синяя) и в концентрации 10^{-3} М — мумифицированное состояние (кривая 2, красная). Кривая 3 (зеленая) — фаза активного роста. На вставках изображены дифракционные картины для анабиотического (вверху) и мумифицированного (внизу) состояний клеток.

потерю жизнеспособности клеток бактерий. Однако эти нежизнеспособные клетки сохраняют внешнюю форму в течение периода наблюдения около трех лет в условиях, благоприятствующих автолизу. Данные клетки были названы мумифицированными клетками, или микромумиями [39].

Оказалось, что действие 4-ГР видонеспецифично, зависит от концентрации, физиологического состояния клеток и других факторов окружающей среды [4, 39].

III. 1. Приготовление анабиотических покоящихся клеток и микромумий

Клетки *E. coli* штаммов Top10/pBAD-DPS и BL21-Gold(DE3)/pET-DPS выращивали, как описано выше [25], до стационарной фазы роста. Для получения анабиотических клеток в стационарной фазе через 7.5 ч после начала культивирования в клетки вносили спиртовой раствор 4-ГР до конечной концентрации 10^{-4} М (концентрация этилового спирта составила 1%). В аналогичных условиях получали мумифицированные клетки, но при внесении спиртового раствора 4-ГР до конечной концентрации 10^{-3} М. Клетки инкубировали в статическом режиме при температуре 23°C в течение 1–3 сут, и готовили затем образцы для их изучения методами дифракции синхротронного излучения или электронно-микроскопических исследований.

III. 2. Исследование структурного ответа на действие 4-гексилрезорцина методом дифракции синхротронного излучения

III. 2.1. Изучение структуры анабиотических и мумифицированных клеток *E. coli*

На рис. 8 приведены кривые рассеяния синхротронного излучения для клеток, подверженных действию 4-ГР в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М (кривая 1, синяя) и 10^{-3} М (кривая 2, красная).

Кривая рассеяния, полученная от растущей популяции клеток, в нашем случае бралась как реперная (контрольная) кривая, относительно которой рассматривались все наблюдаемые дифракционные эффекты, изображена на этом и ниже на рис. 9 зеленым цветом (кривые 3).

Интенсивность рассеяния от клеток *E. coli* в стационарной фазе роста, находящихся под воздействием 4-ГР в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М (кривая 1 на рис. 8), по форме идентична кривой, полученной от клеток при стрессе голодания. На кривой видны пики, соответствующие разрешению в 44 и 22 Å, и широкий пик с максимумом интенсивности при разрешении 90 Å. Такое совпадение кривых наводит на мысль об идентичности структуры конденсированной ДНК внутри анабиотической и покоящейся (стресс голодания) клетки, и на то, что в образовании защитных кристаллических структур участвуют одни и те же белки.

При увеличении концентрации 4-ГР до 10^{-3} М воздействие на клетки оказывается существенно отличным от ранее наблюдаемых. Такая концен-

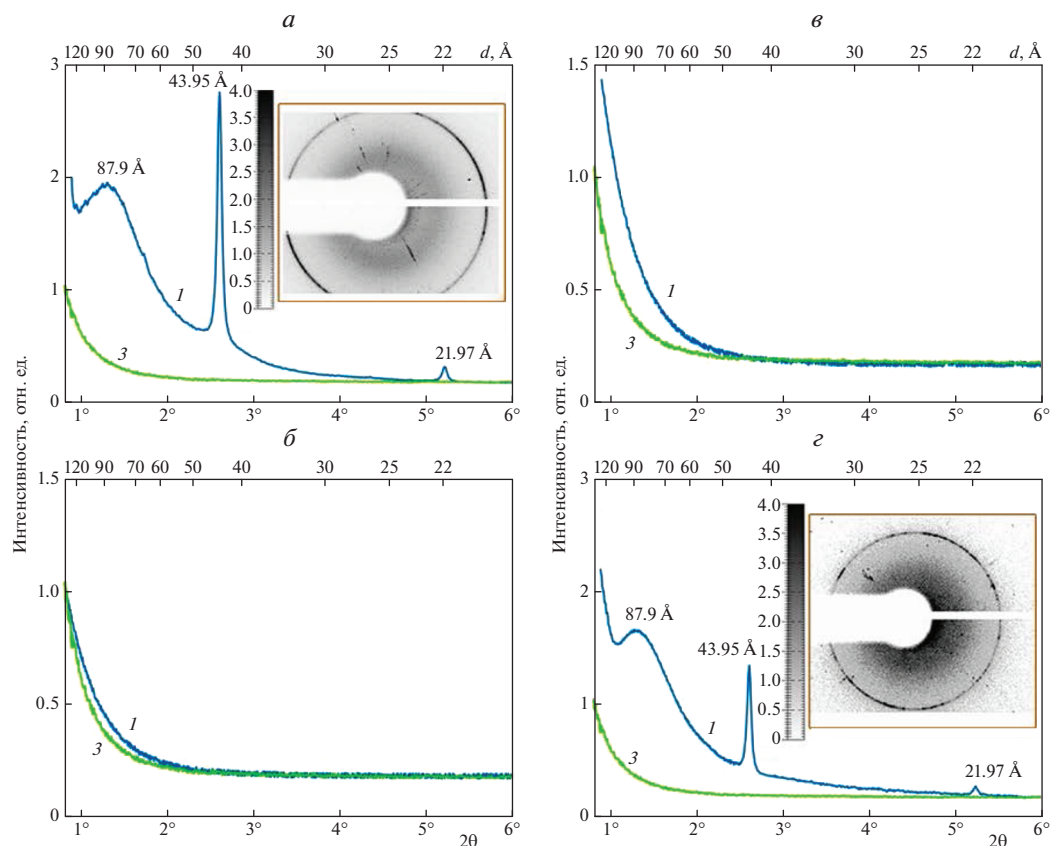


Рис. 9. Динамика активации и прорастания анабиотических форм клеток *E. coli*, полученных под действием 4-ГР: *a* — кривая 3 (зеленая) — растущие клетки, кривая 1 (синяя) — клетки под действием 4-ГР в концентрации 10^{-4} М (стационарная фаза роста); *б* — выдержка в течение 1.5 ч в питательной среде, *в* — 14 ч в питательной среде, *г* — 96 ч в питательной среде (стресс голодания); подробнее см. в тексте.

трация 4-ГР приводит к образованию из клетки микромумии [39]. Кривая рассеяния от таких клеток (кривая 2 на рис. 8) имеет небольшой широкий пик с максимумом интенсивности, соответствующим разрешению в 77 Å. Пик, соответствующих нанокристаллическим структурам, обнаруженным для анабиотического покоящегося состояния, на кривых рассеяния от мумифицированных клеток *E. coli* под воздействием 4-ГР при его концентрации 10^{-3} М не наблюдается.

III. 2.2. Изучение динамики активации и прорастания анабиотических форм *E. coli*

На рис. 9*a* изображены кривые рассеяния от клеток *E. coli* штамма BL21-Gold, подверженных стрессу воздействия 4-ГР в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М, и контрольной популяции того же штамма, находящейся в экспоненциальной стадии роста. Кривая рассеяния от клеток, подвергнутых стрессу воздействия 4-ГР, содержит острые брэгговские пики при разрешении 44 и 22 Å, кратные друг другу, и размытый широкий пик с максимумом интенсивности, соответствующий межплоскостному

расстоянию в 88 Å. Для контрольной популяции наблюдается плавный монотонный спад интенсивности рассеяния при увеличении угла 2θ .

Следующий шаг эксперимента заключался в помещении анабиотических клеток *E. coli* в питательную среду. Рисунок 9*б* демонстрирует почти точное совпадения кривых рассеяния от контрольной популяции и от анабиотических клеток, помещенных в питательную среду и культивируемых в ней на протяжении 1.5 ч.

Далее проросшие клетки были выдержаны в течение 14 ч, и на рис. 9*в* уже начинает проявляться разница между кривыми рассеяния от контрольной популяции и от проросшей колонии. Сравнение кривых рассеяния от контрольной популяции и от проросшей колонии из анабиотических клеток возрастом 96 ч приведены на рис. 9*г*.

По прошествии 96 ч с момента помещения анабиотических клеток в питательную среду вновь появляются кристаллические образования, пики интенсивности рассеяния которых по положению оказываются идентичны пикам, полученным от клеток, соответствующих стрессу воздей-

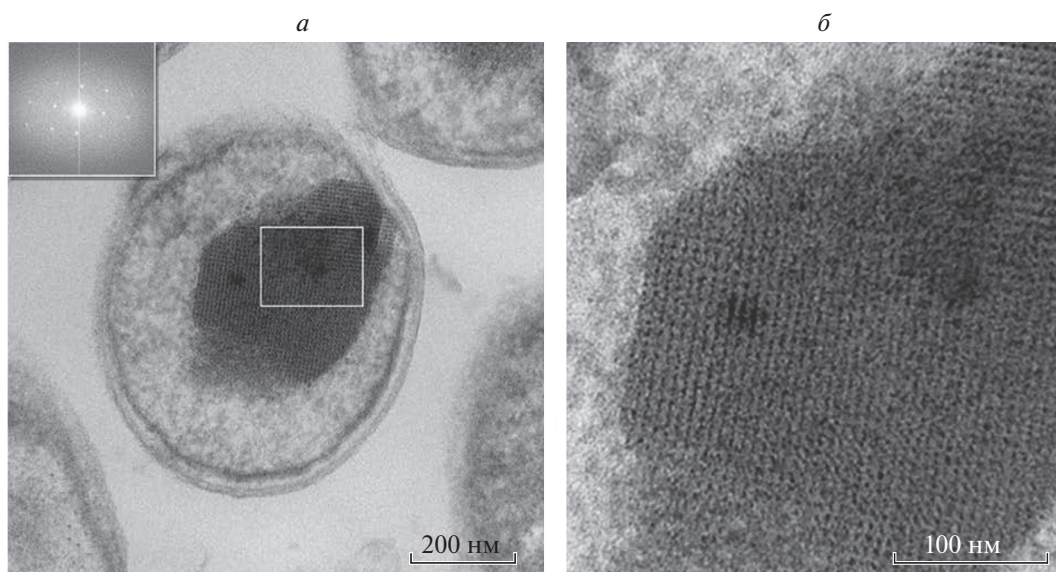


Рис. 10. Морфология нанокристаллов ДНК–Dps в клетках *E. coli* под действием 4-ГР. Штамм *E. coli* Top10/pBAD-DPS, растущий на среде LB со сверхэкспрессией Dps в фазе линейного роста, находящийся под действием 4-ГР в концентрации 10^{-4} М на стационарной фазе роста. На вставке — фурье-преобразование от области с кристаллом. Справа — увеличенное изображение.

ствия 4-ГР в концентрации 10^{-4} М. Этот факт позволяет сделать вывод о том, что с точки зрения дифракционного эксперимента покоящееся анабиотическое состояние и покоящееся состояние, образующееся при стрессе голодания, идентичны по структуре.

Обратимость структурных изменений, происходящих внутри клетки под действием стресса воздействия 4-ГР в концентрации 10^{-4} М указывают на то, что кристаллические образования, брэгговские пики которых мы наблюдаем на разрешении 88, 44 и 22 Å, участвуют в защите клеточного нуклеоида и сохраняют его в состоянии, пригодном для последующей регенерации.

III. 3. Исследование структурного ответа на действие 4-гексилрезорцина методом просвечивающей электронной микроскопии

На рис. 10 представлены данные, полученные методом ПЭМ, для клетки *E. coli* после внесения в культуру 4-ГР в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М. Слева на вставке приведены данные фурье-преобразования для области с предполагаемым нанокристаллом, которые действительно показывают наличие нанокристаллического образования в выделенной области.

На рис. 11 представлены аналогичные рис. 10 данные, но после внесения в культуру 4-ГР в концентрации 10^{-3} М) соответствующей состоянию микромумии.

Данные ПЭМ не позволяют визуализировать какое-либо упорядоченное состояние в микромумиях. Этот результат находится в согласии с данными по дифракции синхротронного излучения (см. рис. 8).

Таким образом, оригинальные экспериментальные исследования позволяют сделать вывод о том, что:

- 1) 4-ГР является инициатором перехода клетки в анабиотическое и мумифицированное состояние;
- 2) покоящееся анабиотическое состояние по структуре сильно напоминает покоящееся состояние, полученное в результате голодания;
- 3) мумифицированное состояние (полное отсутствие метаболизма, но при сохранении формы клетки) сильно отличается по структуре от анабиотического. В мумифицированном состоянии не наблюдаются внутриклеточные нанокристаллические структуры, характерные для анабиотического покоящегося состояния;
- 4) требуются дальнейшие исследования обнаруженных эффектов как с помощью дифракции синхротронного излучения, так и с помощью ПЭМ для визуализации наличия упорядоченных структур в анабиотических покоящихся клетках и отсутствия этих структур в мумифицированном состоянии клеток.

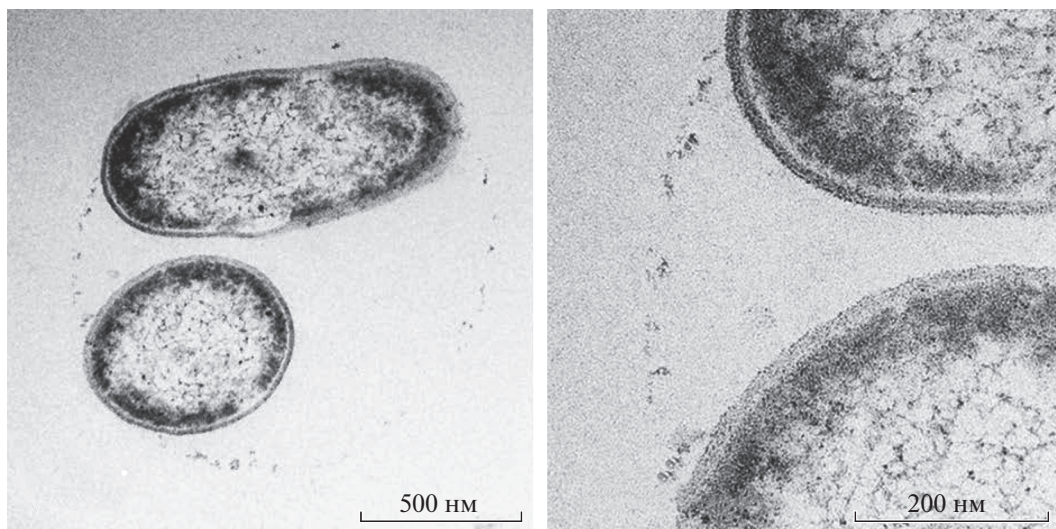


Рис. 11. Штамм *E. coli* Top10/pBAD-DPS, растущий на среде LB без сверхэкспрессии Dps в фазе линейного роста, находящийся под действием 4-ГР в концентрации 10^{-3} М на стационарной фазе роста.

IV. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДЫ

В обзоре представлены результаты литературных и оригинальных экспериментальных исследований, полученных авторами в 2016–2022 гг., по структурной организации ДНК в активно растущих, покоящихся (стресс голодания), в анабиотических покоящихся и мумифицированных клетках *Escherichia coli* с помощью методов дифракции синхротронного излучения и просвечивающей электронной микроскопии. Приведены результаты молекулярно-динамического моделирования взаимодействия ДНК с NAP.

В разд. I обсуждаются современные представления об архитектуре конденсированной ДНК в активно растущей клетке, полученные методами молекулярной биологии ЗС и Ni-S. Данные методы позволили выделить три уровня структурной организации компактной бактериальной ДНК [2]. На низшем уровне (малом масштабе ~ 1 Кбайт п.о.) компактизация обеспечивается за счет взаимодействия ДНК со связывающими ДНК белками. На промежуточном уровне (среднем масштабе ~ 10 Кбайт п.о.) ДНК образует сверхспиральные петли. На самом высоком уровне (мега масштабе $\sim 10^6$ п.о.) ДНК образует шесть пространственно-организованных макродоменов с четкой территориальной организацией, на которые разделен бактериальный нуклеоид. Экспериментальные исследования свойств пространственной организации конденсированной ДНК в активно растущей клетке привлекли внимание к фрактальной глобуле как к структурной модели хроматина на крупном масштабе ~ 10 Мбайт [18]. Фрактальная глобула практически не заузлена, любая область фрактальной глобулы может легко

и быстро разворачиваться, становясь доступной для транскрипционных и других белковых механизмов клетки. Фрактальная глобула имеет поразительную территориальную организацию цепочки, которая сильно контрастирует с перемешанной организацией цепочки, наблюдаемой в равновесной глобуле. Модель фрактальной глобулы не согласуется со всеми имеющимися к настоящему времени экспериментальными данными: например, нет согласия с данными по малоугловому рассеянию нейтронов [20]. Однако поразительная территориальная организация и возможность любой области глобулы быстро и легко разворачиваться делает фрактальную глобулу одной из самых привлекательных моделей крупномасштабной упаковки ДНК в клетке.

Отметим еще одно важное свойство моделей на основе модели фрактальной глобулы. В этой модели структура конденсированной ДНК соответствует долгоживущему промежуточному, т.е. частично, а не глобально равновесному энергетическому состоянию, поэтому можно ожидать, что ДНК в различных клетках бактериальной колонии может конденсироваться по-разному, т.е. можно говорить о гетерогенности упаковки ДНК в различных клетках. Как показано в разд. II, гетерогенность упаковки действительно наблюдается при изучении новых структур конденсированной ДНК в покоящихся клетках при стрессе голодания.

В экспоненциальной фазе роста происходят бурный рост бактерии и потребление питательных веществ. Далее бактерии переходят в стационарную фазу роста, в которой клетки начинают испытывать стресс голодания. Если стресс голодания сохраняется, то происходит образование покоящихся форм. По мере перехода клеток в по-

коящееся состояние (практически полное отсутствие метаболизма) обычные биохимические способы защиты ДНК перестают работать. Клетки, адаптируясь к новым условиям, вынуждены использовать физические механизмы защиты ДНК (плотную упаковку ДНК, наноуровневую кристаллизацию ДНК с белками и т.д.). Для покоящихся клеток можно было ожидать появления совершенно новых структур (новой архитектуры ДНК) по сравнению с растущими клетками.

В разд. II описаны эксперименты и их результаты по обнаружению новых структур конденсированной ДНК в покоящихся клетках при стрессе голодания, которые были действительно обнаружены. Это *нанокристаллическая, жидкокристаллическая и свернутая нуклеосомоподобная* структуры конденсированной ДНК. Обнаружение указанных различных структур в ансамбле клеток подтверждает гетерогенность упаковки конденсированной ДНК в различных клетках популяции. По-видимому, из этих наблюдений, а также из анализа данных, изложенных в публикациях [10–12], можно сделать важный вывод, что природа очень часто использует лишь частично, а не глобально, равновесные энергетические состояния. Что из этого вывода следует? У белков в результате самоорганизации появляется пространственная структура (конформация, или 3D-упаковка). При более тщательном рассмотрении этой пространственной структуры оказывается, что она слегка размыта, имеются локальные минимумы энергии или конформационные подсостояния (подробнее см. в [10]).

В случае ДНК оказывается, что в результате самоорганизации упаковка конденсированной ДНК в различных клетках популяции неодинакова, гетерогенна. Если бы ДНК в результате самоорганизации оказывалась бы в равновесном состоянии (глобальном минимуме энергии) [19], то никакой гетерогенной упаковки конденсированной ДНК в различных клетках не было бы. Молекула ДНК была бы упакована во всех клетках одинаково. Для окончательного ответа на поставленные вопросы и предварительные выводы нужны дальнейшие экспериментальные исследования как сворачивания белка, так и конденсации ДНК.

В разд. III описывается действие на культуру клеток химического аналога аутоиндуктора анабиоза 4-гексилрезорцина. Оригинальные экспериментальные исследования позволяют сделать вывод о том, что 4-ГР является инициатором перехода клетки в анабиотическое и мумифицированное состояния. Покоящееся анабиотическое состояние по структуре сильно напоминает покоящееся состояние, полученное в результате голодания. Мумифицированное состояние (полное отсутствие метаболизма, но при сохранении фор-

мы) сильно отличается по структуре от анабиотического.

В мумифицированном состоянии не наблюдаются внутриклеточные упорядоченные (в том числе нанокристаллические) структуры, характерные для анабиотического покоящегося состояния. По-видимому, это результат того, что мумифицированное состояние существенно ближе к состоянию термодинамического равновесия с максимальной энтропией (неупорядоченностью), чем анабиотическое покоящееся состояние. Заметим, что экспериментальные исследования как анабиотического покоящегося состояния, так и мумифицированного состояния только начинаются. Так, в анабиотическом покоящемся состоянии обнаружен только один вид упорядоченных структур в отличие от покоящегося состояния, возникающего как ответ на стресс голодания. В мумифицированном состоянии упорядоченных состояний пока не обнаружено. Возможно, это связано с недостаточным количеством экспериментальных данных, а не с увеличением энтропии (неупорядоченности) в образце.

Изменения в окружающей среде влияют на структуру конденсированной ДНК. Эти изменения, скорее всего, не затрагивают иерархию структуры ДНК в нуклеоиде. Методом ПЭМ изучалась структура ДНК, находящаяся в тонких 2D-срезах. Этого недостаточно, чтобы описать объемную 3D-структуру нуклеоида. Поэтому методом ПЭМ, использованным в работе, можно визуализировать лишь структуры, принадлежащие нижнему (первому) иерархическому уровню компактизации ДНК. Конформация ДНК не визуализируется используемыми в статье методами ни в одной из конденсированных структур, кроме жидкокристаллической. Поэтому к настоящему времени можно предложить самые простые модели упорядоченной конденсации ДНК в нуклеоиде покоящихся и мумифицированных клеток, что и сделано в настоящей статье.

V. ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

С помощью рентгеноструктурного анализа определена структура многих молекул, в том числе макромолекул белков и ДНК. Все молекулы, которые образуют сравнительно большие кристаллы, исследованы и их структура определена. Однако для макромолекул, образующих малые 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 3D-визуализации конденсированной ДНК *in vivo* с высоким разрешением будет найден и пройден в обозримое время. Методы визуализации и томографии на на-

ноуровне, используемые на синхротроне ESRF-EBS (Гренобль, Франция), позволяют количественно оценивать 3D-структуру и элементный состав образцов в их естественном состоянии [40]. С помощью метода наноразрешенной флуоресцентной спектроскопии и томографии можно изучать 3D-распределение фосфора, а следовательно, и ДНК по всей клетке [41]. К сожалению, пространственное разрешение этого метода в настоящий момент не превышает 20 нм. Развитие метода визуализации на наноразрешении ведет к созданию рентгеновского микроскопа. Пока это картина будущего, но исследователи в данной области уже сейчас вместо термина “рентгеновская дифракция” употребляют термин “рентгеновская микроскопия”. Быстро развиваются методы электронной микроскопии. В работе [42] для визуализации хроматина *in situ* был использован улучшенный метод обнаружения ДНК с помощью флуоресцентного красителя. Метод получил название томография ChromEM, или ChromEMT. Этот метод позволил определить структуру и трехмерную организацию нитей хроматина.

Интерпретация приведенных в работе данных требует 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.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ESRF за предоставленную возможность проведения экспериментов. Аналитическая электронная микроскопия и двухосная томография были выполнены в Центре пользователей “Электронная микроскопия в науках о жизни” МГУ им. М.В. Ломоносова. Расчеты проводили на высокопроизводительной вычислительной системе МВС-10П в Межведомственном суперкомпьютерном центре РАН.

Авторы благодарят за финансовую поддержку Министерство науки и высшего образования Российской Федерации.

Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки России (тема № 122040400089-6 и № 122040800164-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stonington O.G., Pettijohn D.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1971. V. 68. № 1. P. 6
2. Verma S.C., Qian Z., Adhya S.L. // PLoS. Genet. 2019. V. 15. № 12. e1008456
3. Trun N., Marko J. // Amer. Soc Microbiol. News. 1998. V. 64. № 5. P. 276.
4. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005.

5. Ткаченко А.Г. Молекулярные механизмы стрессовых ответов у микроорганизмов. Екатеринбург: Уро РАН, 2012.
6. Minsky A., Shimoni E., Frenkiel-Krispin D. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2002. V. 3. P. 50.
7. Grosberg A.Y., Khokhlov A.R. Statistical physics of macromolecules. N.Y.: AIP, 1994.
8. Bloomfield V.A. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1996. V. 6. P. 334.
9. Циммер К. Микрокосм. *E. coli* и новая наука о жизни. Пер. с англ. М.: ООО “Альпина нон-фикшн”, 2013.
10. Крунянский Ю.Ф., Гольданский В.И. // УФН. 2002. Т. 172. № 11. С. 1247.
11. Крунянский Ю.Ф. // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 3. С. 60; <https://doi.org/10.31857/S0207401X21030079>
12. Шайтан К.В. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 6. С. 40.
13. Dekker J., Rippe K., Dekker M., Kleckner N. // Capturing Chromosome Conform. Sci. 2002. V. 295. P. 1306; <https://doi.org/10.1126/science.1067799>
14. Simonis M., Klous P., Splinter E. et al. // Nat. Genet. 2006. V. 38. P. 1348; <https://doi.org/10.1038/ng1896>
15. Dostie J., Richmond T.A., Arnaout R.A. et al. // Genome Res. 2006. V. 16. P. 1299; <https://doi.org/10.1101/gr.5571506>
16. Gennes P.G.D. Scaling concepts in polymer physics. Ithaca: Cornell University Press, 1979.
17. Grosberg A.Y., Nechaev S.K., Shakhnovich E.I. // J. Phys. 1988. V. 49. P. 2095.
18. Lieberman-Aiden E., Van Berkum N.L., Williams L. et al. // Science. 2009. V. 326. P. 289.
19. Mirny L.A. // Chromosome Res. 2011. V. 19. P. 37.
20. Яшина Е.Г., Григорьев С.В. // ЖЭТФ. 2019. Т. 156. Вып. 3. С. 540.
21. Zwietering M.H., Jongenburger I., Rombouts F.M., van't Riet K. // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. № 6. P. 1875.
22. Loiko N., Danilova Y., Moiseenko A. et al. // PLOS One. 2020. V. 15. № 10; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231562>
23. Шрёдингер Э. Что такое жизнь с точки зрения физики? М.: РИМИС, 2009.
24. Moiseenko A., Loiko N., Sokolova O.S., Krupnyanskii Y.F. // Methods in Molecular Biology. 2022. V. 2516. P. 143; https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2413-5_9
25. Синицын Д.О., Лойко Н.Г., Гуларян С.К. и др. // Хим. физика. 2017. Т. 36. № 9. С. 59.
26. Крунянский Ю.Ф., Лойко Н.Г., Синицын Д.О. и др. // Кристаллография. 2018. Т. 63. № 4. С. 572.
27. Reich Z., Wachtel E., Minsky A. // Science. 1994. V. 264. № 5164. P. 1460.
28. Frenkiel-Krispin D., Ben-Avraham I., Englander J. et al. // Mol. Microbiol. 2004. V. 51. P. 395.
29. Kovalenko V., Popov A., Santoni G. et al. // Acta Cryst. 2020. V. F76. P. 568.
30. Moiseenko A., Loiko N., Tereshkina K. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2019. V. 517. № 3. P. 463.

31. *Tereshkin E., Tereshkina K., Loiko N. et al.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2019. V. 37. P. 2600.
32. *Терешкин Э.В., Терешкина К.Б., Коваленко В.В. и др.* // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 10. С. 48.
33. *Tereshkin E.V., Tereshkina K.B., Krupyanskii Y.F.* // J. Physics: Conf. Ser. 2021. V. 2056. № 1. P. 012016.
34. *Blinov V.N., Golo V.L., Krupyanskii Y.* // Nanostuctures. Math. Phys. Model. 2015. V. 12. P. 5.
35. *Vasilevskaya V.V., Khokhlov A.R., Kidoaki S., Yoshikawa K.* // Biopolymers. 1997. V. 41. P. 51.
36. *Loiko N., Danilova Y., Moiseenko A. et al.* // bioRxiv. 2020. P. 2020.03.27.011494; <https://doi.org/10.1101/2020.03.27.011494>
37. *Shapiro J.A.* // Scientific American. 1988. V. 258. № 6. P. 82.
38. *Shapiro J.A., Dworkin M.* // Quarterly Rev. Biol. 1998. V. 73. № 3. P. 352.
39. *Сузина Н.Е., Мулюкин А.Л., Лойко Н.Г. и др.* // Микробиология. 2001. Т. 70. № 5. С. 776.
40. *Procopio A., Malucelli E., Pacureanu A. et al.* // ACS Central Science. 2019. V. 5. P. 1449.
41. *Santos S., Yang Y., Rosa M. et al.* // Scientific Reports. 2019. V. 9. P. 17217.
42. *Ou H.D., Phan S., Deerinck T.J. et al.* // Science. 2017. V. 357. № 6349. eaag0025; <https://doi.org/10.1126/science.aag0025>