

## АРХИТЕКТУРА КОНДЕНСИРОВАННОЙ ДНК В НУКЛЕОИДЕ БАКТЕРИИ *Escherichia coli*

© 2022 г. Ю.Ф. Крупянский\*,#, В.В. Коваленко\*, Н.Г. Лойко\*, \*\*, А.А. Генералова\*,  
А.В. Моисеенко\*, \*\*\*, Э.В. Терешкин\*, О.С. Соколова\*\*\*, К.Б. Терешкина\*,  
Г.И. Эль-Регистан\*\*, А.Н. Попов\*\*\*\*

\*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН,  
ул. Косыгина, 4, Москва, 119991, Россия

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

\*\*Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,  
Ленинский проспект, 33/2, Москва, 119071, Россия

\*\*\*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,  
Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

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

Поступила в редакцию 11.04.2022 г.

После доработки 11.04.2022 г.

Принята к публикации 06.05.2022 г.

3D-архитектура генома определяет функцию клетки. Изучение конденсации ДНК в клетке важно для понимания механизмов выживания бактерий и для медицины, поскольку упорядоченная конденсация ДНК обеспечивает устойчивость патогенных бактерий к действию антибиотиков. В разбавленном растворе длина ДНК составляет несколько сантиметров. Длина бактерии *Escherichia coli* составляет около 2.0 мкм. Столь драматичное уменьшение объема, занимаемого ДНК – следствие ее конденсации. Обнаружено, что ДНК организована в нуклеоиде иерархически с тремя уровнями компактизации ДНК: нижний уровень (малый масштаб  $\geq 1$  кб п.о.) обеспечивается гистоноподобными NAP-белками. Бактерии при стрессе голодания, в отличие от активно растущих бактерий, используют энергонезависимый механизм поддержания порядка и защиты жизненно важных структур (ДНК), как в неживой природе. Изучение структуры ДНК в нуклеоиде бактерии *E. coli* проводили с помощью дифракции синхротронного излучения и просвечивающей электронной микроскопии. Экспериментальные результаты позволили визуализировать структуры 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. Просвечивающая электронная микроскопия позволила извлечь более тонкую визуальную информацию о типе конденсации ДНК в нуклеоиде бактерии *E. coli*. Обнаружены внутриклеточные нанокристаллические, жидкокристаллические и свернутые нуклеосомо-подобные структуры ДНК. Свернутая нуклеосомо-подобная структура наблюдалась впервые, она является результатом множественного сворачивания длинных молекул ДНК вокруг белка Dps и его ассоциатов.

**Ключевые слова:** ДНК, бактерия *Escherichia coli*, стресс голодания, внутриклеточные нанокристаллическая, жидкокристаллическая, свернутая нуклеосомо-подобная структуры.

DOI: 10.31857/S0006302922040020, EDN: ISJNCS

*Светлой памяти Льва Александровича Блюменфельда посвящается*

3D-архитектура генома определяет функцию клетки. Изучение конденсации ДНК в клетке важно также для понимания механизмов выживания бактерий и для медицины, поскольку упорядоченная конденсация ДНК обеспечивает устойчивость патогенных бактерий к действию анти-

биотиков. Устойчивость к антибиотикам на сегодняшний день является одной из важнейших медицинских проблем в мире.

Бактерии *Escherichia coli*, как и другие микроорганизмы, находятся в постоянно изменяющихся условиях окружающей среды, часто неблаго-

Сокращения: ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия, Dps – ДНК-связывающий белок [впервые выделенный] из голодающих клеток (DNA-binding protein from starved cells).

приятных. 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, позволяющие сохранить часть популяции и выжить в любых неблагоприятных условиях [1]. В первую очередь эти стратегии направлены на защиту генетического материала клетки. Стресс голодания и переход бактерий в покоящееся состояние представляет особый интерес, поскольку покоящиеся клетки существенно более устойчивы к воздействию антибактериальных препаратов, кроме этого, бактерии приобретают способность выживать в самых агрессивных условиях.

Данный обзор посвящен последним оригинальным (2017–2022 гг.) и литературным результатам экспериментальных исследований структурной организации ДНК в покоящихся клетках *E. coli* с помощью дифракции синхротронного излучения, просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) при действии на бактерию стресса голодания. Приведены результаты молекулярно-динамического моделирования кристаллов Dps-ДНК. Обсуждаются изменения в архитектуре нуклеоида при переходе от активно растущих к покоящимся клеткам, образующимся при стрессе голодания. Для лучшего понимания происходящих изменений обсуждается архитектура нуклеоида в активно растущей клетке. Обсуждаются последние методические успехи в нано-визуализации и нано-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 покоящихся бактериях.

### КОНДЕНСАЦИЯ ДНК В АКТИВНО РАСТУЩИХ КЛЕТКАХ. ФРАКТАЛЬНАЯ ГЛОБУЛА

*E. coli* – широко распространенная грамотрицательная бактерия, являющаяся одним из важнейших инструментов биологической науки [2]. *E. coli* в этом смысле является аналогом атома водорода для микробиологии.

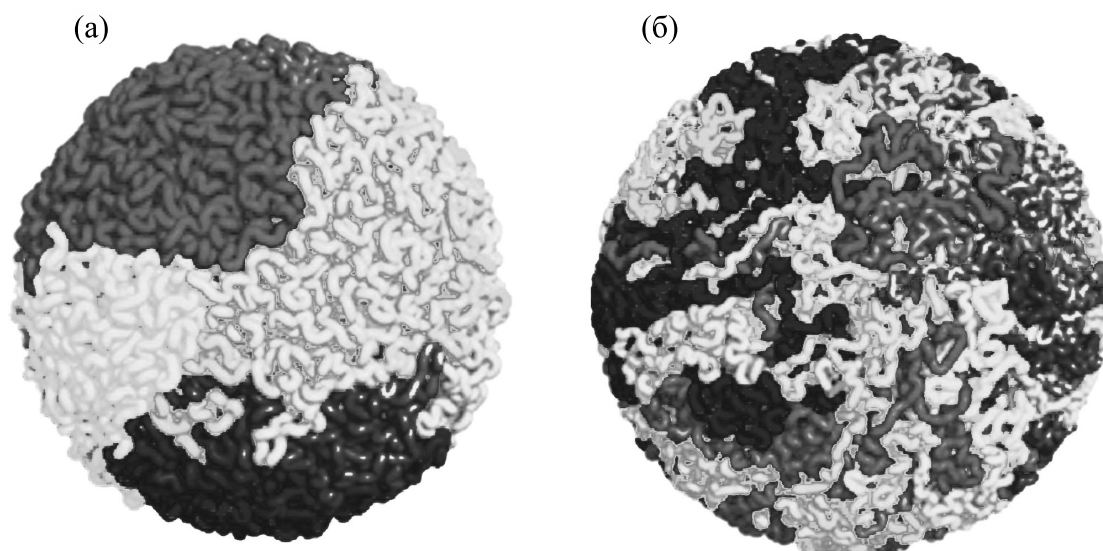
Бактериальная геномная ДНК и ассоциированные с ней белки (nucleoid-associated proteins, NAP-белки) расположены в клетке в сильно конденсированной и функционально организованной форме в нуклеоиде. ДНК – длинный, сильно заряженный гетерополимер. В разбавленном растворе при термодинамическом равновесии ДНК бактерии *E. coli* образует стохастический клубок [3] объемом около  $500 \text{ мкм}^3$ . Объем нуклеоида *E. coli*, где располагается ДНК, в клетке не превы-

шает  $1 \text{ мкм}^3$ . Для размещения в нуклеоиде ДНК должна дополнительно компактизоваться [4]. Кроме этого, конденсированная в нуклеоиде ДНК должна быть функциональной. Конденсированная ДНК должна быть способна осуществлять такие процессы как репликация, рекомбинация, сегрегация и транскрипция. Структура бактериального нуклеоида с высоким разрешением еще не определена. Однако исследования, начавшиеся еще в 1971 г., показали, что конденсированная ДНК в нуклеоиде имеет иерархическую структуру и что конденсация ДНК имеет некоторое сходство с фолдингом (самоорганизацией) белка [4, 5]. Можно грубо выделить следующие уровни структурной организации компактной бактериальной ДНК [6]. Низший уровень (малый масштаб  $\sim 1$  килобайт пар оснований (п.о.)) обеспечивается взаимодействием ДНК с ДНК-связывающими белками. На промежуточном уровне (средний масштаб  $\sim 10$  килобайт 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 (как у фрактальной глобулы), на которые разделен бактериальный нуклеоид.

Фрактальная (или складчатая) глобула – это компактное полимерное состояние, которое возникает при конденсации полимера в результате топологических ограничений, препятствующих переходу одной области цепи в другую. Это долгоживущее промежуточное состояние было введено в 1988 году А.Ю. Гроссбергом с соавт. [7]. Экспериментальное исследование свойств пространственной организации хроматина в ядре клетки человека с использованием набора новых методов молекулярной биологии, сокращенно называемых 3С (chromosome conformation capture) и Hi-C, привлекли внимание к фрактальной глобуле как к структурной модели хроматина на крупном масштабе  $\sim 10 \text{ Мб}$  [8, 9].

Согласно работе [10], 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 уже сам образует более крупные складки и т. д. [7]. Авторы работы [7] продемонстрировали, что этот процесс приводит к образованию долгоживущего состояния, которое они назвали складчатой (впоследствии ее стали называть фрактальной) глобулой. Было предположено, что такая глобула характеризуется иерархией складок, образуя самоподобную структуру [7].

На рис. 1 показаны конформации фрактальной и равновесной глобул. Фрактальная глобула



**Рис. 1.** Конформации фрактальной (а) и равновесной (б) глобул. Фрактальная глобула имеет четкую территориальную организацию, которая сильно контрастирует со смешением, наблюдаемым в равновесной глобуле.

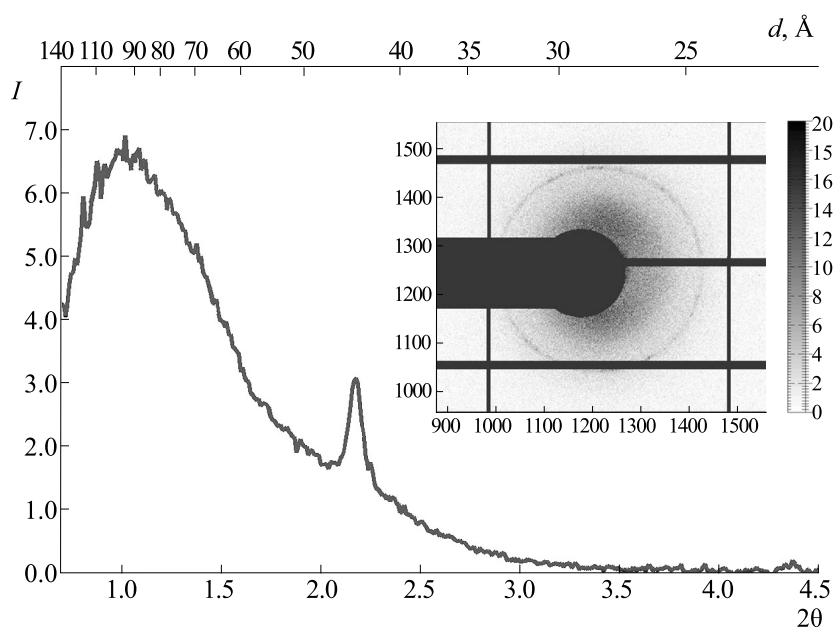
имеет поразительную территориальную организацию цепочки, которая сильно контрастирует с перемешанной организацией цепочки, наблюдаемой в равновесной глобуле. Хромосомные контакты в клетках человека были охарактеризованы с помощью экспериментов Hi-C. При сравнении с экспериментом было решено, что фрактальная глобула достаточно хорошо описывает свойства хромосомы человека на мега-масштабах, или третьем 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 [9].

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 [9]. В работе [9] моделировалось флуктуационное открытие области размером около 3 Мб в двух глобулах — складчатой и равновесной. Во фрактальной глобуле область раскрывается, образуя большую петлю. В равновесной глобуле такая же область не открывается из-за перепутывания цепи. В модели хроматина, описываемого равновесной глобулой, заузленная

цепочка ДНК не позволяет открыть петлю достаточного размера и доступ к сайтам ДНК ограничен.

#### РОСТ БАКТЕРИЙ. СТРЕСС ГОЛОДАНИЯ. 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 [11]. Первая фаза роста называется лаг-фазой, это период медленного роста, когда клетки адаптируются к среде, богатой питательными веществами. 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 закончится 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 необходимыми. Финальная фаза роста — фаза смерти, при которой запас питательных веществ исчерпывается и бактерии погибают. В экспоненциальной фазе роста меняется относительное содержание ДНК-ассоциированных гистоноподобных белков (NAP-белков). Например, если в фазе роста содержание белка Dps (DNA-binding protein from starved cells, ДНК-свя-



**Рис. 2.** Зависимость интенсивности рассеяния от угла  $2\theta$  для образца голодающих бактерий *E. coli* штамма BL21-Gold(DE3). На врезке – дифракционная картина для этого образца. Повышенная интенсивность свидетельствует о наличии периодической упорядоченной организации (близкой к нанокристаллической) ДНК с ДНК-ассоциированными белками.

зывающий белок [впервые выделенный] из голодающих клеток) составляет около 6000 молекул белка на клетку, то в стационарной и в поздней стационарной фазе содержание белка Dps становится подавляющим по сравнению с другими белками и составляет 180000–200000 молекул белка на клетку. В поздней стационарной фазе решающим для конформации ДНК (архитектуры бактериального нуклеоида) становится взаимодействие ДНК с Dps. Dps играет регулируемую и защитную роль в клетках *E. coli* [12–15]. При голодании Dps очень активен и может сильно изменять структуру бактериальной ДНК. Его структура [16] и взаимодействие с ДНК недавно были изучены *in vitro* [16, 17] и *in silico* [18, 19]. Dps представляет собой додекамер и состоит из 12 идентичных цепей [16]. Структура депонирована в Protein Data Bank (1dps.pdb).

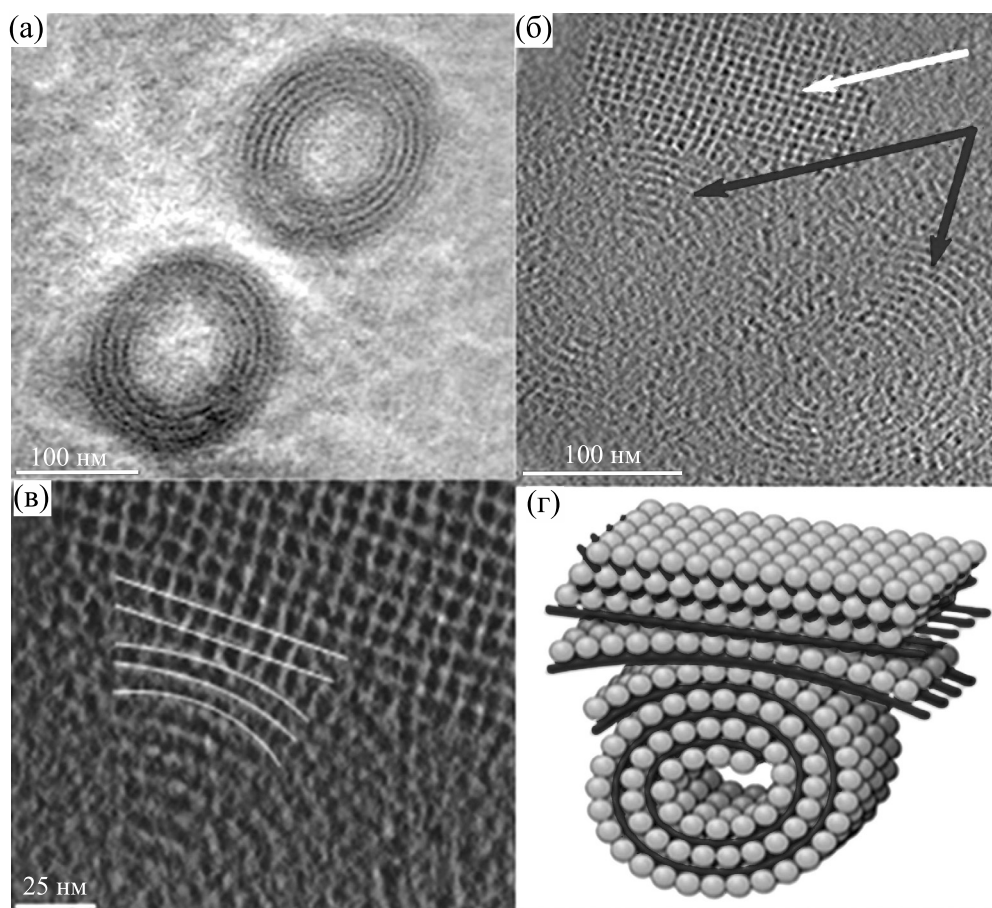
#### ПОКОЯЩИЕСЯ КЛЕТКИ. СТРУКТУРНЫЙ ОТВЕТ НА СТРЕСС. ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ НАНОКРИСТАЛЛИЗАЦИЯ НУКЛЕОИДА

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 [20]. Клетки

становятся покоящимися. Большинство клеток (до 99.98%) в голодающих долгое время популяциях подвергаются автолизу. Остальные клетки развиваются в покоящиеся формы, которые существенно отличаются по структурной организации от растущих клеток [21].

Для покоящихся клеток можно ожидать обнаружение 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. Внутриклеточная нано(био)кристаллизация позволяет защитить ДНК от повреждений и потенциальную способность возобновления метаболической активности бактериальных клеток в свежей среде. Другие виды структурного ответа на стресс голодания изложены в разделе «АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ВИДЫ КОНДЕНСАЦИИ ДНК В КЛЕТКЕ».

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 [22, 23]. Для популяции клеток под действием стресса голодания зарегистрированы дифракционные картины вида, показанного на врезке на рис. 2. С целью детального анализа этих данных построены зависимости интенсивности рассеяния от угла рассе-



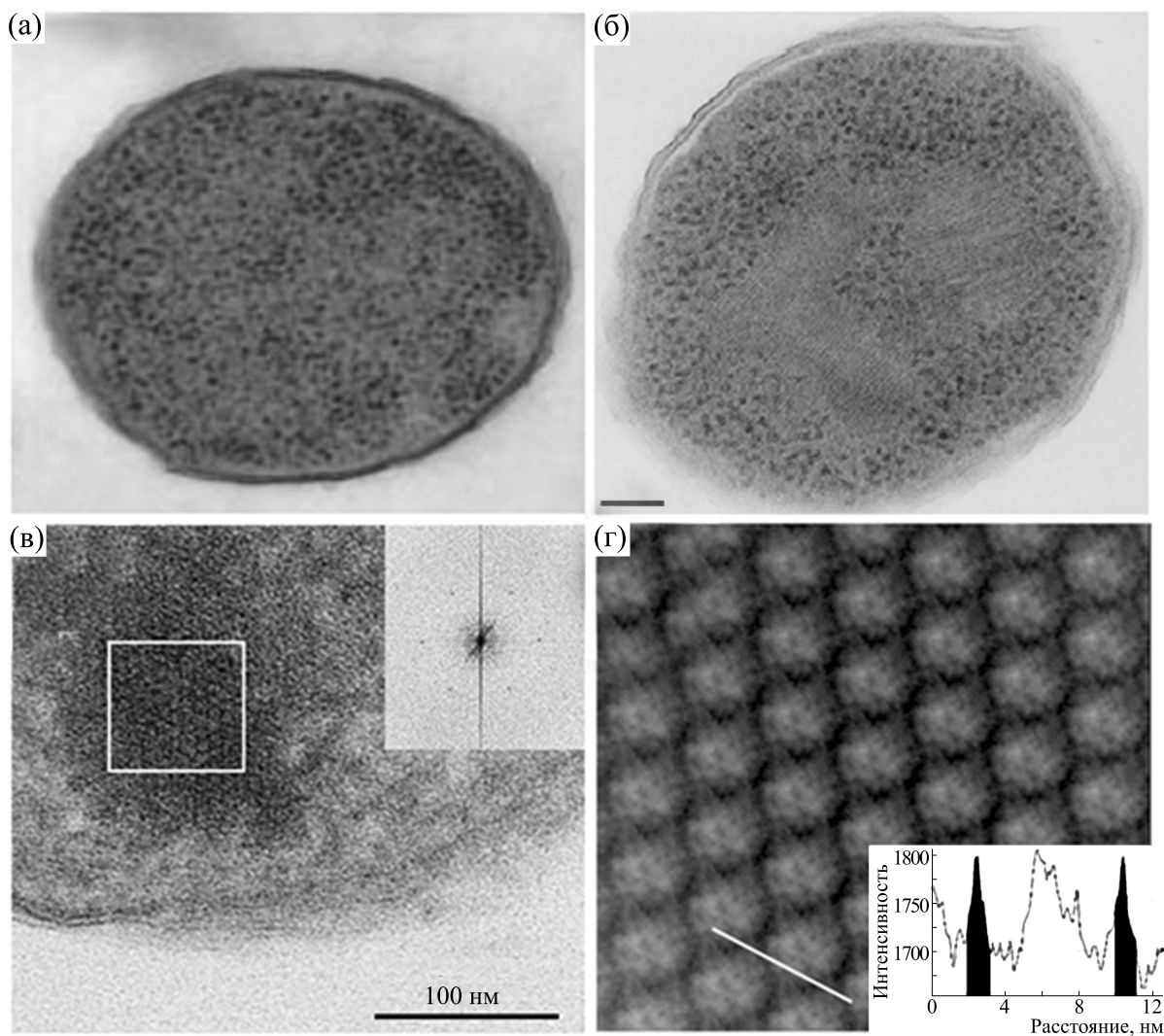
**Рис. 3.** ПЭМ. Последовательная внутриклеточная кристаллизация ДНК–Dpsv клетках *E. coli* при стрессе голодания: (а) — при 24-часовом голодании (образование тороидов); (б) — при 36-часовом голодании, наблюдаются структуры ДНК (черные стрелки) в непосредственной близости от растущего кристалла ДНК–Dps (белая стрелка); (в) — сильно увеличенная область из рис. (б), показывающая рост кристаллов (белые линии); (г) — модель внутриклеточной сборки ДНК–Dps, которая изображает первоначально сформированную тороидальную структуру, действующую как шаблон для кристалла ДНК–Dps. Взято с разрешения из работы [25].

яния  $2\theta$  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 растущих клеток, где области повышенной интенсивности не были замечены. Первый широкий пик лежит в области 90–93 Å. Диаметр Dps-додекамера около 90 Å, поэтому этот пик может соответствовать расстоянию между слоями Dps. Второй пик в 45 Å может соответствовать второму порядку дифракции Dps–Dps или расстояниям ДНК–ДНК в плотно упакованном ансамбле ДНК [24].

Приведенные на рис. 2 результаты дифракционных экспериментов свидетельствуют о наличии периодической упорядоченной организации (скорее всего нанокристаллической) нуклеоида бактерий с указанными выше периодами.

**Просвечивающая электронная микроскопия** позволяет 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 и элементный анализ) проводили на аналитическом просвечивающем электронном микроскопе JEM-2100 (Jeol, Япония).

Электронная микроскопия и электронно-микроскопическая томография позволили добиться существенного прогресса в визуализации упорядоченных ДНК–Dps образований *in vivo*. В стационарной фазе при 24-часовом стрессе голодания ДНК образует тороидальные структуры (рис. 3а). Для тороидов, возникающих в клетках



**Рис. 4.** Данные ПЭМ для клеток *E. coli*. (а) – Экспоненциально растущие клетки *E. coli*. Темные частицы – рибосомы; пространство, свободное от рибосом, содержит ДНК. (б) – Просвечивающая электронная микроскопия клетки после 48 ч голодания, выявляющая плотно упакованные кристаллы ДНК–Dps; Взято с разрешения из работы [25]. (в) – Полутолстый срез томограммы клетки *E. coli* с нанокристаллической структурой, на врезке – Фурье-преобразование области с белой рамкой. (г) – Отфильтрованный кристалл ДНК–Dps, на врезке – профиль интенсивности вдоль белой линии на основном изображении. Черным выделены плотности, соответствующие межслойным цепям ДНК.

*E. coli*, данные методы позволили определить форму и размеры тороидальных структур (внешний диаметр – около 150 нм, внутренний диаметр – около 50 нм (рис. 3а) [25]. Далее (при 36-часовом стрессе голодания) наряду с тороидальными структурами появляются кристаллические структуры ДНК–Dps (рис. 3б,в). Это позволило предположить, что тороиды играют роль подложки для последующего образования кристаллов ДНК–Dps. Авторы работы [25] выдвинули гипотезу о том, что ДНК локализована между гексагонально упакованными слоями Dps в кристалле (рис. 3г). Это означает, что характерное расстояние между цепочками ДНК–ДНК будет около 90 Å, а не 45 Å, как предполагалось выше.

На рис. 4а приведены результаты, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) для экспоненциально растущей клетки. Темные частицы обозначают рибосомы. Место, свободное от рибосом, содержит хроматин [25]. На рис. 4б представлены результаты для клетки, испытавшей стресс 48-часового голодания. Тороидальные структуры исчезают, наблюдаются достаточно большие кристаллы ДНК–Dps [25]. На рис. 4в показан срез томограммы клетки с нанокристаллической структурой; на врезке на рис. 4в – результат Фурье-анализа нанокристаллической области клетки, очерченной белой каймой [21], свидетельствующий о наличии нанокристалла в этой области клетки [21].



Отфильтрованный кристалл ДНК–Dps представлен на рис. 4г; на вставке к рис. 4г изображен профиль интенсивности электронной плотности вдоль белой линии основного изображения. Черным выделены плотности, видимо, соответствующие межслойным цепям ДНК [21]. 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.

Экспериментальные данные, полученные с помощью дифракции синхротронного излучения и 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 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.

Опишем результаты, полученные методом макромолекулярной кристаллографии [26]. Для проведения экспериментов были синтезированы кристаллические комплексы ДНК (длиной 3000 п.о.) с белком Dps. Синтезированные кристаллы оказались небольшими по размеру ( $\approx 3$ – $7$  мкм). Полученные малые монокристаллы плохо отражали излучение, обладали низкой симметрией и неизвестной пространственной группой. Из-за этого 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 подпадающих под экспериментальные данные. Поэтому основной задачей стала задача определения пространственной группы кристалла. Для продвижения дальше и определения пространственной группы пришлось объединять общие рефлексы от разных малых монокристаллов. Первым шагом вперед являлось определение кластера, состоящего из наиболее изоморфных монокристаллов данных. Для выбора удобного набора данных и их объединения был использован иерархический кластерный анализ с помощью программы ccCluster [27]. Оказалось, что объединение данных, принадлежащих группе P1, наиболее успешно.

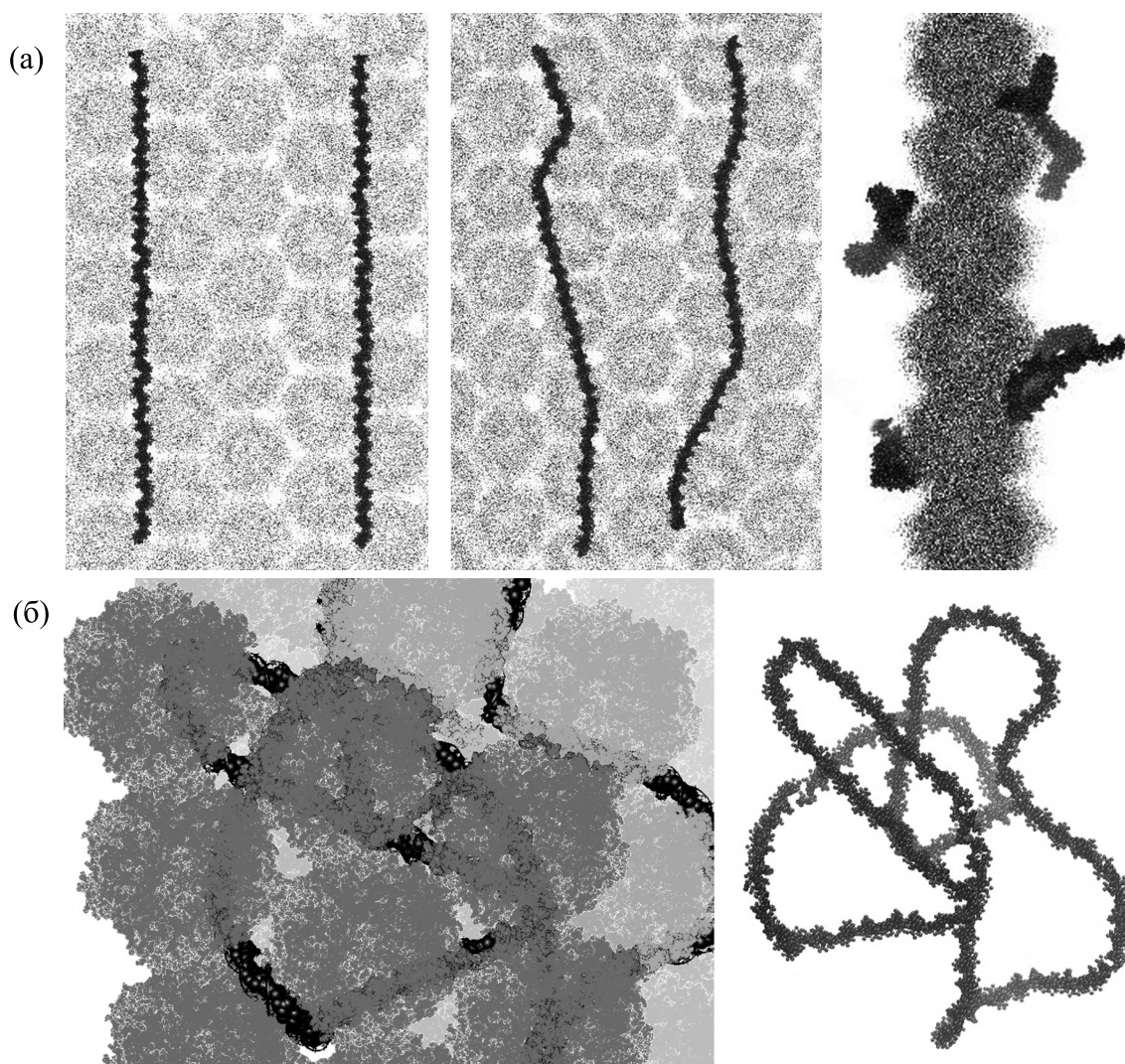
Таким образом, несмотря на малость размеров монокристаллов, низкую симметрию (P1), относительно большие параметры решетки и слабые рефлексы, программные комплексы Mesh&Collect и ccCluster, позволили определить структуру белка Dps [26] (в процессе определения структуры оказалось, что ДНК не образовала комплекс ДНК–Dps, а вышла из кристалла). Структура депонирована в Protein Data Bank как 6QVX [26].

Для проведения 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 [28]. Электронно-микроскопические исследования позволяют увидеть следы ДНК в тонких (2D) кристаллах ДНК–Dps. Чтобы объяснить противоречие с данными рентгеноструктурного анализа на массивных монокристаллах, мы предположили, что тонкие 2D-кристаллы ДНК–Dps имеют увеличенную по сравнению с массивным кристаллом постоянную решетку, поэтому в тонких кристаллах есть пространство для ДНК.

Также было предпринято молекулярно-динамическое моделирование, с помощью которого изучались однослойные и многослойные кристаллы белка Dps [18, 19, 28, 29] на траекториях 0.6 мкс, адсорбция ДНК (длиной 165 п.о.) на поверхности однослойных двумерных (2D) и конденсация в трехмерных (3D) кристаллах. Показано, что механизм адсорбции ДНК на поверхности двумерного кристалла зависит от его локальных свойств (область N-концов, область остова) и расположения ДНК относительно главных направлений кристалла. Нити ДНК распределяются на поверхности кристаллов неупорядоченно, образуя изгибы в процессе укладки (рис. 5а).

В многослойных (трехмерных, 3D) кристаллах белка Dps за счет шарообразной формы молекул белка формируются многочисленные каналы. Предположительно, в этих каналах может укладываться ДНК. Скорее всего, кристалл ДНК–Dps образуется постепенно, поэтому ДНК внутри кристалла располагается нелинейно, изгибаясь и проходя через каналы различных направлений. Для проверки этой гипотезы была построена модель участка геномной ДНК *E. coli* (513 пар оснований, ген *dps*). На основании проведенных молекулярно-динамических расчетов было показано, что кристаллы белка Dps остаются стабильными в присутствии ДНК (рис. 5б). Образование изгибов внутри при переходе между каналами кристалла не нарушает структуру ДНК. Значит, ДНК в кристаллах Dps может располагаться и, скорее всего, располагается неупорядоченно.

Таким образом, изучение кристаллов *in vitro* не оправдало ожиданий. Четкого ответа о конфор-



**Рис. 5.** 2D- и 3D-кристаллы белка Dps *E. coli*: (a) – линейные молекулы ДНК на поверхности 2D-кристалла белка Dps в начальный момент времени (слева), образование изгибов ДНК на поверхности 2D-кристалла Dps в процессе динамики (посередине – вид сверху, справа – вид сбоку); (б) – участок 3D кристалла Dps с изогнутой нитью ДНК внутри каналов (слева), конформация ДНК внутри кристалла (справа). Серые сферы – молекулы белка Dps, темные линии – нити ДНК.

мации ДНК в монокристаллах ДНК–Dps получить не удалось. Молекулярно-динамические расчеты подтверждают этот вывод. Поэтому пока что остаются лишь гипотетические модели укладки ДНК как в нанокристаллах Dps *in vitro*, так и в клетках бактерий.

#### АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ВИДЫ КОНДЕНСАЦИИ ДНК В КЛЕТКЕ

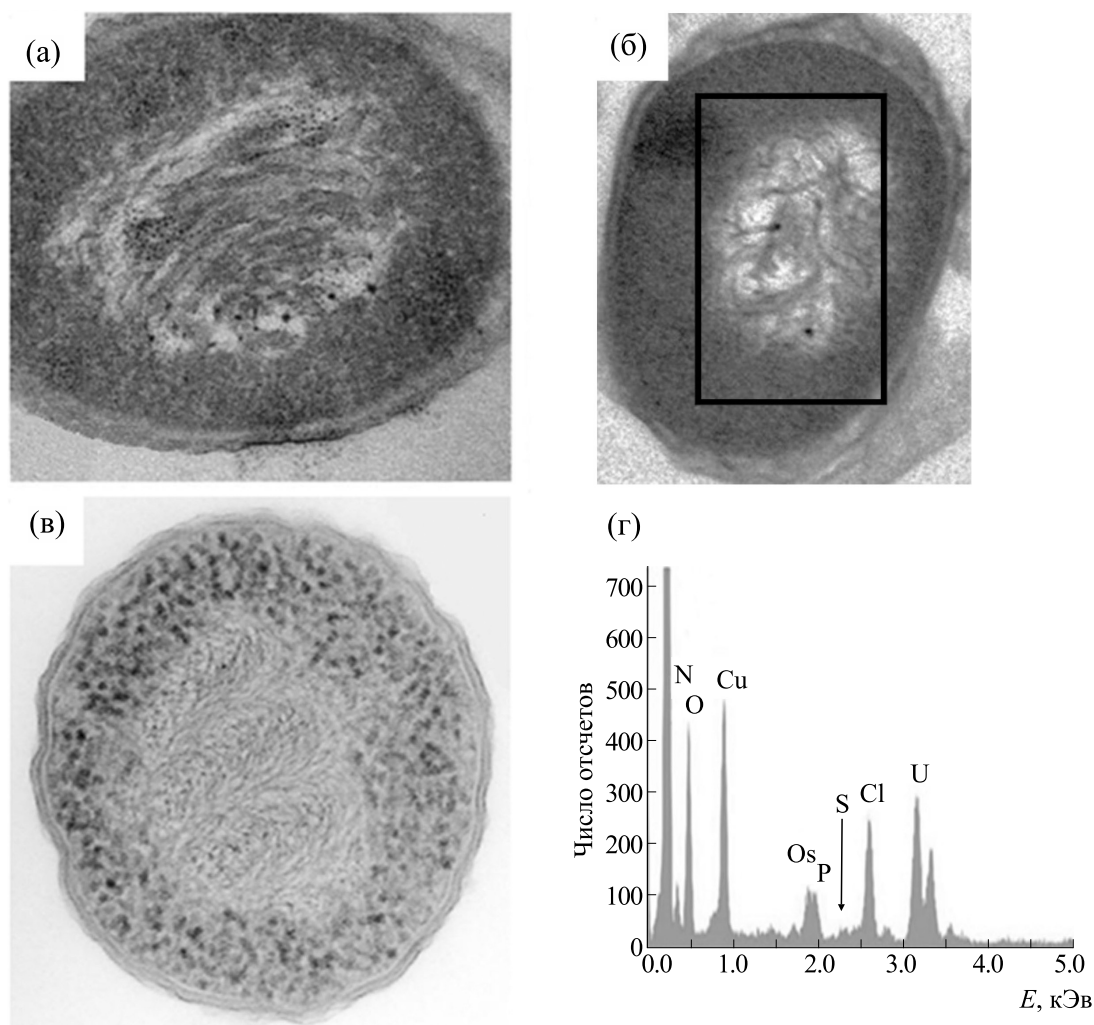
До сих пор был рассмотрен один из основных механизмов структурного ответа, каким является внутриклеточная нано(био)кристаллизация ДНК с Dps. Рассмотрим другие конденсированные состояния ДНК в клетке. Вспомним, что конденсация ДНК в нуклеоиде бактерий является проме-

жуточным инженерным решением между практически свободной от белка упаковки ДНК в вирусах и определяемой белками-гистонами упаковки ДНК в эукариотах [30].

Несколько слов об упаковке ДНК в вирусах. Обнаружено [31], что в вирусе-бактериофаге ф6 двойная спираль ДНК (dsDNA) хранится внутри капсида в виде катушки, которая 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 [31].

Перейдем к покоящимся бактериальным клеткам. Примечательно, что жидкокристаллические





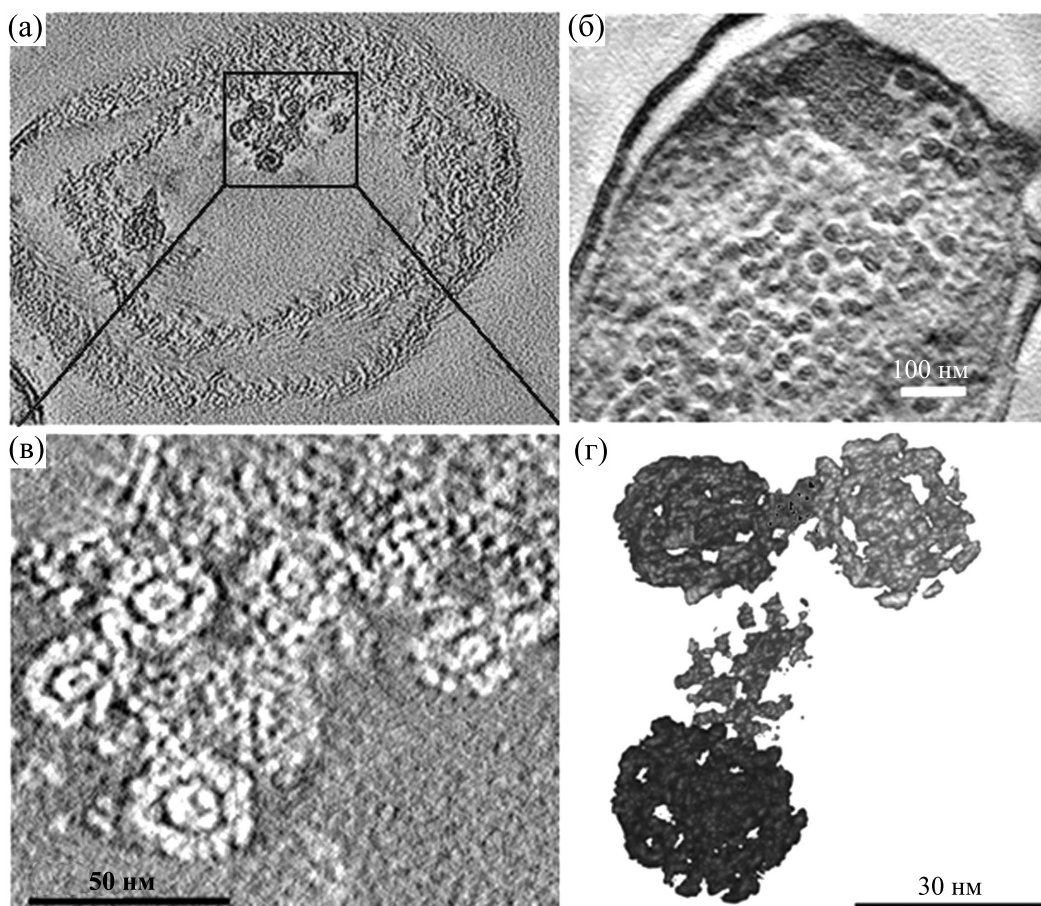
**Рис. 6.** (а)–(в) – Жидкокристаллические ансамбли ДНК–Dps в покоящихся клетках *E. coli*; (г) – видно, что содержание фосфора (P) сильно превышает концентрацию серы (S).

структуры были обнаружены во всех популяциях клеток *E. coli* – как с геном *dps*, так и без гена *dps* (Dps-null), то есть в отсутствие белка Dps в клетке. В некоторых клетках ДНК имеет вид холестерического жидкого кристалла (рис. 6а,в). ДНК расположена в виде вложенных дуг, характерных для холестерической фазы, рибосомы выглядят как темные частицы и находятся на периферии клетки [20, 21]. Упаковка ДНК в жидкокристаллической фазе снижает доступность молекул ДНК к различным повреждающим факторам, включая облучение, окислители и нуклеазы [20, 21].

Особый интерес представляет третий тип упорядоченной структуры: свернутая нуклеосомоподобная структура, обнаруженная в покоящихся клетках *E. coli* впервые в работе [21]. 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. 7а–в) со средним диаметром 30 нм. Томографические исследования (рис. 7г) демонстрируют, что эти структуры не являются тороидами (см. рис. 3а), а представляют собой почти сферические образования. С учетом того, что бактериальный нуклеоид представляет собой промежуточное инженерное решение между свободной от белка упаковкой ДНК в вирусах и определяемой белками-гистонами упаковкой ДНК в эукариотах, данный тип конденсации ДНК был назван нами «свернутой нуклеосомоподобной структурой».

Элементный анализ показал [21], что сферические агрегаты действительно содержат пики, соответствующие сере и фосфору и указывающие



**Рис. 7.** Свернутая нуклеосомоподобная структура ДНК–Dps в покоящихся клетках *E. coli*. (а) – Томограмма клетки *E. coli* (штамм Top10/pBAD-Dps), растущей на среде M9, без индукции производства Dps, возраст 7 месяцев. (б) – Томограмма клетки *E. coli* (штамм BL21-Gold (DE3) /pET-Dps), растущей на среде M9, с индуцированной продукцией Dps в фазе линейного роста, возраст 7 месяцев. (в) – Часть рисунка (а) с большим увеличением. (г) – Трехмерная реконструкция сферических ассоциатов Dps.

на присутствие ассоциатов ДНК–Dps. В бактериальных клетках сферические образования молекул Dps (см. рис. 8) могут действовать аналогично гистонам, на которые накручивается ДНК (гистоноподобное поведение). ДНК может также проходить сквозь сферические образования бусинок Dps, образуя «бусинки на нитке» (рис. 8). 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, «бусинки на нитке» могут путем множественного складывания образовать компактную структуру, похожую на складчатую глобулу (рис. 8). Схематическое изображение образования свернутой нуклеосомоподобной

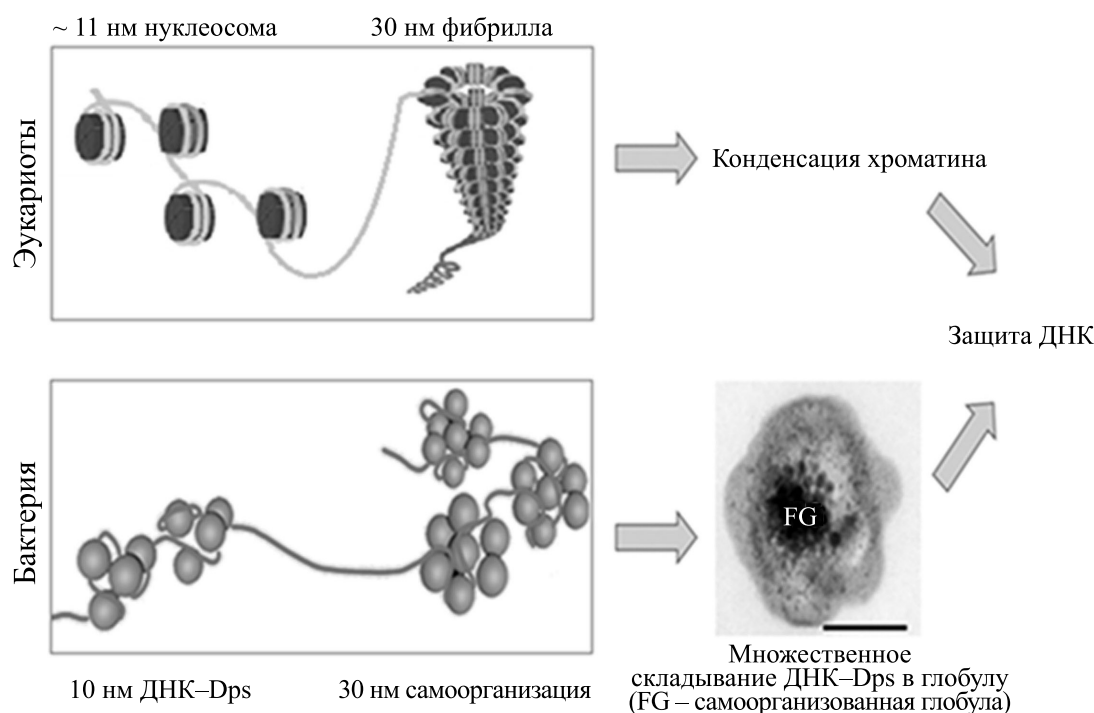
структуры можно увидеть на рис. 8. Внешние молекулы Dps могут налипать на глобулу и дополнительно защищать ДНК [21].

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДЫ

В данном кратком обзоре представлены оригинальные и литературные результаты по изучению архитектуры нуклеоида покоящихся клеток с помощью дифракции синхротронного излучения и просвечивающей электронной микроскопии.

Результаты дифракционных экспериментов свидетельствуют о наличии периодической упорядоченной организации (скорее всего нанокристаллической) в нуклеоиде бактерий *E. coli*.

Более тонкую визуальную информацию о типе конденсации ДНК в нуклеоиде дает просвечивающая электронная микроскопия. В результате



**Рис. 8.** 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, тем самым 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 «бусинки на нитке», которые затем могут складываться в сферические агрегаты диаметром 30 нм и далее, путем множественного складывания, переходит в глобулу ДНК–Dps – структуру, которая эффективно защищает нуклеоидную ДНК от внешних воздействий.

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. Доля специфической структуры зависит от штамма и условий культивирования. Свернутая нуклеосомоподобная структура наблюдалась и описана в оригинальных исследованиях авторов впервые в работе [21]. 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 [20], но и мешает визуализации ДНК.

В первом разделе описаны результаты пятидесятилетнего экспериментального изучения архитектуры нуклеоида бактерий, находящихся в стадии активного экспоненциального роста. Эти ис-

следования 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], состоящую из трех уровней организации. Первый, низший уровень структурной организации, обеспечивается взаимодействием ДНК с ДНК-ассоциированными белками. На втором уровне структурной организации образуются плектонемичные сверхспиральные петли ДНК. На мега-масштабе ДНК образует шесть пространственно организованных доменов (макродоменов) с четкой территориальной организацией, на которые разделен бактериальный нуклеоид. Описана популярная теоретическая модель пространственной организации ДНК в клетке – фрактальная глобула, которая обладает поразительной территориальной организацией цепочки, как и ДНК в клетке на мега-масштабе (шесть пространственно организованных доменов). Кроме этого, упаковка ДНК, описываемая фрактальной глобулой, позволяет практически безболезненно открыть любую петлю ДНК,

открывая доступ к любому сайту ДНК, что важно для ее функционирования.

При переходе от активно растущих клеток к покоящимся, образующимся при стрессе голодания, ситуация радикально меняется. Химия и структура живых систем поддерживаются исключительно энергозависимым динамическим порядком [20, 32]. 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 (в частности, ДНК) — создание устойчивых молекулярных структур, как в неживой природе [20]. Клетки становятся покоящимися. 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 новых вида стабильной конденсации ДНК в покоящихся клетках *E. coli*, отличные от структуры ДНК в растущих клетках. Первые две — нанокристаллическая и жидкокристаллическая структуры — типичны для неживой природы (рис. 4–6). Третий тип — свернутая нуклеосомоподобная структура — может быть результатом сложного взаимодействия и множественного сворачивания длинных молекул ДНК вокруг додекамеров Dps и их ассоциатов (рис. 7 и 8). Таким образом, обнаружены новые структуры в покоящихся клетках [17, 20–23]. 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. 3–8. Можно ли обнаружить структуры второго и третьего уровней компактизации методами, изложенными в данной работе? Методом ПЭМ изучается структура ДНК, находящаяся в тонких 2D-срезах. Этого, конечно, недостаточно, чтобы описать объемную 3D-структуру нуклеоида. 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 макромолекулы? На эти многочисленные вопросы исследования, приведенные в обзоре, не дают ответа.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

XX век был веком рентгеноструктурного анализа. С помощью рентгеноструктурного анализа была 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 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 трехмерной (3D) визуализации архитектуры нуклеоида *in vivo* с высоким разрешением будет найден и пройден в обозримое время. Методы нановизуализации и нанотомографии, используемые на синхротроне ESRF-EBS (Гренобль, Франция), позволяют количественно оценивать 3D-структуру и элементный состав образцов в их естественном состоянии [33]. С помощью наноплуоресцентной спектроскопии и нанотомографии можно изучать 3D-распределение фосфора, а, следовательно, и ДНК по всей клетке [34]. К сожалению, пространственное разрешение этого метода в настоящий момент не превышает 20 нм. Развитие метода нановизуализации 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 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 [35]. Срезы можно также изготавливать сфокусированным ионным пучком, после чего (срез за срезом) визуализировать архитектуру клетки в трех измерениях (3D-архитектуру) [36]. В работе [37] для визуализации хроматина *in situ* был использован улучшенный метод обнаружения ДНК с помощью флуоресцентного красителя. Метод получил название томография ChromEM или ChromEMT. ChromEMT позволил определить структуру и трехмерную организацию нитей хроматина, ор-

ганизацию крупномасштабных (мегабазных) доменов.

Очевидно, что наибольший успех принесет использование комбинации методов, использующих синхротронное излучение и электронную микроскопию. Описанные выше методические успехи обещают в ближайшем будущем визуализировать архитектуру 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.

### БЛАГОДАРНОСТИ

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

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Авторы благодарят за финансовую поддержку Министерство науки и высшего образования Российской Федерации. Работа выполнена в рамках Госзадания для ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН (№ государственной регистрации 122040400089-6).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. О. В. Бухарин, А. Л. Гинцбург, Ю. М. Романова и Г. И. Эль-Регистан, *Механизмы выживания бактерий* (Медицина, М., 2005).
2. К. Циммер, *Микрокосм: E. coli и новая наука о жизни* (ООО «Альпина нон-фикшн», М., 2013).
3. A. Y. Grosberg and A. R. Khokhlov, *Statistical physics of macromolecules* (AIP, New York, 1994).
4. V. A. Bloomfield, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**, 334 (1996).
5. Ю. Ф. Крупянский и В. И. Гольданский, *Успехи физ. наук*, **172** (11), 1247 (2002).
6. S. C. Verma, Z. Qian, and S. L. Adhya, *PLoS Genet.*, **15** (12), e1008456 (2019).
7. A. Y. Grosberg, S. K. Nechaev, and E. I. Shakhnovich, *J. Phys.*, **49**, 2095 (1988).
8. E. Lieberman-Aiden, N. L. Van Berkum, L. Williams, et al., *Science*, **326**, 289 (2009).
9. L. A. Mirny, *Chromosome Res.*, **19**, 37 (2011).
10. P. G. D. Gennes, *Scaling concepts in polymer physics* (Cornell University Press, Ithaca, 1979).
11. M. H. Zwietering, I. Jongenburger, F. M. Rombouts, and K. T. Riet, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56** (6), 1875 (1990).
12. E. Chiancone, *Front. Biosci.*, **15**, 122 (2010).
13. M. de Martino, D. Ershov, P. J. van den Berg, et al., *J. Bacteriol.*, **198**, 1662 (2016).
14. M. Almirón, A. J. Link, D. Furlong, and R. Kolter, *Genes. Dev.*, **6**, 2646 (1992).
15. L. N. Calhoun and Y. M. Kwon, *J. Appl. Microbiol.*, **110**, 375 (2011).
16. R. A. Grant, D. J. Filman, S. E. Finkel, et al., *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 294 (1998).
17. D. Frenkiel-Krispin and A. Minsky, *J. Struct. Biol.*, **156**, 311 (2006).
18. E. Tereshkin, K. Tereshkina, N. Loiko, et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **37**, 2600 (2019).
19. Э. В. Терешкин, К. Б. Терешкина, В. В. Коваленко и др., *Хим. физика*, **38** (40), 48 (2019).
20. A. Minsky, E. Shimoni, and D. Frenkiel-Krispin, *Nat. Rev. Mol. Cell.*, **3**, 50 (2002).
21. N. Loiko, Y. Danilova, A. Moiseenko, et al., *PLoS One*, **15** (10), e0231562 (2020).
22. Y. F. Krupyanskii, N. G. Loiko, D. O. Sinitsyn, et al., *Crystallogr. Reports*, **63**, 594 (2018).
23. D. O. Sinitsyn, N. G. Loiko, S. K. Gularyan, et al., *Russ. J. Phys. Chem. B*, **11**, 833 (2017).
24. Z. Reich, E. Wachtel, and A. Minsky, *Science*, **264** (5164), 1460 (1994).
25. D. Frenkiel-Krispin, I. Ben-Avraham, J. Englander, et al., *Mol. Microbiol.*, **51**, 395 (2004).
26. V. Kovalenko, A. Popov, G. Santoni, et al., *Acta Cryst.*, **F76**, 568 (2020).
27. G. Santoni, U. Zander, Ch. Muelлер-Dieckmann, et al., *J. Appl. Crystallography*, **50**, 1844 (2017).
28. A. Moiseenko, N. Loiko, K. Tereshkina, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **517** (3), 463 (2019).
29. E. V. Tereshkin, K. B. Tereshkina, and Y. F. Krupyanskii, *J. Physics: Conf. Ser.*, **2056** (1), 012016 (2021).
30. V. B. Teif and K. Bohinc, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **105**, 208 (2011).
31. S. L. Ilca, X. Sun, K. El Omari, et al., *Nature*, **570**, 252 (2019).
32. Э. Шрёдингер, *Что такое жизнь с точки зрения физики?* (РИМИС, М., 2009).
33. A. Procopio, E. Malucelli, A. Pacureanu, et al., *ACS Central Sci.*, **5**, 1449 (2019).
34. S. Santos, Y. Yang, M. Rosa, et al., *Sci. Rep.*, **9**, 17217 (2019).
35. D. Vanhecke, W. Graber, and D. Studer, *Methods Cell Biol.*, **88**, 151 (2008).
36. K. Narayan and S. Subramaniam, *Nat. Methods*, **12** (11), 1021 (2015).
37. H. D. Ou, S. Phan, T. J. Deerinck, et al., *Science*, **357** (6349), eaag0025 (2017).

**Architecture of Condensed DNA in the *Escherichia coli* Nucleoid****Y.F. Krupyanskii\*, V.V. Kovalenko\*, N.G. Loiko\*, \*\*, A.A. Generalova\*, A.V. Moiseenko\*, \*\*\*, E.V. Tereshkin\*, O.S. Sokolova\*\*\*, K.B. Tereshkina\*, G.I. El'-Registan\*\*, and A.N. Popov\*\*\*\***

\**Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina, 4, Moscow, 119991 Russia*

\*\**Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences, Leninskiy prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia*

\*\*\**Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1/12, Moscow, 119234 Russia*

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

Three-dimensional (3D) architecture of the genome determines the function of the cell. Condensation studies of DNA in a cell can provide important information about the mechanisms that enable the bacteria to survive. This information can be also valuable for medicine, since ordered DNA condensation ensures the resistance of pathogenic bacteria to antibiotics. The length of DNA in dilute solution is a few centimeters long. *Escherichia coli* cell is about 2.0  $\mu\text{m}$  long. Such a dramatic decrease in the volume occupied by DNA is a consequence of its condensation. It was found that DNA in the nucleoid is hierarchically organized folding into a three-level compact structure: the primary level (on the scale of  $\geq 1$  kbp) is provided by histone-like NAP proteins. Unlike actively growing bacteria, bacteria upon stress starvation use an energy-independent mechanism to maintain the order and protect vital structures (DNA), as in nature inspired inorganic material. The study of the DNA structure in the *E. coli* nucleoid was carried out using synchrotron X-ray diffraction and transmission electron microscopy (TEM). The experimental results made it possible to visualize the structures of the primary organizational level in the hierarchical process by which DNA is packaged in the nucleoid of dormant cells. A series of diffraction experiments performed for the first time provide evidence of the presence of a periodic ordered organization of DNA in all studied bacteria. TEM was used for providing detailed information about the type of DNA condensation in the *E. coli* nucleoid. Intracellular nanocrystalline, liquid-crystalline and folded nucleosome-like structures of DNA were visualized. The folded nucleosome-like structure was observed for the first time and is the result of multiple folding of long DNA molecules around the Dps protein and its associates.

*Keywords: DNA, Escherichia coli, stress starvation, intracellular nanocrystalline, liquid crystalline, folded nucleosome-like structures*