## \_\_\_\_\_ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ \_\_\_\_ СТАТЬИ

# ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ПОКОЯЩИХСЯ ЦИСТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI*<sup>1</sup>

© 2023 г. Ю. А. Николаев<sup>а, \*</sup>, Н. Г. Лойко<sup>а</sup>, О. А. Галуза<sup>а</sup>, А. В. Марданов<sup>b</sup>, А. В. Белецкий<sup>b</sup>, Д. Г. Дерябин<sup>c</sup>, Е. В. Демкина<sup>a</sup>, Г. И. Эль-Регистан<sup>a</sup>

<sup>а</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН, Москва, 119071 Россия <sup>b</sup> Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН, Москва, 119071 Россия <sup>c</sup> ФНЦ биологических систем и агротехнологий РАН, Оренбург, 460000 Россия \*e-mail: nikolaevva@mail.ru

Поступила в редакцию 09.07.2023 г. После доработки 19.07.2023 г. Принята к публикации 20.07.2023 г.

Впервые исследован транскриптом покоящихся клеток *Esherichia coli* (цистоподобных покоящихся клеток). Содержание PHK в одной покоящейся клетке составляет  $0.26\ \text{фг/кл.}$ , что в  $13.5\ \text{ раз меньше}$ , чем в одной клетке растущей культуры. Наличие мРНК в покоящихся клетках *E. coli* показано впервые. Охарактеризованы пулы прочтений генов покоящихся и растущих клеток, а также дифференциальные экспрессии всех генов, рассчитанной по специальному алгоритму, учитывающему среднее количество мРНК в одной клетке. Впервые рассмотрено понятие "гены, активные в каждой клетке популяции". Выявлено, что не каждый ген, представленный в пуле транскриптов всей популяции, представлен транскриптами в каждой клетке популяции. В каждой клетке популяций покоящихся и растущих клеток *E. coli* представлены транскриптами  $21\ \text{и }16\%$  генов соответственно. Выявленная разнокачественность клеток по совокупности активных генов является одной из причин (и форм) гетерогенности популяций бактерий. Выявлено  $60\ \text{генов}$ , активность которых возрастает в  $2\ \text{и }60$ лее раз при формировании покоящихся клеток *E. coli*. Это гены, ответственные за активность генома, строение и свойства оболочек клеток, пролиферацию клеток, стрессоадаптацию, образование и функционирование биопленок и коллективное поведение, а также обеспечивающие выживание популяции при прорастании покоящихся клеток.

Ключевые слова: цистоподобные покоящиеся клетки, Escherichia coli K12, транскриптом

**DOI:** 10.31857/S0026365623600372, **EDN:** CLVHBQ

Образование покоящихся форм (ПФ) (англ. — dormant cells) — важнейшая стадия жизни бактериальных популяций, позволяющая им переживать неблагоприятные условия существования, сохранять вид и расширять ареал его обитания (Бухарин и соавт., 2005; Jones, Lennon, 2010).

Наиболее известными и хорошо изученными являются ПФ у типа *Bacillota* (ранее — *Firmicutes*; Oren, Garrity, 2021) — эндоспоры, образующиеся в результате скоординированной деятельности предварительно удвоенного генома, первый из которых окружается многочисленными защитными покровами, а второй находится в спорангии и обеспечивает протекание этих процессов и в дальнейшем лизируется (Sussman, Douthit, 1973).

В настоящее время морфология, цитология, биохимия и генетика образования и прорастания эндоспор всесторонне исследованы (Setlow, 2014).

Представители типа Pseudomonadota (ранее – Proteobacteria; Oren, Garrity, 2021) при истощении ресурсов для роста или воздействии стрессовых факторов экстремальной интенсивности также образуют ПФ, которые характеризуются сниженным уровнем метаболизма или его отсутствием, специфической внутриклеточной организацией, а также повышенной устойчивостью к различным повреждающим факторам (Бухарин и соавт., 2005: Мулюкин и соавт., 2008, 2009, 2015). В покоящееся состояние переходит только малая часть бактериальной популяции, как правило, не более 1% от общей численности. Образование ПФ происходит на основе глубоких функциональных и морфологических изменений обычных вегетативных клеток.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365623600372 для авторизованных пользователей.

К формам покоя, по крайней мере пролиферативного, также можно отнести "жизнеспособное, но не культивируемое состояние" (англ. — viable but non culturable; VBNC), развивающееся при воздействии различных стрессовых факторов и характеризующееся сохранением остаточной метаболической активности с одновременной утратой способности к культивированию на плотных питательных средах с использованием стандартных бактериологических техник (Pinto et al., 2015; Zhang et al., 2021).

Другим вариантом ПФ некоторыми авторами рассматриваются клетки-персистеры (англ. — persisters), традиционный подход к получению (выявлению) которых заключается в воздействии на бактериальную популяцию высоких доз антибиотиков (Shah et al., 2006). При этом для VBNC и персистеров показано наличие ряда сходств морфологической и структурной организации, включающих димеризацию рибосом (Kim et al., 2018).

Наиболее глубокой формой бактериального покоя (за исключением спор) являются цистоподобные ПФ, названные так по аналогии с цистами, образуемыми бактериями рода *Azotobacter*, важными элементами формирования которых являются жестко-кристаллическая мембрана, стабилизированные ДНК и ферменты, выход ионов К<sup>+</sup> и витрифицированная (стеклообразная) цитоплазма (Бухарин и соавт., 2005; Parry, 2014). Именно цистоподобным ПФ принадлежит ключевая роль в сохранении бактериальных популяций во множестве сред обитания, условия существования в которых сопряжены с периодическим развитием трофического и иных видов стресса.

Важным инструментом исследования процессов функционирования микробных клеток, в том числе в состоянии покоя, в настоящее время стал транскриптомный анализ, основанный на исследовании профилей присутствующих в них матричных (кодирующих) РНК (мРНК).

Так, транскриптомный анализ VBNC продемонстрировал повышенный уровень образования стрессового регулятора RpoS (Boaretti et al., 2003), фермента каталазы (Kong et al., 2004) и лактатдегидрогеназы (Wagley et al., 2021), что в совокупности обеспечивает возможность их существования в неоптимальных условиях среды обитания.

Особенностью транскриптома клеток-персистеров явилось существенное повышение уровней экспрессии систем "токсин—антитоксин", а также генов деградации ароматических соединений при одновременной выраженной репрессии других метаболических путей (Alkasir et al., 2018).

На этом фоне сведения о транскриптоме цистоподобрых ПФ до сих пор отсутствуют. Ожидаемым ограничением для подобного анализа являются представления о низком времени полужизни мРНК (Selinger et al., 2003), что должно обусловить их отсутствие при формировании глубоких форм бактериального покоя. С другой стороны, факт ингибирования гидролаз в цистоподобных бактериальных клетках (Бухарин и соавт., 2005) позволяет предполагать сохранение мРНК, образовавшихся на финальных этапах их перехода в покоящееся состояние.

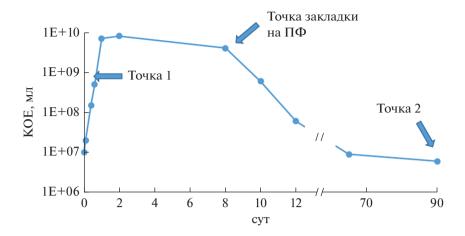
Целью работы явился анализ присутствия и профиля мРНК в покоящихся клетках *Esherichia coli*, метод получения и морфология которых соответствует представлениям о цистоподобных покоящихся формах.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования являлся штамм *Escherichia coli* K12 MG1655 (F-lambda-ilvG-rfb-50 rph-1), полученный из коллекции ФГБНУ "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе" РАН. Данные о полном геноме данного штамма представлены в работе Hayashi et al. (2006); сведения о вариантах его транскриптомов доступны в работе Sastry et al. (2019).

Культивирование. Бактерии выращивали на разбавленной в 3 раза среде Луриа-Бертани (LB Broth, Miller) состава ( $\Gamma/\pi$ ): дрожжевой автолизат — 3.3; пептон — 1.7; NaCl — 1.7; pH среды 7.0. Инокулят — E. coli K12 MG1655 стационарной фазы роста (20 ч), вносили в количестве, обеспечивающем стартовую численность  $8.0 \times 10^7$  клеток (KOE)/мл. Культуру выращивали в колбах объемом 500 мл с 300 мл среды LB/3 при температуре 28°C на качалке (100 об./мин). После 4.5 ч культивирования, что соответствовало середине фазы экспоненциального роста, часть культуры отбирали, клетки отделяли центрифугированием (15000 g, 10 мин). Данная культура соответствует точке 1 для транскриптомного анализа (рис. 1). Оставшуюся часть продолжали культивировать при тех же условиях в течение 24 ч, после чего оставляли в статических условиях на 9 сут при той же температуре. Выросшую биомассу сгущали в 20 раз центрифугированием (5000 g, 15 мин) и хранили при комнатной температуре в течение 45 сут. После указанного времени образовавшиеся ПФ три раза промывали стерильным физиологическим раствором (0.9% NaCl; pH 7-7.2), осадок собирали центрифугированием (10 000 g, 15 мин). Данная культура соответствовала точке 2 для транскриптомного анализа. Количество полученных ПФ составляло 0.5-0.8% от количества жизнеспособных клеток, определяемых как колониеобразующие единицы (КОЕ) культуры, оставленной на "созревание".

Всего было получено по три идентичных образца-повторности для каждой из экспериментальных точек. Образцы хранили в жидком азоте



**Рис. 1.** Схема расположения точек отбора материала для транскриптомного анализа (1 и 2), а также обработки клеток для получения покоящихся форм.

в течение нескольких часов и затем использовали для экстракции мРНК.

**Титр жизнеспособных клеток (КОЕ)** определяли высевом аликвот десятичных разведений на плотную среду LB.

Образование цистоподобных  $\Pi\Phi$  контролировали методом фазово-контрастной микроскопии ("Reichert", Австрия) по наличию характерных рефрактерных клеток (Мулюкин и соавт., 2008, 2009).

Наличие цистоподобных ПФ подтверждали по результатам трансмиссионной электронной микроскопии. Образцы помещали в 2.5% раствор глутарового альдегида в какодилатном буфере (0.05 М раствор какодилата натрия; рН 7.0-7.5) и выдерживали в течение 24 ч при 4°C; затем трижды промывали тем же буферным раствором в течение 5 мин и фиксировали в растворе  $OsO_4$  (1%  $OsO_4$ )-0.7% раствор рутениевого красного в какодилатном буфере) в течение 1.5 ч при 4°С. После фиксации образцы заключали в 2% агар-агар и последовательно выдерживали в 3% растворе уранилацетата в 30% этиловом спирте в течение 4 ч, далее в 70% этаноле в течение 12 ч при 4°C. Материал обезвоживали в 96% этиловом спирте (2 раза по 15 мин), затем в абсолютном ацетоне (3 раза по 10 мин). Образцы пропитывали смолой ЭПОН-812 (Ероху Embedding Medium Эпон® 812, "Sigma-Aldrich", США) выдерживали в смеси смола-ацетон в соотношении 1:1 в течение 1 ч, затем в смеси смолаацетон в соотношении 2:1 в течение 1 ч. Полученный материал заливали в капсулы со смолой и проводили полимеризацию при температуре 37°C в течение 24 ч, затем при 60°C в течение 24 ч. Ультратонкие срезы получали на микротоме LKB-III ("LKB", Швеция) и контрастировали в водном растворе 3% уранилацетата (30 мин), затем в водном растворе 4% цитрата свинца (30 мин). Полученные препараты анализировали с помощью

электронного микроскопа JEM 100СХП ("JEOL", Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и рабочем увеличении 5000—50000. Фотодокументирование материалов проводили с помощью цифровой системы вывода оптических изображений Morada G2.

О наличии покоящихся форм судили по присутствию в образцах клеток, имеющих характерные признаки: утолщенную клеточную стенку, электронно-плотную цитоплазму (Мулюкин и соавт., 2008, 2009; Соляникова и соавт., 2017; Лойко и соавт., 2017).

Выделение РНК из подготовленных клеточных суспензий осуществляли с помощью набора ExtractRNA ("Евроген", кат. № ВС032) по протоколу, рекомендованному производителем. Удаление рибосомальной РНК осуществляли с использованием набора RiboZero Bacteria Kit ("Illumina"). Качество полученной мРНК проверяли при проведении электрофореза, а ее количество измеряли при помощи Qubit.

Удаление последовательностей рибосомальной РНК осуществляли при помощи набора RiboZero Bacteria Kit ("Illumina"), подготовку полученных образцов РНК к секвенированию проводили с помощью набора TruSeq Stranded Total RNA LibraryPrep Kit ("Illumina") в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Последовательность адаптеров, использованных при подготовке библиотек (read 1): AGATCG-GAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACNNNNNATCTCGTATGCCGT-CTTCT, где NNNNN — последовательность индекса.

Подготовку библиотек кДНК проводили по технологии RNA-seq (с рассеянной затравки) для секвенаторов, совместимых с TruSeq ("Illumina"). Подготовку образцов проводили с помощью набора TruSeq Stranded Total RNA LibraryPrep Kit

("Illumina") в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем.

Секвенирование библиотек кДНК проводили на 1 дорожке Illumina HiSeq 2500 (101 цикл с одной стороны фрагментов) с использованием реактивов TruSeq SBS sequencing kit version 4 ("Illumina", Сан-Диего, Калифорния, США).

Обработку библиотек прочтений, расчет уровней экспрессии и дифференциальной экспрессии индивидуальных генов проводили в программе RSEM v1.1.17. после наложения чтений с помощью программы Bowtie2 и сопоставляли с эталонной последовательностью *E. coli* K-12 MG1655 (NCBI Reference Sequence: NC 000913.3). Уровни экспрессии для каждого гена рассчитывали на основе количества прочтений путем усреднения трех повторностей. Функции транскриптов были определены путем сравнения с последовательностями известных генов  $E.\ coli$ , представленных в базе данных The Clusters of Orthologous Groups (COGs) of proteins (Tatusov et al., 2000). Tpahскрипционные профили визуализировали с помощью браузера генома Artemis.

Для аннотированных генов был проведен расчет дифференциальной экспрессии в точке 2 ( $\Pi\Phi$ ) относительно точки 1 (растущие клетки) по формуле 1, выведенной с использованием следующего алгоритма.

Мы полагаем, что именно и только величина экспрессии гена в пересчете на одну клетку имеет биологический смысл при изменении условий культивирования (жизни организмов), приводящим к изменению количества нуклеиновых кислот или эффективности их извлечения. Эта удельная величина экспрессии также позволяет делать выводы о гетерогенности клеток в популяции по признаку транскрипционной активности различных генов и их групп.

Традиционно в работах по анализу транскриптомов используют величины экспрессии генов непосредственно в библиотеках, полученных после секвенаторов. Это является корректным подходом, если для экстракции РНК берутся однотипные по физиологическому состоянию клетки, с одинаковым удельным количеством РНК, подвергнутые тем или иным одинаковым воздействиям в ходе экстракции, мультипликации, секвенирования, а также при условии, когда для первого этапа экстракции РНК берут одинаковое количество одинаковых клеток.

В условиях нашего опыта мы имели другую ситуацию, когда надо было сравнить активность генов не только в разных условиях, но и для разных состояний одного и того же биологического объекта — культуры кишечной палочки, содержащей разное количество РНК на одну клетку. Нам пришлось разработать собственный алгоритм расчета уровня дифференциальной экспрессии генов.

Поскольку невозможно точно рассчитать количество транскриптов в одной клетке на основе полученного количества прочтений генов, мы разработали алгоритм расчета относительной удельной транскрипции для исследуемых групп клеток. Эта величина позволяет сравнивать изменение активности генов в различных группах клеток в условиях данного конкретного опыта. Логика алгоритма следующая.

Очевидно, что величина прочтений определенного гена в библиотеке прочтений прямо пропорциональна экспрессии гена в клетке (количеству копий гена (мРНК) в одной клетке). В секвенатор наносится стандартное и, главное, одинаковое количество (масса) РНК. Постулировали, что все экспериментальные процедуры были одинаковыми для исследуемых образцов: эффективность экстракции РНК из клеток, доля мРНК в общем пуле РНК, эффективность работы обратной транскриптазы и др., что обусловливает прямую пропорциональность количества прочтений (экспрессию) конкретного гена количеству транскриптов этого гена в пуле мРНК, вносимого в секвенатор.

Приводим алгоритм расчета.

Дано:

- 1) Для гена X в группах клеток A и Б число копий гена в каждой клетке было  $N_{x-a}$  и  $N_{x-6}$  соответственно.
- 2) Число прочтений после секвенатора было  $N'_{x-a}$  и  $N'_{x-6}$ .
- 3) Число клеток для экстракции РНК было  $C_{\rm кл-a}$  и  $C_{\rm kл-6}.$
- 4) Масса экстрагированной РНК была  $M_{\rm A}$  и  $M_{\rm B}$ .
  - 5) Содержание РНК в одной клетке  $M'_{A}$  и  $M'_{B}$ .
- 6) Число прочтений прямо пропорционально числу копий в клетке с неизвестным коэффициентом k. Т.е.  $N_{x-a} = k \times N'_{x-a}$ .
- 7) Количество транскриптов N в одной клетке для любого гена прямо пропорционально суммарной массе мРНК в этой клетке (при прочих равных условиях).

Постулируем: В секвенатор на анализ отбирается одинаковое количество РНК, что надо учитывать при расчете количества копий мРНК на одну клетку (реальной экспрессии, активности гена) путем домножения числа копий гена (прочтений гена) на определенную величину.

Требуется: Рассчитать изменение активности гена X в клетках группы A по сравнению с клетками группы Б на основе чисел прочтения после секвенатора.

Решение: изменение активности гена, "изменение уровня экспрессии", X определяется как частное от деления  $N_{x-a}$  на  $N_{x-6}$ . Т.е.  $X = N_{x-a}/N_{x-6}$ .

При расчете на 1 клетку в состоянии А:

 $N_{x-a}=$  Число прочтений  $\times$  k  $\times$  массу РНК/число клеток, т.е. =  $(N'_{x-a}) \times k \times (M_{\rm A})/(C_{\rm кл-a})$ ,

Аналогично для состояния Б:  $N_{x-6} = (N'_{x-6}) \times k \times (M_{\rm E})/(C_{\kappa_{\rm I}-6})$ .

Подставим эти значения в формулу  $X = N_{x-a}/N_{x-6}$  и после сокращения коэффициента k получим:

$$\begin{split} X &= N_{x-a} \big/ N_{x-6} = \\ &= (N_{x-a}')(M_{\rm A}) \Big/ \Big( (C_{\rm KJI-a}) \Big/ (N_{x-6}')(M_{\rm B}) \Big/ (C_{\rm KJI-6}) \Big). \end{split}$$

При этом заметим, что частное от деления массы выделенной РНК М на общее количество клеток C, из которого получена эта РНК, дает

удельное содержание РНК в одной клетке  $M_{\rm A}' = (M_{\rm A})/(C_{{\rm K}{\rm I}-{\rm a}}).$ 

Тогда имеем:

$$X = N_{x-a}/N_{x-6} = (N'_{x-a})/(N'_{x-6})(M'_A)/M'_B$$

т.е. изменение экспрессии гена (равное частному числа транскриптов гена X в единичных клетках групп A и Б) равно частному их прочтений, умноженному на отношение удельного содержания РНК в клетках этих групп.

Зная отношение удельного содержания РНК в группах А и Б, например H/Z, домножаем все числа прочтений всех генов группы А на H, а группы Б на Z, получаем массив скорректирован-

ных чисел прочтения  $(N'_{x-a})(H)$  для массива A и

 $(N'_{x-6})(Z)$  для массива Б. Тогда для расчетов величин изменения экспрессии в группах А и Б, достаточно будет получить отношения скорректированных чисел чтения относительно варианта с наименьшим удельным содержанием РНК на одну клетку.

В случае условий нашего опыта для покоящихся клеток и растущих клеток, удельное содержание РНК в одной клетке составляет 0.26 и 3.5 фг соответственно. Их отношение составляет 1 : 13. Соответственно, количество чтений для каждого гена в библиотеке, полученной после секвенирования, домножали на 1 для покоящихся клеток и на 13 для экспоненциальных клеток, и именно эти величины брали в анализ изменения активностей генов.

Наш алгоритм схож с использованным в работе Milo, Phillips (2015), представлял величину экспрессии гена в пересчете на одну клетку.

В итоге — изменение уровня транскрипции гена "X" в клетках группы 2 по сравнению с клетками группы 1 определяется по формуле:

$$X = (N_{x-2})/(N_{x-1} \times 13), \tag{1}$$

где  $N_{x-2}$  — число прочтений гена X в группе клеток 2 (ПФ);  $N_{x-1}$  — число прочтений гена X в группе клеток 1 (растущие клетки); 13 — отношение количества РНК в растущих клетках к количеству РНК в ПФ.

Результаты секвенирования депонированы в базе данных Bioproject, accession ID: 977551.

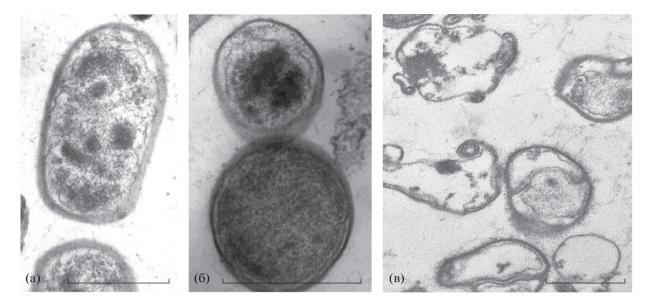
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика покоящихся форм *E. coli* K12 MG1655. После 45 сут культивирования и последующего "созревания" образование покоящихся форм было оценено методами фазово-контрастной и трансмиссионной электронной микроскопии.

Использование фазово-контрастной микроскопии показало наличие в промытом центрифугированном осадке "рефрактерных" клеток, характеризующихся повышенным коэффициентом оптического преломления. В свою очередь, на электронномикроскопических фотографиях (рис. 2) подобные объекты визуализировались как один из двух морфотипов: (а) вытянутые клетки с более светлой гранулированной комковатой цитоплазмой, более темным фрагментированным нуклеоидом и фибриллярной капсулой; (б) округлые клетки с электронно-плотной цитоплазмой и утолщенной клеточной стенкой с поверхностным фибриллярным слоем. Их морфология соответствовала описанным нами ранее  $\Pi\Phi$ , образующимся на позднем этапе развития периодических бактериальных культур (Соляникова и соавт., 2013; Мулюкин и соавт., 2015; Лойко и соавт., 2017).

Количество полученных ПФ *E. coli* K12 MG1655 составляло 0.5—0.8% от КОЕ культуры, оставленной на созревание. Остальные >99% визуализированных объектов были представлены "тенями" — пустыми клеточными оболочками (тип "в" на рис. 2), представляющими собой отмершие и частично разрушенные бактериальные клетки.

Количественный анализ содержания мРНК в растущих и покоящихся клетках E. coli K12 MG1655. Для экстракции мРНК было использовано  $\approx$ 9 млрд экспоненциально растущих клеток (точка 1) и  $\approx$ 1.8 млрд покоящихся клеток (точка 2). В экспоненциально растущих клетках количество тотальной мРНК характеризовалось значением  $3.5 \pm 0.7 \times 10^{-15}$  г/кл., в то время как в покоящихся клетках ее содержание снижалось более чем на порядок (в 13.5 раз) до уровня  $2.6 \pm 0.5 \times 10^{-16}$  г/кл. При этом



**Рис. 2.** Электронные фотографии  $\Pi\Phi$  *E. coli* K12 MG1655, использованных для выделения мРНК. Обозначения: а, б — морфотипы  $\Pi\Phi$ , описанные в тексте; в — остатки отмерших бактериальных клеток. Масштабная линейка — 1 мкм.

как в точке 1, так и в точке 2 выделенная мРНК имела сходные качественные характеристики без признаков деградации, что свидетельствовало о сохранении функциональности данной группы биополимеров и обеспечивало корректность последующего транскриптомного анализа.

Макрохарактеристика транскриптомов *E. coli* K12 MG1655. На основании библиотеки прочтений с применением специального алгоритма (табл. S1) было рассчитано количество транскриптов, приходящееся на одну клетку. В геноме экспоненциально растущих клеток показана транскрипция 4073 из 4101 имеющихся генов, для 28 генов не обнаружено ни одного транскрипта. Среднее число прочтений одного гена составило 54396; разброс по количеству прочтений для разных генов составлял 7 порядков; наиболее представленными были гены с числом чтений 1001—10000 (рис. 3).

Парадоксально, но в покоящихся клетках транскрипционая активность была показана также для большинства генов (для 4098 из 4101); "молчащими" оставались только 3 гена. В то же время для ПФ характерно общее подавление транскрипционной активности: среднее число прочтений одного гена снижалось более чем в 20 раз (до 2164), а наиболее представленными становились гены с числом чтений 101—1000 (рис. 3).

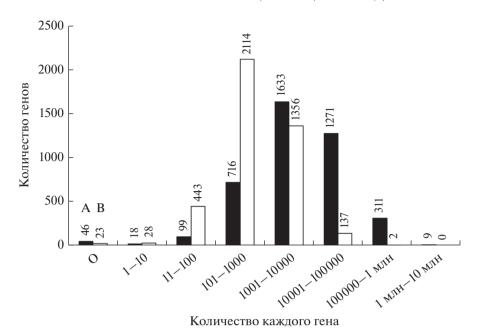
Оценка количества транскриптов, присутствующих во всех клетках культуры *E. coli* K12 MG1655. С учетом полученных данных о широком варьировании количества транскриптов, которыми представлены разные гены, представляло интерес оценить, транскрипты каких генов присутствуют в каждой клетке популяции, а каких — только в некоторой

части клеток популяции. Это было сделано, пользуясь следующим алгоритмом.

Известно, что в 1 клетке E. coli в среднем присутствует несколько тысяч молекул иРНК (транскриптов) (Milo, Phillips, 2015). Тогда при числе генов  $E.\ coli \sim 4000$  это возможно при двух сценариях: если каждый ген представлен только одной-несколькими копиями, или что гены крайне неравномерно представлены транскриптами. Разброс количества прочтений генов, пропорциональных количеству транскриптов в клетке, на 7 порядков (рис. 3) свидетельствует о второй ситуации. Считается, что у *E. coli* в каждый момент активны порядка 25% генов (Richmond et al., 1999). Среднее количество единиц каждой индивидуальной мРНК в клетке не превышает нескольких копий у бактерий (Milo, Phillips, 2015) и нескольких десятков у млекопитающих (Schwanhäusser et al., 2011).

Примем, что если для какого-либо гена число прочтений, полученных в данных условиях, равно или превышает среднее количество прочтений на один ген для всей популяции генов в данной группе, то такой ген будем считать представленным в каждой клетке. Гены, представленные меньшим числом экспрессии, будем считать активными лишь в некоторой части популяции. Такая условно пороговая величина для растущих клеток и ПФ составляет 54396 и 2164 прочтений мРНК соответственно.

Подсчет числа генов, представленных разным количеством прочтений, выраженных в %, дает долю генов, активных в каждой клетке популяции (табл. 1). Для растущих клеток и ПФ эти величины составляют, соответственно, 16 и 21%. Полу-



**Рис. 3.** Сравнение транскриптомов растущих (A) и покоящихся (B) клеток *E. coli* K12 MG1655 по численности прочтений отдельных генов. Гены объединены в группы, различающиеся по численности прочтений на 1 порядок.

ченные величины близки литературным данным о доле активной части генома в клетках бактерий (25%) (Richmond et al., 1999), что доказывает адекватность нашего расчета. Аналогичный нашему расчет по количеству мРНК на одну клетку приведен в работе (Milo, Phillips, 2015).

Гены, активные в каждой метаболически активной клетке, можно считать необходимыми для развития бактерий в данных условиях.

Наличие значительного количества генов, активных не в каждой клетке популяции, указывает на то, что полученный транскриптом относится не к одной клетке, а ко всей популяции бактерий, в которой клетки весьма гетерогенны по набору чтений различных генов. Такая ситуация обусловливает и отражает высокую внутрипопуляционную гетерогенность клеток бактерий.

Сравнительный анализ транскриптомов растущих и покоящихся клеток *E. coli* K12 MG1655 по функциональным группам генов. По результатам

аннотирования на основе базы данных COGs (The Clusters of Orthologous Groups) транскрипты были разделены на 5 блоков (метаболизм низкомолекулярных соединений, метаболизм полимеров, энергетика клетки, функционирование клетки как единого целого, неопределенное назначение), включающих 19 функциональных групп (табл. 2).

Проведенный сравнительный анализ свидетельствовал в пользу качественных различий транскриптомного профиля растущих и покоящихся клеток *E. coli* K12 MG1655, что соответствовало исходным представлениям о дифференцированном уровне активности генов у морфологически и физиологически различающихся растущих и покоящихся клеток. Гены, активные в каждой клетке, с максимальной относительной активностью в ПФ в 2 раза более высокой, чем в растущих клетках, принадлежат к группам: оборота ДНК, подвижности клеток, механизмам защиты, генов с неопределенными функциями.

**Таблица 1.** Статистические количественные характеристики транскриптомов растущих клеток и покоящихся форм *E. coli* K12 MG1655

Тип клеток	Общее число генов	Число неактивных генов	Максимальное число чтений гена*	Среднее число чтений	Количество генов, активных во всех клетках популяции	
					число	%
Растущие клетки	4101	28	7.2 млн.	54396	650	16%
ПФ	4101	3	425 тыс.	2164	798	21%

<sup>\*</sup> Гены с максимальным числом прочтений представлены в табл. 3.

**Таблица 2.** Функциональные группы генов и их представленность прочтениями в каждой клетке в различных популяциях  $E.\ coli-$  растущих клеток и  $\Pi\Phi$ 

Тип клеток	Растущие	ПФ				
Блок I — метаболизм низкомолекулярных соединений						
Аминокислоты (транспорт и метаболизм)	122	162				
Липиды (транспорт и метаболизм)	50	34				
Углеводы (транспорт и метаболизм)	142	112				
Коферменты (транспорт и метаболизм)	30	44				
Неорганические ионы (транспорт и метаболизм)	72	72				
Нуклеотиды (транспорт и метаболизм)	48	34				
Вторичные метаболиты (синтез, транспорт и метаболизм)	12	14				
Блок II — метаболизм полимеров						
Белки — оборот, шапероны, пост-трансляционная модификация	74	84				
ДНК – репликация, рекомбинация, репарация	28	76				
Транскрипция	80	122				
РНК – процессинг и модификация	1	1				
Трансляция, структура и сборка рибосом	188	182				
Блок III — энергетический метаболизм						
Энергия – продукция и конверсия	162	122				
Блок IV — уровень целой кле	гки	•				
Деление клеток, контроль клеточного цикла, деление хромосомы	14	22				
Подвижность клеток	16	42				
Механизмы защиты	2	4				
Механизмы передачи сигнала	70	112				
Внутри- и внеклеточный транспорт белков	26	44				
Блок V — функции не определены						
Общие функции только предсказаны	77	102				
Неопределенная функция	46	104				

Примечание. Жирным шрифтом выделены группы генов с различиями в величине экспрессии генов между фазами развития клеток в 2 и более раз.

В целом можно заключить, что групповой анализ генов оказался малоэффективным (видимо, по причине присутствия в каждом из функциональных блоков генов с чрезвычайно низким уровнем активности) и поэтому должен быть дополнен тотальным анализом изменения активности отдельных генов независимо от их представленности.

Поэтому поиск генов, важных для образования  $\Pi\Phi$ , был далее продолжен путем использования двух нижеописанных подходов.

Идентификация генов, важных для формирования цистоподобных  $\Pi\Phi$ , проведена с использованием двух подходов: (а) путем определения генов, представленных в  $\Pi\Phi$  максимальным количеством прочтений; (б) путем сравнения активности генов, активность которых возрастает в 2 и более раз независимо от уровня их экспрессии.

С использованием первого подхода были выявлены 6 генов, максимально транскрибируемых в  $\Pi\Phi$  (табл. 3): *pspA* (регуляторный белок оперона

фагового шока; 153274 прочтений), жизненно важный для поддержания протонной движущей силы через мембраны в стрессовых условиях (Flores-Kim, Darwin, 2016); *rmf* (фактор модуляции рибосом; 149375 прочтений), делающий рРНК более устойчивой к деградации и вовлеченный в процесс димеризации 70S рибосом с формированием т.н. "100S рибосом" (Yoshida et al., 2021); cspE (антитерминатор транскрипции, относящийся к семейству белков холодового шока; 133624 прочтений), в том числе, что важно в контексте настоящего исследования, выступающий в качестве регулятора стабильности РНК; а также ген rbsD (кодирует пираназу D-рибозы; 130465 прочтений) вовлеченный в процесс углеводного метаболизма. Интересно, что генами с наибольшим количеством прочтений являются raiA (cold shock protein associated with 30S ribosomal subunit; 425157 прочтений) и ompF (outer membrane porin 1a (Ia; b; F), высокая транскрипционная активность которых харак-

Клетки	Количество прочтений мРНК	Ген	Продукт (функция) гена
Активные	2926225	aspA	Аспартат-аммоний-лиаза
	3024222	ompA	Белок наружной мембраны А
	3102452	pflB	Формиатлиаза 1
	3200888	fusA	Фактор элонгации цепи EF-G
	3508555	gapA	Глицероальдегид-3-фосфат дегидрогеназа А
	3508766	tufA	Фактор элонгации EF-Tu 1
	3632342	raiA	Белок холодового шока, ассоциированный с 30S субъединицей рибосом
	6453556	lpp	Синтез липопротеина муреинового слоя
	7216487	ompF	Порин наружной мембраны F
ПФ	130465	rbsD	Пираназа D-рибозы
	133624	cspE	Белок холодового шока, фактор антитерминации транскрипции, участвует в плавлении РНК, связывает ssДНК
	149375	rmf	Фактор модуляции рибосом
	153 274	pspA	Фаговый белок-регулятор
	253939	ompF	Порин наружной мембраны F
	425 157	raiA	Белок холодового шока, ассоциированный с 30S субъединицей рибосом

Таблица 3. Гены, представленные максимальным числом прочтений

терна и для экспоненциально растущих клетках. Последний факт подтверждает более длительную выживаемость мРНК, чем считали ранее (Selinger et al., 2003), не минуты—десятки минут, а десятки суток.

Наиболее понятна важность для формирования ПФ генов *raiA* и *cspE*. Первый из них стабилизирует 70S рибосому, ингибирует процесс элонгации и повышает точность трансляции (Agafonov, Spirin, 2004), а второй обеспечивает правильную укладку молекул РНК и помогает им принимать функционально активные состояния (Rennella et al., 2017).

Очевидно, что такой подход, не учитывающий сравнительных активностей всех генов, не является плодотворным, поскольку он выявляет, вопервых, не все гены, важные для образования ПФ, и, во-вторых, может ошибочно выявлять гены, активность которых более характерна для других фаз развития культур. Кроме того, нет объективного критерия для определения уровня, определяющего гены, с максимальным уровнем транскриптов. Этот подход приводится в работе в качестве сравнения.

Наиболее значимые результаты получены при анализе всей совокупности транскриптов мРНК, когда были рассчитаны отношения экспрессии генов в ПФ относительно их экспрессии в экспоненциально растущих клетках. В табл. 4 представлены гены, экспрессия которых в 2 и более раз выше в ПФ. Всего было обнаружено 60 таких генов.

Все гены можно объединить в функциональные группы (рис. 4) на основе активностей их продуктов или их функций:

функционирование генома (токсин/антитоксиновая система, иммунитет, транспозазы; 6 генов):

свойства оболочек (мембраны, периплазма; 13 генов);

метаболизм (5 генов);

биопленки (адгезия и коллективное поведение; 12 генов);

стрессоадаптация (8 генов);

регуляция пролиферации (клеточное деление, консервация рибосом; 2 гена).

Большая группа генов, активируемых при формировании ПФ, пока не имеет выявленных функций (14 генов). При этом часть функциональных генов принадлежит фаговым геномам (в виде профагов) (выделены в табл. 4 жирным шрифтом с подчеркиванием) (13 генов).

Рассмотрим гены с максимальным уровнем повышения активности. Восемь генов характеризовались транскрипционной активностью, превышающей таковую в растущих клетках в 8-10 раз (в таблице выделены голубой заливкой). Два из них (усеО и упсJ) кодировали белки с неизвестной функцией, функция шести генов позволяла предполагать их роль в переходе бактериальных клеток в покоящееся состояние. Высокий уровень экспрессии гена csgB, дополняемый повышенным в 2 раза уровнем экспрессии гена csgA свиде-

**Таблица 4.** Гены, экспрессия которых возрастает в  $\Pi\Phi$  в 2 и более раз по сравнению с растущими клетками. Гены, активность которых возрастает в 8 и более раз, выделены жирным шрифтом и подписаны в первом столбце.  $\Phi$ аговые гены выделены жирным шрифтом с подчеркиванием в первом столбце

Ген	Продукт гена					
	Стрессоадаптация					
<u>pspB</u>	Активатор транскрипции оперона psp operon					
pspA	Белок-регулятор шоковых белков					
acrS	Репрессор транскрипции оперона acrAB (синтеза токсина AcrAB—TolC)					
<u>ynaE</u>	Белок холодового шока					
<u>ydfK</u>	Белок холодового шока					
<u>ynfN</u>	Белок холодового шока					
<u>cspI</u>	Шоковый белок					
pspG	Шоковый белок G					
Биопленки (адгезия и коллективное поведение)						
ecpR	Предполагаемый регулятор транскрипции оперона еср					
csgB - 10 pas	Белок малой субъединицы белка фимбрий типа курлей					
csgA	Амилоидный белок фимбрий типа курлей					
ycgZ	Белок регуляции биопленок и кислотоустойчивости					
ymgA	Белок регуляции биопленок					
<i>ymgC</i> − 8 pa3	Белок адаптации к низкой температуре и др. стрессам, образования биопленок					
ari R	Белок регуляции биопленок и кислотоустойчивости					
ypdI	Предполагаемый липопротеин, участвующий в синтезе колановой кислоты					
yraI	Предполагаемый периплазматический шаперон пилина					
ydeQ	Предполагаемый адгезин типа фимбрий					
ydeR	Предполагаемый адгезин типа фимбрий					
<i>ydeS</i> – 10 pa3	Предполагаемый адгезин типа фимбрий					
D 10	Оболочки (мембраны, периплазма)					
<i>cpxP</i> – <b>10 pa3</b>	Периплазматический ингибитор оперона срх					
kdpA	Субъединица А АТФ-зависимой транслоказы К <sup>+</sup>					
kdpB	Субъединица В АТФ-зависимой транслоказы К <sup>+</sup>					
kdpC	Субъединица С АТФ-зависимой транслоказы К+					
ybfB	Предполагаемый мембранный белок					
artJ	Периплазматический связывающий белок системы транспорта аргинина АВС					
ycdU	Предполагаемый белок внутренней мембраны					
ompG	Белок внешней мембраны G					
ynbA	Белок внутренней мембраны					
yneM	Белок внутренней мембраны					
ynbB - 8 pa3	Предполагаемая синтаза диглицеридов CDP					
yiaW	Белок внутренней мембраны DUF3302					
yjbT	Предполагаемый периплазматический белок					
	Метаболизм					
rspB	Предполагаемая Zn-зависимая NAD(P)-связывающая оксидоредуктаза					
<u>argF</u>	Орнитин-карбамаил-трансфераза профага СР4-6					
trpE	Компонент I антранилат-синтазы					
argC	N-ацетил-гаммаглутамилфосфатредуктаза, NAD(P)-связывающая					
argI	Орнитин-карбамаил-трансфераза 1					

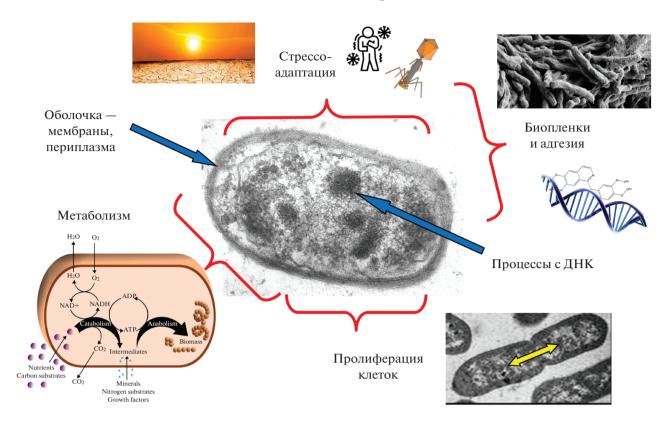
Таблица 4. Окончание

Ген	Продукт гена					
Регуляция пролиферации (клеточное деление, консервация рибосом)						
<u>dicB</u>	Белок-ингибитор клеточного деления профага Qin					
rmf	Фактор модуляции рибосом					
Φ	Функциональность генома-ДНК (системы токсин/антитоксин, иммунитета, транспозазы)					
<i>yhhZ</i> − 10 pa3	Предполагаемый токсин семейства Hcp1 с колициноподобной ДНКазной и тРНКазной активностью					
yhhH	Предполагаемый антитоксин токсина RhsB семейства NTF2, фактор иммунитета					
<i>yjcF</i>	Белок с пентапептидными повторами Үјс Г					
yhhI	Предполагаемая транспозаза					
ydcC	Предполагаемая транспозаза с повторами Н-типа					
ybfD	Предполагаемая транспозаза с повторами Н-типа					
insK	Транспозаза типа В мобильного элемента IS150					
	Гены без специфических выявленных (известных) функций					
	Регуляторы транскрипции (пока без функций)					
ygeH	Предполагаемый регулятор транскрипции					
<u>yagA</u>	Предполагаемый регулятор транскрипции профага СР4-6					
Фаги						
<u>ydaE</u>	Белок профага Rac					
<u>ydfD</u>	Белок профага Qin					
<u>ybcV</u>	Белок профага DLP12					
<u>ydfD</u>	Белок профага Qin					
	С неизвестными функциями					
<i>yceO</i> −10 pa3	Белок с неизвестной функцией					
ybeR	Белок с неизвестной функцией					
yqeJ	Белок с неизвестной функцией					
yqeK	Белок с неизвестной функцией					
<i>yncJ</i> − 10 pa3	Белок с неизвестной функцией					
yncH	Белок с неизвестной функцией					
yjbL	Белок с неизвестной функцией					

тельствовал об интенсивном биосинтезе белков внеклеточного матрикса ("курлей"), формирующих дополнительный адгезивный слой поверх клеточной стенки формирующихся ПФ и предполагающих дальнейшее существование ПФ в прикрепленном состоянии на границах раздела фаз (Hammer et al., 2007). Аналогичное заключение может быть сделано в отношении гена ydeS, вместе с также активно транскрибируемыми генами *ydeQ* и ydeR кодирующего вероятный фимбрия-подобный адгезивный протеин. Ген утдС также связан с формированием биопленок, особенно в стрессовых условиях (Domka et al., 2007; Kannan et al., 2008; White-Ziegler et al., 2008). Ген упbВ отвечает за синтез фосфатидцитидилтрансферазы, фермента, связанного с фосфатидилинозитольной сигнальной системой и обусловливающего встра-

ивание белков во внутреннюю мембрану  $E.\ coli$  (Sato et al., 2019).

На этом фоне роль гена yhhZ (кодирует предполагаемый полиморфный токсиновый белок семейства Hcp1) может определяться его колицино-подобной активностью тРНКазы (как условия для остановки процесса трансляции). Активность токсин-антитоксиновых модулей характерна для образования персистеров (Maisonneuve, Gerdes, 2014; Alkasir et al., 2018), что согласуется с нашим предположением о том, что персистеры являются предшественниками ПФ (Мулюкин и соавт., 2015). Наконец, еще одним свехэкспрессируемым в ПФ геном являлся срхР, кодирующий периплазматический адапторный белок, который ингибирует индукцию стрессовой реакции при неправильной упаковке белков (Thede et al., 2011), а также способствует DegP-опосредованному протеолизу не-



**Рис. 4.** Функциональные группы генов, важных для формирования покоящихся клеток  $E.\ coli.$ 

правильно свернутых белков (Isaac et al., 2005). По сути, это наиболее сильно индуцированный член регулона Cpx, который улавливает различные типы экстрацитоплазматических стрессов и устраняет их, чтобы гарантировать выживание организма и, как показывает настоящее исследование, обеспечить его переход состояние глубокого покоя. Очевидно, что функции этих генов важны при созревании  $\Pi\Phi$ .

Из других генов отметим наиболее важные:

Функция генов kdp — транспорт  $K^+$ . Его роль в формировании ПФ заключается в следующем. В конце стационарной фазы, когда в популяции достаточно энергетических субстратов, и позже в фазу лизиса, когда остается функциональной малая доля клеток-персистеров (будущих покоящихся клеток), этот транспортер нужен для энергозависимой накачки ионов К+ в клетку. Когда энергодающие системы клеток угасают, и формируются собственно ПФ, этот белок осуществляет пассивный транспорт К+ по градиенту концентрации (в дополнение к его выходу по порам, формирующимся в цитоплазаматческой мембране (Эль-Регистан и соавт., 1985; Бухарин и соавт., 2005). Вынос воды с ионами К<sup>+</sup> приводит к обезвоживанию цитоплазмы и ее витрификации, что является важнейшим механизмом покоя у микроорганизмов (Parry et al., 2014).

Чрезвычайно важным видится повышенная активность гена dicB, кодирующего белок-ингибитор деления клеток (Labie et. al., 1990; Masuda et al., 2012).

Репрессирование системы выброса токсинов AcrAB-TolC (ген ингибитора этой системы — acrS) обусловлено тем, что в ее активности в нерастущей клетке нет необходимости.

Активация блока генов, связанных с адгезией и образованием биопленок, обусловливает повышенную выживаемость популяции в состоянии биопленок в ходе созревания  $\Pi\Phi$ .

Очевидной и важной для ПФ видится функция гена *rmf*, продукт которого, фактор модуляции рибосом, во время стационарной фазы преобразует незрелые рибосомы 70S в димерную форму (90S рибосомы), которые преобразуются в неактивные 100S рибосомы (процесс "рибосомальной спячки") (Wada et al., 1995). Димеризация рибосом ведет к подавлению связывания аминоацилтРНК, останавливает синтез белка, одновременно делая рРНК более устойчивой к деградации, что может быть оценено как универсальный механизм перехода в покоящееся состояние. Такой механизм зафиксирован также и в VBNC и клетках-персистерах (Kim et al., 2018).

Активность генов с повышенной в ПФ активностью, регулирующих активность ДНК, может

быть связана не с образованием  $\Pi\Phi$ , а с подготовкой к их пробуждению. Нейтрализация ингибитора клеточного роста продуктом гена  $\mathit{yhh}H$  выглядит более востребованной в фазе пробуждения  $\Pi\Phi$  в благоприятных условиях, а не при их формировании.

Активность четырех транспозаз (yhhI, ydcC, ybfD, insK) также видится более связанной с функционированием клеток, образующихся из проросших ПФ. Известно, что популяции, вырастающие из ПФ, характеризуются расширенным диссоциативным спектром по сравнению с активно растущими культурами (Solyanikova et al., 2011; Соляникова и соавт., 2013, 2017; Ivshina et al., 2015). При этом одним из двух механизмов переключения фенотипов является сайт-специфическая рекомбинация, основанная на наличии в переключаемых генах ISэлементов (van der Woude, Bäumler, 2004). Ферментами, обеспечивающими функционирование таких генов, являются рекомбиназы и транспозазы (относящиеся к одному классу ДНК-узнающих рекомбиназ). Наличие широкого спектра диссоциантов обеспечивает максимальную вероятность выживания популяции бактерий, вырастающих из  $\Pi\Phi$ , в чем и заключается биологический смысл высокой активности транспозаз в ПФ.

Часть генов относится к генам с неизвестной функцией, и эти гены являются резервом для исследования механизмов формирования покояшихся клеток.

Путь превращения растущих клеток в зрелые ПФ состоит из нескольких ключевых стадий: дифференциация растущих клеток на клетки-персистеры, переход в стационарную фазу, автолиз большей части клеток, созревание персистеров в покоящиеся клетки. По литературным данным к генам, важным для формирования персистеров, относятся некоторые системы токсин-антитоксин, сигнальные системы с участием ppGpp и SOS-ответа (Maisonneuve, Gerdes, 2014). Однако, против нашего ожидания, мРНК генов, важных для формирования клеток персистеров, в нашем исследовании не найдено, за исключением некоторых генов токсин-антитоксиновой системы, что также указывает на завершенность повышенной активности таких генов к моменту начала формирования покоящихся клеток и, поэтому, отсутствия транскриптов этих генов в ПФ.

Большая часть генов ожидаемо снижала активность при переходе из активного состояния в покоящееся (приложение S1). Однако пятнадцать генов снижали свою активность в 200 и более раз (табл. 5). Рассмотрим их фунции.

Наиболее выраженная репрессия зафиксирована для расположенных рядом и совместно транскрибируемых генов *treB* и *treC*, вовлеченных в процесс транспорта и метаболизма трегалозы (Klein et al., 1995). Зафиксированное снижение в

 $\Pi\Phi$  уровня экспрессии генов treB и treC в 2—4 тыс. раз относительно экспоненциально растущих клеток свидетельствует о практически полном выключении рассматриваемого транспортного и метаболического процессов.

Существенно ингибируемым в  $\Pi\Phi$  оказался и процесс транспорта железа белком внешней мембраны FecA, функционирующим также как приемник и передатчик сигнала для инициации транскрипции fec-оперона (Sauter et al., 2004). Уровень экспрессии гена fecA снижался в 1460 раз, что ожидаемо кратно подавляло транскрипцию расположенных рядом генов fecE, fecD, fecC и fecB, кодирующих структурные белки ABC-транспортера цитрата железа.

Еще одной группой генов, активность которых существенно угнеталась в  $\Pi\Phi$ , оказались гены, связанные с транспортом и метаболизмом органических кислот и аминосахаров:

ген *nanA*, продукт которого катализирует альдольное расщепление N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты с образованием пирувата и N-ацетилманнозамина;

ген *garD*, ответственный за утилизацию D-галактарата, и ген *garP*, кодирующий предполагаемый переносчик D-галактарата;

ген nagB, отвечающий за деградацию глюкозамина, что также сопровождалась нарушением транспорта названного аминосахара вследствие снижения экспрессии рядом расположенного гена nagE;

ген mglB, отвечающий за транспорт D-галактозы/метилгалактозида;

гены *manX*, *manY* и *manZ*, в совокупности отвечающие за функционирование маннозо-специфической фосфотрансферазной системы.

В транскриптоме ПФ также обнаружено выраженное снижение экспрессии фермента энергетического метаболизма фосфоглицератмутазы, катализирующего взаимопревращение 2- и 3-фосфоглицерата в гликолитическом и глюконеогенном путях (активность гена gpmM подавлена в 247 раз), а также нарушение метаболизма аминокислот как следствие снижения экспрессии периплазматической L-аспарагиназы (продукта гена ansB) — в 200 раз.

Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует о комплексном подавлении процессов транспорта и метаболизма низкомолекулярных соединений в  $\Pi\Phi$  *E. coli* K12 MG1655, в ряде случаев сопряженных с нарушением энергетического метаболизма. Тем самым данный результат хорошо согласуется с устоявшимися представлениями о гипо- и анабиотическом статусе покоящихся форм неспорообразующих бактерий (Kaprelyants et al., 1993; Бухарин и соавт., 2005), позволяющем им длительно сохранять свою жизнеспособность.

**Таблица 5.** Гены, уровень транскрипции которых снижался в покоящихся клетках *E. coli* K12 MG1655 относительно экспоненциально растущих клеток в 200 и более раз

Ген	Продукт гена/функция	Функциональный блок (см. табл. 2)	Кратность понижения уровня экспрессии
ansB	Периплазматическая L-аспарагиназа	I	200
garP	Предполагаемый переносчик D-галактарата	I	204
gpmM	Фосфоглицеромутаза III (кофактор-независимая)	I/III	247
manY	Маннозо-специфический фермент фосфотрансферазной системы (IIC компонент)	I	252
manX	Маннозо-специфический фермент фосфотрансферазной системы (IIA и IIB компоненты)	I	280
yeiQ	Предполагаемая НАД-зависимая D-маннонатоксидоредуктаза	I/III	290
nagE	N-ацетилглюкозамин-специфический фермент фосфотрансферазной системы (IIC, IIB и IIA компоненты)	I	302
tdcE	2-кетобутиратформиат-лиаза (пируватформиат-лиаза)	I/III	311
mglB	D-галактоза/метилгалактозид-связывающий периплазматический белок	I	348
nagB	Глюкозамин-6-фосфатдезаминаза	I/III	364
garD	D-галактаратдегидрогеназа	I/III	552
nanA	N-ацетилнейраминалиаза	I/III	732
fecA	Белок внешней мембраны — переносчик цитрата железа, приемник и передатчик сигнала для инициации транскрипции <i>fec</i> -оперона	I	1459
treC	Трегалозо-6-фосфатгидролаза	I/III	1867
treB	Трегалозо-специфический фермент фосфо-трансферазной системы (IIB и IIC компоненты)	I	4302, 585

Полученные нами данные соотносятся с аналогичными, полученными другими исследователями.

Транскриптомный анализ созревания ПФ микобактерий (Wu et al., 2016) выявил, что снижается активность генов трансляции и транскрипции, гены клеточного деления сначала активируются, а к моменту созревания ПФ снижают активность на несколько порядков, что согласуется с нашими данными. Гены энергетического метаболизма в большинстве активируются до 1000 раз, гены сигнальных систем и факторов транскрипции вели себя разнонаправлено: некоторые сигма-факторы и факторы транскрипции индуцировались, синтез других подавлялся. В нашей работе мРНК факторов транскрипции в ПФ не активировались.

В покоящихся некультивируемых клетках *М. tuberculosis* (Ignatov et al., 2015), как и в нашей работе, было отмечено снижение уровня мРНК на порядок (в 30—50 раз). В них сохранялись мРНК, кодирующие ферменты биосинтеза, белки, участвующие в процессах адаптации и репарации, детоксикации и контроле инициации транскрипции,

а также некодирующие малые РНК. Повышение активности отмечено для генов синтеза НАДН-дегидрогеназы II (ndhA) и системы взаимодействия этого патогена с хозяином PE-PGRS (51 ген из 62 был активирован), большинство генов основного метаболизма активированы не были. Однако покоящиеся некультивируемые клетки M. tuberculosis существенно отличаются от  $\Pi\Phi$  E. coli.

Анализ транскриптома при созревании спор грамотрицательных миксобактерий (Müller et al., 2010) выявил, что при созревании спор миксобактерий подавлялись в наибольшей степени гены энергетического метаболизма, низкомолекулярных интермедиатов, синтеза и оборота белка, клеточных оболочек, регуляторов, а активировались — передачи сигнала, транскрипции, метаболизма ДНК. Данный паттерн активации генов весьма отличен от  $E.\ coli$  и других грамотрицательных бактерий.

В работе (Dong, Bauer, 2015) исследовали транскриптом форм покоя (цист) других грамотрицательных бактерий, родоспирилл. При созревании цист повышалась активность (экспрессия) следующих генов: транспорт неорганических ионов,

движение клеток, оборот белков, метаболизм липидов и углеводов, энергетический. Такая ситуация естественна для начала процесса созревания ПФ.

Для анализа наших ланных представляет особый интерес работа Arunasri et al. (2014), в которой исследовали транскриптом длительной стационарной фазы E. coli, в которой речь идет об условиях, аналогичных нашей работе. Этой группой выявлено, что в поздней стационарной фазе существенно меняется экспрессия 95 генов (22 – активируются, 73 — подавляются). Активировались 9 генов, связанных с метаболизмом ДНК, IS-элементами и транспозицией генов, 2 гена с Н-повторностями, 3 гена метаболизма, а подавлялись — связанные с синтезом белка, транспортом и метаболизмом, что совпадает с нашими результатами. В силу иного акцента указанных исследований, авторы работы Arunasri et al. (2014) не связывали активность генов с созреванием ПФ.

Интересно, что в  $\Pi\Phi$  бацилл, спорах, найдено всего 23 типа транскриптов (Keijser et al., 2007), тогда как в  $\Pi\Phi$  *E. coli* присутствуют транскрипты практически всех генов. Очевидно, что такая ситуация происходит по причине принципиальной разницы спор и цистоподобных  $\Pi\Phi$ .

Таким образом, можно заключить, что:

- (1) впервые проведен транскриптомный анализ форм глубокого покоя, цистоподобных покоящихся клеток  $E.\ coli;$
- (2) впервые показано присутствие в них существенного количества мРНК практически всех генов;
- (3) количество мРНК по сравнению с экспоненциальным ростом в пересчете на одну клетку снижено в 13.5 раз, но она функционально полноценна;
- (4) в ПФ обнаруживаются транскрипты большинства генов; транскрипты распределены по клеткам популяции не равномерно, только небольшая часть генов представлена транскриптами во всех клетках популяции. Поэтому клетки популяции ПФ крайне гетерогенны по представленности транскриптами во всех клетках работают лишь самые нужные гены, а большая часть генов может быть активна лишь в некоторой части клеток популяции, что обусловливает гетерогенность клеток популяции;
- (5) только 21% генов представлены транскриптами в каждой клетке. Эти гены важны для реализации самых важных функций (core-metabolism). Остальные гены, которых большинство, очевидно, кодируют ферменты с функциями, без которых в условиях опыта можно выжить. Эти гены обусловливают гетерогенность популяции. Одна группа клеток имеет ферменты и системы, дающие им преимущество в данных условиях роста, такие клетки составляют доминирующий фенотип. Часть клеток, не имеющая важных белков,

будет проигрывать конкуренцию клеткам доминантного фенотипа и медленнее расти, они составляют минорные фенотипы. В последнем случае клетки могут иметь преимущества при изменении условий роста (в пределах видовых пределов роста и развития);

- (6) причиной наличия мРНК в покоящихся клетках, очевидно, является ингибирование активности гидролаз, включая РНКазы, что характерно для  $\Pi\Phi$ ;
- (7) разработанный алгоритм расчета дифференциальной активности генов на основе учета количества РНК в одной клетке позволил вычленить наиболее активные гены. Использование альтернативных алгоритмов выявляло число генов с повышенной активностью в ПФ относительно растущих клеток на порядок больше, что затрудняет проведение анализа;
- (8) гены, представленные в ПФ транскриптами, представлены тремя онтогенетическими группами а) специфическими для ПФ, важными для формирования ЦПК; б) неспецифическими, оставшимися от предыдущих стадий развития; в) важными для последующих стадий прорастания и активного роста. Функционально эти гены относятся к группам:

обеспечивающим функциональность генома (ДНК) (токсин/антитоксиновая система, иммунитет, транспозазы;

связанным с функционированием оболочек клетки (мембраны, периплазмы);

метаболизма;

образования и функционирования биопленок и связанного с этим коллективного поведения;

стрессоадаптации;

регуляции пролиферации (клеточное деление, консервация рибосом).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена по госзаданию для ФИЦ Биотехнологии РАН.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов исследований, где в качестве объектов использовались животные.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. 367 с.

Дорошенко Е.В., Лойко Н.Г., Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Горнова И.В., Эль-Регистан Г.И. Характеристика диссоциантов *Bacillus cereus* шт. 504 // Микробиология. 2001. Т. 70. С. 811—819.

Doroshenko E.V., Loiko N.G., Il'inskaya O.N., Kolpakov A.I., Gornova I.B., Klimanova E.V., El'-Registan G.I. Characterization of *Bacillus cereus* dissociants // Mucrobiology (Moscow), 2001. V. 70. P. 698–706.

Капрельянц А.С., Скрыпин В.И., Эль-Регистан Г.И., Стоянович Ф.М., Лилле Ю.Э., Островский Д.Н. Изменение структурного состояния мембран М. lysodeikticus под влиянием препаратов ауторегуляторных факторов  $d_1$  // Прикл. биохимия и микробиология. 1985. Т. 21. С. 378—381

Лойко Н.Г., Сузина Н.Е., Соина В.С., Смирнова Т.А., Зубашева М.В., Азизбекян Р.Р., Синицын Д.О., Терешкина К.Б., Николаев Ю.А., Крупянский Ю.Ф., Эль-Регистан Г.И. Биокристаллические структуры в нуклеоидах стационарных и покоящихся клеток прокариот // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 703—719.

Loiko N.G., Suzina N.E., Soina V.S., Smirnova T.A., Zubasheva M.V., Azizbekyan R.R., Sinitsyn D.O., Tereshkina K.B., Nikolaev Yu.A., Krupyanskii Yu.F., El'-Registan G.I. Biocrystalline structures in the nucleoids of the stationary and dormant prokaryotic cells // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 714–728.

Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Сорокин В.В., Сузина Н.Е., Чердынцева Т.А., Котова И.Б., Гапонов А.М., Тутельян А.В., Эль-Регистан Г.И. Формы выживания Pseudomonas aeruginosa при антибиотической обработке // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 645—659.

Mulyukin A.L., Kozlova A.N., Sorokin V.V., Suzina N.E., Cherdyntseva T.A., Kotova I.B., Gaponov A.M., Tutel'yan A.V., El'-Registan G.I. Surviving forms in antibiotic-treated *Pseudomonas aeruginosa* // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 751–764.

Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Структурное и физиологическое разнообразие цистоподобных покоящихся клеток бактерий рода *Pseudomonas* // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 512—523.

Mulyukin A.L., Suzina N.E., Duda V.I., El'-Registan G.I. Structural and physiological diversity among cystlike resting cells of bacteria of the genus *Pseudomonas* // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 455–466.

Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Погорелова А.Ю., Антонюк Л.П., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Разнообразие морфотипов покоящихся клеток и условия их образования у Azospirillum brasilense // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 42—51.

Mulyukin A.L., Suzina N.E., Pogorelova A.Yu., Antonyuk L.P., Duda V.I., El-Registan G.I. Diverse morphological types of dormant cells and conditions for their formation in Azospirillum brasilense // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 33–42.

Погорелова А.Ю., Мулюкин А.Л., Антонюк Л.П., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Фенотипическая вариабельность у Azospirillum brasilense штаммов Sp7 и Sp245: сопряженность с состоянием покоя и свойства диссоциантов // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 618—628.

Pogorelova A.Y., Mulyukin A.L., Galchenko V.F., El'-Registan G.I., Antonyuk L.P. Phenotypic variability in Azospirillum brasilense strains Sp7 and Sp245: association with dor-

mancy and characteristics of the variants // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 559–568.

Мулюкин А.Л., Демкина Е.В., Кряжевских Н.А., Сузина Н.Е., Воробьева Л.И., Дуда В.И., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Покоящиеся формы Micrococcus luteus и Arthrobacter globiformis, не прорастающие на стандартных средах // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 456—468.

Mulyukin A.L., Demkina E.V., Kryazhevskikh N.A., Suzina N.E., Vorob'eva L.I., Duda V.I., Galchenko V.F., El-Registan G.I. Dormant forms of Micrococcus luteus and Arthrobacter globiformis not platable on standard media // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 407–419.

Ратнер В.А. Что содержит геном Escherichia coli? // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2002. № 18. Статья 1.

Соляникова И.П., Сузина Н.Е., Егозарьян Н.С., Поливцева В.Н., Мулюкин А.Л., Егорова Д.О., Эль-Регистан Г.И., Головлева Л.А. Особенности структурно-функциональных перестроек клеток актинобактерий ВN52 при переходе от вегетативного роста в состояние покоя и при прорастании покоящихся форм // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 463—475.

Solyanikova I.P., Suzina N.E., Egozarjan N.S., Polivtseva V.N., Mulyukin A.L., Egorova D.O., El-Registan G.I., Golovleva L.A. Structural and functional rearrangements in the cells of actinobacteria *Microbacterium foliorum* BN52 during transition from vegetative growth to a dormant state and during germination of dormant forms // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 476–487.

Соляникова И.П., Сузина Н.Е., Мулюкин А.Л., Эль-Регистан Г.И., Головлева Л.А. Влияние состояния покоя на штамм *Pseudomonas fluorescens* 26K — деструктор ксенобиотиков // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 552—562.

Solyanikova I.P., Suzina N.E., Mulyukin A.L., El'-Registan G.I., Golovleva L.A. Effect of a dormant state on the xenobiotic-degrading strain *Pseudomonas fluorescens* 26K // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 562–571.

Хабибуллин С.С., Николаев Ю.А., Лойко Н.Г., Голод Н.А., Милько Е.С., Воейкова Т.А., Эль-Регистан Г.И. Ауторегуляция фенотипической диссоциации у Bacillus licheniformis // Журнал микробиол., эпидемиол. иммунобиол. 2006. № 6. С. 9—13.

Цыганкова С.В., Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Хабибулин С.С., Дорошенко Е.В., Коротков Е.В., Эль-Регистан Г.И. Получение внутрипопуляционных диссоциантов некоторых бацилл и применение метода DIR-ПЦР для их идентификации // Микробиология. 2004. Т. 73. С. 398—405.

Tsygankova S.V., Boulygina E.S., Kuznetsov B.B., Khabibulin S.S., Doroshenko E.V., Korotkov E.V., El'-Registan G.I. Obtaining of intrapopulational dissociants of some bacilli and the use of DIR-PCR for their identification // Microbiology (Moscow). 2004. V. 73. P. 334–341.

*Agafonov D.E.*, *Spirin A.S.* The ribosome-associated inhibitor A reduces translation errors // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 320. P. 354–358.

Alkasir R., Ma Y., Liu F., Li J., Lv N., Xue Y., Hu Y., Zhu B. Characterization and transcriptome analysis of *Acineto-bacter baumannii* persister cells // Microbial. Drug Resist. 2018. V. 24. P. 1466–1474.

Almiron M., Link A.J., Furlong D., Kolter R. A novel DNAbinding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli* 2646 // Genes & Development. 1992. V. 6. P. 2646–2654.

*Armstrong R.L., Sueoka N.* Phase transitions in ribonucleic acid synthesis during germination of *Bacillus subtilis* spores // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1968. V. 59. P. 153–160.

*Arunasri K., Adil M., Khan P.A.A., Shivaji S.* Global gene expression analysis of long-term stationary phase effects in *E. coli* K12 MG1655 // PLoS One. 2014. V. 9. Art. e96701. *Bishop H.L., Doi R.H.* Isolation and characterization of ri-

bosomes from *Bacillus subtilis* spores // J. Bacteriol. 1966. V. 91. P. 695–701.

Boaretti M., Lleo M.M., Bonato B., Signoretto C., Canepari P. Involvement of rpoS in the survival of Escherichia coli in the viable but non-culturable state // Environ. Microbiol. 2003. V. 5. P. 986–996.

Boone T., Driks A. Protein synthesis during germination: shedding new light on a classical question // J. Bacteriol. 2016. V. 198. P. 3251–3253.

Chung L.M., Ferguson J.P., Zheng W., Qian F., Bruno V., Montgomery R.R., Zhao H. Differential expression analysis for paired RNA-seq data // BMC Bioinform. 2013. V. 14. P. 110.

Doi R.H., Igarashi R.T. Ribonucleic acids of Bacillus subtilis spores and sporulating cells // J. Bacteriol. 1964. V. 87. P. 323–328.

*Domka J., Lee J., Bansal T., Wood T.K.* Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms // Environ. Microbiol. 2007. V. 9. P. 332–346.

*Dong Q., Bauer C.E.* Transcriptome analysis of cyst formation in *Rhodospirillum centenum* reveals large global changes in expression during cyst development // BMC Genomics. 2015. V. 16. P. 68.

*Dworkin M., Gibson S.M.* A system for studying microbial morphogenesis: rapid formation of microcysts in *Myxococcus xanthus* // Science. 1964. V. 146 P. 243–244.

Flores-Kim J., Darwin A.J. The phage shock protein response // Annu. Rev. Microbiol. 2016. V. 70. P. 83–101.

Hammer N.D., Schmidt J.C., Chapman M.R. The curli nucleator protein, CsgB, contains an amyloidogenic domain that directs CsgA polymerization // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 12494—12499.

Hayashi K., Morooka N., Yamamoto Y., Fujita K., Isono K., Choi S., Ohtsubo E., Baba T., Wanner B.L., Mori H., Horiuchi T. Highly accurate genome sequences of Escherichia coli K-12 strains MG1655 and W3110 // Mol. Syst. Biol. 2006. V. 2. Art. 2006.0007.

Ignatov D.V., Salina E.G., Fursov M.V., Skvortsov T.A., Azhikina T.L., Kaprelyants A.S. Dormant non-culturable Mycobacterium tuberculosis retains stable low-abundant mRNA // BMC Genomics. 2015. V. 16. P. 954.

*Isaac D.D., Pinkner J.S., Hultgren S.J., Silhavy T.J.* The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 17775–17779.

https://doi.org/10.1073/pnas.0508936102

*Ishihama A.* Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival // Genes to Cells. 1999. V. 4. P. 135—143.

Ivshina I.B., Mukhutdinova A.N., Tyumina H.A., Vikhareva H.V., Suzina N.E., El'-Registan G.I., Mulyukin A.L. Drotaverine

hydrochloride degradation using cyst-like dormant cells of *Rhodococcus ruber* // Curr. Microbiol. 2015. V. 70. P. 307—314.

*Jones S.E., Lennon J.T.* Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 5881–5886.

Kannan G., Wilks J.C., Fitzgerald D.M., Jones B.D., Bondurant S.S., Slonczewski J.L. Rapid acid treatment of Escherichia coli: transcriptomic response and recovery // BMC Microbiol. 2008. V. 8. P. 37.

*Kaprelyants A.S., Gottschal J.C., Kell D.B.* Dormancy in non-sporulating bacteria // FEMS Microbiol. Rev. 1993. V. 3–4. P. 271–285.

Keijser B.J.F., Beek A.T., Rauwerda H., Schuren F., Montijn R., van der Spek H., Brul I S. Analysis of temporal gene expression during *Bacillus subtilis* spore germination and outgrowth // J. Bacteriol. 2007. V. 189. P. 3624—3634.

*Kim J.S., Chowdhury N., Yamasaki R., Wood T.K.* Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state // Environ. Microbiol. 2018. V. 20. P. 2038–2048

Klein W., Horlacher R., Boos W. Molecular analysis of treB encoding the Escherichia coli enzyme II specific for trehalose // J. Bacteriol. 1995. V. 177. P. 4043–4052. https://doi.org/10.1128/jb.177.14.4043-4052.1995

*Koch R*. The etiology of anthrax, based on the life history of *Bacillus anthracis* // Beiträge zur Biologie der Pflanzen. 1876. V. 2. P. 277–310.

Kong I.S., Bates T.C., Hulsmann A., Hassan H., Smith B.E., Oliver J.D. Role of catalase and oxyR in the viable but non-culturable state of *Vibrio vulnificus* // FEMS Microbiol. Ecol. 2004. V. 50. P. 133–142.

*Kvam V.M.*, *Liu P.*, *Si Y.* A comparison of statistical methods for detecting differentially expressed genes from RNA-seq data // Am. J. Bot. 2012. V. 99. P. 248–256.

Labie C., Bouché F., Bouché J.P. Minicell-forming mutants of Escherichia coli: suppression of both DicB- and MinD-dependent division inhibition by inactivation of the minC gene product // J. Bacteriol. 1990. V. 172. P. 5852–5855.

*Maisonneuve E., Gerdes K.* Molecular mechanisms underlying bacterial persisters // Cell. 2014. V. 157. P. 539–548.

Masuda H., Tan Q., Awano N., Wu K., Inouye M. YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. 2012. V. 84. P. 979–989.

*Milo R., Phillips R.* Cell biology by the numbers. N.Y.: Garland Science, 2015. 400 p.

https://doi.org/10.1201/9780429258770

Müller F.-D., Treuner-Lange A., Heider J., Huntley S.M., Higgs P.I. Global transcriptome analysis of spore formation in Myxococcus xanthus reveals a locus necessary for cell differentiation // BMC Genomics. 2010. V. 11. P. 264.

*Oren A., Garrity G.M.* Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2021. V. 71.

https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.005056

Oshlack A., Robinson M.D., Young M.D. From RNA-seq reads to differential expression results // Genome Biol. 2010. V. 11. P. 220.

Parry B.R., Surovtsev I.V., Cabeen M.T., O'Hern C.S., Dufresne E.R., Jacobs-Wagner C. The bacterial cytoplasm has

glass-like properties and is fluidized by metabolic activity // Cell. 2014. V. 156. P. 183–194.

*Pinto D., Santos M.A., Chambel L.* Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms // Crit. Rev. Microbiol. 2015. V. 41. P. 61–76.

Raivio T.L., Leblanc S.K.D., Price N.L. The Escherichia coli Cpx envelope stress response regulates genes of diverse function that impact antibiotic resistance and membrane integrity // J. Bacteriol. 2013. V. 195. P. 2755–2767.

Rennella E., Sára T., Juen M., Wunderlich C., Imbert L., Solyom Z., Favier A., Ayala I., Weinhäupl K., Schanda P., Konrat R., Kreutz C., Brutscher B. RNA binding and chaperone activity of the E. coli cold-shock protein CspA // Nucleic Acids Res. 2017. V. 45. P. 4255–4268.

*Reynolds E.S.* The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J. Cell. Biol. 1963. V. 17. P. 208–213.

Richmond C.S., Glasner J.D., Mau R., Jin H., Blattner F.R. Genome-wide expression profiling in Escherichia coli K-12 // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. P. 3821–3835.

Rolfe M.D., Rice C.J., Lucchini S., Pin C., Thompson A., Cameron A.D.S., Alston M., Stringer M.F., Betts R.P., Baranyi J., Peck M.W., Hintona J.C.D. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation // J. Bacteriol. 2012. V. 194. P. 686–701.

Sastry A.V., Gao Y., Szubin R., Hefner Y., Xu S., Kim D., Choudhary K.S., Yang L., King Z.A., Palsson B.O. The Escherichia coli transcriptome mostly consists of independently regulated modules // Nat. Commun. 2019. V. 10. P. 5536. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13483-w

Sato R., Sawasato K., Nishiyama K. YnbB is a CdsA paralogue dedicated to biosynthesis of glycolipid MPIase involved in membrane protein integration // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2019. V. 510. P. 636–642. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.01.145

Sauter A., Braun V. Defined inactive FecA derivatives mutated in functional domains of the outer membrane transport and signaling protein of *Escherichia coli* K-12 // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 5303–5310.

Schwanhäusser B., Busse D., Li N., Dittmar G., Schuchhardt J., Wolf J., Chen W., Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control // Nature. 2011. V. 473. P. 337–342.

Selinger D.W., Saxena R.M., Cheung K.J., Church G.M., Rosenow C. Global RNA half-life analysis in Escherichia coli reveals positional patterns of transcript degradation // Genome Res. 2003. V. 13. P. 216–223.

Setlow P. Germination of spores of Bacillus Species: what we know and do not know // J. Bacteriol. 2014. V. 196. P. 1297–1305.

Setlow P. Protein metabolism during germination of Bacillus megaterium spores. II. Degradation of pre-existing and newly synthesized protein // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. P. 631–637.

Shah D., Zhang Z., Khodursky A.B., Kaldalu N., Kurg K., Lewis K. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli* // BMC Microbiol. 2006. V. 6. P. 53.

Sinai L., Rosenberg A., Smith Y., Segev E., Ben-Yehuda S. The molecular timeline of a reviving bacterial spore // Molecular Cell. 2015. V. 57. P. 695–707.

Solyanikova I.P., Suzina N.E., Golovleva L.A., Mulyukin A.L., El-Registan G.I. Improved xenobiotic-degrading activity of Rhodococcus opacus strain 1cp after dormancy // J. Environ. Sci. Health. Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes. 2011. V. 46. C. 638–647.

Soneson C., Delorenzi M. A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data // BMC Bioinform. 2013. V. 14. P. 91.

Sussman A.S., Douthit H.A. Dormancy in microbial spores // Annu. Rev. Plant. Physiol. 1973. V. 24. P. 311–352.

*Tatusov R.L., Galperin M.Y., Natale D.A., Koonin E.V.* The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. P. 33–36.

Thede G.L., Arthur D.C., Edwards R.A., Buelow D.R., Wong J.L., Raivio T.L., Glover J.N.M. Structure of the periplasmic stress response protein CpxP // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 2149–2157.

*Trapnell C., Hendrickson D.G., Sauvageau M., Goff L., Rinn J.L., Pachter L.* Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq // Nat. Biotechnol. 2013. V. 31. P. 46–53.

*Ueta M., Wada C., Daifuku T., Sako Y., Bessho Y., Kitamura A., Ohniwa R.L., Morikawa K., Yoshida H., Kato T., Miyata T., Namba K., Wada A.* Conservation of two distinct types of 100S ribosome in bacteria // Genes to Cells. 2013. V. 18. P. 554–574.

van der Woude M.W., Bäumler A.J. Phase and antigenic variation in bacteria // Clin. Microbiol. Rev. 2004. V. 17. P. 581–611.

https://doi.org/10.1128/CMR.17.3.581-611

Wada A., Igarashi K., Yoshimura S., Aimoto S., Ishihama A. Ribosome modulation factor: stationary growth phase-specific inhibitor of ribosome functions from *Escherichia coli //* Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995. V. 214. P. 410–417.

*Wada A*. Growth phase coupled modulation of *Escherichia coli* ribosomes // Genes Cells. 1998. V. 3. P. 203–208.

*Wada A., Yamazaki Y., Fujita N., Ishihama A.* Structure and probable genetic location of a "ribosome modulation factor" associated with 100S ribosomes in stationary-phase *Escherichia coli* cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 2657–2661.

Wagley S., Morcrette H., Kovacs-Simon A., Yang Z.R., Power A., Tennant R. K., Love J., Murray N., Titball R.W., Butler C.S. Bacterial dormancy: a subpopulation of viable but non-culturable cells demonstrates better fitness for revival // PLoS Pathogens. 2012. V. 17. Art. e1009194.

*Wainwright J., Hobbs G., Nakouti I.* Persister cells: formation, resuscitation and combative therapies // Arch. Microbiol. 2021. V. 203. P. 5899–5906.

White-Ziegler C.A., Um S., Pérez N.M., Berns A.L., Malhowski A.J., Young S. Low temperature (23°C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12 // Microbiology (SGM). 2008. V. 154. P. 148–166.

https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/012021-0

Wu M.-L., Gengenbacher M., Chung J.C.S., Chen S.L., Mollenkopf H.-J., Kaufmann S.H.E., Dick T. Developmental transcriptome of resting cell formation in Mycobacterium smegmatis // BMC Genomics. 2016. V. 17. P. 837.

Yoshida H., Nakayama H., Maki Y., Ueta M., Wada C., Wada A. Functional sites of ribosome modulation factor (RMF) involved in the formation of 100S ribosome // Front. Mol. Biosci. 2021. V. 8. P. 661691.

Zhang D., de Souza R.F., Anantharaman V., Iyer L.M., Aravind L. Polymorphic toxin systems: comprehensive characterization of trafficking modes, processing, mechanisms of ac-

tion, immunity and ecology using comparative genomics // Biology Direct. 2012. V. 7. P. 18.

Zhang X.H., Ahmad W., Zhu X.Y., Chen J., Austin B. Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine microorganisms // Mar. Life Sci. Technol. 2021. V. 3. P. 189–203.

# Transcriptome Analysis of *Escherichia coli* Dormant Cystlike Cells

# Yu. A. Nikolaev<sup>1, \*</sup>, N. G. Loiko<sup>1</sup>, O. A. Galuza<sup>1</sup>, A. V. Mardanov<sup>2</sup>, A. V. Beletskii<sup>2</sup>, D. G. Deryabin<sup>3</sup>, E. V. Demkina<sup>1</sup>, and G. I. El'-Registan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>2</sup> Skryabin Institute of Bioengineering, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

Received July 9, 2023; revised July 19, 2023; accepted July 20, 2023

**Abstract**—The transcriptome of *Esherichia coli* cystlike dormant cells was investigated. RNA content in a single dormant cell was 0.26 fg, i.e., 13.5 times less than in a cell of a growing culture. The presence of mRNA in *E. coli* dormant cells has not been reported previously. The pools of gene reads for the dormant and growing cells were characterized, as well as the differential expression of all genes, calculated according to the special algorithm considering the average mRNA amount in a single cell. The notion of the genes active in every cell of the population was introduced. In each cell of the dormant and growing *E. coli* population, such genes were represented by the transcripts of 21 and 16% of the genes, respectively. The revealed cell heterogeneity in the set of active genes is one of the reasons (and forms) of heterogeneity of bacterial populations. Sixty genes were revealed, for which activity increased twice or more during formation of *E. coli* dormant cells. These were the genes responsible for genome activity, structure and properties of the cell envelope, cell proliferation, stress adaptation, biofilm formation and functioning, and collective behavior, as well as the genes providing for survival of the cell population during germination of the dormant cells.

Keywords: cystlike dormant cells, Escherichia coli K12, transcriptome

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies, Russian Academy of Sciences, Orenburg, 460000 Russia \*e-mail: nikolaevya@mail.ru