

УДК 579.246

СТРУКТУРА БИОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО НУКЛЕОИДА И ЕГО РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ДИССОЦИАТИВНОЙ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ МИКРОБНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ¹

© 2024 г. Г. И. Эль-Регистан^а, Н. Е. Сузина^б, Е. В. Демкина^{а, *}, Ю. А. Николаев^а

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии РАН”, 119071, Москва, Россия

^бИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”, Пушкино, 142290, Россия

*e-mail: elenademkina@mail.ru

Поступила в редакцию 17.06.2024 г.

После доработки 21.06.2024 г.

Принята к публикации 10.07.2024 г.

Выживание микробной популяции в неблагоприятных для роста условиях обеспечивается: (1) образованием клеток-персистеров (П), созревающих в аметаболические покоящиеся формы (ПФ); (2) защитой хромосомальной ДНК путем формирования биокристаллического нуклеоида (БН); (3) способностью ПФ прорасти в свежей среде смешанной популяцией фенотипически различающихся диссоциантов, один из которых будет к ней наиболее адаптивен. Настоящее исследование решало две задачи: выяснить (1) как структурно организован БН в ПФ прокариот и (2) как биокристаллизация нуклеоида связана с фенотипической гетерогенностью популяций, вырастающих из ПФ. В работе предложена новая модель декристаллизации/рекристаллизации БН при нагревании/охлаждении ПФ при сублетальных температурах в неростовой среде, что воспроизводит динамику формирования БН в модели организации нуклеоида как складчатой глобулы. Электронно-микроскопический анализ структурных изменений БН в прогретых/охлажденных ПФ, совокупно с определением диссоциативных спектров вырастающих из них популяций, позволил получить следующую новую информацию. Биокристаллизация нуклеоида происходит в следующей последовательности: (1) начинающаяся ко-кристаллизация ДНК-Dps сопровождается разделением объема нуклеоида с формированием из суперскладчатой ДНК компактизованного нуклеоида в центральной области клетки и отходящих от него петель линейной ДНК; (2) ко-кристаллизация петельной ДНК-Dps сопровождается ее различной геометрической укладкой – тороидальной, ламеллярной, др.; (3) кристаллизация Dps-Dps, повторяющая матричную укладку петельной ДНК-Dps, приводила к образованию кристаллического массива Dps-Dps, что завершает образование БН. Обнаружено, что нагревание ПФ (45–70°C, 15 мин), приводящее к декристаллизации петельной ДНК-Dps при сохранении структурированности компактизованного нуклеоида, не влияет на диссоциативный (колониально-морфологический) спектр популяции, вырастающей из ПФ. На изменение ее диссоциативного спектра влияет процесс рекристаллизации ДНК-Dps, при котором, по-видимому, происходит связывание Dps не только с прежними, но и с другими сайтами ДНК, также афинными для Dps, что влияет на изменение топологии ДНК и ее транскрипцию.

Ключевые слова: покоящиеся формы бактерий (ПФ), ультраструктура, биокристаллический нуклеоид, нагревание/охлаждение ПФ, де/рекристаллизация ДНК-Dps, фенотипическая гетерогенность популяций

DOI: 10.31857/S0026365624060045

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

КН – компактизованный нуклеоид; ЦПМ – цитоплазматическая мембрана; КС – клеточная

стенка; ВМ – внешняя мембрана; ТС – тороидальная структура; ЛМ – ламеллярные структуры; МО – многослойная оболочка ПФ II типа; ПМУ – примембранная укладка ДНК-Dps; ПУ – плотная

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: <https://doi.org/10.31857/S0026365624060045>

упаковка ДНК-Dps; МПС — мембраноподобная структура; ПП — периплазматическое пространство; Н — нить ДНК-Dps; Dps — электронная плотность Dps-Dps (Krupyanskii et al., 2018).

Организация хромосомальной ДНК в клетке осуществляется за счет ее взаимодействия с нуклеоид-ассоциированными белками (**N**ucleoid **A**ssociated **P**roteins, NAPs), которые контролируют структурное топологическое состояние бактериальной ДНК и действуют как глобальные транскрипционные регуляторы (Azam et al., 1999).

В условиях, неблагоприятных для роста, при переходе микробных культур в стационарную фазу основным NAPs является Dps (**D**NA-binding **p**rotein from **s**tarved cells), принадлежащий семейству ферритинов (Azam et al., 1999; Frenkel-Krispin et al., 2004; Orban et al., 2022). Его экспрессия также включена в клеточные ответы на различные стрессорные воздействия (Karas et al., 2015). Синтезируясь в виде мономеров ($M = 19$ кДа), Dps самосборкой организуется в додекамеры (Grant et al., 1998), в форме которых он проявляет свою полифункциональную активность, обусловленную их способностью к: (1) образованию комплексов с ДНК, так называемой ко-кристаллизации ДНК-Dps, что обуславливает компактизацию ДНК и обратимую супрессию транскрипционной активности и (2) самосборке Dps-Dps в упорядоченную кристаллическую структуру. Совокупно это приводит к образованию биокристаллического нуклеоида (БН) (Frenkel-Krispin et al., 2004). На микрофотографиях БН визуализируется как тороидальная или ламеллярная укладка ко-кристаллизованной ДНК-Dps и как тонко пакетированные слои Dps-Dps, собранные в единую кристаллическую структуру. Модели укладки ДНК в кристаллической решетке Dps дискутируются в статье (Dadinova et al., 2019).

Ферроксидазная активность, обусловленная способностью Dps связывать и окислять ионы Fe^{2+} в межсубъединичном центре додекамера, обеспечивает антиоксидантную защиту ДНК от гидроксильных радикалов. Накопление в полости сферы додекамера окисленного железа (не менее 50% от возможного), стабилизирует структуру додекамера (Antipov et al., 2017). В клетках культур стационарной фазы концентрация ионов железа меньше, чем в экспоненциальных, тогда как число молекул Dps в 15–30 раз больше. Поэтому додекамерная организация Dps относительно нестабильна, что обеспечивает обратимость как самосборки додекамеров, так и их связывания с ДНК и, следовательно, возможность декристаллизации Dps-ДНК и реверсии ДНК к транскрипционной активности.

Аффинность ДНК для Dps в значительной степени зависит от буферных условий. Концентрация бивалентных ионов, действующая как триггер для образования комплексов ДНК-Dps, обуславливает

обратимость процесса. При этом, как показано *in vitro*, связывание ДНК с Dps характеризуется ее резким коллапсом — компактизацией, с последующей реверсией от напряженного сжатого состояния к исходному (Vtyurina et al., 2016). Это явление гистерезиса, по-видимому, имеет место *in cellulo* в клетках бактерий. При достижении критических значений концентраций Dps, Fe^{2+} и Mg^{2+} , что на модели *E. coli* соответствует 48–72 ч стационарной фазы, в клетке завершается процесс ко-кристаллизации Dps-ДНК и Dps-Dps в единый БН с сохранением способности хромосомальной ДНК вернуться в исходное структурное и функциональное состояние, когда бактериальные клетки вновь окажутся в условиях, благоприятствующих росту, что предложено рассматривать как длительно живущий кооперативный гистерезис (Abbon dan Zeieri et al., 2014; Karas et al., 2015).

Таким образом, образование БН обеспечивает: (1) защиту нуклеоида от действия внутриклеточных гидралаз в условиях снижения метаболической активности клетки; (2) антиоксидантную и стрессопротекторную защиту нуклеоида за счет ферроксидазной активности Dps; (3) уникальное эпигенетическое состояние ДНК, приводящее к обратимому ингибированию ее транскрипционной активности.

Отметим, что при переходе периодических культур бактерий в стационарную фазу роста в клетках малочисленной субпопуляции (около 1%) происходит еще одно молекулярно-генетическое событие — цитодифференцировка, в результате которой ординарные клетки приобретают свойства персистеров (П): (1) выживающих в присутствии летальных доз антибиотиков — антибиотикотолерантных; (2) устойчивых к автолизу, (3) медленно или не делящихся, (4) с резко сниженной метаболической активностью (дормантных); (5) при пересеве в свежую среду воспроизводящих родительскую популяцию (Van den Bergh, 2016; Balaban et al., 2019). В фазе отмирания стареющей культуры ординарные клетки автолизуются, а устойчивые к автолизу П, согласно нашей гипотезе, созревают в цистоподобные покоящиеся клетки (ЦПК) (Лойко и соавт., 2015; Мулюкин и соавт., 2015; Николаев и соавт., 2020), что было подтверждено при анализе транскриптов вегетативных клеток и ПФ *E. coli* (Николаев и соавт., 2023).

Важной характеристикой ЦПК является существенное расширение диссоциативного спектра вырастающих из них популяций по колонияльно-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам (Эль-Регистан и соавт., 2006; Кряжевских и соавт., 2013; Мулюкин и соавт., 2014, 2015), тогда как персистеры, как предшественники цистоподобных ПФ, прорастают в свежей среде как популяция доминантного родительского фенотипа, что показано в многочисленных исследованиях (Van den Bergh et al., 2016; Balaban et al., 2019). Наиболее вероятным объяснением этого свойства ЦПК могут быть различия в ко-кристаллизации

ДНК-Dps в разных ПФ в процессе их созревания, что будет влиять на транскрипционный профиль ДНК в прорастающих ПФ. В этом случае искусственно вызванные локальные изменения в структуре БН в ПФ приведут к изменениям в фенотипическом профиле вырастающей из ПФ популяции, что может быть вызвано, например, нагреванием/охлаждением, обеспечивающим декристаллизацию/рекристаллизацию БН. Напомним, что нагревание ПФ бацилл (эндоспор) широко известно в спорологии как прием их активации перед прорастанием. Этап активации обратим: если в среде отсутствуют источники питания, активированные споры возвращаются в анабиотическое состояние с сохранением потенции к прорастанию.

Целью настоящего исследования было: с использованием модели нагревания/охлаждения ПФ, воспроизводящей декристаллизацию/рекристаллизацию биокристаллического нуклеоида (БН), определить (1) структуру и этапность образования БН и (2) связь между этапностью образования БН и изменением диссоциативного фенотипического спектра популяций, вырастающих из ПФ.

Отметим, что реализация диссоциативной фенотипической гетерогенности микробной популяции отражает ее чрезвычайно высокий адаптивный потенциал, а у патогенных бактерий — связана с реализацией их вирулентности и патогенности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе использовали бактерии *Escherichia coli* K-12 (ВКМ РАН, РФ), *Rhodococcus erythropolis* 3C-3^a и *Pseudomonas extrem australis* F 2 (коллекция углеводородокисляющих бактерий ИНМИ РАН). ПФ получали при культивировании бактерий в жидкой среде LB в колбах объемом 750 мл с 300 мл среды при перемешивании на орбитальной качалке (120 об./мин) при температуре 28°C в течение 5 сут с последующим инкубированием в статическом режиме в течение 1–3 мес. при температуре 20–22°C.

Численность жизнеспособных клеток в культурах бактерий определяли путем посева аликвот их десятичных разведений на плотную среду LB (1.5% агара). Чашки инкубировали в течение 3 сут при 28°C, определяли число КОЕ/мл.

Диссоциативный спектр популяций, вырастающих из ПФ на плотных средах, определяли по удельной доле (%) колоний доминантного типа и колоний минорных альтернативных фенотипов (суммарно) на основании их колониально-морфологических признаков.

Термообработка ПФ бактерий осуществлялась прогреванием аликвоты (1.5 мл) суспензии ПФ в эпепендорфах (2 мл) в 10 повторностях на термошейкере

(TS 100, “Biosan”, Латвия) в течение 15 мин при температурах 50–70°C с последующим: (а) резким охлаждением, помещая образцы в колотый лед на 5–7 мин; (б) медленным охлаждением при комнатной температуре в течение 25–30 мин или (в) без охлаждения, сразу фиксируя прогретые клетки глутаральдегидом (1.5%). В образцах определяли численность жизнеспособных ПФ (КОЕ/мл) и ультраструктурную организацию ПФ электронно-микроскопически.

Электронно-микроскопические исследования. Суспензии ПФ центрифугировали (5000 g, 15 мин). Осажденные клетки фиксировали в 1.5% растворе глутарового альдегида в 0.05 М какодилатном буфере (рН 7.2) при 4°C в течение 1 ч, трижды отмывали в том же буфере и дофиксировали в 1% растворе OsO₄ в 0.05 М какодилатном буфере (рН 7.2) в течение 3 ч при 20°C. После обезвоживания в серии спиртов и ацетоне материал заключали в эпоксидную смолу Epon 812. Ультратонкие срезы (Микротом LKB-III, “LKB”, Швеция) монтировали на опорные сеточки, контрастировали в течение 30 мин 3% раствором уранилацетата в 70% спирте и дополнительно контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу. Срезы просматривали в электронном микроскопе JEM-100B (“JEOL”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ (с использованием оборудования ЦКП “Коллекция UNIQEM” ФИЦ Биотехнологии РАН).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Основным объектом электронно-микроскопических исследований были ПФ бактерии *E. coli* K-12 (хранение 3 мес.), как принятая модель изучения биокристаллического нуклеоида. Выявленные закономерности верифицировали на ПФ бактерий *P. extrem australis* и *R. erythropolis* (хранение 3 мес.).

Структурная организация биокристаллического нуклеоида в покоящихся формах бактерий. Покоящиеся формы *E. coli* были представлены двумя морфотипами, различающимися толщиной клеточной оболочки: утолщенной (I тип) (рис. 1а) и толстой многослойной (II тип) (рис. 1б; рис. 1Са, 1Сб), что было отмечено ранее для ПФ других неспорообразующих бактерий (Suzina et al., 2006). На фоне электронно-плотного массива Dps-Dps хорошо выявлялись области упорядоченной укладки кристаллизованной ДНК-Dps или повторяющей ее укладку Dps-Dps тороидального (рис. 1в, 1г) или ламеллярного (рис. 1б; рис. 1Са, 1Сб) типов, многократно описанные ранее, а также центрально расположенная зона низкой электронной плотности с компактизованным нуклеоидом (КН), образованном жидкокристаллической ДНК (рис. 1а, 1б).

Покоящиеся формы *P. extrem australis* (3 мес.) двух морфотипов (I и II), различались толщиной клеточной оболочки (рис. 2а, 2б). Выявляются:

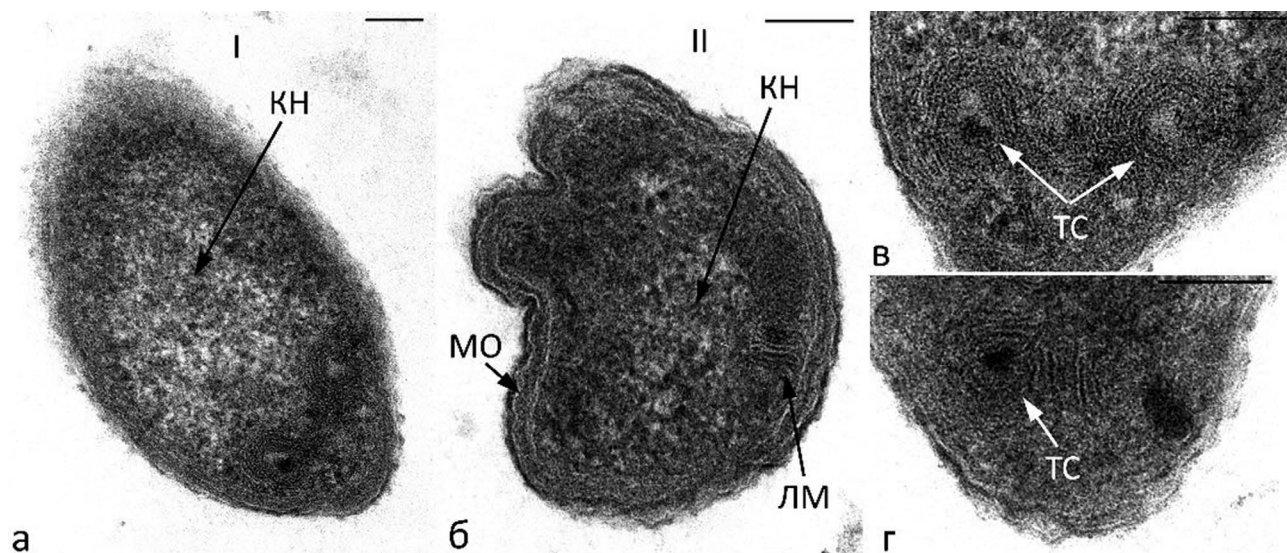


Рис. 1. Тонкие срезы интактных ПФ *E. coli* (3 мес.): а – ПФ I типа тонкостенная; б – ПФ II типа многослойная. Видны: область компактизованного нуклеоида (а, б, е); многослойная оболочка ПФ II типа (б); ламеллярная укладка ДНК-Dps и/или Dps-Dps (г); тороидальная укладка ДНК-Dps и/или Dps-Dps (в). Масштабная метка – 0.2 мкм.

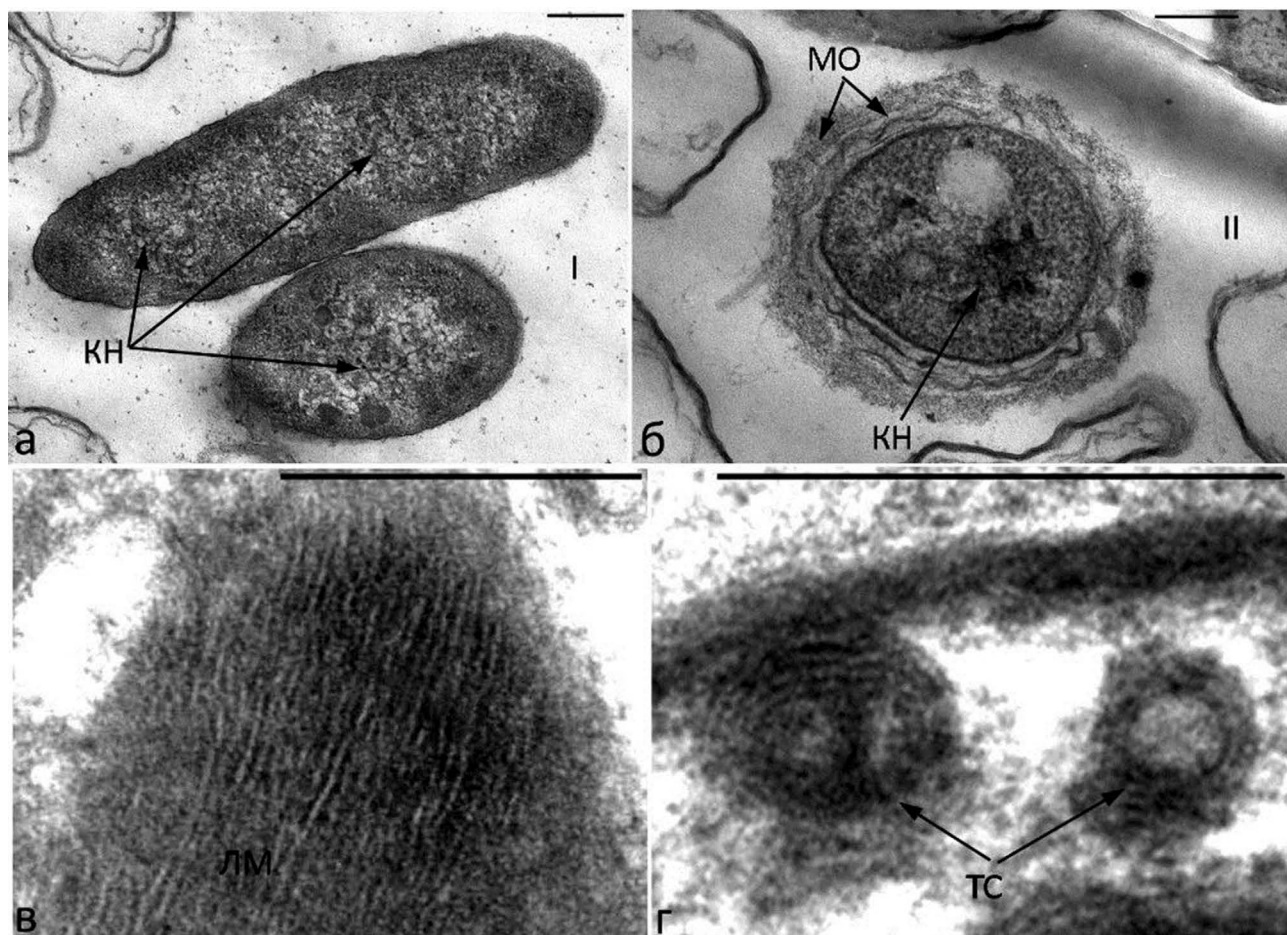


Рис. 2. Тонкие срезы интактных ПФ *P. extremaustralis* (3 мес.): а – ПФ I типа; б – ПФ II типа. Видны: ламеллярная укладка ДНК-Dps и/или Dps-Dps (в, г); тороидальная укладка ДНК-Dps (г). Масштабная метка – 0.2 мкм.

области укладки ко-кристаллизованной ДНК-Dps тороидального (рис. 2г; 2Св) или ламеллярного (рис. 2в; рис. 2Са–2Св); тонко-пакетированная укладка, характерная для Dps-Dps (рис. 2в). Масштабная метка – 0.2 мкм.

Покоящиеся формы *R. erythropolis* (3 мес.) также различались толщиной клеточной оболочки: I типа (рис. 3а, 3б, 3г) и II типа (рис. 3в, 3г). Виден КН, представленный жидкокристаллическими структурами изотропного (рис. 3а, 3б; рис. 3Са, 3Сб), нити

линейной ДНК-Dps, образующие многослойную укладку и петлю (рис. 3в), а также тороидальные структуры (рис. 3г). В ПФ родококка были выявлены ранее не обнаруживаемые мембраноподобные линейные структуры (рис. 3б, 3в). Встречаемость таких структур во многих ПФ не позволяет считать их артефактом.

Структура биокристаллического нуклеоида при нагревании покоящихся форм бактерий. Нагревание ПФ *E. coli* при 50, 55, 65°C в течение 15 мин

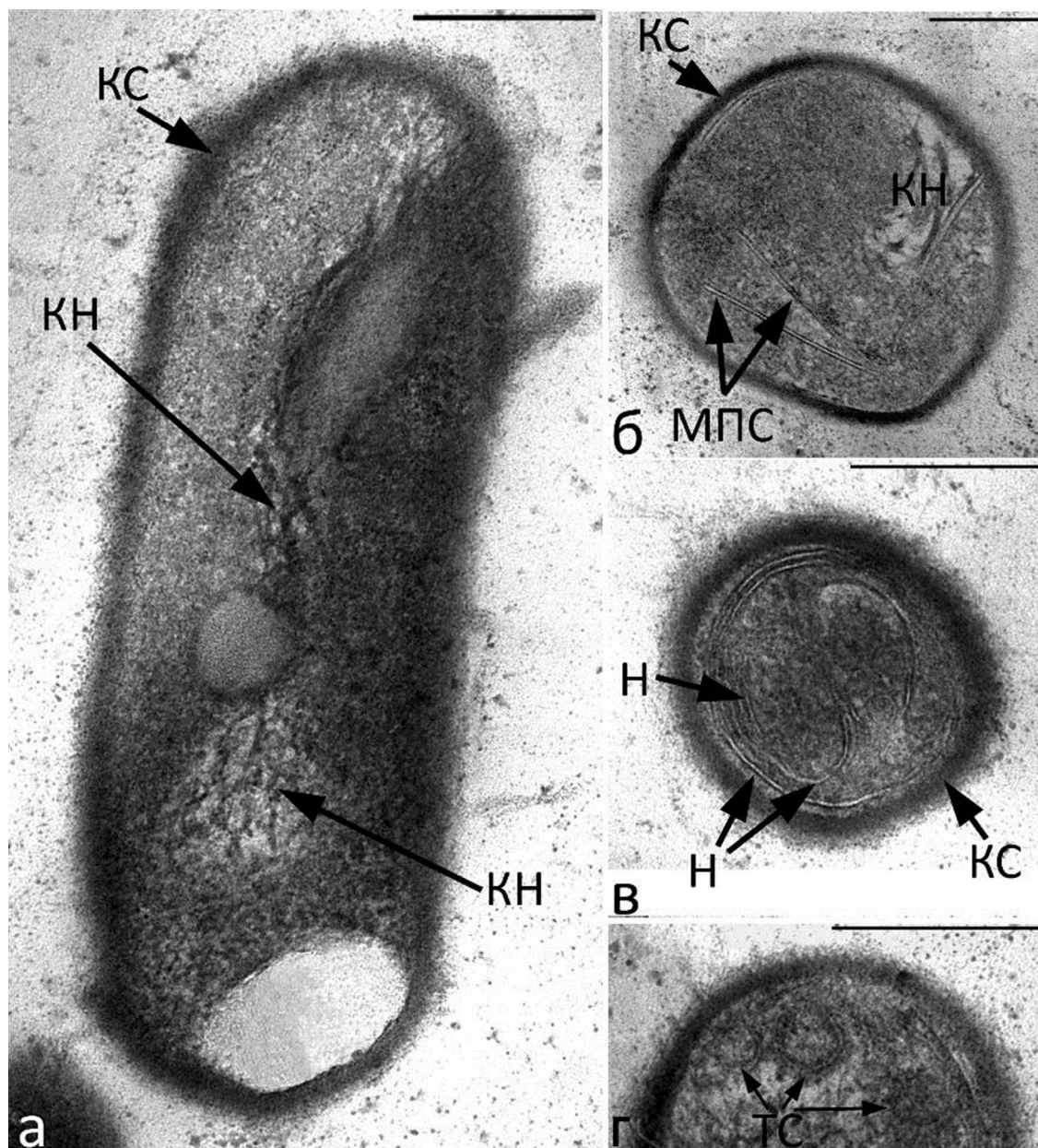


Рис. 3. Тонкие срезы intactных ПФ *R. erythropolis* (3 мес.): а, б – ПФ I типа; в – ПФ II типа. Видны: компактизованный нуклеоид (а, б); жидкокристаллическая структура ДНК компактизованного нуклеоида изотропного типа (б); мембраноподобные линейные структуры (б); многослойная укладка и петля линейной ДНК-Dps (в). Масштабная метка – 0.2 мкм.

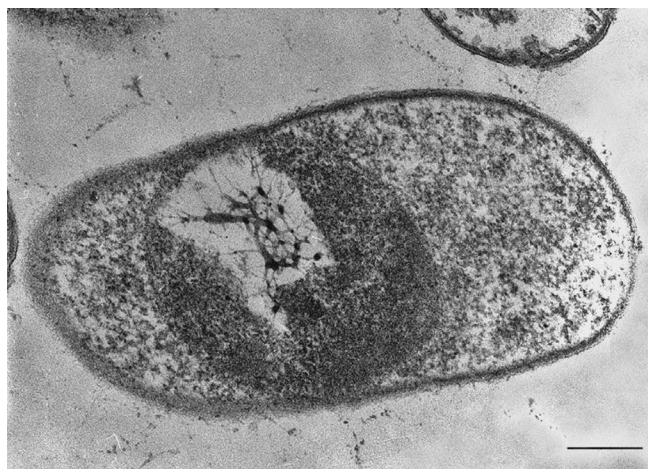


Рис. 4. Тонкие срезы ПФ *E. coli*, нагретых до 50°C, моментальная фиксация. Видны: расплав биокристаллического нуклеоида (БН); жидкокристаллическая структура компактизованного нуклеоида изотропного типа. Масштабная метка — 0.2 мкм.

с моментальной фиксацией (внесением глутаральдегида) (рис. 4–6) демонстрирует картину неравномерного плавления БН.

Видны области остаточной кристаллической укладки ДНК-Dps и/или Dps-Dps (рис. 4а; рис. 4Са; рис. 5Са, 5Сб; рис. 6б; рис. 6Са); сохраняющий свою структуру компактизованный нуклеоид (рис. 4а); обломки кристаллитов Dps-Dps (рис. 4Са; рис. 6Са). Хорошо сохраняющиеся области тороидальной укладки ДНК-Dps с отходящими от тороида нитями ДНК-Dps, что визуализируется впервые (рис. 5а, 5б).

Нагревание ПФ *E. coli* при 55 и 65°C в течение 15 мин с последующим резким охлаждением (лед) (рис. 7, 8; рис. 7С, 8С) выявило интересный феномен увеличения периплазматического пространства (рис. 7а; рис. 8Сб, 8Св), характерный для плазмолиза, как известно, имеющего место при дегидратации клетки, но в данном случае являющегося признаком ее витрификации.

Сжатие протопласта наблюдалось в большей степени на одном из полюсов, несимметрично (рис. 7а; рис. 8Сб, 8Св). Очень хорошо визуализируется жидкокристаллическая структура компактизованного нуклеоида, располагающегося в центре клетки и окруженного сохранившимися участками кокристаллизованной ДНК-Dps и Dps-Dps (рис. 7 в; рис. 7С а, б).

Нагревание ПФ *E. coli* при 55°C с последующим медленным охлаждением при комнатной температуре демонстрирует в большей степени восстановление структурированности БН: образование тороидальных структур (рис. 9а, 9б, рис. 9Сб); увеличение зон плотной укладки структурных элементов БН (рис. 9а, рис. 9Са).

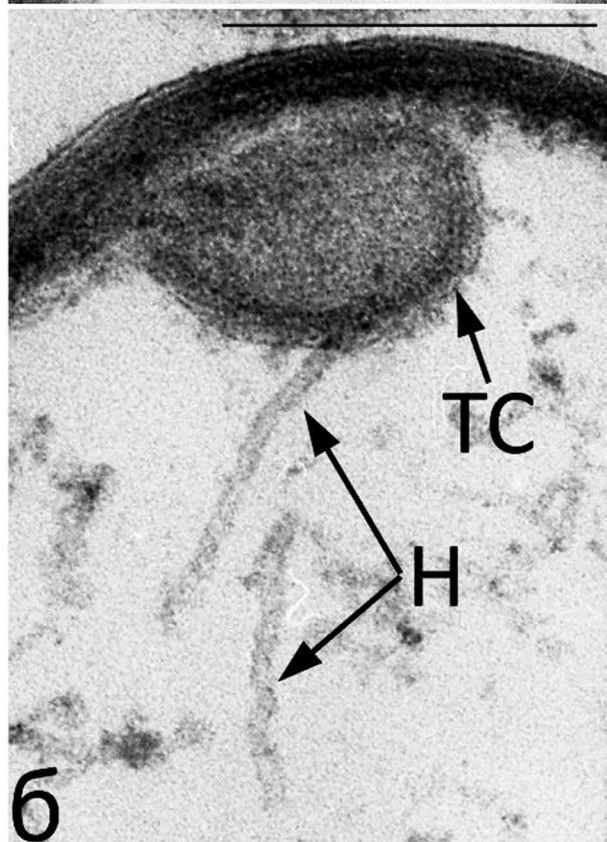
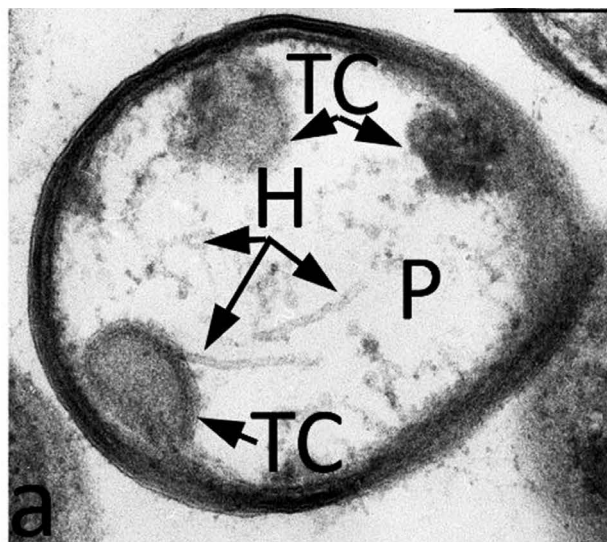


Рис. 5. Тонкие срезы ПФ *E. coli*, нагретых до 55°C, моментальная фиксация: плавление тороидальной структуры в ПФ I типа. Видны: сохранившие биокристаллическую структуру тороиды и нити ДНК-Dps. Увеличение — отходящая от тороида нить ДНК-Dps (б). Масштабная метка — 0.2 мкм.

Нагревание ПФ *R. erythropolis* при 60 и 70°C с последующим резким охлаждением (рис. 10, рис. 11) выявило такие же, как и для ПФ *E. coli*

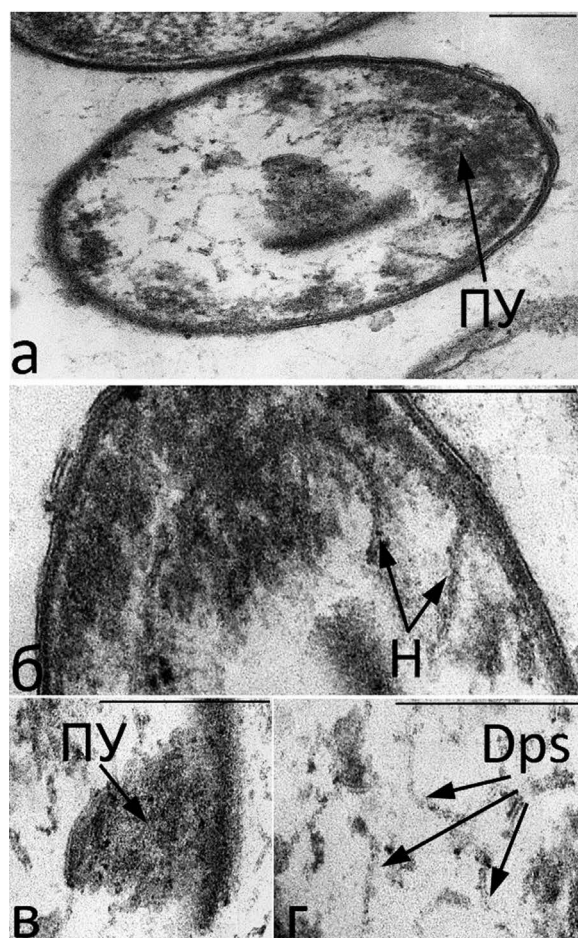


Рис. 6. Тонкие срезы ПФ *E. coli*, нагретых до 65°C, моментальная фиксация: клетка с расплавленным БН. Видны отдельные островки плотной укладки БН (а, б, в); нити ДНК-Dps (б); фрагменты расплавлена БН Dps-Dps (б, в, г). Масштабная метка – 0.2 мкм.

закономерности восстановления структуры расплавленного БН: рекристаллизацию нитей ДНК-Dps (рис. 10а, 10б); жидкокристаллическую структуру компактизованного нуклеоида изотропного (рис. 10б, 10в; рис. 11а) и холестерического типа (рис. 10г; рис. 10Sб). По-видимому, при кристаллизации суперскладчатой ДНК компактизованного нуклеоида сохраняется свойственная ей спиралевидная, тороидальная плектонемическая укладка тяжей ДНК (Willenbrock et al., 2004).

Нагревание ПФ *R. erythropolis* при 60 и 70°C с последующим медленным охлаждением (рис. 12, рис. 13) более наглядно демонстрирует процесс восстановления кристаллической структуры БН, сформированной участками ДНК-Dps с тороидальной (рис. 12а) или петлеобразной укладкой нитей ДНК-Dps (рис. 12б; 13а). Выявляются отмеченные ранее мембраноподобные структуры (рис. 12Sв).

Нагревание ПФ *P. extremaustralis* при 60°C с последующим быстрым или медленным охлаждением выявило их низкую термостойкость. Встречаются интактные ПФ I (рис. 14б) и II типов (рис. 14а) у этого штамма. Плавление БН приводило к визуализации тяжей компактизованного нуклеоида (рис. 14в; рис. 14Sб) вследствие плавления ДНК-Dps и Dps-Dps, сплетения, клубки из сохранившихся нитей ДНК-Dps (рис. 14г, 14д; рис. 14Sв, 14Sд, 14Se), в том числе “омембранные” нитями ДНК-Dps (рис. 14г, 14д), что свидетельствует о такой важной стрессопротекторной функции Dps, как защита ДНК от деструкции внутриклеточными нуклеазами.

Таким образом, при нагревании ПФ бактерий и плавлении БН наиболее долго сохраняются компактизованный нуклеоид, образованный неравномерно толстыми тяжами жидкокристаллической

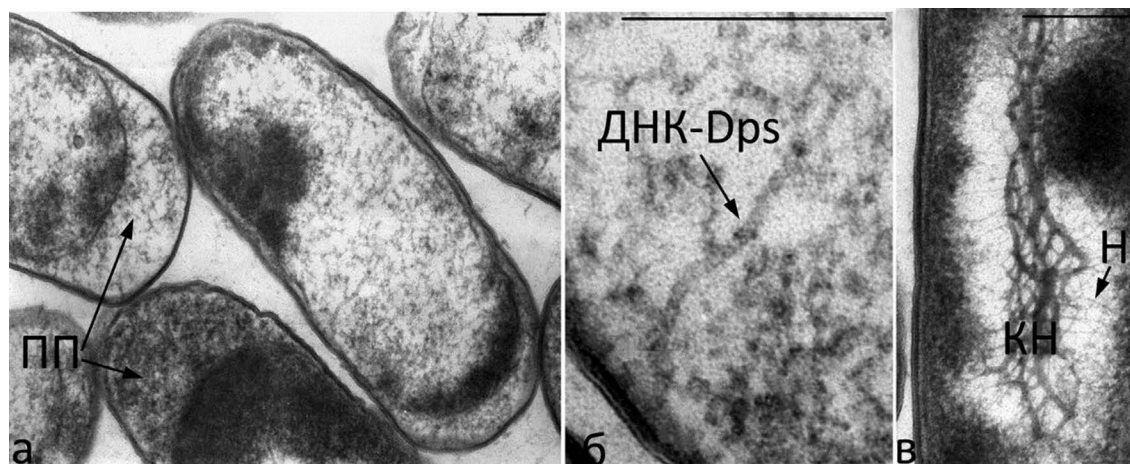


Рис. 7. Тонкие срезы ПФ *E. coli*, нагретых до 55°C, быстрое охлаждение. Видны: расширенное периплазматическое пространство в прогретых ПФ (а); нить линейной ДНК-Dps (б); жидкокристаллическая структура ДНК биокристаллического нуклеоида холестерического типа. Масштабная метка – 0.2 мкм.

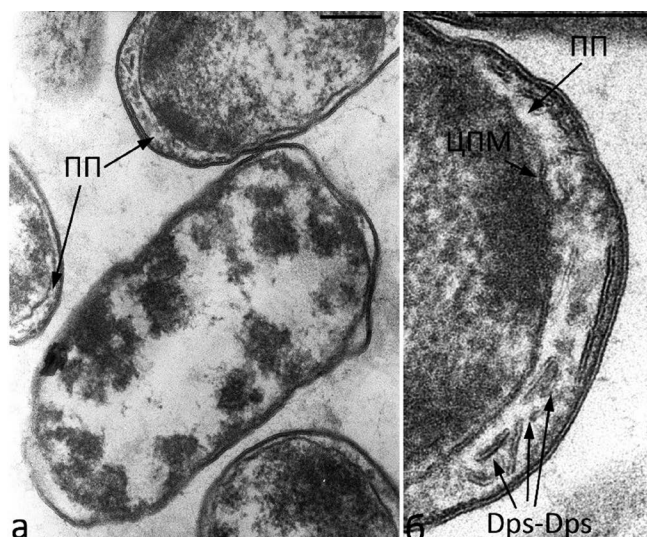


Рис. 8. Тонкие срезы ПФ *E. coli*, нагретых до 65°C, быстрое охлаждение: а–е — плазмолиз протопласта и плавление БН. Видно: увеличение периплазматического пространства (а, б); обрывки укладки Dps-Dps в периплазматическом пространстве (б); остатки плотной укладки биокристалла (а). Масштабная метка — 0.2 мкм.

суперскладчатой ДНК и располагающийся в центральной области клетки с низкой электронной плотностью, а также неравномерно расположенные зоны сохранившейся кристаллической укладки БН, что свидетельствует о гетерогенности структуры БН. Наименее устойчив к нагреванию кристаллический массив Dps-Dps. При всех режимах нагревания фиксируется гетерогенность популяций ПФ по их отклику на нагревание, что отражает гетерогенность терморезистентности субпопуляции ПФ.

Изменения диссоциативной фенотипической гетерогенности популяций, вырастающих из прогретых/охлажденных покоящихся форм *E. coli*. Фенотипическую гетерогенность вырастающих на плотной среде из ПФ популяций оценивали по колониально-морфологическим признакам. В 1 сут культуре *E. coli*, перешедшей в стационарную фазу роста (3×10^9 КОЕ/мл), все клетки, в том числе и персистеры (П), проросли на свежей среде как доминантный фенотип, что соответствует литературным данным (Balaban et al., 2019). Через 2 мес. инкубации жизнеспособность сохраняли около 1–3% клеток П, из которых в виде альтернативных фенотипов вырастали уже более 40%. При посеве ПФ (2 мес.) сразу после их прогревания (50–70°C, 15 мин) без последующего остывания численность выросших КОЕ снижалась при возрастании температуры прогрева, что свидетельствует о гетерогенности популяций ПФ по признаку терморезистентности и/или глубине покоя. При этом диссоциативный спектр вырастающих

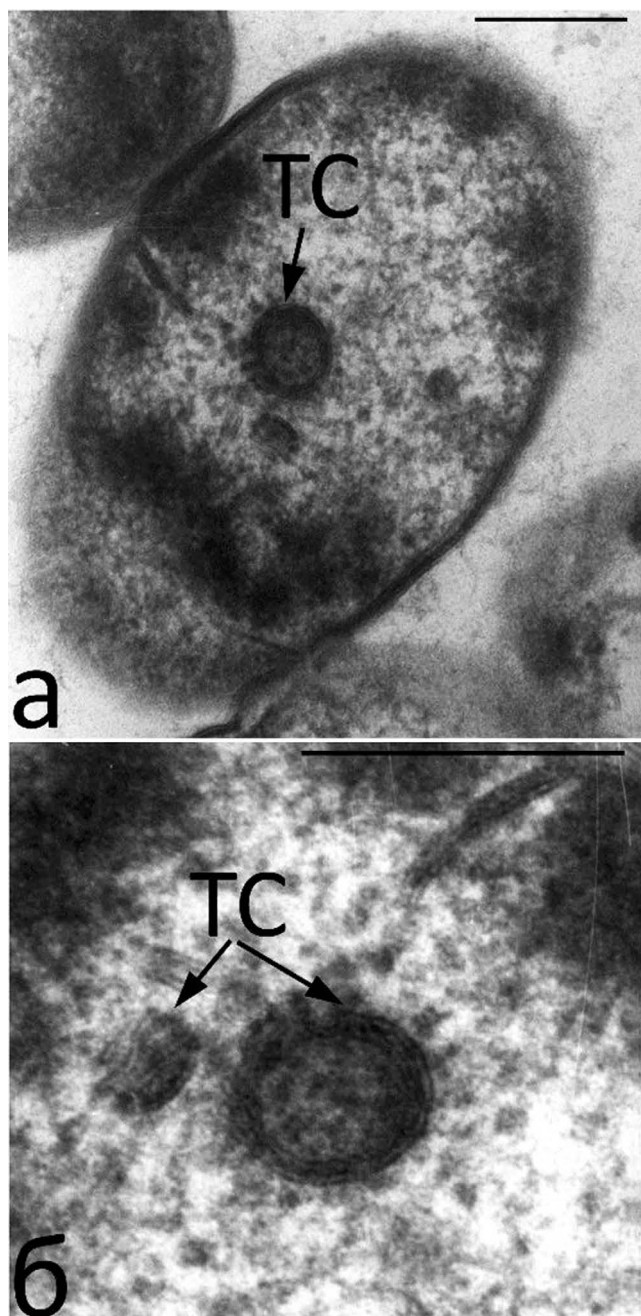


Рис. 9. Нагрев ПФ *E. coli*, нагретых до 55°C, медленное охлаждение: а, б — плазмолиз, начало рекристаллизации БН. В охлажденных ПФ видны: уплотненные участки БН (а); образование тороидов (а, б). Масштабная метка — 0.2 мкм.

популяций незначительно менялся относительно контроля (табл. 1), то есть декристаллизация ДНК-Dps не влияла на фенотип прорастающих ПФ.

В отличие от этого, при посеве ПФ, прогретых и затем резко или постепенно охлажденных (табл. 2, 3), соотношение диссоциантов доминантного и альтернативных фенотипов достоверно изменялось,

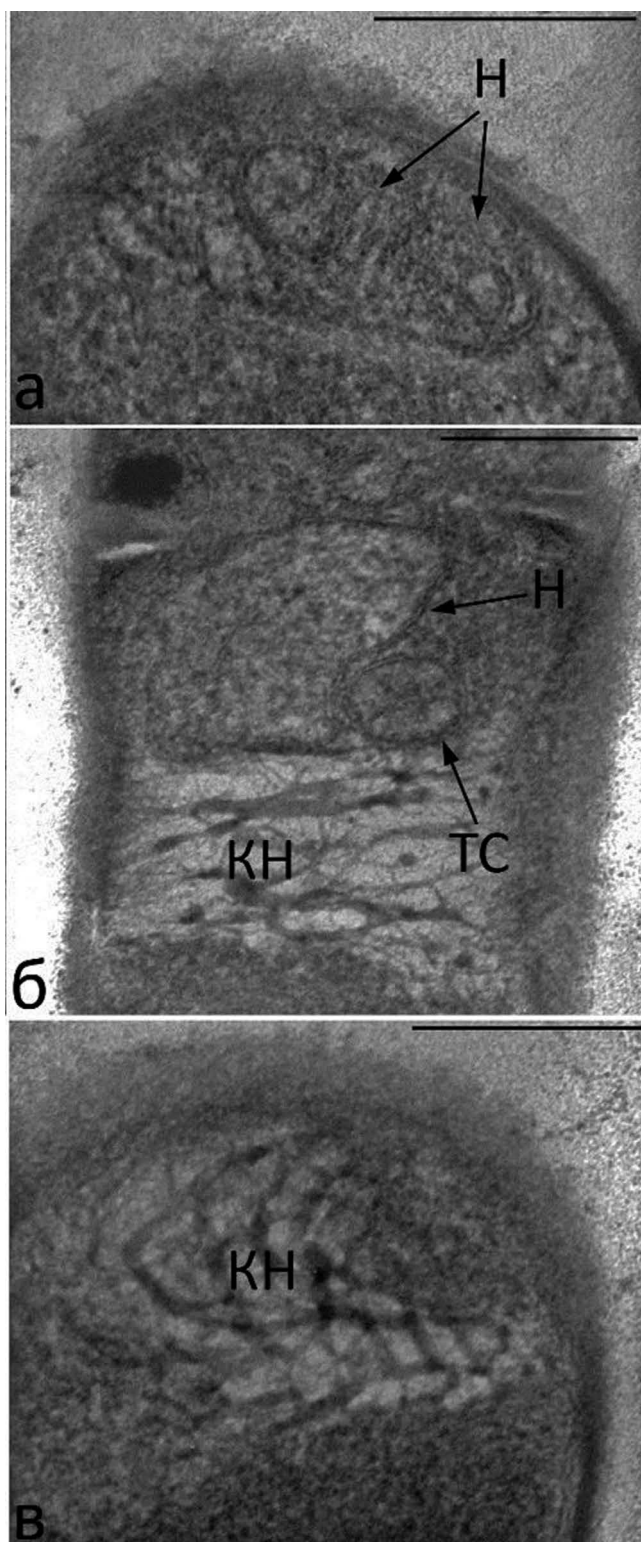


Рис. 10. Тонкие срезы ПФ *R. erythropolis*, нагретых до 60°C, быстрое охлаждение: а–г – компактизованный нуклеоид. Видны: области сохранившей структуру жидкокристаллической ДНК холестерического (в, г) и изотропного типа компактизованного нуклеоида (б); укладка нитей ДНК-Dps (а, б), в том числе тороидального типа (б). Масштабная метка – 0.2 мкм.

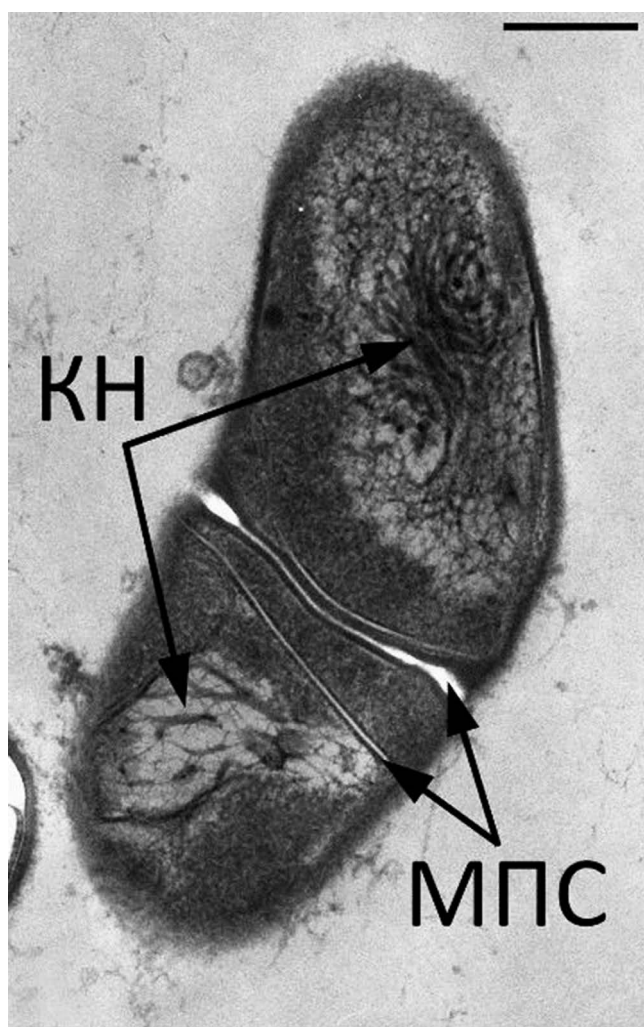


Рис. 11. Тонкие срезы ПФ *R. erythropolis*, нагретых до 50°C, быстрое охлаждение: а – клетка с достаточно хорошо сохранившимся БН. Видны: жидкокристаллическая ДНК сохранившего структуру компактизованного нуклеоида. Масштабная метка – 0.2 мкм.

особенно при резком охлаждении (табл. 2), что можно объяснить изменением сайтов взаимодействия ДНК с Dps, и следовательно, топологии ДНК (и затем РНК) при рекристаллизации ДНК-Dps в процессе остывания прогретых ПФ. Приведенные результаты были подтверждены в экспериментах с нагреванием-охлаждением ПФ родококка и псевдомонады (данные не приводятся).

ОБСУЖДЕНИЕ

Какими свойствами обладают нуклеоид и цитоплазма бактериальной клетки? Анализ литературы в области биофизики цитоплазмы бактериальной клетки и организации нуклеоида совокупно

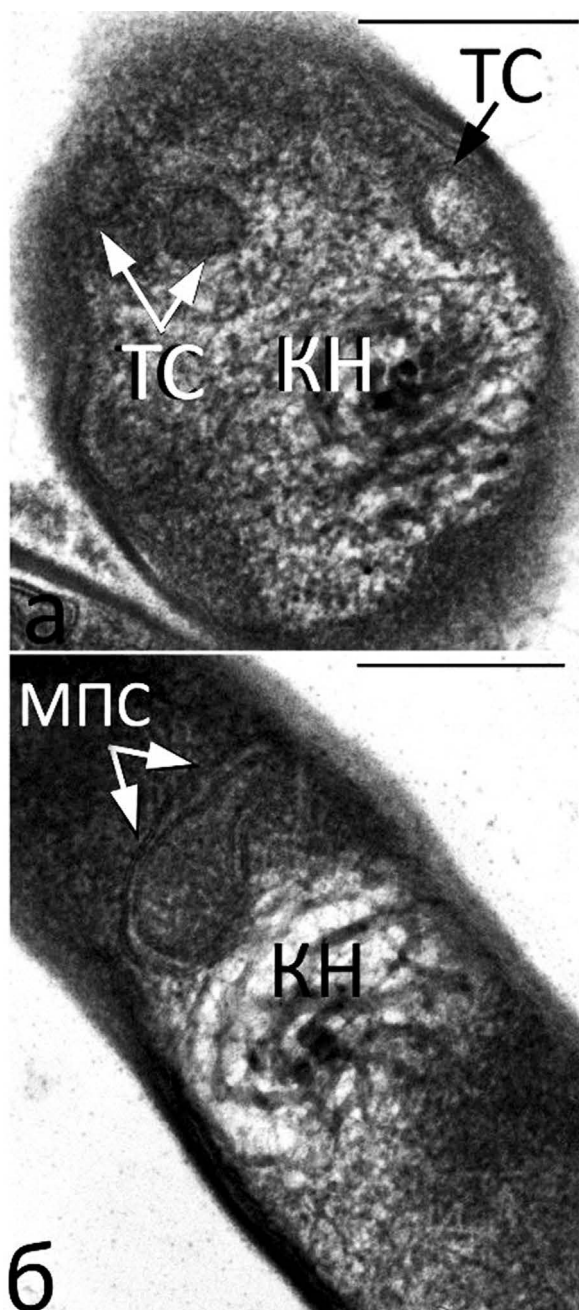


Рис. 12. Тонкие срезы ПФ *R. erythropolis*, нагретых до 60°C, медленное охлаждение. Видны: а, б – компактизованный нуклеоид, практически восстановивший свою структуру БН (а, б); тороидальные структуры ДНК-Dps (а); петля нити линейной ДНК-Dps (б). Масштабная метка – 0.2 мкм.

с результатами наших исследований ЦПК бактерий и данными, полученными в настоящей работе в модели нагревания/охлаждения ПФ, позволяют предложить следующую модель организации БН и связанные с этим проявления фенотипической гетерогенности популяций, вырастающих из ПФ.

Бактериальная цитоплазма, в которой расположен нуклеоид, проявляет свойства, характерные для стеклообразующих коллоидных растворов. В стационарных клетках она изменяется от более жидкообразного к более твердообразному состоянию вследствие: (1) снижения метаболической активности клетки; (2) снижения количества свободной воды (A_w); (3) увеличения размеров и количества внутриклеточных компонентов (Parry et al., 2014). В силу изменения структурной организации цитоплазматической мембраны и изменения транспортных потоков ионов (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} в клетку, а K^+ , Na^+ из клетки) (Minsky et al., 2002) в клетках снижается уровень свободной воды (A_w). Это приводит к увеличению концентрации внутриклеточного “раствора”; собиранию (макро) молекул в более крупные образования, в том числе к образованию рибосом 100S (Mourão et al., 2014), и влияет на самосборку додекамеров Dps и кокристаллизацию ДНК-Dps. При этом в уплотняющемся коллоидном растворе менее крупные частицы могут быть подвижны, а более крупные – демонстрируют “стеклообразную” динамику (Zaccarelli et al., 2005).

Нуклеоид прокариотной клетки включает хромосомальную ДНК (около 60%), а также ассоциированные с ней белки (NAPs), РНК и (не)прочно связанные липиды, которые, в зависимости от качественного и количественного состава, влияют на топологию и, потому, транскрипционную активность ДНК (Azam et al., 1999; Albi et al., 2004). В бактериальной клетке хромосомальная ДНК компактизована более чем в 1000 раз, поэтому нуклеоид обладает многоуровневой, иерархической структурной организацией (Dame et al., 2020). В клетке *E. coli* хромосома организована в 6 макродоменов (Postow et al., 2004; Espeli et al., 2008), в которых обеспечена доступность к отдельным хромосомальным областям для взаимодействия с NAPs в аффинных для них сайтах. Это приводит к топологическим ограничениям нити ДНК и образованию складок, затем складок из складок и т.д., что формирует легко раскрываемую суперскладчатую “глобулу” с отходящими от нее петлями суперспирализованной линейной ДНК (Grosberg et al., 1988), которая располагается диффузно в объеме цитоплазмы.

Что происходит с нуклеоидом ординарных клеток в динамике стационарной фазы? Очевидно, что различающаяся плотность ко-кристаллизованных с Dps участков суперспирализованной линейной и суперскладчатой ДНК будет обуславливать их различную пространственную реорганизацию с образованием зон суперскладчатой ДНК-Dps и петель, сформированных линейной ДНК-Dps, обладающих разной подвижностью, с конденсацией более неподвижных участков хромосомы в центральной области клетки (Perry et al., 2014), что и будет образовывать компактизованный

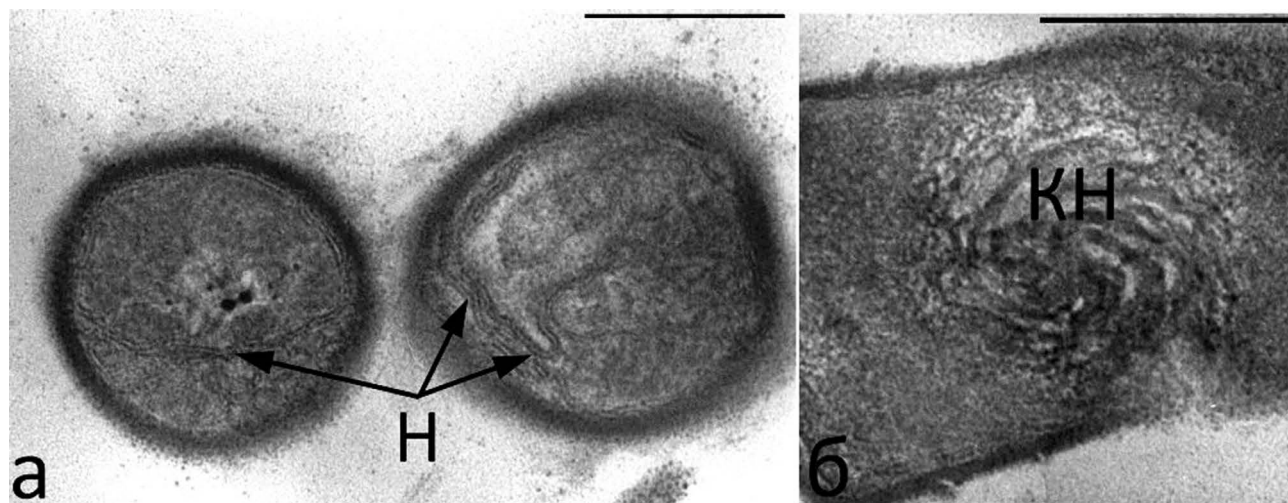


Рис. 13. Тонкие срезы ПФ *R. erythropolis*, нагретых до 70°C, быстрое охлаждение: а, б — восстановление БН. Видны: образование и укладка нитей линейной ДНК-Дпс (а); сохранившаяся укладка тяжелой суперспирализованной ДНК компактизованного нуклеоида холестерического типа (б). Масштабная метка — 0.2 мкм.

нуклеоид (рис. 1а, 2а, 3а, 3б). Суперскладчатая структура компактизованного нуклеоида будет препятствовать дальнейшему взаимодействию ДНК с Дпс, что подтверждено элементарным анализом (наличием фосфора при крайне низкой концентрации серы) (Крупянских, 2023). Продолжающаяся ко-кристаллизация линейной ДНК с Дпс и Дпс-Дпс будет вытеснять малые молекулы в центральную область клетки с очень низким значением A_w с образованием там своеобразного “криопега”. Это приведет к переходу ДНК компактизованного нуклеоида в жидкокристаллическое состояние холестерического (рис. 10г, 10сб) или изотропного (рис. 3Са, 7в, 10б, 10в) типов.

Ко-кристаллизация суперспирализованной линейной ДНК-Дпс, располагающейся в виде петель в объеме цитоплазмы, может осуществляться согласно теоретическим моделям, предложенным на основании электронных микрофотографий БН в голодающих клетках бактерии *E. coli* (Dadinova et al., 2019). Согласно модели (Dadinova et al., 2019), додекамеры Дпс формируют различно ориентированные кристаллиты, которые комплементарно со своей нативной структурой огибает ДНК. Последующая ко-кристаллизация Дпс-Дпс будет повторять эту первичную матричную укладку ДНК-Дпс, образуя кристаллический массив Дпс-Дпс, на срезах которого визуализируется тороидальная (рис. 2д), ламеллярная (рис. 2в) или иная (рис. 1в, 1г) укладка додекамеров Дпс.

Так как хромосомальная ДНК гетерогенна по своей первичной структуре и составу адьювантов (НАР, липидов, РНК), ее ко-кристаллизация с Дпс должна быть различна на разных участках ДНК. Поэтому, на наш взгляд, в клетках *in cellulo*

кристаллическая структура ДНК-Дпс вряд ли возможна, и методы X-лучевой дифракции выявляют кристаллическую структуру только Дпс-Дпс, а структура ДНК-Дпс не фиксируется (Крупянских et al., 2018).

При снижении в клетке метаболической активности и A_w скорость движения компонентов цитоплазмы замедляется и прекратится, когда концентрация молекул превысит 400 г/л. Происходит стеклование — витрификация цитоплазмы как критическое повышение ее вязкости (Perry et al., 2014), сопровождающееся обратимым прекращением клеточного метаболизма (анабиоз) с приобретением клеткой устойчивости к стрессорным воздействиям. Витрифицированная цитоплазма сохраняет (консервирует) внутриклеточную архитектуру клетки, перешедшей в состояние анабиоза, в том числе — структуру биокристаллизованного нуклеоида (БН). Важным свойством процессов, приводящих к образованию БН, является их обратимость, как отмечено выше, обусловленная относительной нестабильностью додекамерной организации Дпс (Antipov et al., 2017), что обеспечивает реверсию стационарных и покоящихся клеток, содержащих БН, к росту в свежей среде.

В отсутствие благоприятных для роста условий судьба клеток поздней стационарной фазы различна. Обычные стационарные клетки (~99%) автолизуются. В клетках немногочисленной субпопуляции устойчивых к автолизу персисторов на протяжении длительного периода (~1 мес.) их созревания в ПФ могут продолжаться обратимые процессы локальной кристаллизации—декристаллизации линейной ДНК-Дпс с возможным изменением сайтов взаимодействия Дпс с ДНК, что

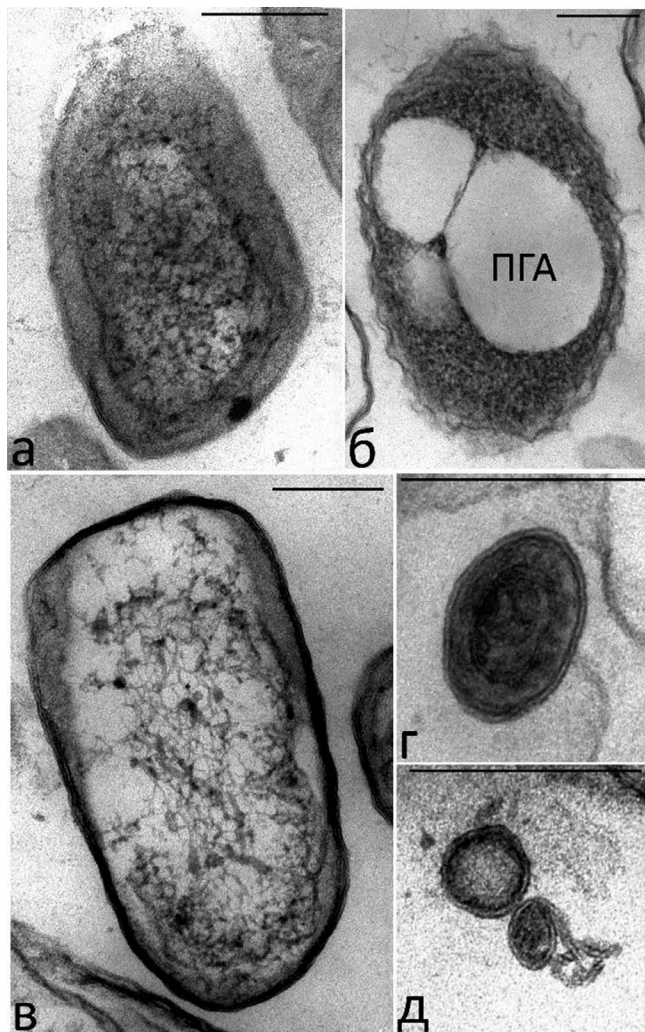


Рис. 14. Тонкие срезы ПФ *P. extremaustralis*, нагретых до 60°C, медленное охлаждение (а–д). Видны: сохранившиеся интактность ПФ II типа (а) и I типа (б) с включениями поли-β-оксимасляной кислоты (ПОМК) (б); нити ДНК потерявшего структурированность компактного нуклеоида (в); самосборка нитей ДНК-Dps в “тороидальные” структуры (г, д). Масштабная метка – 0.2 мкм.

отразится на ко-кристаллизации и укладке нитей ДНК-Dps. Этот процесс возможен только при наличии свободной воды в клетке и будет прекращен вследствие витрификации цитоплазмы, которая фиксирует последние взаимодействия ДНК с Dps в созревших из клеток-персистеров анабиотических ПФ.

Полученные данные о динамике декристаллизации/рекристаллизации БН при нагревании/охлаждении ПФ модельных бактерий, совокупно с анализом информации в области биофизики цитоплазмы, позволяют предложить следующую последовательность событий биокристаллизации нуклеоида в стационарных клетках и персистерах бактерий.

(1) На начальном этапе интенсивный синтез Dps и комплексообразование ДНК с Dps приводят к образованию дополнительных складок и суперскладчатых участков ДНК, которые, как более плотные, обладающие меньшей подвижностью и меньшей долей сайтов, открытых для Dps, будут концентрироваться в центральной области клетки, образуя компактизованный нуклеоид с отходящими от него петлями линейной ДНК. Происходит разделение объема нуклеоида. В центральной области клетки формируется компактизованный нуклеоид, имеющий в сечении вид тороидально или параллельно уложенных тяжей суперскладчатой ДНК разной толщины (рис. 7в, 7Sa, 10б–10г), что наблюдается в ЦПК бактерий, эндоспорах бацилл и ПФ других типов, а также в ПФ *in situ* в вечномёрзлых почвах (1–3 млн. лет) (Soina et al., 2004; Suzina et al., 2006; Лойко и соавт., 2017). Ко-кристаллизация петлевой линейной ДНК-Dps и на ее скелете – Dps-Dps выдавливает мелкие молекулы в центральную область клетки, вследствие чего в ней резко снижается A_w , что индуцирует переход ДНК компактизованного нуклеоида в жидкокристаллическое состояние. (2). На втором этапе продолжающаяся ко-кристаллизация Dps с петлевой линейной ДНК обуславливает ее компактизацию в объеме цитоплазмы в виде тороидально или параллельно уложенных нитей ДНК-Dps (рис. 2в, 2г, 2Sa, 3б), что многократно демонстрировалось ранее (Frenkel-Krispin, 2001). (3). На третьем этапе происходят кристаллизация Dps-Dps, повторяющая матричную укладку петлевой линейной ДНК-Dps, а также многослойная укладка Dps-Dps, заполняющая периферический объем цитоплазмы.

Такая структурная организация свойственна БН как стареющих стационарных (48–72 ч), так и покоящихся клеток бактерий (1 мес.–миллионы лет), которые, однако, существенно различаются степенью фенотипической гетерогенности популяций, вырастающих при их посеве на свежую среду (Кряжевских и соавт., 2013; Мулюкин и соавт., 2014). Так как молекулярно-генетические события в уже сформированном БН невозможны, отмеченные различия могут быть следствием только физико-химических процессов, связанных с протекающей ко-кристаллизацией ДНК-Dps, при этом, по-видимому, суперспирализованной линейной ДНК-Dps, так как структура компактизованного нуклеоида первична и очень устойчива, в наших экспериментах при нагревании/охлаждении ПФ она не менялась.

Влияние биокристаллизации нуклеоида на проявление фенотипической гетерогенности популяции, вырастающей из ПФ. Недавние исследования обнаружили, что функциональная активность Dps не ограничивается его участием в обратимой супрессии транскрипционной функции ДНК, Dps также

Таблица 1. Соотношение доли (%) диссоциантов доминантного (S) и суммарно минорных (Sm + SCV) фенотипов в популяциях, выросших из прогретых ПФ *E. coli* (2 мес. хранения) без остывания

Температура прогрева, °C	Общее число, КОЕ/мл	Численность диссоциантов, КОЕ/мл			Доля диссоциантов, %	
		S	Sm	SCV	S	Sm + SCV
Контроль*	4.1×10^6	2.6×10^6	1.4×10^6	1×10^5	63	37
45	3.8×10^6	2.2×10^6	1.5×10^6	1.1×10^6	58	42
50	2.3×10^6	1.4×10^6	0.9×10^6		61	39
55	2×10^4	1.1×10^4	0.9×10^4		55	45
60	2.5×10^4	1.65×10^4	0.85×10^4		67	42
65	2×10^2	1×10^2	1×10^2		50	50
70	2×10^2	1×10^2	1×10^2		50	50

*Численность и доли диссоциантов в вариантах без прогревания ПФ.

Таблица 2. Соотношение доли (%) диссоциантов доминантного (S) и суммарно минорных (Sm + SCV) фенотипов в популяциях, выросших из прогретых и затем резко охлажденных ПФ *E. coli* (2 мес. хранения)

Температура прогрева, °C	Общее число, КОЕ/мл	Численность диссоциантов, КОЕ/мл			Доля диссоциантов, %	
		S	Sm	SCV	S	Sm + SCV
Контроль	1.1×10^7	0.55×10^6	0.3×10^6	0.25×10^5	50	50
45	9.7×10^6	0.7×10^6	6.3×10^6	2.7×10^6	7	93
50	3.2×10^6	0.6×10^6	0.9×10^6	1.7×10^6	18	82
60	2.4×10^5	0.6×10^5	0.4×10^5	1.4×10^5	24	78
65	2.2×10^5	0.5×10^5	0.5×10^5	1.2×10^5	23	77

Таблица 3. Соотношение доли (%) диссоциантов доминантного (S) и суммарно минорных (Sm + SCV) фенотипов в популяциях, выросших из прогретых и затем постепенно охлажденных при комнатной температуре ПФ *E. coli* (2 мес. хранения)

Температура прогрева, °C	Общее число, КОЕ/мл	Численность диссоциантов, КОЕ/мл			Доля диссоциантов, %	
		S	Sm	SCV	S	Sm+SCV
Контроль	1.1×10^7	0.55×10^7	0.3×10^7	0.25×10^7	50	50
45	7.4×10^6	1.6×10^6	2.2×10^6	1.6×10^6	29	71
50	7.7×10^6	2.6×10^6	1.5×10^6	3.6×10^6	34	66
60	1.7×10^5	0.7×10^5	0.4×10^5	0.6×10^5	39	61
65	1.2×10^5	0.39×10^5	0.44×10^5	0.37×10^5	33	67
70	2.4×10^3	1.0×10^3	0.6×10^3	0.8×10^3	42	58

влияет на ее транскрипционный профиль (Antipov et al., 2017). Распределение Dps на хромосомальной ДНК имеет неслучайный характер. В *E. coli* регионы его связывания с ДНК перекрываются сайтами, занятыми другими NAPs, что может влиять на связывание Dps с ДНК, а с другой стороны, Dps может вмешиваться в транскрипционную регуляцию других NAPs (Melekhov et al., 2015).

Если специфичность связывания ДНК с Dps и другими NAPs влияет на реализацию определенной транскрипционной программы ДНК в прорастающих ПФ, то нарушения этой сайт-специфичности ДНК-NAPs, вызванные нагреванием/охлаждением

ПФ, будут влиять на изменения транскрипционного профиля (фенотип) в популяции прорастающих ПФ. В настоящем исследовании было показано, что собственно нагревание ПФ *E. coli* (45–60°C, 15 мин) без последующего остывания, приводящее к декристаллизации петельной линейной ДНК-Dps при сохранении структурированности компактизованного нуклеоида (рис. 4, 5, 6), не влияло на диссоциативный спектр популяции прорастающих ПФ (табл. 1). Однако последующее охлаждение прогретых ПФ, при котором происходила рекристаллизация петельной линейной ДНК-Dps, достоверно изменяло степень фенотипической гетерогенности

популяций, вырастающих из ПФ *E. coli* (табл. 2, 3). Из полученных результатов следует, что на изменение транскрипционной программы клетки, вырастающей из ПФ, влияет процесс не декристаллизации, а рекристаллизации ДНК-Dps, при котором, по-видимому, происходило связывание Dps не только с прежними, но и другими, также афинными для Dps сайтами и, возможно, частично оккупированными другими NARs, что влияло на реализацию альтернативных доминантному фенотипов.

Экстраполируем полученные результаты на процесс созревания персистеров в ПФ. Отметим, что 48–72 ч персистеры, в которых, в силу их крайне низкого метаболизма, в отличие от стационарных ординарных клеток, еще не сформировался БН, вырастают на свежей среде как родительский фенотип (доминантный), что неоднократно отмечалось в литературе (Van den Bergh et al., 2016; Balaban et al., 2019). Однако длительно инкубируемые (не менее 1 мес.) персистеры, созревшие в ПФ, вырастают популяцией, содержащей 40–50% альтернативных фенотипов (табл. 1). То есть принципиально важным фактором для появления гетерогенности популяций, вырастающих из ПФ является длительность процессов биокристаллизации нуклеоида ПФ, так как это может обуславливать возможность процессов декристаллизации/рекристаллизации на отдельных участках петельной линейной ДНК-Dps в созревающих ПФ, аналогично процессам, наблюдаемым при нагревании/охлаждении ПФ. Такой обратимый процесс локальной компактизации ко-кристаллизованной ДНК-Dps – декомпактизация ДНК без Dps (Vtyurina et al., 2016), при этом, возможно, неоднократный за длительный период созревания персистеров в ПФ, может быть причиной изменения сайтов связывания ДНК-Dps и затем – топологии ДНК, аналогично показанному в модели нагревания–охлаждения ПФ. Эти события, протекающие стохастически в разных областях петельной ко-кристаллизованной ДНК-Dps и в разных клетках-персистерах, созревающих в ПФ, случайным образом прекратятся в силу наступившей витрификации цитоплазмы как последнего этапа созревания П в ПФ и приобретения ими анабиотического состояния. Это объясняет гетерогенность диссоциативного фенотипического спектра вырастающих из ПФ популяций. Важно подчеркнуть, что этот процесс был эволюционно закреплён как адаптивное свойство популяции, которая выживает в неростовых условиях в виде ПФ и сохраняет вид в результате прорастания ПФ спектром диссоциантов, свойственных этому виду (штамму).

Таким образом, впервые с использованием модели нагревания/охлаждения цистоподобных ПФ неспорообразующих бактерий определена последовательность этапов структурной организации

биокристаллического нуклеоида. Показано, что на изменение диссоциативного спектра популяции, вырастающей из прогретых/охлажденных ПФ, по сравнению с вырастающей из нативных ПФ, влияет не процесс декристаллизации (нагревание ПФ) петельной линейной ДНК-Dps, а процесс ее рекристаллизации (охлаждение ПФ) при сохранении структурированности компактизованного нуклеоида. Полученные данные подчеркивают и расширяют важную роль физико-химических процессов в структурной организации клеток бактерий, которая определяет уровень и тип их функциональной активности в соответствии с условиями окружающей среды. Биокристаллизация нуклеоида как физико-химическая консервация ко-кристаллизованной хромосомальной ДНК-Dps в кристаллическом массиве Dps-Dps обеспечивает не только стрессопротекторную защиту ДНК и супрессию ее транскрипционной функции в ПФ, но и фенотипическую гетерогенность вырастающих из ПФ популяций.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кряжевских Н.А., Демкина Е.В., Лойко Н.Г., Колганова Т.В., Соина В.С., Манучарова Н.А., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Сравнение адаптационного потенциала изолятов из вечномерзлых осадочных пород *Arthrobacter oxydans* и *Acinetobacter lwoffii* и их коллекционных аналогов // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 27–41.
- Kryazhevskikh N.A., Demkina E.V., Loiko N.G., Baslerov R.V., Kolganova T.V., Soina V.S., Manucharova N.A., Gal'chenko V.F., El'-Registan G.I. Comparison of the adaptive potential of the *Arthrobacter oxydans* and *Acinetobacter lwoffii* isolates from permafrost sedimentary rock and the analogous collection strains // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 29–42.
- Лойко Н.Г., Козлова А.Н., Николаев Ю.А., Гапонов А.М., Тутельян А.В., Эль-Регистан Г.И. Влияние стресса на образование антибиотикотолерантных клеток *Escherichia coli* // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 595–609.

- Loiko N.G., Kozlova A.N., Nikolaev Yu.A., Gaponov A.M., Tutel'yan A.V., El'-Registan G.I. Effect of stress on emergence of antibiotic-tolerant *Escherichia coli* cells // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 595–609.
- 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., Крупнянский 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., Zubashева M.V., Azizbekyan R.R., Sinitsyn D.O., Tereshkina K.B., Nikolaev Yu.A., Krupnyanskiy Yu.F., El'-Registan G.I. Biocrystalline structures in the nucleoids of the stationary and dormant prokaryotic cells // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 714–727.
- Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Сорокин В.В., Сузина Н.Е., Чердынцева Т.А., Котова И.Б., Гапоннов 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., Cherdynitseva 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. 751–763.
- Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Мельников В.Г., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Состояние покоя и фенотипическая вариабельность у *Staphylococcus aureus* и *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 15–27.
- Mulyukin A.L., Suzina N.E., Mel'nikov V.G., Gal'chenko V.F., El'-Registan G.I. Dormant state and phenotypic variability of *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 149–159.
- Николаев Ю.А., Лойко Н.Г., Демкина Е.В., Атрошчик Е.А., Константинов А.И., Перминова И.В., Эль-Регистан Г.И. Функциональная активность гуминовых веществ в пролонгировании выживания популяции углеводородокисляющей бактерии *Acinetobacter junii* // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 74–87.
- Nikolaev Yu.A., Loiko N.G., Demkina E.V., Atroshchik E.A., Konstantinov A.I., Perminova I.V., El'-Registan G.I. Functional activity of humic substances in survival prolongation of populations of hydrocarbon-oxidizing bacteria *Acinetobacter junii* // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 74–85.
- Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 446–456.
- El-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Yu.A., Suzina N.E., Gal'chenko V.F., Duda V.I. Adaptogenic functions of extracellular autoregulators of microorganisms // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 380–389.
- Abbondanzieri E.A., Vtyurina N., Meyer A. Nucleoid reorganization by the stress response protein Dps // Biophys. J. 2014. V. 106. P. 79a.
- Albi E., Magni M.P.V. The role of intranuclear lipids // Biol. Cell. 2004. V. 96. P. 657–667.
- Antipov S.S., Tutukina M.N., Preobrazhenskaya E.V., Kondrashov F.A., Patrushev M.V., Toshchakov S.V., Dominova I., Shvyreva U.S., Vrublevskaya V.V., Morenkov O.S., Sukharicheva N.A., Panyukov V.V., Ozoline O.N. The nucleoid protein Dps binds genomic DNA of *Escherichia coli* in a non-random manner // PLoS One. 2017. V. 12. Art. e0182800.
- Azam T.A., Iwata A., Nishimura A., Ueda S., Ishihama A. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid // J. Bacteriol. 1999. V. 181. P. 6361–6370.
- Balaban N.Q., Helaine S., Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D.I., Brynildsen M.P., Bumann D., Camilli A., Collins J.J., Dehio C., Fortune S., Ghigo J.-M., Hardt W.-D., Harms A., Heinemann M., Hung D.T., Jenal U., Levin B.R., Michiels J., Storz G., Tan M.-W., Tenson T., Melder L., Zinkernagel A. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence // Nat. Rev. Microbiol. 2019. V. 17. P. 441–448.
- Dadinova L.A., Chesnokov Y.M., Kamyshinsky R.A., Orlov I.A., Petoukhov M.V., Mozhaev A.A., Soshinskaya E.Yu., Lazarev V.N., Manuvera V.A., Orekhov A.S., Vasiliev A.L., Shtykova E.V. Protective Dps–DNA co-crystallization in stressed cells: an *in vitro* structural study by small-angle X-ray scattering and cryo-electron tomography // FEBS Lett. 2019. V. 593. P. 1360–1371.
- Dame R.T., Rashid F.Z.M., Grainger D.C. Chromosome organization in bacteria: mechanistic insights into genome structure and function // Nature Rev. Genet. 2020. V. 21. P. 227–242.
- Espeli O., Mercier R., Boccard F. DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome // Mol. Microbiol. 2008. V. 68. P. 1418–1427.
- Frenkiel-Krispin D., Ben-Avraham I., Englander J., Shimon E., Wolf S.G., Minsky A. Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria // Mol. Microbiol. 2004. V. 51. P. 395–405.
- Frenkiel-Krispin D., Levin-Zaidman S., Shimon E., Wolf S.G., Wachtel E.J., Arad T., Minsky A. Regulated phase transitions of bacterial chromatin: a non-enzymatic pathway for generic DNA protection // EMBO J. 2001. V. 20. P. 1184–1191.
- Grant R.A., Filman D.J., Finkel S.E., Kolter R., Hogle J.M. The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA // Nature Struct. Biol. 1998. V. 5. P. 294–303.
- Grosberg A.Y., Nechaev S.K., Shakhnovich E.I. The role of topological constraints in the kinetics of collapse

- of macromolecules // *J. Physique*. 1988. V. 49. P. 2095–2100.
- Karas V.O., Westerlaken I., Meyer A.S. The DNA-binding protein from starved cells (Dps) utilizes dual functions to defend cells against multiple stresses // *J. Bacteriol.* 2015. V. 197. P. 3206–3215.
- Krupyanskii Y.F., Loiko N.G., Sinitsyn D.O., Tereshkina K.B., Tereshkin E.V., Frolov I.A., Chulichkov A.L., Bokareva D.A., Mysyakina I.S., Nikolaev Y.A., El'-Registan G.I., Popov V.O., Sokolova O.S., Shaitan K.V., Popov A.N. Biocrystallization in bacterial and fungal cells and spores // *Crystallogr. Rep.* 2018. V. 63. P. 594–599.
- Krupyanskii Y.F. Determination of DNA architecture of bacteria under various types of stress, methodological approaches, problems, and solutions // *Biophys. Rev.* 2023. V. 15. P. 1035–1051.
- Melekhov V.V., Shvyreva U.S., Timchenko A.A., Tutukina M.N., Preobrazhenskaya E.V., Burkova D.V., Artiukhov V.G., Ozoline O.N., Antipov S.S. Modes of *Escherichia coli* Dps interaction with DNA as revealed by atomic force microscopy // *PLoS One*. 2015. V. 10. Art. e0126504.
- Mika J.T., Poolman B. Macromolecule diffusion and confinement in prokaryotic cells // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011. V. 22. P. 117–126.
- Minsky A., Shimon E., Frenkiel-Krispin D. Stress, order and survival // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2002. V. 3. P. 50–60.
- Mourão M.A., Hakim J.B., Schnell S. Connecting the dots: the effects of macromolecular crowding on cell physiology // *Biophys. J.* 2014. V. 107. P. 2761–2766.
- Nikolaev Y.A., Loiko N.G., Galuza O.A., Mardanov A.V., Beletskii A.V., Deryabin D.G., Demkina E.V., El'-Registan G.I. Transcriptome analysis of *Escherichia coli* dormant cystlike cells // *Microbiology (Moscow)*. 2023. V. 92. P. 775–791.
- Orban K., Finkel S.E. Dps is a universally conserved dual-action DNA-binding and ferritin protein // *J. Bacteriol.* 2022. V. 204. Art. e00036–22.
- 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.
- Postow L., Hardy C.D., Arsuaga J., Cozzarelli N.R. Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome // *Genes Dev.* 2004. V. 18. P. 1766–1779.
- Soina V.S., Mulyukin A.L., Demkina E.V., Vorobyova E.A., El'-Registan G.I. The structure of resting microbial populations in soil and subsoil permafrost // *Astrobiology*. 2004. V. 4. P. 348–358.
- Suzina N.E., Mulyukin A.L., Dmitriev V.V., Nikolaev Yu.A., Shorokhova A.P., Bobkova Yu.S., Barinova E.S., Plakunov V.K., El'-Registan G.I., Duda V.I. The structural bases of long-term anabiosis in non-spore-forming bacteria // *J. Adv. Space Res.* 2006. V. 38. P. 1209–1219.
- Van den Bergh B., Michiels J.E., Wenseleers T., Windels E.M., Boer P.V., Kestemont D., De Meester L., Verstrepen K.J., Verstraeten N., Fauvart M., Michiels J. Frequency of antibiotic application drives rapid evolutionary adaptation of *Escherichia coli* persistence // *Nat. Microbiol.* 2016. V. 1. Art. 16020.
- Vtyurina N.N., Dulin D., Docter M.W., Meyer A.S., Dekker N.H., Abbondanzieri E.A. Hysteresis in DNA compaction by Dps is described by an Ising model // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. P. 4982–4987.
- Willenbrock H., Ussery D.W. Chromatin architecture and gene expression in *Escherichia coli* // *Genome Biol.* 2004. V. 5. Art. 252.
- Zaccarelli E., Buldyrev S.V., La Nave E., Moreno A.J., Saika-Voivod I., Sciortino F., Tartaglia P. Model for reversible colloidal gelation // *Phys. Rev. Lett.* 2005. V. 94. Art. 218301.

EXPERIMENTAL ARTICLES

The Structure of the Biocrystalline Nucleoid and Its Role in the Regulation of Dissociative Phenotypic Heterogeneity of Microbial Populations

G. I. El'-Registan¹, N. E. Suzina², E.V. Demkina^{1, *}, Yu. A. Nikolaev¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, FRC Fundamental of Biotechnology RAS, Moscow, 119071 Russia

²Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Pushchino Scientific Center for Biological Research RASciences, Pushchino, 142290, Russia

*e-mail: elenademkina@mail.ru

The survival of the microbial population in constantly changing environmental conditions, including those unfavorable for growth, is ensured by: (1) the formation of a subpopulation of persister cells (P), maturing into ametabolic quiescent forms (RF); (2) protection of chromosomal DNA of stationary cells using the physicochemical mechanism of its co-crystallization with the nucleoid-associated

protein Dps and the formation of a biocrystalline nucleoid (BN); (3) the ability of RF to germinate in a fresh environment with a mixed population of phenotypically different dissociators, one of which will be the most adaptive to it. This study addressed two questions: (1) how BN is structurally organized in prokaryotic RFs, and (2) how nucleoid biocrystallization is related to the phenotypic heterogeneity of populations growing from RFs. The work proposes a new model of BN decrystallization/recrystallization during heating/cooling of RF at sublethal temperatures in a non-growth environment, which reproduces the dynamics of BN formation in the model of nucleoid organization as a folded globule. Electron microscopic analysis of structural changes in BN in heated/cooled RFs, together with the determination of the dissociative spectra of the populations growing from them, allowed us to obtain the following new information. Biocrystallization of the nucleoid occurs in the following sequence: (1) the beginning co-crystallization of DNA-Dps is accompanied by the division of the nucleoid volume with the formation of a compacted nucleoid from superfolded DNA in the central region of the cell and loops of superfolded linear DNA extending from it; (2) co-crystallization of looped DNA-Dps with its different geometric arrangement – toroidal, lamellar, etc.; (3) crystallization of Dps-Dps, repeating the template folding of looped DNA-Dps and the formation of a multilayer structure of the Dps-Dps crystalline array. It was found that the actual heating of the PF (45–700C, 15 min), leading to decrystallization of looped DNA-Dps while maintaining the structure of the compacted nucleoid, does not affect the dissociative (colonial-morphological) spectrum of the population growing from the PF. The change in its dissociative spectrum is influenced by the process of DNA-Dps recrystallization, during which, apparently, Dps binds not only to the former, but also to other DNA sites, also affinity for Dps and, possibly, partially occupied by other nucleoid-associated proteins, which influences changes in DNA topology and its transcription.

Keywords: biocrystalline nucleoid, structure, bacteria, resting forms (RF), de/recrystallization of DNA-Dps, heating/cooling of RF, phenotypic heterogeneity of populations