



## Картирование ДНК в капсиде гигантского бактериофага *phiEL (Caudovirales: Myoviridae: Elvirus)* с помощью аналитической электронной микроскопии

Трифонова Т.С.<sup>1,2\*</sup>, Моисеенко А.В.<sup>2,3\*</sup>, Буркальцева М.В.<sup>4</sup>, Шабурова О.В.<sup>4</sup>, Шайтан А.К.<sup>2</sup>, Крылов В.Н.<sup>4</sup>, Соколова О.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», факультет физико-математических и естественных наук, 115419, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра биоинженерии, 119234, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ФГБУН «Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук», 119334, Москва, Россия;

<sup>4</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия

**Введение.** Гигантские *phiKZ*-подобные бактериофаги имеют внутри капсида уникальное белковое образование – внутреннее тело (ВТ), на которое навита суперскрученная ДНК. Стандартные подходы, используемые в криоэлектронной микроскопии (криоЭМ), не позволяют отличить эту структуру от окружающей её молекулы нуклеиновой кислоты фага. Ранее нами разработан аналитический подход для визуализации комплексов ДНК с белком на срезах бактериальных клеток *Escherichia coli* с использованием в качестве маркера химического элемента фосфора. В настоящем исследовании мы адаптировали данную методику к значительно более мелким объектам – капсидам *phiKZ*-подобных бактериофагов.

**Материал и методы.** В исследовании применялись методы электронной микроскопии: аналитическая (АЭМ) (спектроскопия характеристических потерь энергии электронами, СХПЭЭ) и криоЭМ (сравнение изображений образцов с низкой и высокой дозой электронного облучения).

**Результаты.** Мы изучили упаковку молекулы ДНК внутри капсидов гигантских бактериофагов *phiEL* из семейства *Myoviridae*, инфицирующих *Pseudomonas aeruginosa*. Построены карты распределения фосфора, показавшие несимметричное расположение ДНК внутри капсида.

**Обсуждение.** Мы разработали и применили методику визуализации ВТ с использованием высокоуглового темнопольного детектора (HAADF) и аналитического подхода СПЭМ-СХПЭЭ. Картирование распределения фосфора посредством СХПЭЭ и результаты криоЭМ выявили белковую структуру внутри капсида фагов *phiEL* в виде ВТ, размер которого был оценён с помощью теоретических расчётов.

**Заключение.** Разработанная методика может применяться для исследования распределения фосфора в других ДНК- или РНК-содержащих вирусах при сравнительно низких содержаниях искомого элемента.

**Ключевые слова:** гигантский бактериофаг; *phiEL*; *Pseudomonas aeruginosa*; внутреннее тело (ВТ); аналитическая электронная микроскопия (АЭМ); спектроскопия характеристических потерь энергии электронами (СХПЭЭ); криоэлектронная микроскопия (криоЭМ); «путь-звёздчатая диаграмма»

**Для цитирования:** Трифонова Т.С., Моисеенко А.В., Буркальцева М.В., Шабурова О.В., Шайтан А.К., Крылов В.Н., Соколова О.С. Картирование ДНК в капсиде гигантского бактериофага *phiEL (Caudovirales: Myoviridae: Elvirus)* с помощью аналитической электронной микроскопии. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(6): 434-441. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-80>

**Для корреспонденции:** Соколова Ольга Сергеевна, д-р биол. наук, профессор РАН, профессор кафедры биоинженерии биологического факультета, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119234, Москва, Россия. E-mail: [sokolova@mail.bio.msu.ru](mailto:sokolova@mail.bio.msu.ru)

**Участие авторов:** Трифонова Т.С. – проведение экспериментов по аналитической микроскопии; Моисеенко А.В. – проведение экспериментов по аналитической микроскопии, редактирование текста; Буркальцева М.В. – получение в высоком титре и очистка бактериофагов; Шабурова О.В. – выполнение криоэлектронной микроскопии; Шайтан А.К. – проведение теоретических расчётов; Крылов В.Н. – организация экспериментов; Соколова О.С. – выполнение криоэлектронной микроскопии, написание текста, резюме, общая редакция статьи.

**Финансирование.** Данное исследование финансировалось за счёт гранта Российского научного фонда (№ 21-44-07002).

**Благодарности.** Спектры характеристических потерь энергии электронами получены с использованием уникальной научной установки (УНУ) «3D-ЭМС» биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Криоэлектронная микроскопия проводилась в Федеральном научно-исследовательском центре «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 30.09.2021

Принята в печать 22.10.2021

Опубликована 30.12.2021

\*Первые авторы статьи

## ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-80>

# DNA mapping in the capsid of giant bacteriophage phiEL (*Caudovirales: Myoviridae: Elvirus*) by analytical electron microscopy

Tatiana S. Trifonova<sup>1,2\*</sup>, Andrey V. Moiseenko<sup>2,3\*</sup>, Maria V. Bourkaltseva<sup>4</sup>,  
Olga V. Shaburova<sup>4</sup>, Alexey K. Shaytan<sup>2</sup>, Victor N. Krylov<sup>4</sup>, Olga S. Sokolova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>FSAEI HE «People's Friendship University of Russia», Physical, Mathematical, and Natural Sciences Department, 115419, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>FSBEI HE «Lomonosov Moscow State University», Bioengineering Department, Biological Faculty, 119234, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>FSBIS «N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences», 119234, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>FSBRI «I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia

**Introduction.** Giant phiKZ-like bacteriophages have a unique protein formation inside the capsid, an inner body (IB) with supercoiled DNA molecule wrapped around it. Standard cryo-electron microscopy (cryo-EM) approaches do not allow to distinguish this structure from the surrounding nucleic acid of the phage. We previously developed an analytical approach to visualize protein-DNA complexes on *Escherichia coli* bacterial cell slices using the chemical element phosphorus as a marker. In the study presented, we adapted this technique for much smaller objects, namely the capsids of phiKZ-like bacteriophages.

**Material and methods.** Following electron microscopy techniques were used in the study: analytical (AEM) (electron energy loss spectroscopy, EELS), and cryo-EM (images of samples subjected to low and high dose of electron irradiation were compared).

**Results.** We studied DNA packaging inside the capsids of giant bacteriophages phiEL from the *Myoviridae* family that infect *Pseudomonas aeruginosa*. Phosphorus distribution maps were obtained, showing an asymmetrical arrangement of DNA inside the capsid.

**Discussion.** We developed and applied an IB imaging technique using a high angle dark-field detector (HAADF) and the STEM-EELS analytical approach. Phosphorus mapping by EELS and cryo-electron microscopy revealed a protein formation as IB within the phage phiEL capsid. The size of IB was estimated using theoretical calculations.

**Conclusion.** The developed technique can be applied to study the distribution of phosphorus in other DNA- or RNA-containing viruses at relatively low concentrations of the element sought.

**Keywords:** *giant bacteriophage; phiEL; Pseudomonas aeruginosa; inner body (IB); analytical electron microscopy (AEM); electron energy loss spectroscopy (EELS); cryo-electron microscopy (cryo-EM); «bubblegram imaging»*

**For citation:** Trifonova T.S., Moiseenko A.V., Bourkaltseva M.V., Shaburova O.V., Shaytan A.K., Krylov V.N., Sokolova O.S. DNA mapping in the capsid of giant bacteriophage phiEL (*Caudovirales: Myoviridae: Elvirus*) by analytical electron microscopy. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(6): 434-441. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-80>

**For correspondence:** Olga S. Sokolova, D.Sci. (Biol.), RAS Professor, Professor of Bioengineering Department, Biological Faculty, FSBEI HE «Lomonosov Moscow State University, 119234, Moscow, Russia. E-mail: [sokolova@mail.bio.msu.ru](mailto:sokolova@mail.bio.msu.ru)

## Information about the authors:

Trifonova T.S., <http://orcid.org/0000-0003-2042-5244>

Moiseenko A.V., <http://orcid.org/0000-0003-1112-2356>

Bourkaltseva M.V., <http://orcid.org/0000-0003-3793-1354>

Shaburova O.V., <http://orcid.org/0000-0003-0368-3794>

Shaytan A.K., <http://orcid.org/0000-0003-0312-938X>

Krylov V.N., <http://orcid.org/0000-0001-5775-5146>

Sokolova O.S., <http://orcid.org/0000-0003-4678-232X>

**Contribution:** Trifonova T.S. – analytical microscopy experiments; Moiseenko A.V. – analytical microscopy experiments, text editing; Bourkaltseva M.V. – preparation of high-titer phage stocks and bacteriophage purification; Shaburova O.V. – cryo-electron microscopy performing; Shaytan A.K. – carrying out theoretical calculations; Krylov V.N. – experiment organization; Sokolova O.S. – cryo-electron microscopy performing, writing of the text, summary, general editing of the article.

**Funding.** This study was funded by a grant from the Russian Science Foundation (No. 21-44-07002).

**Acknowledgement.** EELS spectra were obtained using a unique scientific setup «3D-EMS» of the Biological Faculty, FSBEI HE «Lomonosov Moscow State University». Cryo-EM was performed at the Federal Science Research Center for Crystallography and Photonics of the Russian Academy of Sciences.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest.

Received 30 September 2021

Accepted 22 October 2021

Published 30 December 2021

\*Shared first co-authorship

## Введение

Бактериофаги (или фаги) – это вирусы, заражающие бактерии и использующие их ресурсы для своего размножения. Данные микроорганизмы чрезвычайно распространены в естественной среде, при этом большинство из них специфичны в отношении определённых видов бактерий. Система фаг–бактерия часто используется в качестве модельной для изучения этапов жизненного цикла вирусов и понимания механизмов, с помощью которых бактериальные гены могут передаваться от одной бактерии к другой [1].

Хвостатые бактериофаги, содержащие двухцепочечную ДНК, представляют собой филогенетически самую древнюю и наиболее распространённую группу бактериальных вирусов. Порядок *Caudovirales* включает 3 семейства: *Podoviridae*, *Siphoviridae* и *Myoviridae*. Фаги семейства *Mioviridae* составляют около 25% всех фагов *Caudovirales* и отличаются наличием особой структуры – длинного сократимого хвоста. Представители этой группы поражают многие патогенные бактерии, такие как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium*, *Clostridium*, *Salmonella* и др. Гигантские бактериофаги семейства *Myoviridae* инфицируют также *Pseudomonas aeruginosa* (phiKZ, phiEL, phiLin68), *Bacillus subtilis* (AR9), а также *Pseudomonas chlororaphis* (фаг 201phi2-1) и *Erwinia amylovora* (vB\_EamM [2]). Поэтому указанные бактериофаги находят широкое применение в фаговой терапии [3], что значительно расширяет практические возможности медицины и ветеринарии, позволяя в ряде случаев избежать излишнего применения антибиотиков.

В настоящее время число найденных новых гигантских фагов ежегодно увеличивается. Структура некоторых из них изучена с помощью криоэлектронной микроскопии (криоЭМ) [4, 5]), и геномы их секвенированы [6, 7]. Гигантские phiKZ-подобные бактериофаги, активные на бактериях *P. aeruginosa*, имеют кольцевую генетическую карту (признак фагов, реплицирующихся через образование конкатимеров и имеющих терминальную избыточность генома), при этом суперскрученная молекула ДНК намотана вокруг спирального образования – внутреннего тела (ВТ) белковой природы [5, 8–10]. Считается, что в процессе инфицирования клетки-хозяина белки ВТ совместно с ДНК участвуют в транскрипции ранних генов [11, 12].

Первое упоминание о ВТ гигантских бактериофагов относится ещё к 1984 г., когда фаг phiKZ подвергли процедуре замораживания–оттаивания [9]. В ходе эксперимента из разрушенных капсидов вместе с ДНК произошло высвобождение катушкоподобных структур. Авторы предположили, что эти образования могут выполнять функцию поддержки ДНК в гигантском капсиде. Позже атомно-силовая микроскопия (АСМ) также показала выход ВТ из частично разрушенных капсидов phiKZ [13]. Наконец, через 30 лет после первого обнаружения указанных образований была представлена криотехника, названная «пузырь-

ковой диаграммой» (англ. «bubblegram imaging»), позволившая окончательно доказать наличие ВТ внутри капсидов гигантских фагов [5, 10] и даже построить его трёхмерную реконструкцию [10]. С этого времени начались экспериментальные исследования, в которых другие фаги и вирусы подвергались облучению высокими дозами электронов для выявления белковых структур внутри капсида [14–16].

На сегодняшний день в биологии находят широкое применение различные виды просвечивающей электронной микроскопии, в частности сканирующая (растровая) просвечивающая электронная микроскопия (СПЭМ). С целью установления элементного состава различных образцов возможно использование аналитической электронной микроскопии (АЭМ). Наиболее надёжным и простым способом является энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДРС), предоставляющая возможность осуществлять пространственно-разрешённый элементный анализ на срезах клеток с большим количеством искомым элементов, а также детектировать клеточные включения [17], эндокринные гранулы [18], наночастицы [19]. Мы применили эту методику для визуализации комплексов ДНК с белком Dps на срезах бактериальных клеток *E. coli* [20], используя как маркер химический элемент фосфор (1 молекула ДНК содержит 2 фосфатные группы на каждую пару нуклеотидов).

Более сложный метод – спектроскопия характеристических потерь энергии электронов (СХПЭЭ), предназначенная для работы с тонкими структурами спектров элементов, определения характера химических связей и полосы проводимости веществ. Среди ранних исследований с использованием СХПЭЭ следует отметить её применение для пространственно-разрешённого анализа фосфора в нуклеиновых кислотах и изучения их пространственной организации на срезах [21]. Картирование фосфора описано также для ультратонких срезов вирусов мышиной лейкемии (MuLV, murine leukemia virus) [22], замороженных личинок дрозофил (*Drosophila*) [23] и плёнок, образованных бактериофагами  $\lambda$  [24]. Все эти эксперименты выполнены при помощи энергетически фильтруемой просвечивающей электронной микроскопии (energy-filtered transmission electron microscopy, EFTEM).

В настоящей работе мы значительно повысили чувствительность метода, применив СПЭМ–СХПЭЭ-анализ и использовав охлаждающий держатель образцов для минимизации радиационного повреждения. Это позволило картировать ДНК в значительно меньшем по размеру объекте – капсиде гигантского бактериофага phiEL (диаметр 145 нм). В результате мы впервые продемонстрировали присутствие ВТ внутри капсида данного фага с использованием аналитических подходов: темнопольного изображения в высокоугловых рассеянных электронах (high-angle annular dark-field, HAADF) и СХПЭЭ. Валидация предложенной методики проведена с помощью криоЭМ и теоретического моделирования.

## Материал и методы

### *Получение в высоком титре и очистка бактериофага phiEL*

Фаг из отдельной негативной колонии вносили в верхний слой полужидкого (0,6%) агара, содержащего  $1 \times 10^8$  КОЕ/мл (КОЕ – колониеобразующая единица) чувствительных бактерий. Смесь помещали на чашки с плотной средой, которые затем инкубировали 16–18 ч при температуре 37 °С. Верхний слой снимали шпателем и ресуспендировали в 0,9% растворе хлорида натрия (NaCl), после чего препарат обрабатывали хлороформом (CHCl<sub>3</sub>) и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 30 мин для удаления агара и остатков клеток. Дальнейшую очистку фага проводили в градиенте хлорида цезия (CsCl) (плотность от 1,33 до 1,6) по методу, описанному J. Sambrook и соавт. [25], путём центрифугирования при 22 000 об/мин на протяжении 4 ч. Материал из полосы, соответствовавшей фагу phiEL, отбирали и освобождали от CsCl посредством диализа 16–18 ч на льду против 0,01 М Трис-HCl буфера, содержащего 0,2 М NaCl и 0,002 М хлорида магния (MgCl<sub>2</sub>), при pH 7,5.

### *Криоэлектронная микроскопия*

3 мкл очищенных бактериофагов (концентрация  $1 \times 10^{12}$  БОЕ/мл) (БОЕ – бляшкообразующая единица) наносили на сетку Quantifoil R 1.2/1.3 (Quantifoil, Германия), обработанную в атмосфере тлеющего разряда в приборе Emitech K100X (Quorum Technologies, Great Britain, England). Сетки замораживали в жидком этане (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>) в установке Vitrobot Mark III (FEI, США) при следующих параметрах: время промакивания 2 с, температура климатической камеры +4 °С, влажность – 95%; после этого их хранили в жидком азоте (N<sub>2</sub>) до использования. Для изучения сетки переносили при температуре жидкого азота (–195,8 °С) в криоэлектронный просвечивающий микроскоп Tecnai G<sup>2</sup>12 SPIRIT (FEI), работающий при ускоряющем напряжении 120 кВ. Изображения получали с увеличением  $\times 50\,000$  при помощи ПЗС-камеры (ПЗС – прибор с зарядовой связью/переносом заряда) Eagle 4K $\times$ 4K (FEI) с размером матрицы 4000  $\times$  4000 пикс. Размер 1 пикс на микрофотографиях составил 2,22 Å.

### *Спектроскопия потери энергии электронов*

3 мл очищенных бактериофагов phiEL наносили на медную сетку (Ted Pella Inc., США), покрытую углеродом (C) и обработанную в атмосфере тлеющего разряда в приборе Emitech K100X, на 30 с; избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой и окрашивали сетки 2% водным раствором молибдата аммония ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) в течение 30 с. После этого их высушивали на воздухе и хранили в пластиковом контейнере до использования. Впоследствии сетки загружали в охлаждающий держатель образцов модели 21090 (JEOL, Япония), вставляли в колонну микроскопа и понижали температуру держателя до –182 °С для уменьшения эффекта радиационного поврежде-

ния и повышения стабильности образца под электронным пучком.

Спектры СХПЭЭ и карты элементов фосфора получали на спектрометре Gatan GIF Quantum ER (Gatan, США) в режиме СПЭМ. Размер 1 пикс был установлен на 15–20 нм (значение варьировалось в зависимости от конкретного образца). Коррекция дрейфа СПЭМ применялась после каждых 40–50 пикс. Каждый спектр получен при угле сбора 6,0 мрад, дисперсии 0,25 эВ и энергетическом сдвиге спектра на 132 эВ. Спектры из разных пикселей были выровнены по К-пику углерода. Фон экстраполировался согласно степенному закону по окну 118–128 эВ; окно сигнала для картирования фосфора было установлено на 132–155 эВ, что соответствует положению L<sub>2,3</sub>-пика данного элемента. Коррекция многократного рассеяния не использовалась. Для каждого из пикселей на изображениях, полученных с помощью высокоуглового темнопольного детектора, построен спектр СХПЭЭ, из совокупности которых составлены карты пространственного распределения фосфора.

## Результаты

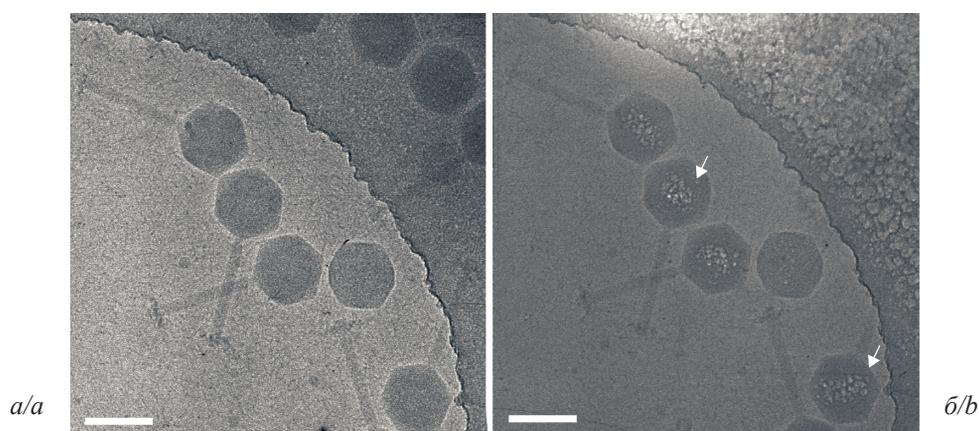
### *«Пузырьковые диаграммы» и расположение внутреннего тела в капсиде бактериофага phiEL*

Для визуализации «пузырьковых диаграмм» с одной и той же области замороженного в аморфном (витрифицированном) льду образца бактериофагов дважды получали электронно-микроскопические изображения – с низкой (10–20 эВ/Å·с) и с высокой (40 эВ/Å·с) дозой электронов (следует отметить, что последняя вызывает радиационное повреждение белков) (рис. 1 а, б) [26, 27]. На серии выполненных микрофотографий видно, что ряды пузырьков водорода (H<sub>2</sub>), выделяющегося при радиолитическом расщеплении воды, располагаются внутри капсида вдоль границы белковой структуры, взаимодействующей с нуклеиновой кислотой (рис. 1, б).

При экспозиции 1 с (рис. 1, а) мы не наблюдали наличия в капсидах ВТ, как и описывалось ранее [10]. Экспозиция длительностью в 2 с привела к тому, что на изображениях появились «пузырьковые диаграммы» как следствие воздействия повышенной дозы электронов (рис. 1, б). При этом локализация данных образований соответствовала расположению ВТ между противоположными вершинами икосаэдрического капсида.

### *Теоретическая модель упаковки ДНК внутри головки гигантского бактериофага*

Для изучения способов упаковки молекулы ДНК внутри гигантского капсида фага мы построили простую теоретическую модель. Во-первых, мы учитывали, что ДНК – это полугибкий полимер, на локальном уровне достаточно жёсткий для того, чтобы его укладка напоминала упаковку жёстких стержней; на более же крупном уровне он достаточно гибок, чтобы заполнить капсид вируса, принимая при необходимости геометрическую форму изогнутой фигуры.



**Рис. 1.** Полученные при криоэлектронной микроскопии изображения частиц бактериофага phiEL, замороженных в витрифицированном льду, после облучения низкой (а) и высокой (б) дозой электронов. Белые стрелки указывают на «пузырьковые диаграммы» (б), соответствующие радиационному повреждению внутреннего тела в капсиде. Масштабный отрезок – 150 нм.

**Fig. 1.** Cryogenic electron microscopy images of phiEL bacteriophage particles frozen in vitrified ice after low dose (a) and high dose (b) electron irradiation. White arrows point to «bubblegram images» (b) resulted from a radiation damage to the inner body in the capsid. The scale bar is 150 nm.

Это согласуется с результатами крупнозернистого моделирования (coarse-grained modeling) упаковки ДНК в вирусные капсиды [28]. Далее мы предположили, что ДНК нерастяжима, вследствие чего увеличение расстояния между тяжами молекулы ослабляет упаковку только в 2 измерениях. Последнее допущение, в свою очередь, подразумевает обратную квадратичную зависимость плотности упаковки ДНК от расстояния между тяжами. В результате было выведено уравнение, связывающее размер генома (S), занимаемый молекулой ДНК объём (V) и расстояние между её тяжами (d):

$$\frac{S}{V} = \frac{A}{d^2}, \quad (1)$$

где A – константа, которую можно рассчитать, имея все остальные показатели для конкретного вирусного капсида.

Подставляя в формулу известные значения для фага phiKZ из материалов соответствующих работ [4, 10, 29], мы получили величину A, равную  $3,149 \times 10^{-3}$  т.п.н./нм. Таким образом, используя расчётное значение константы и литературные данные, можно рассчитать объём ВТ фага phiEL (таблица).

#### Аналитическая микроскопия бактериофага phiEL

Далее мы провели эксперименты с применением СХПЭЭ для идентификации фосфора внутри капсидов гигантского фага phiEL. Поскольку его геном составляет 211 т.п.н., на него приходится 422 тыс. атомов этого элемента. Мы использовали охлаждающий держатель с целью минимизации радиационного повреждения, что существенно увеличило стабильность образца под электронным лучом, уменьшило эффект «дрейфа» образца во время накопления спектров, а также минимизировало выраженность контаминации его поверхности в результате сканирования электронным зондом. Помимо этого, было применено не-

гативное окрашивание образцов с помощью 2% раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$  вместо рутинного окрашивания с использованием ацетата урана (уранилацетата,  $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Это, в свою очередь, позволило избежать перекрытия в спектре  $\text{O}_{4,5}$ -пика урана на 96 эВ и  $\text{L}_{2,3}$ -пика фосфора на 132 эВ, которое препятствует корректной аппроксимации фоновой составляющей перед пиком фосфора.

Интенсивность сигнала фосфора в каждой точке изображения была использована для СПЭМ-СХПЭЭ-картирования данного элемента после вычитания из спектров фоновой составляющей. Типичное распределение фосфора в пределах одного вириона показано на рис. 2. Соответствующий характеристический сигнал зафиксирован только во внутренней части вириона, но не снаружи него (рис. 2, з). Более того, внутри капсида наблюдалась приблизительно прямоугольной формы область (рис. 2, в), в которой детектировалась очень низкая (сопоставимая с фоном) интенсивность сигнала фосфора либо последняя отсутствовала совсем (рис. 2, з). Описанное явление вполне определённо отражает несимметричное распределение геномной ДНК внутри капсида.

#### Обсуждение

В данной работе мы использовали картирование элемента фосфора на основе результатов СПЭМ-СХПЭЭ-анализа. Ранее этот метод позволил нам впервые визуализировать ДНК гигантского бактериофага phiKZ внутри псевдоядра, образованного при инфицировании *P. aeruginosa* [12]. В настоящем случае эта техника была адаптирована для изучения вирусных капсидов phiEL (диаметр 145 нм).

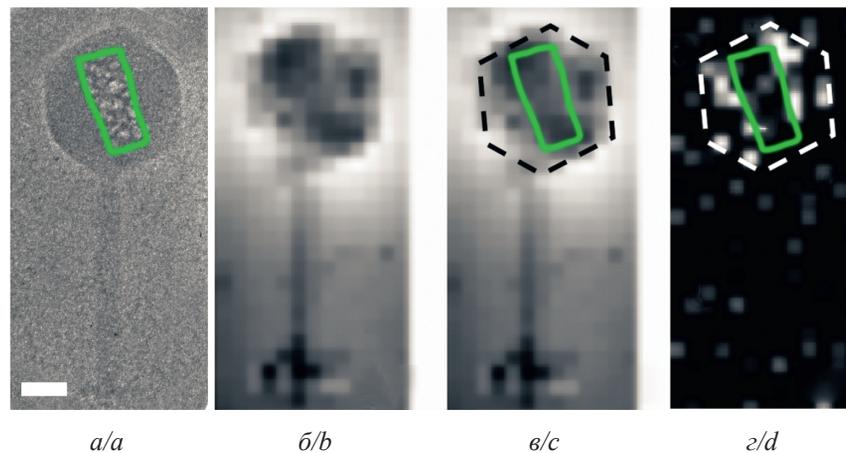
При картировании фосфора (рис. 2) обнаружен сильный сигнал внутри капсида, в то время как снаружи него интенсивность сигнала практически не определялась. Как свидетельствуют наши предыдущие исследования, регистрируемый сигнал исходил от молекулы ви-

**Таблица. Сравнение геометрии капсида и рассчитанных объёмов геномов бактериофагов phiKZ и phiEL**  
**Table. Comparison of capsid geometry and calculated genome volumes of bacteriophages phiKZ and phiEL**

Размеры капсида бактериофага и параметры для упаковки генома Bacteriophage capsid size and parameters for genome packaging	Бактериофаги Bacteriophages	
	phiKZ	phiEL
Высота, нм Height, nm	145,5*	145,0**
Толщина стенки, нм Wall thickness, nm	5*	5**
Внутренний объём, нм <sup>3</sup> Inner volume, nm <sup>3</sup>	744 676	736 303
Объём пустого капсида, нм <sup>3</sup> Empty capsid volume, nm <sup>3</sup>	697 156	642 427
Объём генома, нм <sup>3</sup> Genome volume, nm <sup>3</sup>	515 672***	388 595***
Расстояние между тяжами ДНК, нм Distance between DNA rods, nm	2,8*	3,1**
Объём внутреннего тела, нм <sup>3</sup> Inner body volume, nm <sup>3</sup>	47 520****	93 876†

**Примечание.** \*данные А. Fokine и соавт. [4]; \*\*данные О.С. Sokolova и соавт. [5]; \*\*\*данные М.В. Буркальцевой и соавт. [29]; \*\*\*\*данные W. Wu и соавт. [10]; †результаты настоящего исследования.

**Note.** \*according to Fokine A. et al. [4]; \*\*according to Sokolova O.S. et al. [5]; \*\*\*according to Burkal'tseva M.V. et al. [29]; \*\*\*\*according to Wu W. et al. [10]; †results of this study.



**Рис. 2.** Расположение внутреннего тела в капсиде бактериофага phiEL при картировании фосфора. *a)* – полученное при криоэлектронной микроскопии изображение бактериофага phiEL, облученного высокой дозой электронов. Область внутреннего тела выделена линией зелёного цвета. Масштабный отрезок – 50 нм; *б), в)* – темнопольное изображение в высокоугловых рассеянных электронах частицы бактериофага phiEL. Границы капсида отмечены пунктирной линией чёрного цвета, область внутреннего тела выделена линией зелёного цвета (*в*); *г)* – карта распределения фосфора. Интенсивность пикселей отражает уровень сигнала элемента в спектрах характеристических потерь энергии электронами. Границы капсида отмечены пунктирной линией белого цвета; внутреннее тело показано линией зелёного цвета.

**Fig. 2.** Location of the internal body in phiEL bacteriophage capsid in phosphorus mapping. *a)* cryo-electron microscopy image of the phiEL bacteriophage particle irradiated with a high dose of electrons. The inner body area is indicated with a green line. The scale bar is 50 nm; *b), c)* high-angle annular dark-field image of the phiEL bacteriophage particle. The boundaries of the capsid are marked with a black dotted line, and the area of the inner body is indicated with green line (*c*); *d)* phosphorus distribution map. The pixel intensity reflects the level of the phosphorus signal in the electron energy loss spectra. The borders of the capsid are marked with a white dotted line, and the inner body is shown with a green line.

русной нуклеиновой кислоты [30, 31]. Распределение фосфора оказалось неравномерным: прямоугольная область посередине капсида содержала очень слабый сигнал либо не содержала его вовсе, по краям же указанной области наблюдалась большая интенсивность сигнала. Мы объяснили это наличием в капсиде phiEL белкового тела, занимающего значительную часть внутреннего объёма. Ранее ВТ фага phiKZ идентифицировали различными способами: электронно-микро-

скопическим с негативным окрашиванием образцов [9], АСМ [13], криоЭМ [10]. В данном исследовании мы разработали и применили методику визуализации внутреннего тела с использованием высокоуглового темнопольного детектора (HAADF) и аналитического подхода СПЭМ-СХПЭЭ. Это позволило в отличие от ранних исследований идентифицировать область нахождения ВТ непосредственно в капсиде гигантского бактериофага phiEL [9, 13].

В целях валидации разработанного метода мы применили криоЭМ (рис. 1). Мы показали, что расположение и форма ВТ, оценённые с помощью «пузырьковых диаграмм» (рис. 2, а), в достаточной степени совпадают с областями отсутствия сигнала от фосфора (рис. 2, з). Размеры ВТ бактериофага phiEL были рассчитаны на основе литературных данных (таблица) и показали, что объём его ВТ почти в 2 раза больше такового для phiKZ. Полученные результаты хорошо согласуются с тем фактом, что длины геномов фагов phiKZ и phiEL различаются; при этом молекула ДНК последнего короче на ~30% [29], однако она упакована в такой же по размеру капсид [5].

Следует отметить, что описанная методика может использоваться для изучения распределения нуклеиновых кислот и картирования содержания фосфора в других вирусах (как ДНК-, так и РНК-содержащих) при сравнительно низких содержаниях искомого элемента.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Ochman H., Lawrence J., Groisman E. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. 2000; 405(6784): 299–304. <https://doi.org/10.1038/35012500>
- Duplessis C.A., Biswas B. A review of topical phage therapy for chronically infected wounds and preparations for a randomized adaptive clinical trial evaluating topical phage therapy in chronically infected diabetic foot ulcers. *Antibiotics*. 2020; 9(7): 377. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070377>
- Sharma R., Pielstick B., Bell K., Nieman T., Stubbs O., Yeates E., et al. A Novel, Highly Related Jumbo Family of Bacteriophages That Were Isolated Against *Erwinia*. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 1533. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01533>
- Fokine A., Kostyuchenko V.A., Efimov A.V., Kurochkina L.P., Sykilinda N.N., Robben J., et al. A three-dimensional cryo-electron microscopy structure of the bacteriophage phiKZ head. *J. Mol. Biol.* 2005; 352(1): 117–24. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.018>
- Sokolova O.S., Shaburova O.V., Pechnikova E.V., Shaytan A.K., Krylov S.V., Kiselev N.A., et al. Genome packaging in EL and Lin68, two giant phiKZ-like bacteriophages of *P. aeruginosa*. *Virology*. 2014; 468–470: 472–8. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.09.002>
- Hertveldt K., Lavigne R., Pleteneva E., Sernova N., Kurochkina L., Korchevskii R., et al. Genome comparison of *Pseudomonas aeruginosa* large phages. *J. Mol. Biol.* 2005; 354(3): 536–45. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.08.075>
- Mesyanzhinov V.V., Robben J., Grymonprez B., Kostyuchenko V.A., Bourkaltseva M.V., Sykilinda N.N., et al. The genome of bacteriophage phiKZ of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* 2002; 317(1): 1–19. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5396>
- Thomas J.A., Rolando M.R., Carroll C.A., Shen P.S., Belnap D.M., Weintraub S.T., et al. Characterization of *Pseudomonas chlororaphis* myovirus 201phi2-1 via genomic sequencing, mass spectrometry, and electron microscopy. *Virology*. 2008; 376(2): 330–8. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.04.004>
- Krylov V.N., Smirnova T.A., Minenkova I.B., Plotnikova T.G., Zhazikov I.Z., Khrenova E.A. *Pseudomonas* bacteriophage contains an inner body in its capsid. *Can. J. Microbiol.* 1984; 30(6): 758–62. <https://doi.org/10.1139/m84-116>
- Wu W., Thomas J., Naiqian C., Black L., Steven A.C. Bubblegrams reveal the inner body of bacteriophage phiKZ. *Science*. 2012; 335(6065): 182. <https://doi.org/10.1126/science.1214120>
- Yakunina M., Artamonova T., Borukhov S., Makarova K.S., Severinov K., Minakhin L. A non-canonical multisubunit RNA polymerase encoded by a giant bacteriophage. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(21): 10411–20. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1095>
- Danilova Y.A., Belousova V.V., Moiseenko A.V., Vishnyakov I.E., Yakunina M.V., Sokolova O.S. Maturation of Pseudo-Nucleus Compartment in *P. aeruginosa*, Infected with Giant phiKZ Phage. *Viruses*. 2020; 12(10): 1197. <https://doi.org/10.3390/v12101197>
- Matsko N., Klinov D., Manykin A., Demin V., Klimentko S. Atomic force microscopy analysis of bacteriophages phiKZ and T4. *J. Electron. Microsc. (Tokyo)*. 2001; 50(5): 417–22. <https://doi.org/10.1093/jmicro/50.5.417>
- Fontana J., Jurado K.A., Cheng N., Ly N.L., Fuchs J.R., Gorelick R.J., et al. Distribution and Redistribution of HIV-1 Nucleocapsid Protein in Immature, Mature, and Integrase-Inhibited Virions: a Role for Integrase in Maturation. *J. Virol.* 2015; 89(19): 9765–80. <https://doi.org/10.1128/JVI.01522-15>
- Wu W., Leavitt J.C., Cheng N., Gilcrease E.B., Motwani T., Teschke C.M., et al. Localization of the Houdinisome (Ejection Proteins) inside the bacteriophage P22 virion by bubblegram imaging. *mBio*. 2016; 7(4): e01152–16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01152-16>
- Wu W., Newcomb W.W., Cheng N., Aksyuk A., Winkler D.C., Steven A.C. Internal Proteins of the Procapsid and Mature Capsids of Herpes Simplex Virus 1 Mapped by Bubblegram Imaging. *J. Virol.* 2016; 90(10): 5176–86. <https://doi.org/10.1128/JVI.03224-15>
- Shebanova A., Ismagulova T., Solovchenko A., Baulina O., Lobakova E., Ivanova A., et al. Versatility of the green microalga cell vacuole function as revealed by analytical transmission electron microscopy. *Protoplasma*. 2017; 254(3): 1323–40. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1024-5>
- Scotuzzi M., Kuipers J., Wensveen D.I., De Boer P., Hagen K.C.W., Hoogenboom J.P., et al. Multi-color electron microscopy by element-guided identification of cells, organelles and molecules. *Sci. Rep.* 2017; 7: 45970. <https://doi.org/10.1038/srep45970>
- Allard-Vannier E., Hervé-Aubert K., Kaaki K., Blondy T., Shebanova A., Shaitan K.V., et al. Folic acid-capped PEGylated magnetic nanoparticles enter cancer cells mostly via clathrin-dependent endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2017; 1861(6): 1578–86. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.045>
- Loiko N., Danilova Y., Moiseenko A., Kovalenko V., Tereshkina K., Tutukina M., et al. Morphological peculiarities of the DNA-protein complexes in starved *Escherichia coli* cells. *PLoS One*. 2020; 15(10): e0231562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231562>
- Bazett-Jones D.P., Ottensmeyer F.P. Phosphorus distribution in the nucleosome. *Science*. 1981; 211(4478): 169–70. <https://doi.org/10.1126/science.7444457>
- Ottensmeyer F.P., Andrew J.W. High-resolution microanalysis of biological specimens by electron energy loss spectroscopy and by electron spectroscopic imaging. *J. Ultrastruct. Res.* 1980; 72(3): 336–48. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(80\)90069-6](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(80)90069-6)
- Aronova M.A., Kim Y.C., Harmon R., Sousa A.A., Zhang G., Leapman R.D. Three-dimensional elemental mapping of phosphorus by quantitative electron spectroscopic tomography (QuEST). *J. Struct. Biol.* 2007; 160(1): 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.06.008>
- Nevsten P., Evilevitch A., Wallenberg R. Chemical mapping of DNA and counter-ion content inside phage by energy-filtered TEM. *J. Biol. Phys.* 2012; 38(2): 229–40. <https://doi.org/10.1007/s10867-011-9234-8>
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Печникова Е.В., Кирпичников М.П., Соколова О.С. Радиационные повреждения в криомикроскопии: всегда ли во вред? *Природа*. 2015; (3): 25–9.
- Mishyna M., Volokh O., Danilova Ya., Gerasimova N., Pechnikova E., Sokolova O.S. Effects of radiation damage in studies of protein-DNA complexes by cryo-EM. *Micron*. 2017; 96: 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2017.02.004>
- Petrov A.S., Harvey S.C. Packaging double-helical DNA into viral capsids: structures, forces, and energetics. *Biophys. J.* 2008; 95(2): 497–502. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.131797>
- Буркальцева М.В., Крылов В.Н., Плетенева Е.А., Шабурова О.В., Крылов С.В., Волкарт Г., и др. Феногенетическая характеристика группы гигантских фКЗ-подобных бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa*. *Генетика*. 2002; 38(11): 1470–9.
- Bagrov D.V., Glukhov G.S., Moiseenko A.V., Karlova M.G., Litvinov D.S., Zaitsev P.A., et al. Structural characterization of beta-propiolactone inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) particles. *Microsc. Res. Tech.* 2021. <https://doi.org/10.1002/jemt.23931>

## REFERENCES

- Ochman H., Lawrence J., Groisman E. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. 2000; 405(6784): 299–304. <https://doi.org/10.1038/35012500>
- Sharma R., Pielstick B., Bell K., Nieman T., Stubbs O., Yeates E., et al. A Novel, Highly Related Jumbo Family of Bacteriophages That Were Isolated Against *Erwinia*. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 1533. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01533>
- Duplessis C.A., Biswas B. A review of topical phage therapy for chronically infected wounds and preparations for a randomized adaptive clinical trial evaluating topical phage therapy in chronically infected diabetic foot ulcers. *Antibiotics*. 2020; 9(7): 377. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070377>
- Fokine A., Kostyuchenko V.A., Efimov A.V., Kurochkina L.P., Sykilinda N.N., Robben J., et al. A three-dimensional cryo-electron microscopy structure of the bacteriophage  $\phi$ KZ head. *J. Mol. Biol.* 2005; 352(1): 117–24. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.018>
- Sokolova O.S., Shaburova O.V., Pechnikova E.V., Shaytan A.K., Krylov S.V., Kiselev N.A., et al. Genome packaging in EL and Lin68, two giant  $\phi$ KZ-like bacteriophages of *P. aeruginosa*. *Virology*. 2014; 468–470: 472–8. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.09.002>
- Hertveldt K., Lavigne R., Pleteneva E., Sernova N., Kurochkina L., Korchevskii R., et al. Genome comparison of *Pseudomonas aeruginosa* large phages. *J. Mol. Biol.* 2005; 354(3): 536–45. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.08.075>
- Mesyanzhinov V.V., Robben J., Grymonprez B., Kostyuchenko V.A., Bourkaltseva M.V., Sykilinda N.N., et al. The genome of bacteriophage  $\phi$ KZ of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* 2002; 317(1): 1–19. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5396>
- Thomas J.A., Rolando M.R., Carroll C.A., Shen P.S., Belnap D.M., Weintraub S.T., et al. Characterization of *Pseudomonas chlororaphis* myovirus 201 $\phi$ 2-1 via genomic sequencing, mass spectrometry, and electron microscopy. *Virology*. 2008; 376(2): 330–8. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.04.004>
- Krylov V.N., Smirnova T.A., Minenkova I.B., Plotnikova T.G., Zhazikov I.Z., Khrenova E.A. *Pseudomonas* bacteriophage contains an inner body in its capsid. *Can. J. Microbiol.* 1984; 30(6): 758–62. <https://doi.org/10.1139/m84-116>
- Wu W., Thomas J., Naiqian C., Black L., Steven A.C. Bubblegrams reveal the inner body of bacteriophage  $\phi$ KZ. *Science*. 2012; 335(6065): 182. <https://doi.org/10.1126/science.1214120>
- Yakunina M., Artamonova T., Borukhov S., Makarova K.S., Severinov K., Minakhin L. A non-canonical multisubunit RNA polymerase encoded by a giant bacteriophage. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(21): 10411–20. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1095>
- Danilova Y.A., Belousova V.V., Moiseenko A.V., Vishnyakov I.E., Yakunina M.V., Sokolova O.S. Maturation of Pseudo-Nucleus Compartment in *P. aeruginosa*, Infected with Giant  $\phi$ KZ Phage. *Viruses*. 2020; 12(10): 1197. <https://doi.org/10.3390/v12101197>
- Matsko N., Klinov D., Manykin A., Demin V., Klimenko S. Atomic force microscopy analysis of bacteriophages  $\phi$ KZ and T4. *J. Electron. Microsc. (Tokyo)*. 2001; 50(5): 417–22. <https://doi.org/10.1093/jmicro/50.5.417>
- Fontana J., Jurado K.A., Cheng N., Ly N.L., Fuchs J.R., Gorelick R.J., et al. Distribution and Redistribution of HIV-1 Nucleocapsid Protein in Immature, Mature, and Integrase-Inhibited Virions: a Role for Integrase in Maturation. *J. Virol.* 2015; 89(19): 9765–80. <https://doi.org/10.1128/JVI.01522-15>
- Wu W., Leavitt J.C., Cheng N., Gilcrease E.B., Motwani T., Teschke C.M., et al. Localization of the houdinisome (Ejection Proteins) inside the bacteriophage P22 virion by bubblegram imaging. *mBio*. 2016; 7(4): e01152–16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01152-16>
- Wu W., Newcomb W.W., Cheng N., Aksyuk A., Winkler D.C., Steven A.C. Internal Proteins of the Procapsid and Mature Capsids of Herpes Simplex Virus 1 Mapped by Bubblegram Imaging. *J. Virol.* 2016; 90(10): 5176–86. <https://doi.org/10.1128/JVI.03224-15>
- Shebanova A., Ismagulova T., Solovchenko A., Baulina O., Lobakova E., Ivanova A., et al. Versatility of the green microalga cell vacuole function as revealed by analytical transmission electron microscopy. *Protoplasma*. 2017; 254(3): 1323–40. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1024-5>
- Scotuzzi M., Kuipers J., Wensveen D.I., De Boer P., Hagen K.C.W., Hoogenboom J.P., et al. Multi-color electron microscopy by element-guided identification of cells, organelles and molecules. *Sci. Rep.* 2017; 7: 45970. <https://doi.org/10.1038/srep45970>
- Allard-Vannier E., Hervé-Aubert K., Kaaki K., Blondy T., Shebanova A., Shaitan K.V., et al. Folic acid-capped PEGylated magnetic nanoparticles enter cancer cells mostly via clathrin-dependent endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2017; 1861(6): 1578–86. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.045>
- Loiko N., Danilova Y., Moiseenko A., Kovalenko V., Tereshkina K., Tutukina M., et al. Morphological peculiarities of the DNA-protein complexes in starved *Escherichia coli* cells. *PLoS One*. 2020; 15(10): e0231562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231562>
- Bazett-Jones D.P., Ottensmeyer F.P. Phosphorus distribution in the nucleosome. *Science*. 1981; 211(4478): 169–70. <https://doi.org/10.1126/science.7444457>
- Ottensmeyer F.P., Andrew J.W. High-resolution microanalysis of biological specimens by electron energy loss spectroscopy and by electron spectroscopic imaging. *J. Ultrastruct. Res.* 1980; 72(3): 336–48. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(80\)90069-6](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(80)90069-6)
- Aronova M.A., Kim Y.C., Harmon R., Sousa A.A., Zhang G., Leapman R.D. Three-dimensional elemental mapping of phosphorus by quantitative electron spectroscopic tomography (QuEST). *J. Struct. Biol.* 2007; 160(1): 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.06.008>
- Nevsten P., Evilevitch A., Wallenberg R. Chemical mapping of DNA and counter-ion content inside phage by energy-filtered TEM. *J. Biol. Phys.* 2012; 38(2): 229–40. <https://doi.org/10.1007/s10867-011-9234-8>
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Pechnikova E.V., Kirpichnikov M.K., Sokolova O.S. Radiation damages in cryomicroscopy: are always harmful? [*Radiatsionnye povrezhdeniya v kriomikroskopii: vsegda li vo vred?*] *Priroda*. 2015; (3): 25–9. (in Russian)
- Mishyna M., Volokh O., Danilova Ya., Gerasimova N., Pechnikova E., Sokolova O.S. Effects of radiation damage in studies of protein-DNA complexes by cryo-EM. *Micron*. 2017; 96: 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2017.02.004>
- Petrov A.S., Harvey S.C. Packaging double-helical DNA into viral capsids: structures, forces, and energetics. *Biophys. J.* 2008; 95(2): 497–502. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.131797>
- Burkal'tseva M.V., Krylov V.N., Pleteneva E.A., Shaburova O.V., Krylov S.V., Volkart G., et al. Phenogenetic characterization of a group of giant  $\phi$ KZ-like bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*. *Russian Journal of Genetics*. 2002; 38(11): 1242–50.
- Bagrov D.V., Glukhov G.S., Moiseenko A.V., Karlova M.G., Litvinov D.S., Zaitsev P.A., et al. Structural characterization of  $\beta$ -propiolactone inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) particles. *Microsc. Res. Tech.* 2021. <https://doi.org/10.1002/jemt.23931>