

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КРИСТАЛЛОГРАФИЯ И ФОТНИКА» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ИНСТИТУТ КРИСТАЛЛОГРАФИИ ИМ. А.В. ШУБНИКОВА РАН

На правах рукописи

КАМЫШИНСКИЙ РОМАН АНДРЕЕВИЧ

**СТРУКТУРА БИОКРИСТАЛЛОВ DPS-ДНК ПО ДАННЫМ
КРИОЭЛЕКТРОННОЙ ТОМОГРАФИИ**

Специальность 01.04.18 –
«Кристаллография, физика кристаллов»

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
кандидат физико-математических наук
Васильев Александр Леонидович

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. <i>In cellulo</i> кристаллизация	11
1.2. Биокристаллы Dps-ДНК.....	12
1.2.1. Роль белка Dps	13
1.2.2. Модели комплекса	15
1.3. Методы просвечивающей электронной микроскопии в исследованиях биологических объектов	19
1.3.1. Развитие методов криогенной просвечивающей электронной микроскопии	19
1.3.2. Современная крио-ПЭМ	23
1.3.3. Приготовление образцов для исследований методами крио-ПЭМ	28
1.3.4. Криогенная просвечивающая электронная микроскопия с применением метода анализа проекций одиночных частиц	31
1.3.5. Криоэлектронная томография	35
1.3.6. Ограничение на размер исследуемых образцов	39
1.3.7. Получение тонких срезов биологических образцов с применением фокусированного ионного пучка в крио-режиме	40
1.3.8. Трехмерная реконструкция и анализ экспериментальных данных крио-ЭТ	43
1.3.8.1. Кросс-корреляционное выравнивание.....	43
1.3.8.2. Трехмерная реконструкция.....	44
1.3.8.3. Аннотация и сегментация данных	45
1.3.8.4. Субтомографическое усреднение высокого разрешения	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	51
2.1. Материалы.....	51
2.1.1. Клетки.....	51

2.1.2. Белок	51
2.1.3. ДНК	52
2.2. Методы	52
2.2.1. Получение Dps	52
2.2.2. Получение образцов ДНК.....	52
2.2.3. Подготовка клеток.....	53
2.2.4. Приготовление образцов ко-кристаллов	54
2.2.4.1. Крио-ЭТ исследование образцов первого типа	54
2.2.4.2. Крио-ЭТ исследование образцов второго типа	54
2.2.4.3. Исследование методом анализа проекций одиночных частиц	55
2.2.5. Подготовка образцов для исследований методом криоэлектронной томографии.....	56
2.2.6. Подготовка образцов для исследований методом анализа проекций одиночных частиц.....	57
2.2.7. Утонение витрифицированных образцов с помощью крио-ФИП.....	58
2.3. Проведение экспериментов методами крио-ПЭМ	60
2.3.1. Первичный скрининг и оценка качества образцов.....	60
2.3.2. Криоэлектронная томография	61
2.3.3. Метод анализа проекций одиночных частиц	61
2.4. Обработка экспериментальных данных	62
2.4.1. Обработка данных криоэлектронной томографии	62
2.4.1.1. Обработка данных криоэлектронной томографии кристаллов с триклинной элементарной ячейкой	63
2.4.1.2. Обработка данных криоэлектронной томографии кристаллов с кубической элементарной ячейкой	66
2.4.1.3. Обработка данных криоэлектронной томографии клеток <i>E.coli</i>	69
2.4.2. Обработка данных методом анализа проекций одиночных частиц	70
ГЛАВА 3. ОТРАБОТКА МЕТОДОВ ПРИГОТОВЛЕНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ.....	71

3.1. Витрификация образцов и крио-ПЭМ исследования.....	71
3.2. Электронная томография	73
3.3. Криоэлектронная томография и крио-ФИП.....	74
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ	78
4.1. Крио-ПЭМ исследование <i>in cellulo</i>	78
4.1.1. Морфология бактериальных клеток	78
4.1.2. Криоэлектронная томография исходного препарата клеток <i>E.coli</i>	80
4.1.3. Крио-ЭМ исследование образцов, подвергнутых предварительному утонению с помощью крио-ФИП.....	83
4.2. Крио-ПЭМ исследование морфологии образцов Dps и Dps-ДНК <i>in vitro</i>	85
4.3. Криоэлектронная томография кристаллов, полученных <i>in vitro</i>	86
4.3.1. Кристаллы с триклинной элементарной ячейкой.....	86
4.3.1.1. Обсуждение полученных результатов.....	89
4.3.2. Полимофизм ко-кристаллов Dps-ДНК. Кристаллы с кубической элементарной ячейкой.....	92
4.3.2.1. Обсуждение полученных результатов.....	98
4.4. Исследование одиночных комплексов Dps-ДНК методом анализа проекций одиночных частиц.....	102
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	110
БЛАГОДАРНОСТИ.....	112
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	113
СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ	114
ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	115
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	118

ВВЕДЕНИЕ

Образование живыми организмами кристаллов органических макромолекул было открыто более века назад, но механизм ответа живой материи на экстремальные внешние условия по-прежнему остается малоизученным. Существуют многочисленные примеры *in cellulo* кристаллизации - образования внутриклеточных кристаллических структур. Поскольку способность адаптироваться к изменениям окружающей среды является ключевым фактором для выживания живого организма, все клетки современных организмов выработали аналогичные стратегии для адаптации к различным видам стресса, которые основаны на структурных, биохимических и генетических перестройках. Однако, подробные регуляторные механизмы, с помощью которых в живой клетке достигается контроль над самосборкой определенных белков, до сих пор недостаточно хорошо изучены. Это относится даже к одному из наиболее изученных прокариотических микроорганизмов, широко используемых в биотехнологии и микробиологии – бактерии *Escherichia coli*.

В частности, остается открытым вопрос о структуре комплекса Dps-ДНК, образуемого в клетках *E. coli* при переходе в стационарную фазу в качестве защитной реакции на воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды. Известно, что переход клеток в стационарную фазу сопровождается резким увеличением внутриклеточного синтеза гистоноподобного белка Dps (**DNA-binding protein from starved cells**), который, формируя внутриклеточные кристаллы в комплексе с молекулами ДНК, обеспечивает эффективную защиту последних [1, 2]. Данный механизм позволяет обеспечить продолжительную сохранность генома при экстремальных температурах, голодании, обезвоживании, воздействии радиации и антибиотиков [3, 4].

Несмотря на то, что структура белка Dps и условия образования комплекса Dps-ДНК достаточно хорошо изучены [5, 6], до недавнего времени не удавалось определить структуру нанокристаллов комплекса и напрямую визуализировать

ДНК в нанокристаллах, ввиду чего утверждения о их конформации оставались гипотезами. Кроме того, неизвестен детальный механизм взаимодействия ДНК с Dps, лежащий в основе образования биокристаллов.

Целью данной работы является определение структуры биокристаллов комплекса Dps-ДНК, полученных *in vitro* и *in cellulo*, методами криогенной просвечивающей электронной микроскопии (крио-ПЭМ, крио-ЭМ), в том числе получение трехмерных структур исследуемых кристаллов с помощью криоэлектронной томографии (крио-ЭТ), а также анализ влияния таких параметров, как концентрация и буферный состав исследуемых препаратов Dps и ДНК на структуру кристаллов *in vitro*.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

1. Определить оптимальные условия для проведения процедуры витрификации исследуемых образцов.
2. Подобрать соотношения и составы буферов образцов Dps и ДНК, при которых наблюдается формирование биокристаллов комплекса.
3. Определить оптимальные параметры проведения крио-ПЭМ исследований и съёмки томографических серий изображений.
4. Провести трехмерную реконструкцию полученных данных и субтомографическое усреднение для исследуемых кристаллов комплекса.
5. Изучить внутриклеточные кристаллические образования в бактериальных клетках *Escherichia coli*.
6. Определить сайты связывания белка Dps и ДНК при смешении препаратов ДНК различной длины и Dps в различных буферах.

Научная новизна:

1. Впервые методом криоэлектронной томографии получена трехмерная реконструкция биокристаллов комплекса Dps-ДНК, полученных *in vitro*.
2. Впервые продемонстрирован полиморфизм кристаллов комплекса Dps-ДНК. Обнаружена зависимость структуры комплекса Dps-ДНК от условий его формирования.
3. Впервые продемонстрировано формирование биокристаллов комплекса Dps-ДНК с триклинной и кубической элементарными ячейками. Определены параметры элементарных ячеек.
4. Впервые определено положение молекул ДНК в структуре биокристаллов Dps-ДНК.
5. Впервые визуализировано пространственное положение биокристаллов в клетках *Escherichia coli*.
6. Впервые методом анализа проекций одиночных частиц визуализировано взаимодействие Dps-ДНК.
7. Впервые визуализированы N-концевые фрагменты додекамеров Dps на двумерных классах изображений.

Помимо фундаментального научного интереса и несомненной важности глубокого понимания основ функционирования отдельных элементов живой материи - белков и нуклеиновых кислот, в том числе при выполнении ими защитных функций, **практическая значимость** данной работы определяется широким потенциалом в разработке новых механизмов борьбы с бактериальной резистентностью к лекарственным препаратам. Известно, что резистентность клеток к воздействию антибактериальных средств в стационарной фазе многократно возрастает, что приводит к увеличению численности штаммов различных патогенных организмов, устойчивых к антибиотикам. Понимание и последующее преодоление бактериальной и вирусной резистентности является одной из важнейших проблем современной медицины. Данные о механизмах формирования устойчивых форм бактерий позволят

контролировать процессы перехода бактерий в анабиоз и выхода из него и вносить коррективы как в методы борьбы с инфекционными заболеваниями, так и в методы восстановления клеток из анабиоза. Полученные при выполнении данной работы результаты могут быть использованы для разработки новых антибактериальных препаратов. Кроме того, исследование механизма защиты генетического материала важно для различных применений в биотехнологии, так как потенциально может позволить стабилизировать используемые организмы и биологические продукты, повысив их устойчивость к внешним воздействиям.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Структура комплекса Dps-ДНК зависит от условий его формирования. Существует полиморфизм биокристаллов комплекса.
2. Происходит формирование биокристаллов комплекса Dps-ДНК двух различных типов:
 - Биокристаллы первого типа имеют триклинную элементарную ячейку (SG P1) с параметрами $a \approx b = 9.3 \pm 0.4$ нм, $c = 10.3 \pm 0.4$ нм, $\alpha = 73^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 60^\circ$.
 - Биокристаллы второго типа имеют кубическую элементарную ячейку (Pm $\bar{3}$ m) с параметрами $a = b = c = 13 \pm 1$ нм, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$.
3. В зависимости от типа кристаллов молекулы ДНК укладываются параллельно или перпендикулярно друг другу.
4. Взаимодействие додекамеров Dps в слоях обеспечивается N-концевыми фрагментами.

Достоверность и обоснованность полученных научных результатов определяется использованием высокоточной современной экспериментальной базы, применением комплементарных методов исследования, а также согласованностью и воспроизводимостью расчетных и экспериментальных данных. Данные

криоэлектронной микроскопии, представленные в настоящей работе, подтверждены с помощью исследований методом малоуглового рентгеновского рассеяния, проведенных для всех исследуемых образцов биокристаллов и клеток на синхротроне DESY, накопительном кольце Petra III линии P12, сотрудниками ФНИЦ «Кристаллография и Фотоника» РАН Л.А. Дадиновой, М.П. Петуховым, А.А. Можяевым, Э.В. Штыковой и др.

Апробация работы проведена на научных конференциях, школах и семинарах различного уровня:

1. 61-я Всероссийская научная конференция МФТИ (МФТИ, Москва, 2018);
2. Russian international Conference on Cryo-Electron Microscopy (МГУ, Москва, 2019);
3. XX Зимняя молодежная научная школа по биофизике и молекулярной биологии (НИЦ КИ – ПИЯФ, Гатчина, 2019);
4. RSF - Helmholtz Meeting (Гамбург, Германия, 2019);
5. XVI Курчатовская междисциплинарная молодежная научная школа (НИЦ КИ, Москва, 2019);
6. The 44th FEBS Congress “From molecules to living systems” (Краков, Польша, 2019);
7. XXI Зимняя молодежная научная школа по биофизике и молекулярной биологии (НИЦ КИ – ПИЯФ, Гатчина, 2020);
8. XXVIII Российская конференция по электронной микроскопии (Черноголовка, 2020).

Части диссертационной работы были представлены на конкурсы научных работ, где были отмечены следующими наградами:

9. Премия имени академика Н.В. Белова (ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, молодежный конкурс, секция «Кристаллография», 2019);
10. Премия имени И.В. Курчатова (НИЦ "Курчатовский институт", секция студенческих работ, 2018);

11. Диплом 61-й Всероссийской научной конференции МФТИ (МФТИ ГУ, секция НБИК-технологий, 2018).

Результаты проведенных исследований использованы при выполнении проектов Российского Научного Фонда № 18-74-10071 «Структурные аспекты механизма протекции бактериального генома, как принципиальный шаг на пути преодоления резистентности бактерий к антибиотикам» и НИЦ «Курчатовский Институт» (приказ № 1360 от 25 июня 2019 года) «Разработка новых методических подходов криогенной растровой и просвечивающей электронной микроскопии в исследованиях клеточных систем *in vitro*».

Личный вклад. Результаты диссертационной работы получены автором лично или при его непосредственном участии. Автор принимал активное участие в планировании и проведении экспериментов, обработке и интерпретации экспериментальных данных, подготовке публикаций в рецензируемых научных изданиях, а также лично представлял результаты работы в виде устных и стендовых докладов на ведущих международных и российских конференциях, школах и семинарах.

Публикации. Основные результаты по теме диссертации изложены в 16 печатных изданиях: 7 – в журналах, рекомендованных ВАК, 9 – в тезисах докладов.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав и заключения. Полный объем диссертации составляет 136 страниц печатного текста, включая 57 рисунков и 2 таблицы. Список литературы содержит 178 наименований.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

*Если вы хотите понять функционирование,
исследуйте структуру.*

Ф.Крик, 1989

1.1. *In cellulo* кристаллизация

Широко известно, что кристаллизация белка происходит внутри живых клеток организмов, охватывающих все царства жизни [7]. Существуют многочисленные примеры этого вида биологической самосборки [3, 4, 8–13], которые включают в себя белки в семенах растений [14–16], алкогольоксидазы внутри дрожжей пероксисом [17], тельца Воронина в нитчатых грибах [18], а также инсулин в секреторных гранулах млекопитающих [8]. Хотя эти кристаллы известны как регулирующие клеточные функции, явление нативной внутриклеточной кристаллизации, называемой *in cellulo* кристаллизацией, в прошлом в значительной степени воспринималось как нетипичное поведение и этому явлению уделялось относительно мало внимания. Подробные регуляторные механизмы, с помощью которых в живой клетке достигается контроль над самосборкой определенных белков, до сих пор недостаточно хорошо изучены. Предполагается, что клетки могут контролировать взаимодействия этих белков путем изменения ионной силы среды, протеолизом белков-предшественников или с помощью специфически связывающихся партнеров [18]. У бактерий наблюдаются нативные внутриклеточные кристаллы токсинов, которые, предположительно, служат для того, чтобы сохранить эти молекулы в концентрированном, пространственно-эффективном виде, как сообщалось в [19] для инсектицидного токсина Cry3A из *Bacillus thuringiensis*. Кроме того, нативные внутриклеточные кристаллические структуры участвуют в важном механизме защиты бактериальной ДНК от стресса. Поскольку способность адаптироваться к изменениям окружающей среды является ключевым фактором для выживания живого организма, все клетки современных организмов выработали аналогичные

стратегии для адаптации к различным видам стресса, которые основаны на структурных, биохимических и генетических перестройках [20].

Работы по исследованию способности клеток к выживанию, механизмов их адаптации, процессов биокристаллизации и связанных с этим явлением вторичных эффектов проводятся во всем мире. К настоящему времени спонтанную кристаллизацию *in cellulo* удалось обнаружить для нескольких десятков совершенно разных белков при гетерологичной экспрессии, что ясно указывает на это явление, как на более общее. В зависимости от природы происхождения сигнала от белков, выяснилось, что кристаллы формируются в той или иной части клетки, квалифицируя тем самым секционирование в качестве исходного параметра, который влияет на рост кристаллов *in cellulo*. При этом, нормальные внешние размеры клетки не ограничивают размер кристаллов, и *in cellulo* кристаллизация может быть весьма динамичной [21].

1.2. Биокристаллы Dps-ДНК

Под воздействием экстремальных факторов окружающей среды, *Escherichia coli* (*E. coli*) и другие бактерии способны изменять свою клеточную морфологию и переходить в стационарную фазу [22], что обеспечивает выживание этих клеток в течение миллионов лет [23]. Соответствующие молекулярные механизмы, обеспечивающие эту способность к выживанию, в настоящее время являются предметом активных исследований [20]. Одним из универсальных механизмов ответа на стресс в стационарной фазе является увеличение синтеза специфических гистоноподобных белков, связывающих ДНК, тем самым защищая геном от имеющихся стрессовых факторов и часто сопровождающего их окислительного стресса [24].

В стационарной фазе существенно увеличивается резистентность бактериальных клеток к воздействию многих антибактериальных препаратов, что

является серьезной проблемой для современной медицины. Перспективным направлением преодоления этой устойчивости к антибиотикам является изучение таких клеточных механизмов, которые способствуют бактериальной резистентности к антибактериальным препаратам. Основным объяснением этого эффекта стало ингибирование антибиотиком клеточных процессов в условиях стресса [9, 20].

1.2.1. Роль белка Dps

Известно, что геномная ДНК из *E.coli* вместе с РНК и некоторыми структурными и регуляторными белками образует в цитоплазме структуру, называемую нуклеоидом [10]. За поддержание целостности этой структуры отвечает множество белков, которые продуцируются клеткой во время различных фаз роста. В период стационарной фазы роста клеток в условиях голода резко возрастает концентрация гистоноподобного белка Dps (DNA-binding protein from starved cells, ДНК-связывающий белок из голодающих клеток), до тех пор, пока он не становится главным нуклеоид-ассоциированным белком [11, 12]. Dps - это многофункциональный белок [20], который сочетает ферроксидазную активность и способность неспецифически связывать ДНК. Как правило, бактериальные гистоноподобные белки связаны с нуклеоидом, поддерживая структурную целостность и участвуя в ДНК-зависимых процессах. Важно отметить, что гистоноподобные белки выполняют несколько функций в стрессоустойчивости [25]. Dps является единственным ДНК-связывающим белком, который продуцируется только в стационарной фазе *E.coli* [3], и демонстрирует неспецифическую ДНК-связывающую активность. Белки Dps были обнаружены в большинстве бактериальных групп, а также в археях [26]. Их структура [27] и взаимодействие с ДНК [6] достаточно хорошо изучены. Кристаллическая структура белков Dps представлена в работах [5, 28]. Продемонстрировано, что,

подобно ферритинам, белки Dps собираются в олигомеры, трехмерная форма которых является абсолютно критической и, по существу, определяет их функции [29].

Однако, Dps лучше всего известен как основной ДНК-связывающий фактор, взаимодействующий с бактериальным нуклеоидом с помощью 12 неупорядоченных N-концов [30]. Dps участвует в клеточной реакции на окислительный, УФ, тепловой стрессы и экстремальные значения pH [3, 4, 11, 13, 31]. Белок неспецифично связывается с ДНК в нуклеоиде, конденсируя его, тем самым защищая ДНК [3], базируясь на биохимических функциях Dps, а именно на его ферроксидазной активности и способности связываться с ДНК [32]. Однако, молекулярные механизмы и физиологические последствия этой деятельности еще до конца не выяснены [11].

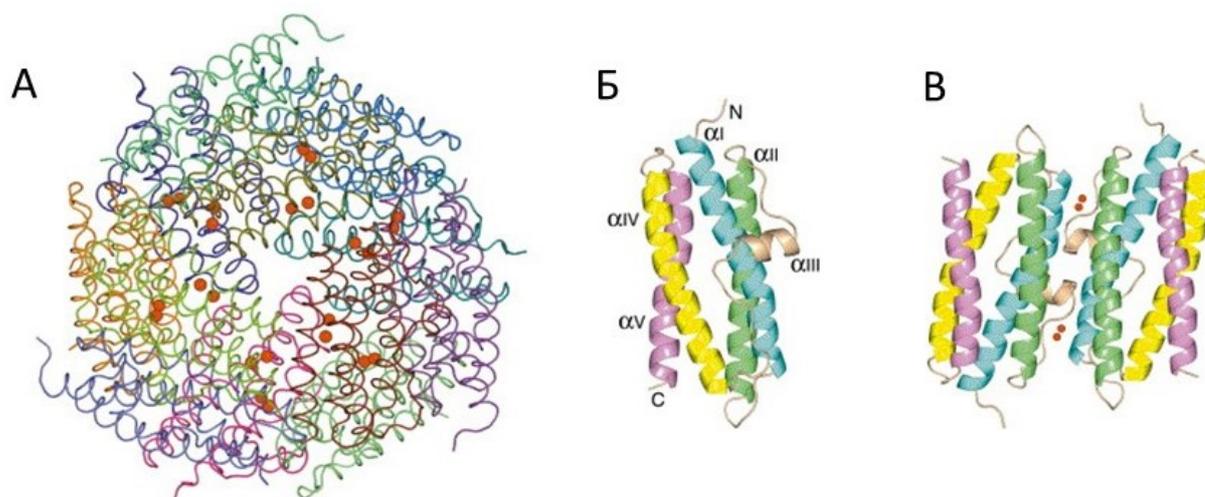


Рисунок 1. Структура Dps из *Bacillus brevis*. **А** - додекамер; **Б** - мономер; **В** - димер. Адаптировано из [33].

Мономеры Dps имеют молекулярную массу 19 кДа и образуют высокоупорядоченную структуру, состоящую из додекамеров (рис. 1), организованных в форме колец, которые связываются с ДНК и носят название «биокристалл» [6]. Данные электронной микроскопии микротомических срезов контрастированных образцов (со сравнительно низким пространственным

разрешением) продемонстрировали, что в начале стадии голодания клетки нуклеоид претерпевает конформационные изменения, превращаясь в тороид, который далее выступает в качестве структурного шаблона для формирования кристаллов комплекса Dps-ДНК [34]. Комплексообразование Dps и ДНК имеет характер неэнзиматического и полностью обратимого фазового перехода, который жестко регулируется внутриклеточной концентрацией поливалентных катионов, однако точные молекулярные взаимодействия до сих пор остаются неясными.

1.2.2. Модели комплекса

В начале стационарной фазы бактериальный хроматин подвергается массивной реорганизации и приходит в упорядоченную тороидальную структуру с помощью образования комплекса стресс-индуцированного белка Dps с ДНК. По мере процесса голодания образованные тороидальные структуры формируют структурную затравку, которая содействует началу кристаллизации ансамблей Dps-ДНК. Электронная микроскопия клеток *E. coli* с временным разрешением демонстрирует, что тороиды образуются в течение первых 24-х часов голодания, а после 48-ми часов в бактериальных клетках обнаруживаются плотноупакованные кристаллы Dps-ДНК [13].

Реконструкция биокристаллов ДНК–Dps с помощью анализа изображений двумерных комплексов, полученных *in vitro*, электронно-микроскопические и рентгеновские структурные исследования привели к умоглядной модели, в которой ДНК находится между сдвинутых относительно друг друга слоев гексагонально упакованных додекамеров Dps [1, 2, 5]. Исследования упорядоченных внутриклеточных структур методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) на интактных клетках показали наличие на дифракционной картине структурных пиков, интерпретация которых остается весьма спорной [4,

12]. Структура Dps из *Porphyromonas gingivalis* в растворе [35] позднее продемонстрировала совпадение с кристаллографической структурой [36].

Последние два десятилетия множество работ было посвящено исследованиям формирования защитного комплекса Dps-ДНК. Нельзя не отметить пионерские работы группы Минского (А. Minsky), в которых впервые было экспериментально продемонстрировано формирование комплекса [1, 2, 35].

Формирование комплекса Dps-ДНК в большой степени зависит от структуры белка и внешних условий. При этом, наиболее успешно защитную функцию выполняет додекамерная форма Dps, способная связываться с ДНК и формировать кристаллы, в то время как димеры и тримеры Dps демонстрируют меньшую эффективность защиты [37, 38].

Кроме того, важно подчеркнуть роль структуры N-концевых доменов Dps в процессе формирования ко-кристаллов Dps-ДНК. Например, было показано, что неупорядоченная богатая лизином N-концевая область Dps из *E. coli* простирается в каналы на границах раздела между тремя соседними додекамерами Dps, чтобы обеспечить связывание ДНК [5]. Роль лизин-содержащего и подвижного N-конца Dps в защите ДНК была также продемонстрирована в работе [30]. Более того, авторы показали влияние pH раствора на структуру комплекса: при значениях pH за пределами физиологического диапазона образование крупных комплексов Dps-ДНК невозможно из-за депротонирования остатков лизина. В целом, неупорядоченные N-концевые области белков Dps, по-видимому, имеют решающее значение для образования кристаллических комплексов белок-ДНК. Было показано, что белки семейства Dps без положительно заряженных N-концов не демонстрируют связывания с ДНК [39–41]. Состав буфера и pH влияют как на структуру самого белка Dps, так и на взаимодействие Dps-ДНК [37]. Также в некоторых работах было продемонстрировано, что Dps не способен напрямую связывать ДНК, и образование комплекса Dps-ДНК зависит от ионных мостиков, образованных Mg^{2+} [13, 33].

Один из наиболее подробных анализов структуры Dps был выполнен в работе [33]. Рентгеноструктурный анализ белка Dps из *Bacillus brevis*, продемонстрировал многослойную структуру, возникающую в результате плотной упаковки додекамеров Dps в отсутствие ДНК, с разрешением 2.2 Å.

В кристалле Dps асимметричная единица содержит четыре субъединицы, которые существуют как два димера. Каждый слой плотно упакованной многослойной структуры, состоящей из додекамеров Dps, отображает одну и ту же псевдогексагональную упаковку с 3 большими отверстиями и 3 маленькими отверстиями. Додекамеры в каждом слое организованы с симметрией 3-го порядка. При кристаллообразовании один слой додекамеров добавляется поверх другого слоя со смещением, так, что каждое большое отверстие в новом слое располагается прямо поверх додекамера в нижнем слое. Формирование многослойной структуры сопровождается появлением «канавок» между частицами Dps. Следует отметить, что данные электронной микроскопии для Dps *E.coli* [1] указывают на гексагональную упаковку частиц Dps внутри каждого слоя.

ПЭМ исследование негативно контрастированных образцов [38] показало, что добавление ДНК не нарушает гексагональную упаковку слоя додекамеров Dps. В работе [1] также обнаружено, что присутствие ДНК в двумерных ко-кристаллах Dps-ДНК не влияет на межплоскостное расстояние кристаллов Dps. На основе кристаллической структуры Dps были предложены две предположительные модели укладки ДНК [5, 33]. Согласно работе [33], ДНК может размещаться в глубоких бороздках слоя Dps. Было также предложено, что ДНК может огибать поверхность додекамера. Альтернативная модель предполагает, что ДНК вводится через отверстия в слоях, образованных Dps [5]. Результаты исследований методом ПЭМ *in vivo* ко-кристаллов Dps-ДНК [1, 2, 34] также предлагают модель упаковки ДНК между слоями додекамеров Dps. Другая интересная модель была предложена в работе [42]. Авторы подчеркивают способность Dps к неспецифическому связыванию ДНК и предполагают, что ДНК обвивается вокруг округлой частицы додекамера гистоноподобным образом.

На рисунке 2 представлены основные модели комплекса Dps-ДНК. Однако, стоит отметить, что все существующие на данный момент модели комплекса являются умозрительными. Подводя итоги, можно заключить, что вопросы о структуре комплекса Dps-ДНК, а также локализации и форме укладки ДНК в нанокристаллах в комплексе с Dps остаются открытыми. Имеющиеся электронно-микроскопические исследования не позволяют напрямую визуализировать ДНК в ко-кристаллах, ввиду чего утверждения о ее упаковке остаются гипотезами. Кроме того, не изучен детальный механизм взаимодействия ДНК с Dps, лежащий в основе образования биокристаллов.

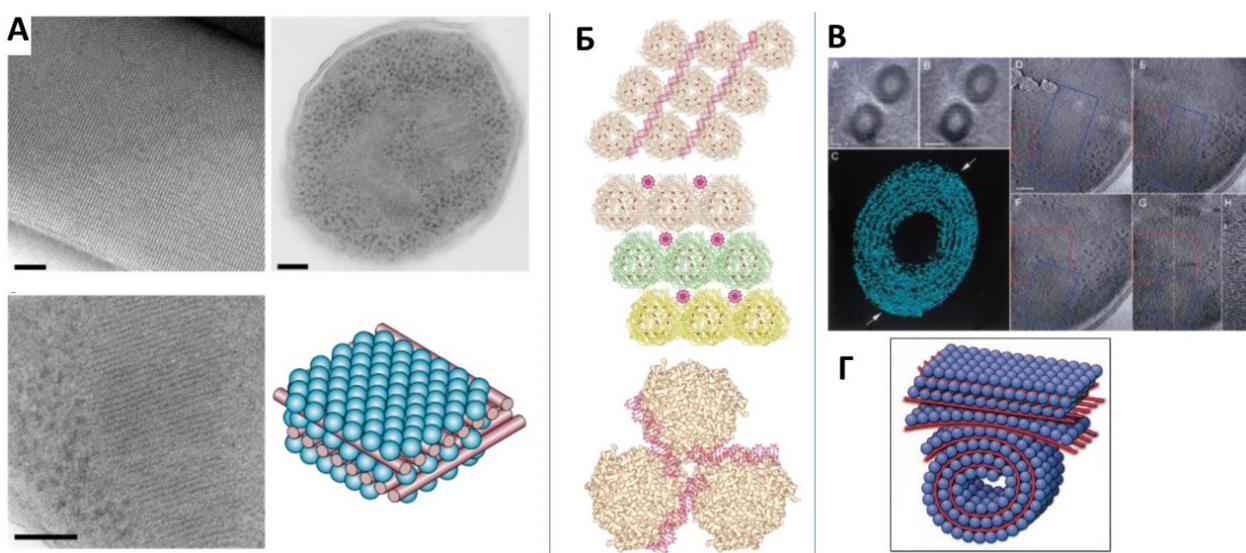


Рисунок 2. Основные модели комплекса Dps-ДНК. **А** – результаты *in vitro* и *in cellulo* исследований комплекса Dps-ДНК, а также модель комплекса, предложенная в работе [43]; **Б** – модель комплекса Dps-ДНК, предложенная в работе [33]. **В** – томографические срезы *E.coli* в после 24-часового голодания. Наблюдаются тороидальные структуры, предположительно соответствующие комплексу. **Г** - модель комплекса Dps-ДНК, предложенная в работе [2].

Крио-ПЭМ, являющаяся основным структурным методом данной работы, дает возможность определить структуру белков, вирусов и макромолекул с молекулярной массой от 100-150 кДа с использованием метода анализа проекций одиночных частиц с разрешением до 1.2 Å и криоэлектронной томографии с

разрешением до 2-10 Å. Бурное развитие методов крио-ПЭМ в последние годы позволяет изучать сложные биологические макромолекулы с разнообразной морфологией, в том числе биокристаллы, сформированные как *in vitro*, так и *in cellulo*. При этом, развитие методов обработки данных крио-ПЭМ обеспечивает возможность получения трехмерных структур с субнанометровым пространственным разрешением даже для относительно малых объемов образца. Таким образом, исследования методами крио-ПЭМ структуры биокристаллов может позволить получить новую информацию о структуре комплекса Dps-ДНК на различных стадиях формирования нанокристаллов в клетках.

1.3. Методы просвечивающей электронной микроскопии в исследованиях биологических объектов

1.3.1. Развитие методов криогенной просвечивающей электронной микроскопии

Долгое время считалось, что методы ПЭМ (рис. 3) [44] несовместимы с исследованиями биологических макромолекул без специфических методов приготовления образцов. Действительно, биологические образцы крайне чувствительны к условиям высокого вакуума, характерным для ПЭМ, а также к радиационным повреждениям высокоэнергетичного электронного пучка. Последняя проблема решается уменьшением дозы электронов, падающих на образец, однако это, в свою очередь, приводит к ухудшению соотношения сигнал-шум и низкому контрасту легких атомов образца на полученных изображениях.

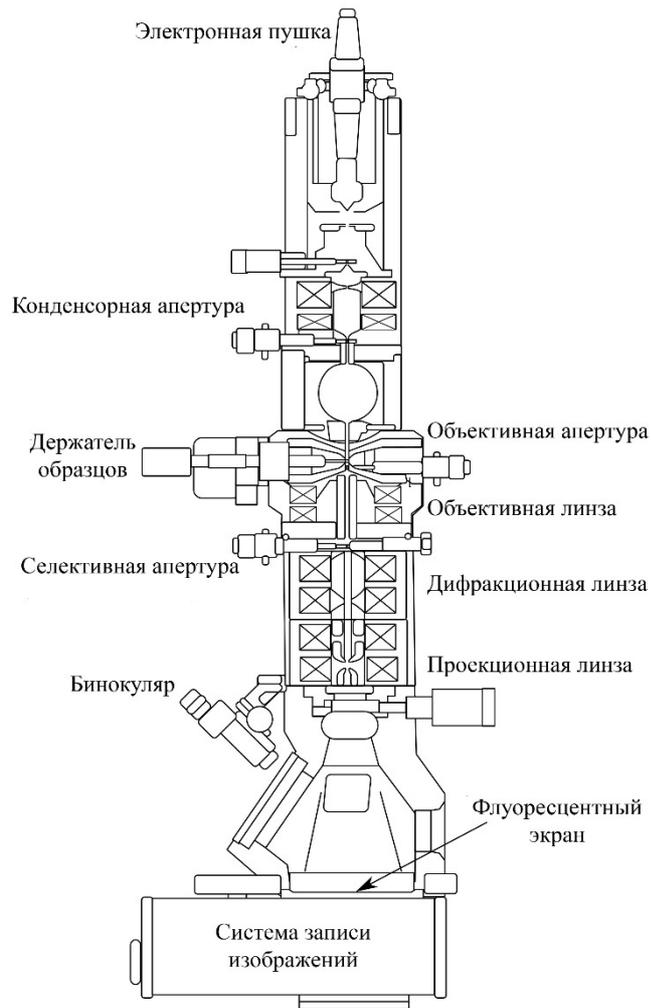


Рисунок 3. Схема принципиального устройства ПЭМ.

В 1959 году разработана методика негативного контрастирования [45], подразумевающая использование водного раствора катионных или анионных солей тяжелых металлов (уранилацетат, уранилформат, молибдат аммония и др.) в качестве контрастирующих агентов, которые формирует оболочку, «оттеняя» исследуемые молекулы и сохраняя их структурные особенности (рис. 4). Одновременно негативное контрастирование обеспечивает формирование существенного контраста на ПЭМ изображениях [46, 47].

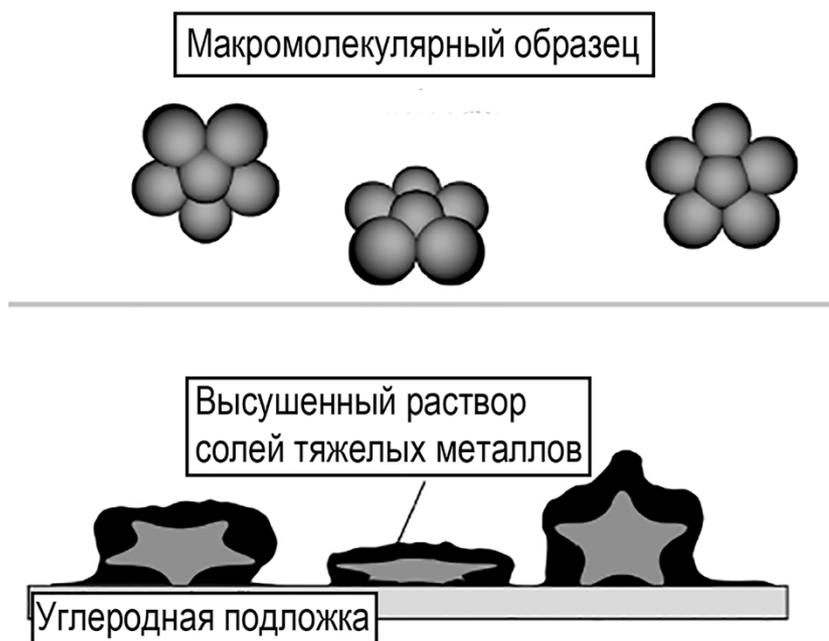


Рисунок 4. Схема негативного контрастирования образцов. Адаптировано из [48].

Уже в 1968 году Д. Де Розье и Э. Круг методами ПЭМ и электронной кристаллографии впервые в мире получили трехмерную реконструкцию биологического объекта - хвоста бактериофага Т4, подвергнутого процедуре негативного контрастирования ацетатом уранила [49]. Они же в своей работе впервые обозначили два основных способа получения трехмерных реконструкций, обсудив их плюсы и минусы: съемку одной и той же частицы под разными углами, или съемку некоторого «поля» частиц, находящихся в различных ориентациях. В дальнейшем эти способы найдут отражение в современных методах электронной томографии и анализа проекций одиночных частиц. В 1982 году Эрон Круг получит Нобелевскую премию по химии за развитие электронной кристаллографии.

Несмотря на большое число достоинств метода негативного контрастирования, к которым относятся решение задачи защиты образца от радиационных повреждений, обеспечение хорошего контраста на изображениях, и простота пробоподготовки, данный подход обладает и рядом недостатков. К ним относятся возможные нарушения структуры исследуемых объектов в процессе сушки образца, неомогенность контрастирующего агента и относительно низкое

пространственное разрешение, как правило, не превышающее 20 Å [50]. В современных исследованиях негативное контрастирование всё еще широко распространено, в силу относительной дешевизны метода, возможности проведения исследований при комнатных температурах, а так же потому, что позволяет работать с объектами существенно меньшей массы, чем большинство приборов крио-ПЭМ [51]. Однако, данный подход всё реже используется в качестве самостоятельного метода, применяясь, как правило, для подбора и оптимизации условий приготовления образцов.

В 1974 году Тейлор и Глейзер, на примере кристаллов каталазы, продемонстрировали принципиальную возможность получения изображений высокого разрешения для биологических образцов в гидратированном состоянии без применения контрастирующих агентов [52, 53], заложив фундамент современной криоэлектронной микроскопии [54]. Дальнейшее развитие методика приготовления гидратированных образцов, замороженных в слое аморфного льда (витрификация), для исследований методами ПЭМ получила в работах Ж. Дюбоше [55].

В 1975 году Р. Хендерсон и П. Анвин [56] получают трехмерную реконструкцию бактериородопсина с разрешением 7 Å, указывая на принципиальную возможность получения данных относительно высокого разрешения с помощью ПЭМ в комбинации с электронной кристаллографией. Однако, до того момента все трехмерные реконструкции, полученные с помощью вышеупомянутых подходов, ограничивались всего несколькими классами объектов с высокой симметрией - вирусами, белками со спиралевидной трубчатой структурой и двумерными кристаллами. Таким образом, большинство биологических объектов нуждалось в предварительной кристаллизации для проведения исследований такого рода.

Примерно в то же время Й. Франк занимался разработкой методов обработки изображений и получения трехмерных реконструкций неперiodических объектов в условиях получения данных с низким соотношением сигнал-шум [57, 58].

Предложенные им методы выравнивания, усреднения и дальнейшей классификации изображений заложили основу современным методам обработки данных крио-ЭМ, позволив распространить применимость метода на ассиметричные биологические макромолекулы.

Логическим завершением вышеупомянутых разработок стала работа Р. Хендерсона и др. 1990 года [59], в которой по данным крио-ПЭМ решена структура бактериородопсина решена с разрешением 3.5 Å. Таким образом, усилиями выдающихся ученых в достаточно короткий срок ПЭМ превратилась из чисто материаловедческого метода в метод, ставший классическим в исследованиях биологических объектов, и в настоящее время являющийся одним из основных методов структурной биологии.

1.3.2. Современная крио-ПЭМ

Основным отличием крио-ПЭМ от стандартного ПЭМ является возможность исследования биологических образцов в нативном состоянии. Помимо процедуры приготовления образцов, описанной в разделе 1.3.3, это обеспечивается условиями проведения исследований. Так, при использовании крио-ПЭМ, держатель образца микроскопа охлаждается до температур жидкого азота, а набор экспериментальных данных проводится в режиме малых доз во избежание радиационных повреждений и нарушений нативной структуры исследуемого объекта.

Крио-ПЭМ долгое время находилась в тени других структурных методов (рентгеноструктурного анализа и ядерного магнитного резонанса), поскольку обеспечивал получение данных лишь низкого разрешения, что сильно ограничивало его применение для исследования белков с относительно низкой молекулярной массой [49, 56, 60]. Прогресс, достигнутый в последнее десятилетие в области крио-ПЭМ позволил получать результаты реконструкции объектов с разрешением, сравнимым с рентгеноструктурным анализом, и сделал метод крио-

ПЭМ одним из наиболее перспективных методов структурного анализа макромолекул [54, 61, 62]. Более того, крио-ПЭМ позволяет получать структурные данные для объектов, которые по ряду причин не могут быть изучены другими методами (большой размер объекта, невозможность кристаллизации и др.) [63–67], а также в определенных условиях проводить времяразрешающие эксперименты [68].

Получение экспериментальных данных с улучшенным соотношением сигнал-шум и новые алгоритмы их анализа привели к феноменальному увеличению пространственного разрешения трехмерных реконструкций, обеспечивая возможность получения *de novo* моделей с помощью методов крио-ЭМ. Так, в настоящее время в базе данных электронной микроскопии (EMDB, Electron Microscopy Data Base), содержащей карты плотности рассеивающего потенциала макромолекулярных комплексов и внутриклеточных структур, находится более 12500 различных карт плотности (рис. 5), и их количество постоянно увеличивается.

Общее количество карт в базе данных электронной микроскопии EMDb

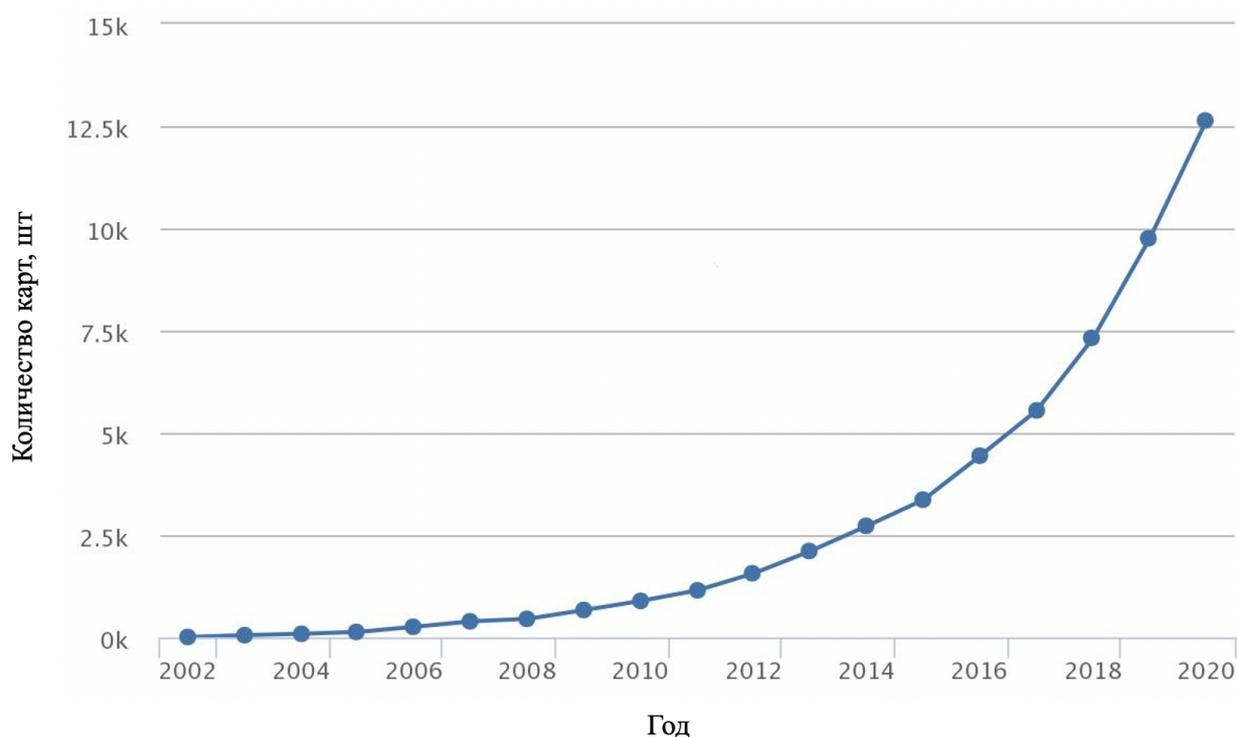


Рисунок 5. График роста числа определенных структур (карт плотности рассеивающего потенциала) в базе данных электронной микроскопии EMDB. Наблюдается резкий рост числа размещаемых карт, совпадающий по времени с развитием и началом широкого использования метода крио-ПЭМ. На основе открытых данных: [69].

Важнейшими компонентами успеха крио-ПЭМ в последние десятилетие стало одновременное развитие методов обработки полученных данных (см разделы 2.6-2.7) и появление детекторов нового поколения. Разработка новых более чувствительных и быстрых систем прямого детектирования электронов на основе комплементарной структуры металл-оксид-полупроводник (КМОП) [62] позволила значительно улучшить соотношение сигнал-шум в процессе генерации экспериментальных данных и одновременно снизить время экспозиции, тем самым минимизируя радиационные повреждения и сохраняя нативную структуру биологических объектов [70, 71]. Высокая скорость работы детектора обеспечивает возможность получения нескольких десятков изображений за короткое время (как правило, 1-5 с) от одного участка, что позволяет в дальнейшем проводить коррекцию дрейфа образца в плоскости изображения [72], вызванного механическими и термическими нестабильностями, в частности, воздействием высокоэнергетичного (как правило, 200 - 300 кВ) пучка электронов.

Разработка новых и совершенствование существующих алгоритмов обработки и анализа получаемых массивов данных позволило решить ряд существовавших ранее проблем в этой области. Так, большинство макромолекулярных комплексов являются гетерогенными, поэтому важную роль при расшифровке таких структур играет классификация объектов в структурно гомогенные классы. Появление новых алгоритмов классификации, основанных на применении метода максимального правдоподобия [73–76], позволяет получить трехмерную реконструкцию высокого разрешения даже в случае работы с загрязненными или гетерогенными объектами [77] и существенно ускоряет процедуру обработки данных (RELION2 [78]). Использование метода

стохастического градиентного спуска, реализованного, например, в программном пакете CryoSPARC [79], позволяет получить трехмерную начальную структуру исследуемого объекта *ab initio*, не опираясь на уже существующие модели.

Поскольку основное влияние на формировании изображений в крио-ЭМ оказывает фазовый контраст, стандартный подход к генерации данных подразумевает получение изображений в некотором диапазоне значений дефокусировки объективной линзы. Однако, одновременно с улучшением соотношения сигнал-шум, увеличение значений дефокусировки приводит к потере интерпретируемости полученных изображений (т.е. уменьшению амплитуды на высоких пространственных частотах), что делает затруднительным исследование частиц с молекулярной массой ниже 200 кДа [80]. Альтернативный способ создания фазового контраста – использование фазовых пластин, широко применяемых в микроскопии оптического диапазона и, теоретически, способных существенно улучшить соотношение сигнал-шум [81], — до недавнего времени не давал практического эффекта [82]. Появление фазовых пластин нового поколения [83] позволило значительно улучшить контрастность генерируемых данных, что особенно актуально при изучении гетерогенных объектов и комплексов с подвижными частями [84]. Использование фазовых пластин позволяет снизить значения дефокусировки в процессе генерации экспериментальных данных, что обеспечивает возможность изучения белков с молекулярной массой от 60 кДа и положительно сказывается на финальном разрешении трехмерных реконструкций [63–66].

Так, существенное увеличение контраста экспериментальных данных при использовании фазовой пластины было показано на примере магнитотактной бактерии и культуры нейронов [85]. В указанной работе продемонстрировано, что изображения клеточной мембраны, полученные при значении дефокусировки 8 мкм, сопоставимы по контрастности с изображениями, полученными при дефокусировке близкой к 0 мкм с использованием фазовой пластины, при этом пространственное разрешение превысило 5 нм.

Если на заре становления метода крио-ЭМ его использование ограничивалось лишь весьма крупными объектами (клеточные органеллы, вирусы и пр.), то в настоящее время этим методом получают структуры относительно небольших белков – до 60 кДа [65]. Неуклонно улучшается и пространственное разрешение получаемых структур. Так, в настоящее время практически рутинным стало получение данных с разрешением порядка 3-4Å [61]. Высокое разрешение, которое обеспечивает метод крио-ЭМ вкупе с последующей обработкой данных, открывает возможность, в частности, исследования взаимодействия макромолекул с лигандами малой массы. Недавно опубликованные крио-ЭМ структуры апоферритина с разрешением 1.25 Å [86] и 1.2 Å [87], полученные с использованием новейшего оборудования и алгоритмов обработки данных, продемонстрировали возможность визуализации рассеивающих потенциалов отдельных атомов, включая атомы водорода, что является важнейшим шагом для разработки новых лекарственных препаратов.

Относительная простота приготовления образцов, в частности отсутствие необходимости их кристаллизации, совместно с возможностью исследования широкого диапазона биологических объектов в нативном виде и получению структурных данных высокого разрешения привела к присуждению Нобелевской премии по химии в 2017 году за развитие метода крио-ЭМ [88]. Прогресс последних лет в области крио-ЭМ, связанный с увеличением пространственного разрешения и снижением допустимой молекулярной массы исследуемых объектов, вплотную приближает данный метод к возможностям рентгеноструктурного анализа. Уникальная возможность получения структурной информации о гетерогенных объектах в состоянии близком к нативному и, как упоминалось выше, относительная простота подготовки образцов делают крио-ЭМ мощным инструментом [89] для исследования пространственных структур биологических объектов различного размера – от отдельных белков до белковых комплексов, вирусов и даже целых клеток, установление пространственного строения которых чрезвычайно важно для решения многих медицинских задач.

В настоящее время существует три основных сценария применения крио-ЭМ к исследованиям биологических объектов. Первый, наиболее простой – прямая визуализация объектов интереса без последующей реконструкции – подходит, в основном, для исследования существенно гетерогенных объектов относительно большой молекулярной массы, а также для проведения процедур скрининга – подбора оптимальных параметров очистки, выделения и подготовки образца. Два других подхода – метод анализа проекций одиночных частиц и криоэлектронная томография, позволяющие получить трехмерные структуры высокого разрешения, будут рассмотрены ниже, в разделах 1.3.4 и 1.3.5.

1.3.3. Приготовление образцов для исследований методами крио-ПЭМ

После выделения и очистки образца проводится поэтапная подготовка препарата для исследований методами крио-ПЭМ [90]. На первом этапе для придания гидрофильных свойств поверхности электронно-микроскопические сетки, покрытые тонким слоем аморфного углерода с регулярными отверстиями, подвергаются обработке тлеющим разрядом. Раствор с исследуемым образцом наносится на подготовленную сетку, излишки раствора с образцом удаляются с помощью фильтровальной бумаги, далее проводится процедура витрификации [55] – сверхбыстрая заморозка образца в этане (или смеси этан-пропан), сконденсированном при температуре жидкого азота (рис. 6). В результате формируется тонкий слой аморфного льда, толщина которого поддается регулировке варьированием продолжительности и силы взаимодействия сетки с образцом и фильтровальной бумаги и имеет критическое значение для дальнейшего эксперимента. Так, во избежание уплощения клеток и появления преференционных ориентаций у массивных белковых комплексов, вирусов и бактериофагов, необходим более толстый слой льда, толщиной до нескольких мкм. В то же время получение тонкого льда необходимо для улучшения соотношения

сигнал-шум при исследовании объектов, обладающих относительно низкой молекулярной массой и малыми размерами.

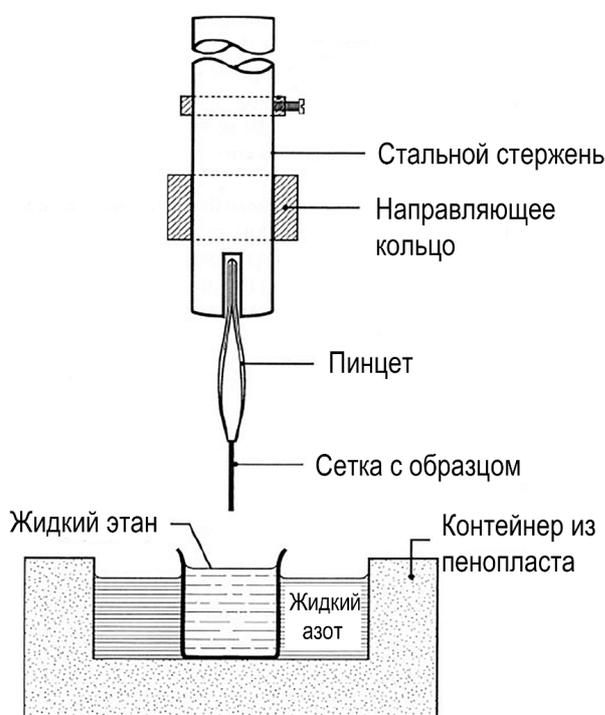


Рисунок 6. Принципиальная схема устройства для проведения процедуры витрификации. Адаптировано из [91].

В настоящее время большинство научных групп использует автоматизированные системы витрификации образцов – Vitrobot (ThermoFisher Scientific), Cryoplunge (Gatan), EM GP (Leica). Во всех вышеупомянутых приборах реализован контроль температуры и влажности в процессе нанесения раствора с образцом на сетку, а также автоматизированное промокивание излишков раствора с образцом с помощью фильтровальной бумаги с контролируемыми параметрами.

Автоматизированная процедура витрификации, с одной стороны, позволяет зафиксировать исследуемый препарат в гидратированном состоянии, близком к нативному, а с другой – стандартизировать процедуру приготовления образцов, обеспечивая воспроизводимость результатов.

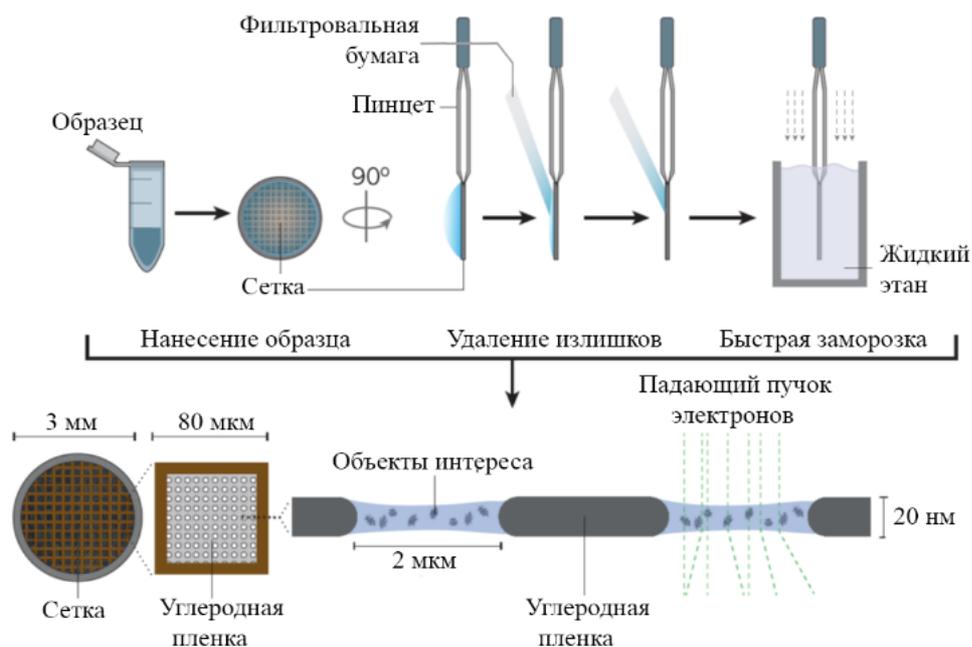


Рисунок 7. Схема выполнения процедуры витрификации. Адаптировано из [92].

Стоит отметить, что стандартный (и наиболее распространенный) подход витрификации с использованием фильтровальной бумаги (рис. 7) во многих отношениях не является оптимальным. Так, промакивание сетки приводит к тому, что основной объем образца, нанесенный на сетку (как правило, несколько мкл) удаляется с нее, что является существенным минусом ввиду дороговизны получения и очистки препаратов биологических образцов. Также, при промакивании часто происходит концентрация объектов исследования на границах раздела вода-воздух [93], что может привести к денатурации и нарушению структуры изучаемых объектов [94], или, чаще, к появлению преференционных ориентаций [95].

В последние годы активно разрабатываются новые методы пробоподготовки образцов для крио-ПЭМ исследований. Так, прибор Spotiton [96, 97] позволяет осуществлять контролируемое распыление нанолитров образца на поверхность электронно-микроскопических сеток. Такой подход позволяет значительно сократить необходимый объем образца для проведения исследований, избежать использования фильтровальной бумаги для получения тонкого льда, и, в перспективе, улучшить качество и воспроизводимость приготовления образцов.

При работе с эукариотическими клетками адгезия клеточных систем к фильтровальной бумаге, применяемой при проведении процедуры витрификации, зачастую оказывается выше, чем адгезия к углеродной подложке сетки [77]. Для подобных объектов вместо стандартного нанесения раствора с образцом на электронно-микроскопические сетки непосредственно перед процедурой витрификации, часто осуществляется культивирование клеточных систем на подложках сеток [78]. При этом, часто используются золотые сетки, которые, в отличие от более традиционных медных или никелевых сеток, не являются токсичными для клеток [79].

1.3.4. Криогенная просвечивающая электронная микроскопия с применением метода анализа проекций одиночных частиц

Наиболее известный подход крио-ПЭМ, называемый в отечественной литературе методом анализа проекций одиночных частиц (англ. Single Particle Analysis, SPA), направлен, в основном, на изучение одиночных белков, вирусов, белковых комплексов и др. В названии метода отражается основной сценарий его использования – изучение множественных копий одиночных макромолекул массой ~100 кДа - 100 мДа [98] в различных ориентациях, обработка полученных данных (десятки и сотни тысяч изображений проекций объекта интереса) и воссоздание трехмерной структуры высокого разрешения на их основе. Изначально анализ проекций одиночных частиц применялся к негативно контрастированным образцам с последующим применением стандартной просвечивающей электронной микроскопии [99]. Несмотря на относительно низкое разрешение структур, полученных с помощью негативного контрастирования, простота приготовления образцов, высокий контраст полученных изображений и развитие алгоритмов обработки данных по сей день обеспечивают его популярность [46, 47].

Подготовленные образцы переносятся в крио-ПЭМ в жидком азоте. В процессе эксперимента используется режим малых доз, подразумевающий экспозицию областей интереса в течение равных фиксированных промежутков времени, а также программное обеспечение, позволяющее осуществлять автоматический набор данных, что минимизирует радиационные повреждения, сохраняя нативную структуру исследуемого объекта. Далее полученный набор данных подвергается нескольким этапам обработки с помощью ряда программных пакетов.

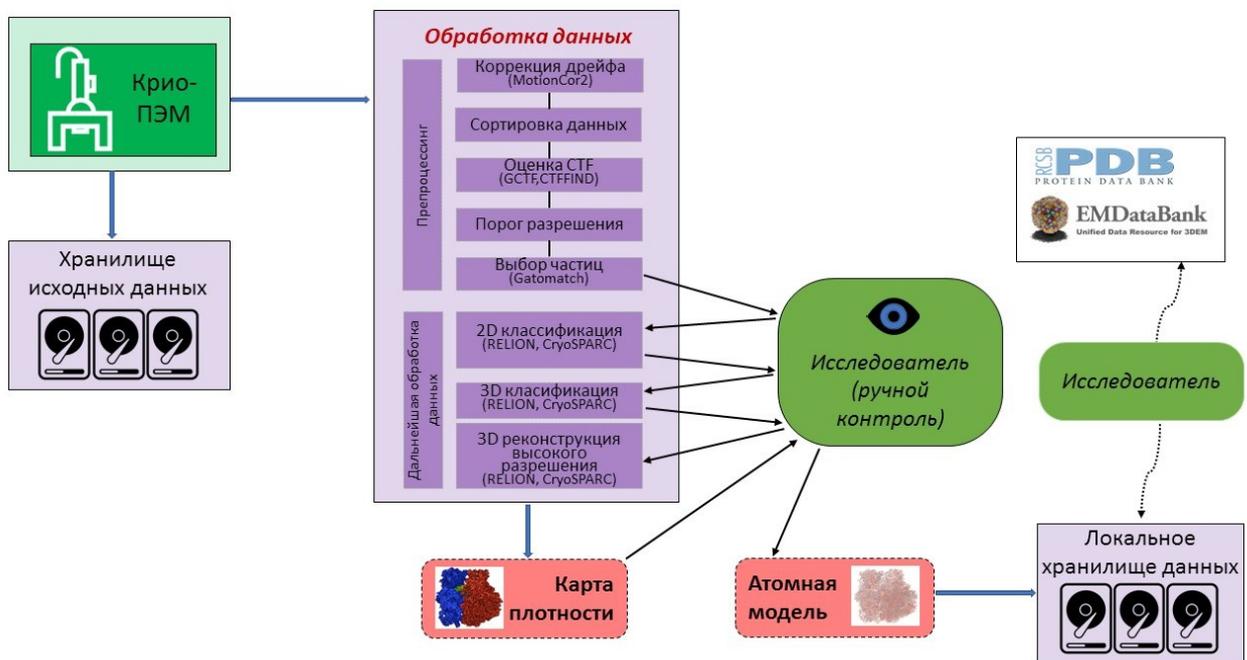


Рисунок 8. Схема основных этапов обработки для получения трехмерной реконструкции исследуемого объекта методом анализа проекций одиночных частиц.

На первом этапе (рис. 8) проводится коррекция анизотропного дрейфа, вызванного воздействием электронного пучка, а также фильтрация изображений в зависимости от дозы облучения (количества электронов, прошедших через единицу площади образца) (Motioncor2 [100] и др.). Далее проводится оценка функции передачи контраста и уточнение локальных значений дефокусировки и астигматизма (Gctf [101], CTFFIND [102]), что позволяет исключить из

рассмотрения часть экспериментальных данных, не соответствующих заданным параметрам.

Функция передачи контраста (CTF, Contrast Transfer Function) моделируется как двумерная функция вектора пространственной частоты \mathbf{g} :

$$CTF(\lambda, |\mathbf{g}|, \Delta f, C_s, \Delta\varphi) = -w_1 \sin[\chi(\lambda, |\mathbf{g}|, \Delta f, C_s, \Delta\varphi)] - w_2 \cos[\chi(\lambda, |\mathbf{g}|, \Delta f, C_s, \Delta\varphi)] \quad (1),$$

где фазовый сдвиг χ есть функция длины волны электрона λ , дефокусировки объективной линзы Δf и C_s - коэффициента сферических аббераций. $\Delta\varphi$ - дополнительный фазовый сдвиг ($\Delta\varphi \neq 0$ при наличии фазовой пластины), параметр w_2 - амплитудный контраст, зависящий от характеристик образца. Относительный фазовый контраст:

$$w_1 = \sqrt{1 - w_2^2} \quad (2).$$

На следующем этапе проводится поиск и выделение различных проекций исследуемого объекта на выровненных изображениях. Для автоматического выделения (Gautomatch (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK) и др.) могут быть использованы шаблоны, полученные в результате ручного выбора проекций на ограниченном наборе экспериментальных данных крио-ЭМ или ПЭМ с использованием негативного контрастирования (программа EMAN2 [103] и др.), а также шаблоны, полученные с использованием уже известных моделей схожих объектов.

В настоящее время приобретают популярность инструменты на основе нейронных сетей с «глубоким обучением», что позволяет выполнять описанные выше процедуры предобработки данных в автоматическом режиме. Такой функционал реализован, например, в программном пакете Warp [104].

Двумерная классификация полученных ориентаций объекта (RELION [78], CryoSPARC [79] и др.) является первым шагом к определению его пространственной структуры. На этом этапе проекционные изображения частиц выравниваются и группируются в отдельные классы. Далее, из рассмотрения

исключаются классы, содержащие частицы льда и загрязнений. Процесс, как правило, проходит в несколько итераций.

На основе выбранных классов осуществляется генерация трехмерной *ab initio* модели низкого разрешения, которая последовательно уточняется итерационными алгоритмами с учетом или без учета известной симметрии исследуемого объекта. *Ab initio* модель может быть получена, в частности, с помощью алгоритма стохастического градиентного спуска (СГС, реализовано в программном пакете CryoSPARC [79]). Алгоритм СГС итеративно оптимизирует целевую функцию $f(\mathbf{V})$, вычисляя приближенные градиенты и определяя соответствующие шаги обновления параметров на основе градиента:

$$f(\mathbf{V}) = \sum_{i=1}^N \log \left(\sum_{j=1}^K \pi_j \int p(X_i | \varphi, V_j) p(\varphi) d\varphi \right) + \sum_{j=1}^K \log p(V_j) \quad (3),$$

где в первом слагаемом под знаком логарифма представлена вероятность наблюдения проекционного изображения X_i трехмерных структур \mathbf{V} , а второе слагаемое является постоянным и независимым для каждой трехмерной структуры.

Градиент целевой функции вычисляется по формуле:

$$\frac{\partial f}{\partial V_k} = \sum_{i=1}^N \frac{1}{U_i} \frac{\partial U_i}{\partial V_k} + \frac{\partial}{\partial V_k} \log p(V_k) = \sum_{i=1}^N \frac{1}{U_i} \pi_k \int \frac{\partial}{\partial V_k} p(X_i | \varphi, V_k) p(\varphi) d\varphi + \frac{\partial}{\partial V_k} \log p(V_k) \quad (4),$$

где U_i – вероятность наблюдения изображения X_i , а подынтегральное выражение – градиент модели формирования крио-ЭМ изображения относительно структуры V_k . При этом для получения начальной трехмерной реконструкции низкого разрешения, имеющей схожие с объектом интереса масштаб и размеры, выбирается случайное подмножество из набора полученных изображений. Использование полученной реконструкции в алгоритме СГС позволяет оперативно получить трехмерную *ab initio* карту с пространственным разрешением до 10 Å, которая затем последовательно уточняется с помощью EM-алгоритма (англ. Expectation-Maximization algorithm) – метода, в котором вычисляется ожидаемое значение функции правдоподобия и оценка максимального правдоподобия. При этом задача поиска функции правдоподобия может быть эффективно решена с использованием техники поиска по ветвям и границам (англ. Branch and Bound) [79].

В случае подвижности исследуемого комплекса, проводится реконструкция его отдельных субъединиц, а в случае гетерогенности образца проводится классификация полученных трехмерных реконструкций (RELION, CisTEM [105]) и уточнение структур полученных трехмерных моделей. На финальной стадии проводится фиттинг и уточнение модели в полученной карте плотности [106].

1.3.5. Криоэлектронная томография

Наряду с методом анализа проекций одиночных частиц, существенное развитие получил метод криоэлектронной томографии (крио-ЭТ) [108, А3], нацеленный, прежде всего, на изучение существенно гетерогенных объектов с вариативной морфологией [108], а также структур, образованных большим числом макромолекул, и обеспечивающий уникальную возможность прямой визуализации молекулярных структур в их естественном функциональном окружении [109].

Крио-ЭТ применяется для объектов, структурная информация для которых по ряду причин не может быть получена другими методами, в силу, например, большого размера, трудностей выделения образцов и их разрушения в процессе очистки. Применение крио-ЭТ, в свою очередь, позволяет изучать комплексы, которые сложно воспроизвести и выделить, непосредственно в клетках [110], а также их конформации, взаимные ориентации и взаимодействия, распределение в пространстве. При этом, как правило, для обработки данных и получения структур высокого разрешения методом крио-ЭТ используется менее 1000 частиц объекта интереса. Таким образом, в настоящее время крио-ЭТ заполняет пробел по физическим размерам исследуемых объектов и пространственному разрешению полученных данных между методами оптической микроскопии сверхвысокого разрешения и такими методами определения структуры биологических макромолекул с атомарным разрешением, как ядерный магнитный резонанс, метод

анализа одиночных частиц и рентгеноструктурный анализ, вплотную приближаясь к последним [А3].

Основная идея метода крио-ЭТ заключается в том, что, согласно теореме о срезе Фурье, двумерное преобразование Фурье* проекции объекта идентично центральному срезу трехмерного преобразования Фурье от объекта. Таким образом, из серии достаточно большого количества проекционных изображений объекта, полученных в широком диапазоне углов наклона, можно реконструировать трехмерную структуру объекта [111] (рис. 9). Для этого в процессе набора экспериментальных данных производится механический поворот сетки с образцом. Полученная реконструкция называется томограммой, а ее части, содержащие отдельные макромолекулярные комплексы – субтомограммами.

**Здесь и далее под преобразованием Фурье подразумевается дискретное преобразование, которое в общем случае может быть представлено матрицей $\vec{X} = \hat{A}\vec{x}$, элементы которой задаются формулой $A(m, n) = \exp\left(-2\pi i \frac{(m-1)(n-1)}{N}\right)$. Согласно теореме о свертке, преобразование Фурье переводит свертку в произведение и произведение в свертку.*

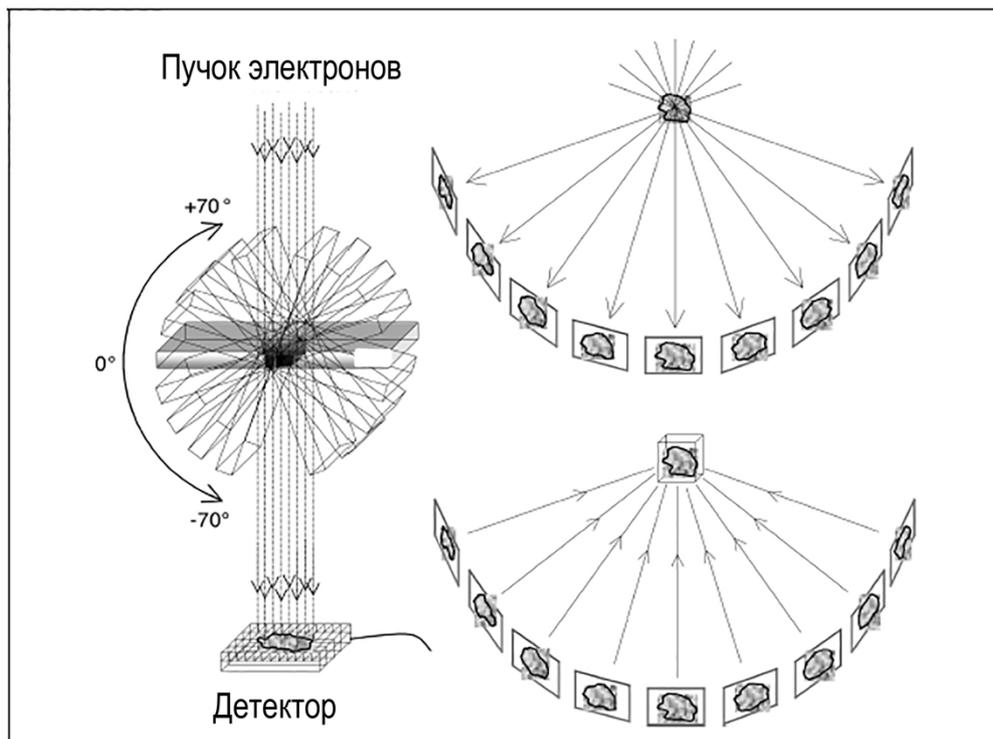


Рисунок 9. Схематическое изображение томографической реконструкции: получение проекционных изображений и обратное проецирование для восстановления трехмерной структуры объекта. Адаптировано из [48].

Последствия угловой дискретизации и использования ограниченного диапазона углов наклона на трехмерную реконструкцию лучше всего могут быть представлены в обратном пространстве. Если рассматривать процесс создания трехмерного объекта путем объединения преобразований Фурье из изображений, полученных при различных углах наклона, то становится видно, что ограниченный диапазон углов наклона во время получения угловой серии изображений ведет к эффекту отсутствующего клина информации (англ. Missing Wedge) в трехмерном Фурье-пространстве. Коэффициенты Фурье исходного объекта в отсутствующем клине не будут реконструированы, и, таким образом, не будут участвовать в трехмерной реконструкции [112].

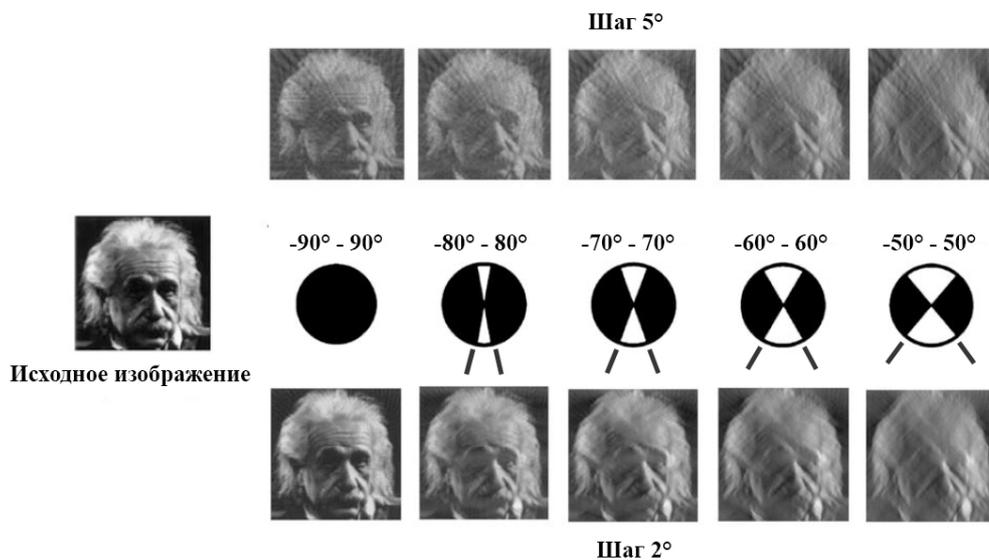


Рисунок 10. Иллюстрация влияния используемого диапазона углов и шага по углу на качество реконструкции томограммы. Адаптировано из [113].

Стандартный способ оценки разрешения томографической реконструкции определяется критерием Кроутера [114]. Оценка для трехмерного разрешения (d) реконструкции сферического объекта диаметром (D) на основе (N) проекций может быть получено на основе уравнения Кроутера:

$$d = \pi \frac{D}{N} \quad (5).$$

Если полученная наклонная серия изображений покрывает ограниченный диапазон углов наклона α_{max} (отсутствующий клин), все объекты будут вытянуты в направлении оси z на фактор элонгации e , который может быть оценен по следующей формуле:

$$e = \sqrt{\frac{\alpha_{max} + \sin \alpha_{max} \cos \alpha_{max}}{\alpha_{max} - \sin \alpha_{max} \cos \alpha_{max}}} \quad (6),$$

где α_{max} – наибольший угол наклона [115, 116].

Стоит отметить, что помимо классической одноосной схемы набора экспериментальных данных, существуют различные геометрические схемы электронной томографии. На рисунке 11 представлена визуализация трехмерного пространства Фурье при одноосной (рис. 11 А), двуосной (рис. 11 Б) и конической (рис. 11 в) томографии. Область отсутствующей информации представлена двойным клином при одноосной схеме, двойной пирамидой при двуосной и двойным конусом при конической схеме.

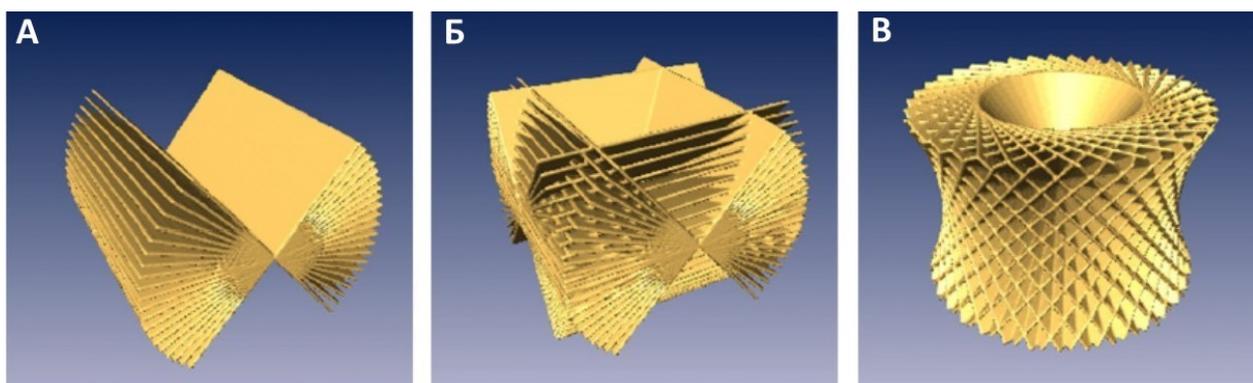


Рисунок 11. Визуализация трехмерного пространства Фурье при различных геометрических схемах получения данных электронной томографии. А – одноосная; Б – двуосная; В – коническая. Адаптировано из [117].

Таким образом, использование двуосной и конической схем набора данных позволяет осуществить более широкое покрытие пространства Фурье, приводя к

увеличению количества получаемой информации и снижению анизотропии разрешения. Однако, одновременно с этим увеличивается и доза электронов, проходящих через единицу площади образца, в связи с чем большинство крио-ЭТ исследований выполняются с использованием одноосной схемы.

Применение субтомографического усреднения (см. раздел 1.3.8.4) для повторяющихся структурных элементов [118] позволяет избавиться от отсутствующего клина информации и обеспечивает возможность получения трехмерных реконструкций объекта с субнанометровым разрешением [119]. Данный подход не только демонстрирует прекрасные результаты при изучении структурных особенностей относительно больших объектов, таких как клетки [120] и вирусы [121], но и позволил изучить механизмы взаимодействия последних с бактериями [122], а также визуализировать некоторые белки на поверхности бактериофагов [123].

1.3.6. Ограничение на размер исследуемых образцов

Существуют ограничения на максимальную толщину исследуемого образца для получения трехмерной реконструкции высокого разрешения методом крио-ЭТ. Как правило, для хорошей детализации микроструктуры витрифицированных образцов, их толщина не должна превышать длину свободного пробега электронов во льду, равную ~350 нм при использовании ускоряющего напряжения 300 кэВ [124, 125], стандартного в крио-ПЭМ. Это исключает возможность прямой визуализации наполнения большинства эукариотических клеток, тем самым ограничивая применимость метода для экспериментов *in cellulo* без проведения дополнительных процедур утонения образца, позволяя изучать лишь относительно тонкие внешние части (латеральные отростки) на периферии эукариотических клеток [126, 127] и некоторые бактерии [128–130]. В результате, возникает вопрос

о дополнительной пробоподготовке для получения достаточно тонких (т.н. электроннопрозрачных) образцов.

Применение метода крио-ультрамикротомирования [131], используемого для получения ультратонких срезов биологических тканей [132], сопряжено с определенными сложностями в случае приготовления срезов замороженных клеток [133], такими как подготовка блока с клетками, точность позиционирования алмазного ножа и переноса срезов на электронно-микроскопическую сетку в условиях работы с жидким азотом. В дополнение к этому, несмотря на прецизионность алмазных ножей, механическое приготовление срезов может вносить артефакты в структуру клетки [134].

Альтернативой вышеописанным способам утонения образцов для исследования клеточных систем *in cellulo* является применение к витрифицированным образцам фокусированного ионного пучка (ФИП) в криогенном режиме (крио-ФИП) (см. раздел 1.3.7), либо их исследование *in vitro* [135, 136]. Так, после лизирования интактных клеток может проводиться крио-ЭТ изучение отдельных структур клеточного наполнения [137–140].

1.3.7. Получение тонких срезов биологических образцов с применением фокусированного ионного пучка в крио-режиме

Для получения тонких срезов витрифицированных биологических образцов в настоящее время начинают использовать их утонение в криогенном растровом электронно-ионном микроскопе (крио-РЭИМ), а именно посредством использования крио-ФИП [141, 142] - модификации популярного метода приготовления образцов для ПЭМ [143]. Данный подход в основном применяется при изучении клеток и клеточных систем и заключается в утонении области интереса образца с помощью ионов Ga^+ при последовательном понижении

ускоряющего напряжения, силы тока и наклона пучка по отношению к образцу [144] (рис. 12).

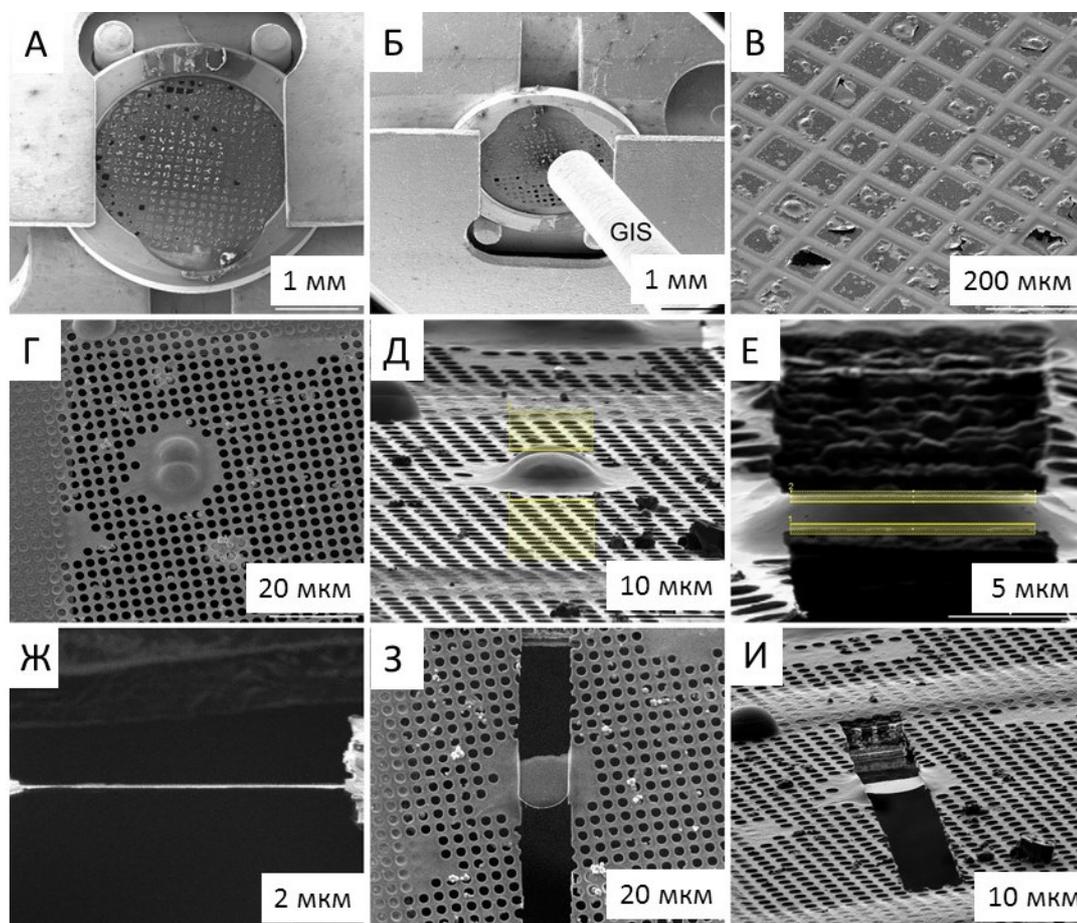


Рисунок 12. Иллюстрация основных этапов приготовления тонких срезов витрифицированных образцов с помощью крио-ФИП. **А** – РЭМ изображение сетки с образцом; **Б, В** - напыление защитного слоя платины с помощью газовой-инжекционной системы; **Г** – РЭМ изображение клетки на поверхности сетки; **Д** - изображение клетки в ионном пучке, желтым показаны паттерны травления ФИП; **Е** – утонение клеточного среза с помощью ФИП; **Ж-И** – финальный срез в различных проекциях. Адаптировано из [145].

Стоит отметить, что процесс поиска и визуализации клеток, зафиксированных в слое аморфного льда на поверхности сетки, является достаточно трудоемким. В настоящее время эта проблема решается с помощью мечения клеток флуоресцентными метками и промежуточного этапа получения данных с помощью криогенной корреляционной микроскопии (рис. 13) [146].

1.3.8. Трехмерная реконструкция и анализ экспериментальных данных крио-ЭТ

1.3.8.1. Кросс-корреляционное выравнивание

На первом этапе трехмерной реконструкции проводится кросс-корреляционное выравнивание поворотной серии изображений, полученной в результате крио-ЭТ.

При изучении объектов, подвергнутых процедуре заморозке без дополнительной пробоподготовки (клеточные системы, бактериальные клетки, вирусы) выравнивание угловой серии изображений, как правило, осуществляется при помощи наночастиц коллоидного золота, добавляемых в исследуемый препарат перед проведением процедуры витрификации [150]. В таком случае соотношения между координатами наночастиц золота в образце и координаты их проекционных изображений могут быть описаны следующей системой уравнений:

$$\mathbf{p}_j^i = \mathbf{M}^i \mathbf{r}_j + \mathbf{d}^i, \quad i=1 \dots N, j=1 \dots N_m \quad (7),$$

где N – количество изображений в угловой серии, N_m – количество золотых меток, $\mathbf{r}_j = (x_j, y_j, z_j)$ – координаты j -ой золотой метки в образце; $\mathbf{M}^i = m^i \mathbf{P} \mathbf{R}^i$ – проекционная матрица, в которой \mathbf{R}^i – матрица поворота 3×3 , содержащая углы Эйлера, соответствующие i -ому изображению угловой серии; \mathbf{P} – оператор проекции вдоль оси Z ; m^i – фактор масштабирования, используемый для учета изменения увеличения на i -ом изображении [116].

Выравнивание угловой серии также может осуществляться без помощи золотых меток с использованием структурных особенностей изучаемого образца [151, 152], что особенно актуально в случае проведения экспериментов с массивными интактными образцами, приготовленными методом крио-ФИП. Это становится возможным благодаря увеличению контраста изображений с помощью фазовой пластины. Однако, фазовая пластина чувствительна к заряду полученной

крио-ФИП ламели, что требует напыления дополнительного проводящего слоя [144] (как правило, используется платина) перед проведением крио-ЭТ экспериментов.

1.3.8.2. Трехмерная реконструкция

Существует большое число различных алгоритмов трехмерной реконструкции томограмм [153]. В настоящее время наиболее часто используется метод взвешенной обратной проекции (Weighted Back Projection, WBP) [115, 154], а также алгоритм одновременной итерационной реконструкции [155] (Simultaneous Iterative Reconstruction Technique, SIRT).

Основной задачей метода SIRT является поиск структуры \mathbf{d} , минимизирующей следующую функцию:

$$L(\mathbf{d}) = |\mathbf{P}\mathbf{d} - \mathbf{g}|^2 \quad (8),$$

где \mathbf{P} – проекционная матрица, элементами которой являются интерполяционные веса; \mathbf{g} – вектор, содержащий пиксели всех доступных проекций. Работа алгоритма начинается с выбора исходной структуры \mathbf{d}^0 , далее происходит последовательное обновление приближения \mathbf{d}^{i+1} , используя градиент функции $\nabla L(\mathbf{d})$:

$$\mathbf{d}^{i+1} = \mathbf{d}^i - \lambda^i \mathbf{P}^T (\mathbf{P}\mathbf{d}^i - \mathbf{g}) = \mathbf{d}^i - \lambda^i (\mathbf{P}^T \mathbf{P}\mathbf{d}^i - \mathbf{P}^T \mathbf{g}) \quad (9).$$

В простейшем случае применения алгоритма обратного проецирования для функции $f(x^j, y^j, z^j)$:

$$p_j = \int f(x^j, y^j, z^j) dz^j \quad (10)$$

– проекция вдоль направления z^j с углами θ^j, φ^j . Тогда обратная проекция может быть получена как свертка p_j с функцией рассеяния точки

$$l_j = \delta(x^j, y^j) c(z^j) \quad (11),$$

$$\text{где } c(z^j) = \begin{cases} 1 & \text{при } -a \leq z^j \leq +a \\ 0 & \text{в прочих случаях} \end{cases} \quad (12).$$

Алгоритм обратного проецирования принимает следующий вид:

$$b(x, y, z) = \sum_j p_j^b(x^j, y^j, z^j) \quad (13).$$

В методе взвешенной обратной проекции (WBP) взвешивающий фильтр вводится для уменьшения вклада низких пространственных частот.

Томограммы, реконструированные методом SIRT, обладают более высоким контрастом, в сравнении с реконструированными методом WBP. В то же время, WBP с большей точностью передает информацию о высоких пространственных частотах. Поэтому реконструкции, полученные методом SIRT, часто используют на этапах сегментации и аннотации данных, в то время как WBP чаще применяется для субтомографического усреднения большого числа идентичных макромолекул [156].

1.3.8.3. Аннотация и сегментация данных

На следующем этапе проводится определение положения макромолекул на томограммах с помощью шаблонов [157]. Сегментация и аннотация томографических стеков производится в полуавтоматическом режиме и, как правило, требует применения нескольких программных пакетов. Так, для сегментации мембран часто используется программа TomoSegMemTV [158] или Avizo (Thermo Fisher Scientific, США), для микротрубочек - XTracing Module в программном пакете Amira. Положения и ориентации различных макромолекул могут определяться в автоматическом режиме посредством использования трехмерных шаблонов этих молекул (PEET [159], EMAN2 [160], Dynamo [161]). Шаблоны могут создаваться на основе известной трехмерной структуры данных макромолекул, определенной методами рентгеноструктурного анализа или с помощью метода анализа одиночных частиц [80, 162] в крио-ПЭМ или ПЭМ с применением негативного контрастирования. Однако, существенная гетерогенность макромолекул и наличие ложно-выбранных координат требует

последующей итерационной трехмерной классификации и усреднения небольших участков томограммы (т.н. субтомограмм), содержащих отдельные макромолекулы [126]. Развитие машинного зрения привело к появлению инструментов для автоматической аннотации и сегментации множества объектов на основе небольшого набора томографических срезов, сегментированных в ручном режиме [163].

1.3.8.4. Субтомографическое усреднение высокого разрешения

Финальное пространственное разрешение трехмерной реконструкции в большой степени зависит от толщины образца, размера и веса изучаемого объекта, точности выравнивания проекционных изображений, шага по углу и углового диапазона в процессе эксперимента, наличия энергетического фильтра, а также используемых алгоритмов обработки данных. Пространственное разрешение томографической реконструкции ограничивается анизотропией разрешения и низким соотношением сигнал-шум, и, как правило, не превышает 5 нм. Однако, при наличии повторяющихся структурных элементов в исследуемом образце, возможно существенно улучшить пространственное разрешение, применяя метод субтомографического усреднения [156]. Такой подход позволяет покрыть всё обратное пространство и избавиться от отсутствующего клина информации. Для этого на реконструированной томограмме в ручном или автоматическом режиме определяются положения объектов интереса (IMOD [164]) и проводится экстракция (извлечение из массива данных) соответствующих им участков томограммы (RELION [75, 78]). На следующем шаге выполняется оценка значений дефокусировки каждого изображения (CTFFIND4 [102]) и построение трехмерной модели функции передачи контраста. Далее проводится извлечение субтомограмм, их выравнивание и последующее итерационное усреднение (рис. 14), что позволяет

увеличить соотношение сигнал-шум, и, как следствие, пространственное разрешение реконструкции [149].

Получение трехмерной структуры в большинстве программных пакетов основано на применении метода максимального правдоподобия (англ. *ML* – *Maximum Likelihood*) и тесно связанного с ним метода оценки с помощью апостериорного максимума (англ. *MAP* – *maximum a posteriori probability*), использующего априорное распределение оцениваемой величины при оптимизации (например, Relion [75]). В пространстве Фурье:

$$X_{ij} = CTF_{ij} \sum_{l=1}^L \mathbf{P}_{jl}^{\varphi} V_{kl} + N_{ij}, j=1 \dots J, i=1 \dots N, l=1 \dots L \quad (14),$$

где X_{ij} – компонента двумерного преобразования Фурье X_i -ого экспериментального изображения; CTF_{ij} – компонента функции передачи контраста; V_{kl} – независимая компонента трехмерного преобразования Фурье \mathbf{V}_k ; \mathbf{P}^{φ} – матрица элементов $\mathbf{P}_{jl}^{\varphi}$, размером $J \times L$. Операция $\sum_{l=1}^L \mathbf{P}_{jl}^{\varphi} V_{kl}$ извлекает срез трехмерного преобразования Фурье, φ определяет ориентацию двумерного преобразования Фурье относительно трехмерной структуры. Параметр N_{ij} соответствует шуму в комплексной плоскости и предполагается независимым.

Задача получения трехмерной реконструкции может быть сформулирована как нахождение модели с параметрами θ , имеющей наибольшую вероятность быть правильной на основании полученных данных X и априорной информации Y . Тогда, согласно формуле Байеса:

$$P(\theta|X, Y) \propto P(X|\theta, Y)P(\theta|Y) \quad (15),$$

где $P(X|\theta, Y)$ – вероятность наблюдения данных на основании модели, а $P(\theta|Y)$ – вероятность учета априорной информации. Оптимизация $P(\theta|X, Y)$ может быть получена с помощью алгоритма EM:

$$V_{kl}^{(n+1)} = \frac{\sum_{i=1}^N \int \Gamma_{ik\varphi}^{(n)} \sum_{j=1}^J \mathbf{P}_{lj}^{\varphi T} \frac{CTF_{ij} X_{ij}}{\sigma_{ij}^{2(n)}} d\varphi}{\sum_{i=1}^N \int \Gamma_{ik\varphi}^{(n)} \sum_{j=1}^J \mathbf{P}_{lj}^{\varphi T} \frac{CTF_{ij}^2}{\sigma_{ij}^{2(n)}} d\varphi + \frac{1}{\tau_{kl}^{2(n)}}} \quad (16),$$

$$\sigma_{ij}^{2(n+1)} = \frac{1}{2} \sum_{k=1}^K \int \Gamma_{ik\varphi}^{(n)} \left| X_{ij} - CTF_{ij} \sum_{l=1}^L \mathbf{P}_{jl}^{\varphi} V_{kl}^{(n)} \right|^2 d\varphi \quad (17),$$

$$\tau_{kl}^{2(n+1)} = \frac{1}{2} |V_{kl}^{(n+1)}|^2 \quad (18).$$

$\Gamma_{ik\varphi}^{(n)}$ – апостериорная вероятность присвоения класса k и ориентации φ для i -го изображения для данной модели на итерации n , которая может быть вычислена следующим образом [75]:

$$\Gamma_{ik\varphi}^{(n)} = \frac{P(\mathbf{X}_i|k, \varphi, \theta^{(n)}, Y)P(k, \varphi|\theta^{(n)}, Y)}{\sum_{k'=1}^K \int P(\mathbf{X}_i|k', \varphi', \theta^{(n)}, Y)P(k', \varphi'|\theta^{(n)}, Y)d\varphi'} \quad (19),$$

$$P(\mathbf{X}_i|k, \varphi, \theta^{(n)}, Y) = \prod_{j=1}^J \frac{1}{2\pi\sigma_{ij}^2(n)} \exp\left(\frac{|X_{ij} - \text{CTF}_{ij} \sum_{l=1}^L \mathbf{P}_{jl}^\varphi V_{kl}^{(n)}|^2}{-2\sigma_{ij}^2(n)}\right) \quad (20).$$

Финальная визуализация трехмерных реконструкций, как правило, выполняется в программном пакете UCSF Chimera [165].

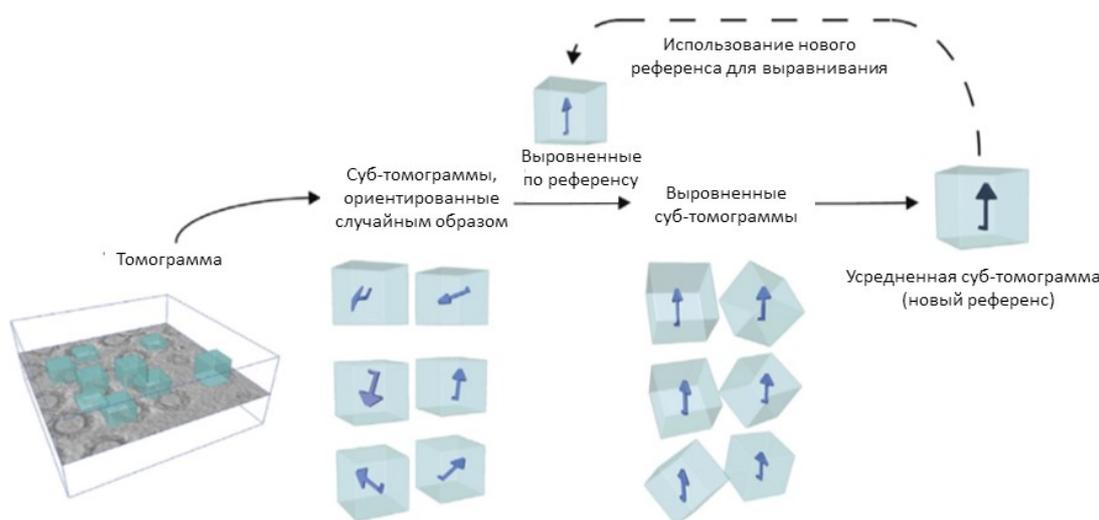


Рисунок 14. Схема процедуры субтомографического усреднения. Адаптировано из [166].

На данный момент субнанометровое пространственное разрешение макромолекул с помощью крио-ЭТ удалось получить только для высокоупорядоченных структур *in vitro*, таких как капсиды вирусов [119] или белки, уложенные в цилиндры [167]. Высокое пространственное разрешение (ниже 4 Å), как правило, обеспечивается использованием большого числа (порядка 100 000) макромолекул для субтомографического усреднения, что сопоставимо с

числом частиц, используемых при проведении экспериментов методом анализа одиночных частиц. Также необходимо соблюдение следующих условий: симметричная по дозе схема наклона при записи томографической серии [168], использование ускоряющего напряжения 300 кэВ, детектора на основе КМОП (Gatan K2/K3 и др.) в режиме идентификации отдельных электронов (достигается быстрой работой камеры), применение энергетического фильтра, коррекция дрейфа для полученных субфреймов. Дополнительное улучшение разрешения обеспечивается новыми методами коррекции функции передачи контраста [169].

В случае изучения более массивных клеточных систем пространственное разрешение, как правило, составляет 20-40 Å. К настоящему моменту при исследовании молекулярной архитектуры белковых агрегатов в интактных нейронах достигнуто пространственное разрешение 11 Å [110]. Однако, представленный недавно алгоритм обработки данных с использованием программного пакета M [170], а также Warp [104] и Relion [75] позволил получить структуру рибосомы в бактериальной клетке с разрешением 3.7 Å, демонстрируя принципиальную возможность получения трехмерных структур *in situ* с пространственным разрешением, сопоставимым с получаемым с использованием метода анализа проекций одиночных частиц *in vitro*.

Стандартным методом оценки разрешения трехмерных реконструкций, полученных методом анализа проекций одиночных частиц или субтомографического усреднения, является вычисление объемной корреляции Фурье [171] (англ. Fourier Shell Correlation, FSC) между эквивалентными областями карт. Для этого исходный набор экспериментальных данных делится на две случайные половины и вычисляется корреляция между ними:

$$FSC(k) = \frac{\sum_{S \in S_k} U_S V_S^*}{\sqrt{(\sum_{S \in S_k} |U_S|^2)(\sum_{S \in S_k} |V_S|^2)}} \quad (21),$$

где S_k - набор вокселей Фурье в сферической оболочке на расстоянии k от начала координат; U и V - преобразования Фурье сравниваемых карт u и v . Предполагаемое разрешение реконструкции, в таком случае, соответствует

пространственной частоте, при которой значение корреляции Фурье (FSC) падает ниже некоторого порогового значения. В настоящее время нет консенсуса на счет выбора оптимального порогового значения для оценки разрешения [172], однако наиболее часто употребляемым является критерий $FSC=0.143$, соответствующий критериям разрешения, используемым в рентгеновской кристаллографии [173].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы

2.1.1. Клетки

В работе использовались клетки грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* BL21-Gold (DE3) (Agilent Technologies, США), а также полученные на её основе с помощью трансформации клетки *Escherichia coli* BL21-Gold (DE3) pET-Dps способные к сверхсинтезу белка Dps, любезно предоставленные Н.Г. Лойко (ФИЦ ХФ РАН) и А.А. Можаяевым (ФНИИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, ИБХ РАН).

2.1.2. Белок

В качестве основного объекта исследования использовался гистоноподобный белок Dps (DNA-binding protein from starved cells) (UniProtKB – P0ABT2 (DPS_ECOLI)) выделенный из *Escherichia coli* K12. Образцы предоставлены А.А. Можаяевым (ФНИИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, ИБХ РАН), а также Лазаревым В.Н. и Манувером В.А. (МФТИ ГУ).

2.1.3. ДНК

В качестве образцов ДНК использовались: Y-образный фрагмент, двухцепочечные линейные фрагменты длиной 66 пар нуклеотидов (п.н.) и 100 п.н., а также двухцепочечные кольцевые векторы длиной 3000 п.н. и 9900 п.н. Образцы предоставлены А.А. Можаяевым (ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, ИБХ РАН).

2.2. Методы

2.2.1. Получение Dps

Экспрессия и очистка белка Dps проводились по ранее разработанной методике [A2]. Очищенный Dps разделяли на аликвоты и хранили при -20°C . Непосредственно перед измерениями белок размораживали и использовали для анализа либо в исходном буфере или диализовали в двух разных буферах: 50 мМ Tris-HCl, 50 мМ NaCl, 0.5 мМ EDTA, pH 8.0 и 20мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, pH 7.5.

2.2.2. Получение образцов ДНК

В качестве образца ДНК использовали кольцевой вектор pcDNA-hIRR-GFP 9900 п.н. Вектор выделялся на диоксиде кремния S5631 (Sigma Aldrich, РФ) по протоколу, описанному в [174]. После выделения вектор повторно осаждали изопропанолом, промывали 70% этанолом, сушили на воздухе и растворяли в воде.

Концентрацию ДНК определяли с использованием спектрофотометра ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., США).

Короткие фрагменты ДНК 66 и 100 п.н. получали путем амплификации с вектора pQE30 с использованием смеси ScreenMix-HS (Евроген, РФ). После амплификации фрагменты очищали фенол-хлороформной экстракцией, осаждали изопропанолом с добавлением 1,5М ацетата аммония, промывали 70% этанолом, высушивали и растворяли в воде MQ. Концентрацию измеряли на спектрофотометре NanoVue, для пересчёта поглощения на 260 нм использовали формулу: $C[\text{мг/мл}] = A_{260} * 20 * 50$.

2.2.3. Подготовка клеток

Клетки *E. coli* BL21-Gold (DE3) и *E. coli* BL21-Gold (DE3) pET-Dps с усиленной экспрессией Dps получали культивированием на среде LB следующего состава (г/л): дрожжевой лизат – 10.0; пептон – 5.0; NaCl – 5; pH 7.0, в случае культивирования штамма сверхэкспрессирующего белок Dps в среду дополнительно добавляли 150 мкг/мл антибиотика ампициллина. Инокулят вносили в количестве 2%. Культивирование осуществляли в колбах на 250 мл с 50 мл питательной среды на качалках при 120 об/мин и 28°C. Для активации экспрессии Dps в питательную среду к штамму *E. coli* BL21-Gold (DE3) pET-Dps в фазе линейного роста добавляли индуктор 0.5 мМ IPTG. Через 24 часа колбы с клетками снимали с качалки и инкубировали в статическом режиме при 28°C. При дальнейшем статическом режиме культивирования клетки переходят в стрессовое для них состояние голодания. Данное состояние индуцирует переход в стационарную фазу и сопровождается ростом количества белка Dps, формирующего комплекс с ДНК для её протекции. В качестве контрольных образцов использовались клетки, не подвергшиеся голоданию.

2.2.4. Приготовление образцов ко-кристаллов

На основании предварительных данных, полученных методом МУРР и описанных в работах [A1, A2] крио-ЭТ исследования с последующим субтомографическим усреднением проводились для двух различных образцов Dps и ДНК, описанных в разделе 2.2.4.1. и 2.2.4.2. Препараты, исследованные методом анализа проекций одиночных частиц, описаны в разделе 2.2.4.3.

2.2.4.1. Крио-ЭТ исследование образцов первого типа

Для получения образцов первого типа использованы додекамеры Dps, выделенные из *E. coli* в буфере 50 мМ Tris-HCl, pH 8, 50 мМ NaCl, 0.5 мМ ЭДТА. В качестве образцов ДНК использовался кольцевой вектор pcDNA-hIRR-GFP длиной 9900 пар оснований (см. статью [A2]). Результаты, полученные с использованием этого типа образцов, описаны в разделе 4.3.1. «Кристаллы с триклинной элементарной ячейкой».

2.2.4.2. Крио-ЭТ исследование образцов второго типа

Для получения образцов второго типа использовались препараты Dps в буфере, содержащем 10 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 100 мМ NaCl, 0.5 мМ ЭДТА. В качестве образца ДНК использован кольцевой вектор pcDNA-hIRR-GFP длиной 9900 пар оснований. Подробное описание образцов представлено в работе [A1]. Результаты, полученные с использованием данного типа образцов, описаны в разделе 4.3.2. «Полиморфизм ко-кристаллов Dps-ДНК. Кристаллы с кубической элементарной ячейкой».

2.2.4.3. Исследование методом анализа проекций одиночных частиц

В таблице 1 указаны образцы, использованные для исследования механизмов образования комплекса Dps-ДНК методом анализа проекций одиночных частиц (результаты описаны в разделе 4.4)

Таблица 1. Описание образцов Dps и ДНК, используемых для изучения механизмов комплексообразования.

Обозначение образца	Описание
1	Препарат ДНК Y-образного, 0.1 мМ, длина \geq 66 пар оснований
2	Препарат ДНК, длина ~100 пар оснований
3	Препарат ДНК, длина ~66 пар оснований
4	Препарат ДНК, длина ~3000 пар оснований
a	Препарат Dps в буфере 100 мМ NaCl; 0.5 мМ EDTA; 50 мМ Tris-HCl; pH 7.5
b	Препарат Dps в буфере 50 мМ NaCl; 0.5 мМ EDTA; 50 мМ Tris-HCl; pH 8
A	Буфер Dps 100 мМ NaCl; 0.5 мМ EDTA; 50 мМ Tris-HCl; pH 7.5
B	Буфер 50 мМ NaCl; 0.5 мМ EDTA; 50 мМ Tris-HCl; pH 8

Осуществлялся подбор оптимальных условий для определения механизма взаимодействия комплекса Dps-ДНК. Ввиду существенного влияния параметров используемых буферов и локальной концентрации ионов на

комплексообразование, вышеупомянутые препараты образцов смешивались в различных пропорциях – варьировалось соотношение Dps и ДНК, а также объемная доля соответствующего буфера.

2.2.5. Подготовка образцов для исследований методом криоэлектронной томографии

На первом этапе проводилось смешивание соответствующих образцов Dps и ДНК. Перед нанесением на электронно-микроскопическую сеточку 9 мкл приготовленного раствора смешивались с 1 мкл наночастиц коллоидного золота. Далее с помощью пипетки 3 мкл полученного препарата наносили на медную сетку (Lacey, Agar Scientific), покрытую тонким слоем аморфного углерода с нерегулярными отверстиями, предварительно подвергнутую процедуре обработки тлеющим разрядом в течение 30 с при токе 25 мА в установке PELCO easyGlow (Ted Pella, США) для придания гидрофильных свойств ее поверхности. С помощью автоматизированной системы Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, США) сетка с нанесенным препаратом в течение 1.5-4.0 с подвергалась одновременному двустороннему сжатию фильтровальной бумагой для удаления излишков раствора с образцом и создания льда оптимальной толщины. (рис. 15). Затем происходило немедленное погружение сетки с тонкой пленкой препарата в жидкий этан, предварительно охлажденный до температуры жидкого азота. В течение всего эксперимента влажность в камере системы Vitrobot Mark IV составляла 95-100%, температура 4°С.

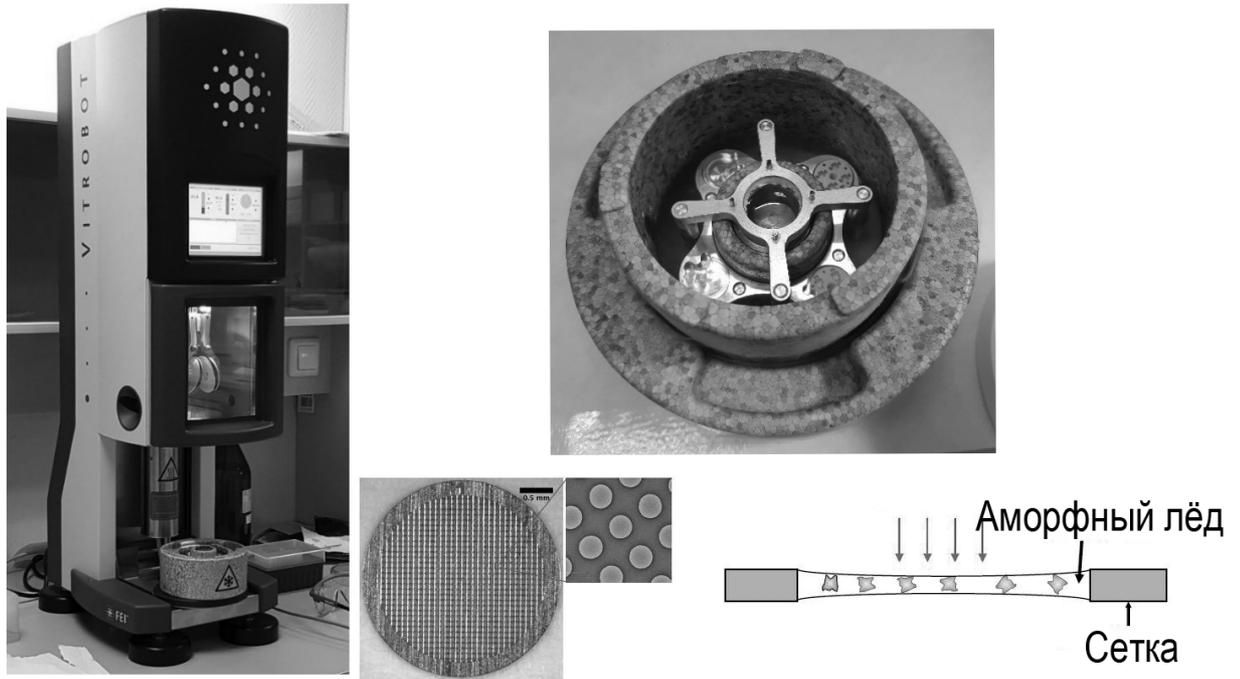


Рисунок 15. Система витрификации образцов Vitrobot Mark IV.

На следующем этапе осуществлялась запрессовка сеток с образцом в специальный картридж, состоящий из медного кольца и полукольца. Готовые сетки переносились в просвечивающий криоэлектронный микроскоп. Запрессовка сеток и перенос в крио-ПЭМ проводились в жидком азоте.

Приготовление сеток с образцами *E.coli* осуществлялось аналогичным образом.

2.2.6. Подготовка образцов для исследований методом анализа проекций одинокных частиц

На первом этапе поддерживающие медные сетки для электронной микроскопии с периодическими (Quantifoil R2/2, Cu) и непериодическими (Lacey, Agar Scientific) отверстиями в аморфной пленке углерода подвергались обработке в тлеющем разряде с помощью установки PELCO easiGlow в течение 30 сек при стандартных условиях (сила тока – 0.25 мА, остаточное давление в камере – 0.26 мБар) для придания гидрофильных свойств их поверхности.

Непосредственно перед выполнением процедуры витрификации осуществлялось равномерное смешивание растворов Dps и ДНК в пробирке с помощью прибора ELMi Vortex V-3.

Далее 3 мкл полученного раствора наносились на подготовленную сетку, установленную в камере установки Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, США), после чего излишки раствора промакивались фильтровальной бумагой. Процедура витрификации проводилась при следующих параметрах: сила сжатия при промакивании (Blot force) – 0 ед., время промакивания (Blot time) – 2.5 сек, температура в камере – 4°C, влажность в камере – 95-100%.

2.2.7. Утонение витрифицированных образцов с помощью крио-ФИП

Утонение методом крио-ФИП проводилось для бактериальных клеток *E.coli*, подвергнутых стрессовым воздействиям. Процедура проводилась с помощью растрового электронно-ионного микроскопа (РЭИМ) Versa 3D FEG (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенного источником с полевой эмиссией и криогенной приставкой Quorum PP3010T (Великобритания), установленного в ресурсном центре зондовой и электронной микроскопии НИЦ «Курчатовский институт» (рис. 16). Сетки с образцами, подвергнутыми процедуре витрификации, закреплялись в специальном держателе, после чего переносились в предварительно откачанную до 10^{-5} Па камеру микроскопа на столик с азотным охлаждением. Значение температуры в процессе эксперимента варьировалось в диапазоне [-165°C; -185°C].



Рисунок 16. Основные элементы крио-РЭИМ Versa 3D и криогенной приставки Quorum.

На первом этапе с помощью газовой-инжекционной системы (ГИС) проводилось напыление защитного слоя платины (температура напыления 26°C) на поверхность всей сетки, что позволяло снизить накопление заряда и защитить поверхность от радиационных повреждений в процессе эксперимента. После идентификации потенциальных областей интереса осуществлялось их травление с помощью крио-ФИП при ускоряющем напряжении 30 кВ и последовательном понижении силы тока от 1 нА до 50 пА для минимизации радиационных повреждений (в соответствии с протоколом, описанным в работе [144]).

Далее держатель с сеткой выгружался в жидкий азот, после чего проводился перенос сетки с утоненным образцом в крио-ПЭМ.

2.3. Проведение экспериментов методами крио-ПЭМ

2.3.1. Первичный скрининг и оценка качества образцов

Для оценки качества полученных образцов проводилось предварительное крио-ПЭМ исследование с помощью крио-ПЭМ Tecnai G2 SPIRIT (Thermo Fisher Scientific, США), установленного в центре коллективного пользования "Структурная диагностика материалов" ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. Микроскоп оборудован ПЗС детектором Eagle (Thermo Fisher Scientific, США) с разрешением 4096x4096 пикселей. Исследования проводились при ускоряющем напряжении 120 кэВ в режиме низких доз.

Дальнейшие исследования проводились с помощью крио-ПЭМ Titan Krios 60-300 TEM/STEM (Thermo Fisher Scientific, США), установленного в НИЦ «Курчатовский институт» и оснащенного высокочувствительной системой прямого детектирования электронов Falcon II (Thermo Fisher Scientific, США), корректором сферических aberrаций (Image corrector, CEOS, Германия) и фазовой пластиной (Volta Phase Plate) при ускоряющем напряжении 300 кВ.

Экспериментальные данные были получены в режиме малых доз с помощью программного обеспечения EPU (Thermo Fisher Scientific, США).

Крио-ПЭМ исследование образцов комплекса Dps-ДНК, полученных *in vitro* проводилось, в том числе, с использованием фазовой пластины при значении дефокусировки ~ 0.5 мкм, фазовом сдвиге $\sim \pi/2$ и суммарном значении электронов, прошедших через единицу площади образца $\sim 30 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$.

2.3.2. Криоэлектронная томография

Исследование проводилось с помощью крио-ПЭМ Titan Krios (Thermo Fisher Scientific, США) при ускоряющем напряжении 300 кВ. Для каждого образца осуществлялся набор нескольких томографических серий на различных участках сетки. Каждый набор данных состоял из 61 изображения, полученных в результате наклона образца от -60° до 60° с угловым шагом в 2° (схема наклона в две стороны: $0^\circ, -2^\circ, \dots, -58^\circ, -60^\circ, 2^\circ, 4^\circ, \dots, 58^\circ, 60^\circ$). Получение данных проводилось в автоматическом режиме с помощью программного обеспечения Tomography (Thermo Fisher Scientific, США) в режиме малых доз, что позволило минимизировать радиационные повреждения, сохраняя нативную структуру исследуемых объектов.

Для проведения *in cellulo* исследований использовались увеличения 8700x и 18000x с экспериментально подобранными оптимальными значениями дефокусировки в диапазоне [-5 мкм; -8 мкм]. *In vitro* исследование проводилось при использовании увеличения 18000x (размер пикселя 3.7 \AA) и с дефокусировкой в диапазоне [-3; -5] мкм. Суммарное значение дозы электронов, прошедших через единицу площади образца за время экспозиции, составило $\sim 60 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$.

2.3.3. Метод анализа проекций одиночных частиц

При проведении исследования методом анализа проекций одиночных частиц экспериментальные данные были получены с использованием программного обеспечения EPU (Thermo Fisher Scientific, США) в режиме малых доз при параметрах, указанных в таблице 2.

Таблица 2. Параметры получения экспериментальных данных крио-ПЭМ.

Ускоряющее напряжение, кВ	300
Номинальное увеличение	75000x
Размер пикселя на уровне образца, Å	0.86
Первая конденсорная апертура, мкм	2000
Вторая конденсорная апертура, мкм	100
Объективная апертура, мкм	100
Время экспозиции, с	1.0 (1.5)
Количество изображений в стеке	20 (30)
Поток электронов $\bar{e}/\text{Å}^2\text{s}$	3.0
Дефокусировки, мкм	[-1.0:-3.0]

После первичной оценки морфологии полученных образцов с помощью крио-ПЭМ, для проведения дальнейших исследований методом анализа проекций одиночных частиц были выбраны образцы (см табл. 1) 1b (1ДНК:1Dps), 3a (1ДНК:1Dps), 3b (1ДНК:1Dps):4(B).

2.4. Обработка экспериментальных данных

2.4.1. Обработка данных криоэлектронной томографии

Каждый полученный набор изображений подвергался процедуре кросскорреляционного выравнивания и томографического восстановления с помощью программного обеспечения IMOD. Процедура томографического

восстановления проводилась с использованием метода одновременной итерационной реконструкции (SIRT) и метода обратно взвешенных проекций (WBP) [154]. Наночастицы коллоидного золота, добавленные в раствор образца на этапе приготовления препарата, использовались для выравнивания полученных угловых серий.

Трехмерная реконструкция методом субтомографического усреднения и классификация субтомограмм проводились на мощностях многофункционального вычислительного комплекса Курчатовского центра обработки данных НИЦ «Курчатовский Институт».

2.4.1.1. Обработка данных криоэлектронной томографии кристаллов с триклинной элементарной ячейкой

Для получения координат центров частиц Dps проводилось автоматизированное сегментирование томограмм, сжатых в два раза (размер пикселя 7.4 \AA), восстановленных методом одновременной итерационной реконструкции с помощью дополнения на основе нейронных сетей к программному пакету EMAN2.2 [163] (рис. 17). Нейронные сети были обучены на центрах частиц Dps, выделенных вручную на полученных томографических срезах. Для создания референсной структуры одиночная частица Dps была вырезана из сегментированной томограммы, далее применялась утилита “*reference-based boxing*”.

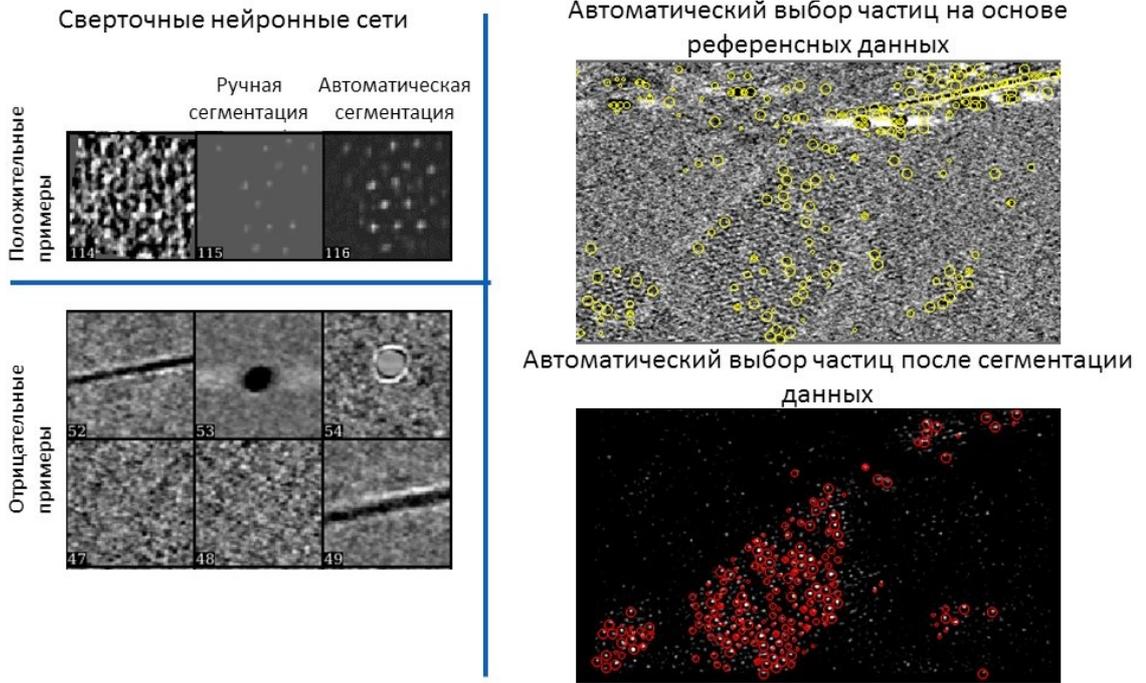


Рисунок 17. Иллюстрация применения сверточных нейронных сетей в программном пакете EMAN2 для сегментации данных.

Примеры результатов сегментирования томограмм приведены на рис. 18.

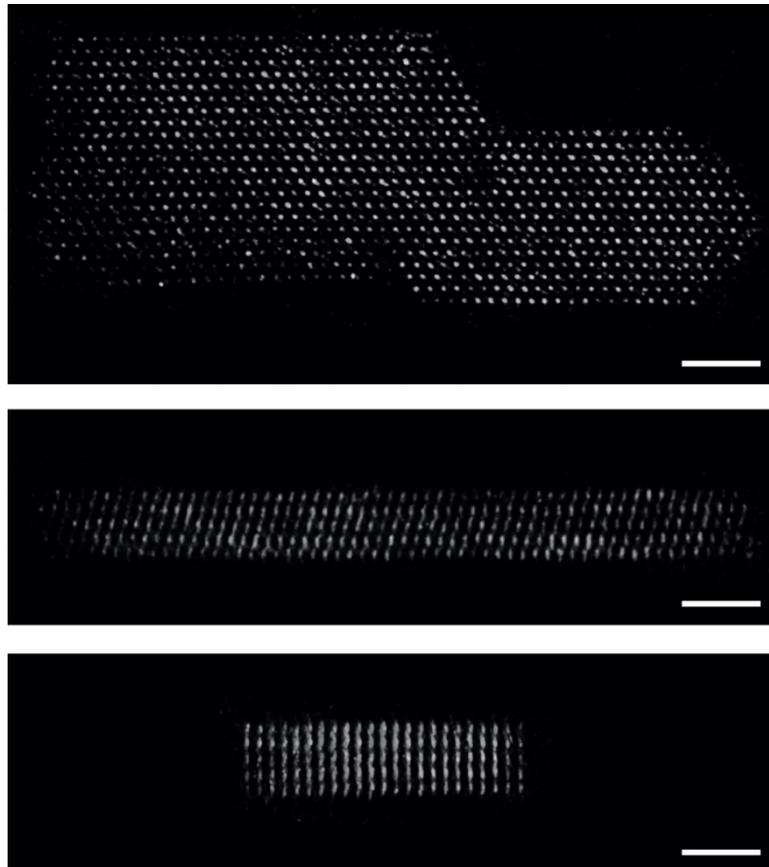


Рисунок 18. Результат сегментации ко-кристалла Dps-ДНК с триклинной элементарной ячейкой в различных ориентациях. Белым цветом показаны центры молекул Dps на сегментированной томограмме. Масштабный отрезок 50 нм.

Полученные координаты центров молекул Dps и несжатые томограммы (размер пикселя 3.7 Å), восстановленные методом обратно-взвешенных проекций были использованы для субтомографического усреднения в программном пакете Relion2 [75, 78] согласно протоколу, описанному в работе [149].

Для оптимизации вычислительных процессов, на первом шаге проведена экстракция ~53500 частиц, отобранных на 11 томограммах, восстановленных методом одновременной итерационной реконструкции. Далее проводилось несколько стадий двумерной классификации данных, в результате чего для ~40200 частиц Dps, выбранных для дальнейшего анализа, была проведена экстракция из данных, восстановленных методом обратно-взвешенных проекций. Для экстракции использовались области (боксы) с размерами 80*80*80 пикселей при размере каждого пикселя 3.84Å. Выбранный размер бокса позволил визуализировать как центральную частицу, так и ее ближайших соседей.

Оценка трехмерной функции передачи контраста проводилась для каждого бокса на основании значений дефокусировки, которые были установлены с помощью программы CTFFIND4 [102].

После первой итерации восстановления трехмерной структуры субтомограммы (3D auto-refinement) было выявлено, что контраст центральной молекулы Dps в субтомограмме существенно выше, чем контраст других молекул. Такой эффект может быть вызван присутствием субтомограмм от границ ко-кристаллов и субтомограмм, содержащим одиночные частицы Dps. Таким образом, была проведена трехмерная классификация полученной реконструкции, в результате чего один класс, содержащий молекулы Dps одинаковой плотности, был выбран для дальнейшего анализа.

После трехмерной классификации с оставшимися ~9100 субтомограммами была проведена процедура усреднения (reference-free 3D auto-refinement [149]).

Обработка проводилась с учетом MTF-фактора. Финальная визуализация проводилась с помощью программного пакета UCSF Chimera [165].

После получения трехмерной реконструкции определялись параметры элементарной ячейки. Для трехмерной решетки Бравэ:

$$\mathbf{R} = n_1 \mathbf{a} + n_2 \mathbf{b} + n_3 \mathbf{c} \quad (19),$$

обратная решетка

$$\mathbf{G}_{hkl} = h \mathbf{a}^* + k \mathbf{b}^* + l \mathbf{c}^* \quad (20)$$

может быть определена с использованием базисных векторов

$$\mathbf{a}^* = 2\pi \frac{\mathbf{b} \times \mathbf{c}}{\mathbf{a} \cdot (\mathbf{b} \times \mathbf{c})}; \quad \mathbf{b}^* = 2\pi \frac{\mathbf{c} \times \mathbf{a}}{\mathbf{b} \cdot (\mathbf{c} \times \mathbf{a})}; \quad \mathbf{c}^* = 2\pi \frac{\mathbf{a} \times \mathbf{b}}{\mathbf{c} \cdot (\mathbf{a} \times \mathbf{b})} \quad (21).$$

Длина векторов трансляции (\mathbf{G}_{hkl}) связана с вектором рассеяния и межплоскостным расстоянием следующей формулой:

$$d_{hkl} = \frac{2\pi}{|\mathbf{G}_{hkl}|} = \frac{2\pi}{|s_{hkl}|} \quad (22).$$

2.4.1.2. Обработка данных криоэлектронной томографии кристаллов с кубической элементарной ячейкой

Начальные этапы обработки данных проведены аналогично описанным в разделе 2.4.2. Сегментированные томограммы были визуализированы в программном пакете UCSF Chimera [165], после чего хорошо различимые ко-кристаллы с ламеллярной структурой были вручную удалены из полученного набора данных и исключены из рассмотрения.

Для поиска координат пиков интенсивности, соответствующих позициям Dps на сегментированных томограммах, применялась утилита *reference-based boxing* в программном пакете EMAN2.22. Далее проводилась экстракция ~55000 субтомограмм с размером бокса 90*90*90 пикселей (размер пикселя 3.7 Å) из 15 томографических серий, восстановленных методом обратно-взвешенных

проекций. На следующем этапе для каждого бокса проводилась оценка трехмерной функции передачи контраста (CTFFIND4 [102]) и субтомографическое усреднение (RELION2 [75, 78]).

Для двумерной классификации использованы проекции субтомограмм, полученные с помощью утилиты “- - project3d” (RELION2). После нескольких итераций 2D классификации координаты 42548 субтомограмм были выбраны для дальнейшей обработки.

Для минимизации вычислительный ресурсов, первый этап восстановления трехмерной структуры проводился на ~500 субтомограммах, выбранных вручную. Полученная 3D модель, а также оставшиеся 42548 субтомограмм были использованы для восстановления трехмерной структуры (reference-based 3D auto-refinement). Однако, контраст центральной частицы Dps после усреднения субтомограмм оказался значительно выше, чем контраст остальных частиц (рис. 19 Г). В результате 3D классификации было получено 2 класса субтомограмм: (1) с однородным контрастом всех частиц (рис. 19 Е); (2) с одиночной частицей Dps (соседние частицы отсутствовали) либо с частицей, расположенной на краю кристалла (частицы Dps и ДНК присутствовали с одной стороны от центральной частицы, но отсутствовали с другой) (рис. 19 Д). Таким образом, было показано, что отличия в контрасте наблюдаемых частиц были вызваны присутствием одиночных частиц Dps и краевыми эффектами (рис. 19 А-В). В результате, только один класс, характеризующийся однородным контрастом частиц и представленный на рис. 19 Е, был использован для дальнейшей обработки.

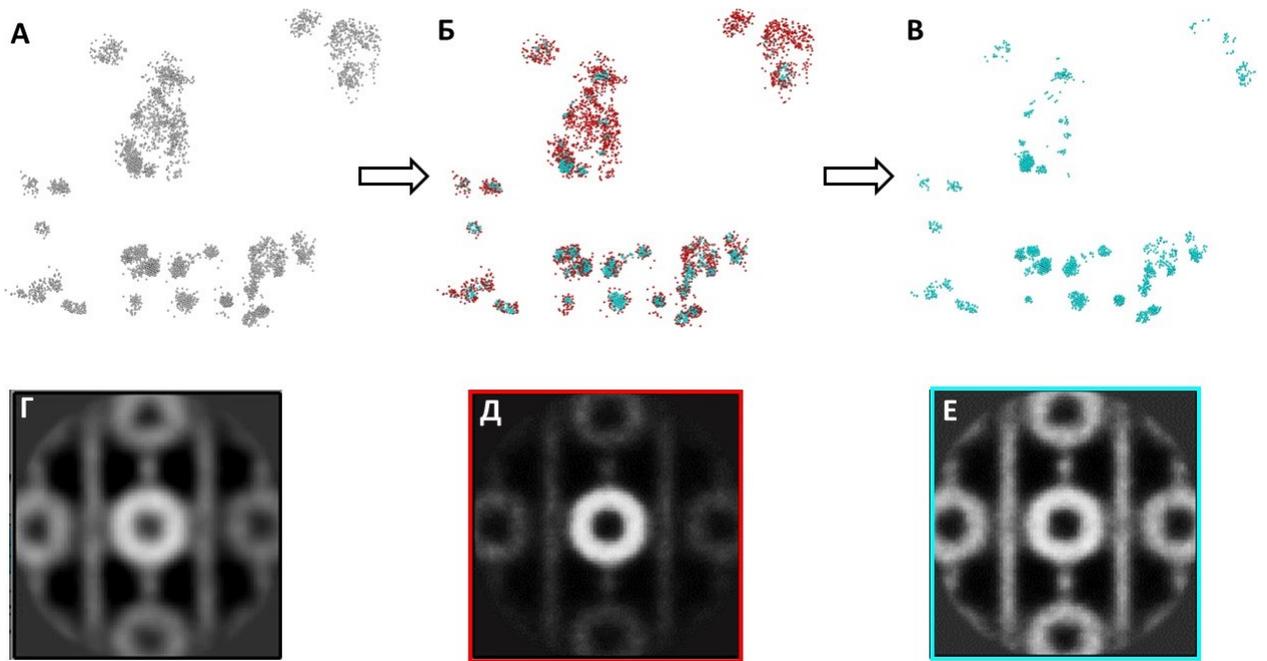


Рисунок 19. А-В – пространственное расположение частиц Dps в кубических ко-кристаллах. Серым цветом (А) показаны все частица Dps, красным (Б) – одиночные частицы и частицы, расположенные на краях ко-кристалла, бирюзовым (Б, В) – частицы Dps, окруженные соседними частицами; Г – результат усреднения всех субтомограмм; Д-Е – результаты трехмерной классификации субтомограмм.

На следующем этапе было проведено усреднение 16372 выбранных субтомограмм (reference-free 3D auto-refinement). Обработка проводилась с учетом MTF-фактора. Финальная визуализация проводилась с помощью программного пакета UCSF Chimera [165].

На рисунке 20 приведена полная схема обработки данных.

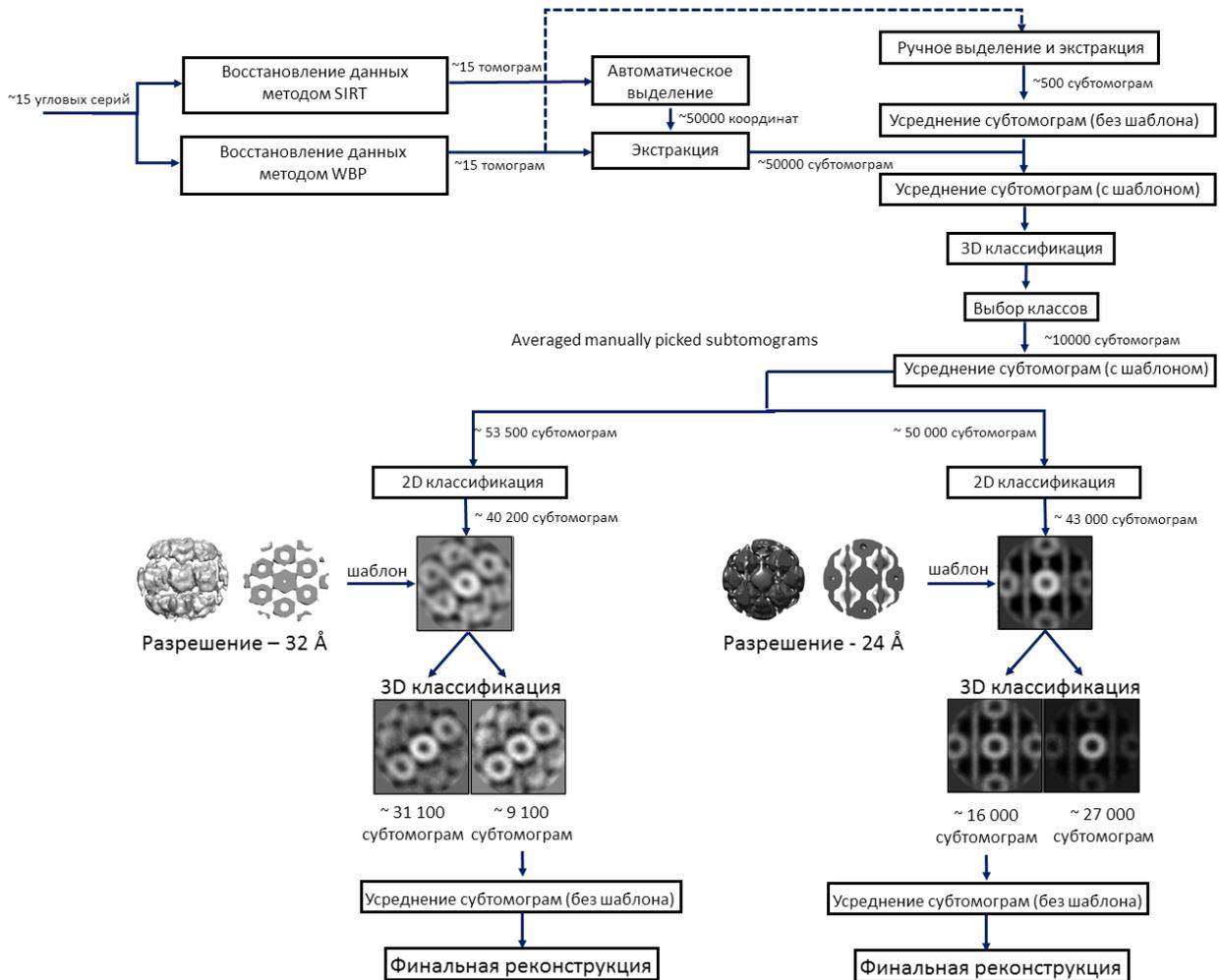


Рисунок 20. Схема обработки данных крио-ЭТ.

2.4.1.3. Обработка данных криоэлектронной томографии клеток *E. coli*

При обработке данных крио-ЭТ бактериальных клеток *E. coli*, изученных без предварительного утонения с помощью крио-ФИП, кросс-корреляционное выравнивание и томографическое восстановление проводилось с помощью программного обеспечения Inspect3D (Thermo Fisher Scientific) методом одновременной итерационной реконструкции (SIRT). Дальнейшая аннотация и сегментирование выполнялись с помощью дополнения на основе нейронных сетей к программному пакету EMAN2.2. Финальная визуализация трехмерной реконструкции осуществлялась с помощью программного пакета UCSF Chimera.

При изучении клеточных срезов, полученных с помощью крио-ФИП, предварительная обработка данных осуществлялась в программном пакете IMOD (аналогично описанному в разделах 2.4.1.1-2.4.1.2).

2.4.2. Обработка данных методом анализа проекций одиночных частиц

Стеки изображений были получены с помощью программного обеспечения EPU в режиме низких доз при параметрах, указанных в таблице 2. Начальные этапы обработки данных – коррекция дрейфа изображений, оценка значений дефокусировки и функции передачи контраста, выделение и экстракция частиц - производились с использованием программного пакета Warp [104] в полуавтоматическом режиме. Для всех нижеописанных образцов проводилась экстракция выделенных областей с размером бокса 200 пикселей (172 Å). Дальнейший анализ данных выполнялся с использованием программного пакета CryoSPARC [79].

ГЛАВА 3. ОТРАБОТКА МЕТОДОВ ПРИГОТОВЛЕНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ

3.1. Витрификация образцов и крио-ПЭМ исследования

Отработка процедур пробоподготовки, а также оптимизация параметров получения экспериментальных данных крио-ПЭМ проводились на различных препаратах внеклеточных везикул (в т.ч. экзосом) [A4], и фибрилл [A5]. Подобраны оптимальные условия гидрофилизации сеток (время гидрофилизации 20-50 с в зависимости от типа сетки и толщины углеродной подложки при силе тока 25 мА и давлении 0.26 мБар), параметры витрификации (сила взаимодействия сетки с фильтровальной бумагой в диапазоне [-6;0] отн. ед., продолжительность 1-4 с, влажность 95-100%, температура при выполнении процедуры 4-10 °С).

В качестве примера, ниже продемонстрированы результаты крио-ПЭМ исследования экзосом, выделенных из спинномозговой жидкости пациентов с болезнью Паркинсона. Удалось произвести визуализацию и классификацию характерных округлых частиц с липидным бислоем (рис. 21), а также сравнить их морфологию с везикулами, выделенными из спинномозговой жидкости контрольной группы пациентов [A4]. Гетерогенность изученных образцов экзосом и их широкое размерное распределение позволили оптимизировать условия пробоподготовки для образцов клеток *E. coli*.

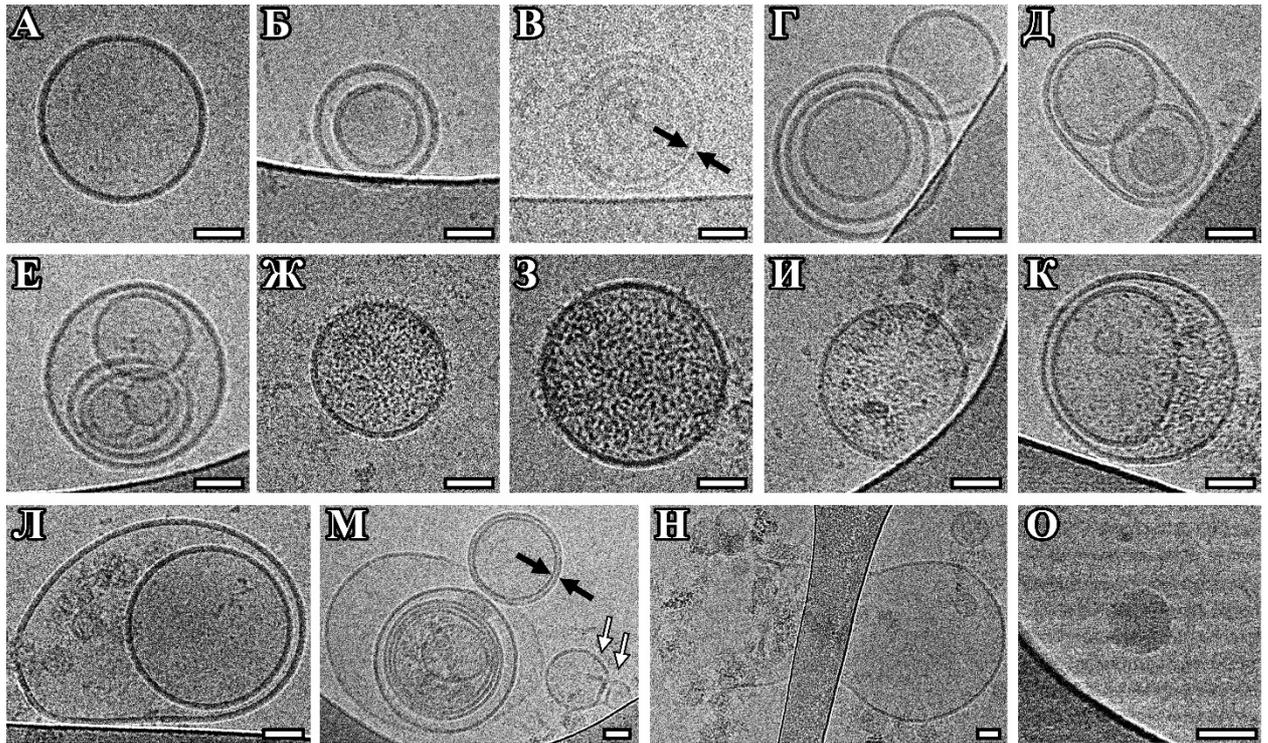


Рисунок 21. Крио-ПЭМ изображения внеклеточных везикул, выделенных из спинномозговой жидкости пациентов с болезнью Паркинсона. А – одиночные везикулы; Б, Л – двойные везикулы; В, М – двумембранные; В-Е, М – многослойные; Ж-К, М – везикулы с плотным наполнением; Л, Н – везикулы с поврежденной мембраной; О – липопротеины. Масштабный отрезок 50 нм.

Отработанные методы приготовления различных объектов для последующих исследований методом крио-ПЭМ, а именно водных суспензий наночастиц структурных полисахаридов: целлюлозы, бета-хитина и альфа-хитина позволили получить микроструктурные данные об этих объектах. Было показано, что частицы целлюлозы и альфа-хитина в суспензии являются нанокристаллами и имеют стержнеобразную форму, а частицы бета-хитина - изогнутые фибриллы. На основании полученных изображений (рис. 22) были собраны статистические данные о морфологии наночастиц, оценен их диаметр, длина и характеристическое отношение [A5]. Стоит отметить морфологическое сходство вышеописанных образцов с образцами ДНК, что позволило оптимизировать условия пробоподготовки последних.

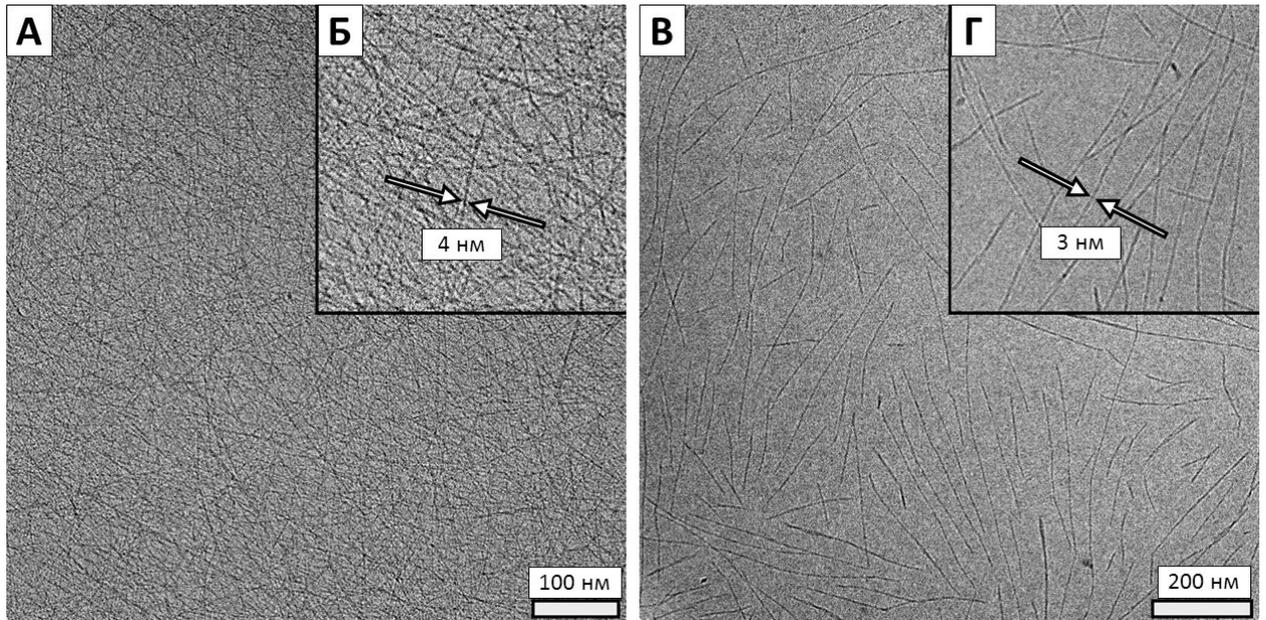


Рисунок 22. Крио-ПЭМ изображения хитиновых дисперсий ch-AscA (А, Б) и ch-TEMPO (В, Г) .

3.2. Электронная томография

Отработка методик получения и обработки экспериментальных данных методами электронной томографии и криоэлектронной томографии осуществлялась на образцах биосенсоров на основе контейнеров CaCO_3 , модифицированных наночастицами серебра [А6], а также гидрозолей детонационных наноалмазов с положительными и отрицательными значениями ζ – потенциалов [А7].

Так, применение электронной томографии позволило исследовать объемное распределение наночастиц серебра в сферических пористых частицах ватерита, определить их форму и размеры [А6]. На рисунке 23 представлены изображения полученных трехмерных реконструкций. Верификация данных проводилась с помощью ПЭМ/ПРЭМ исследования образцов, приготовленных с помощью ФИП.

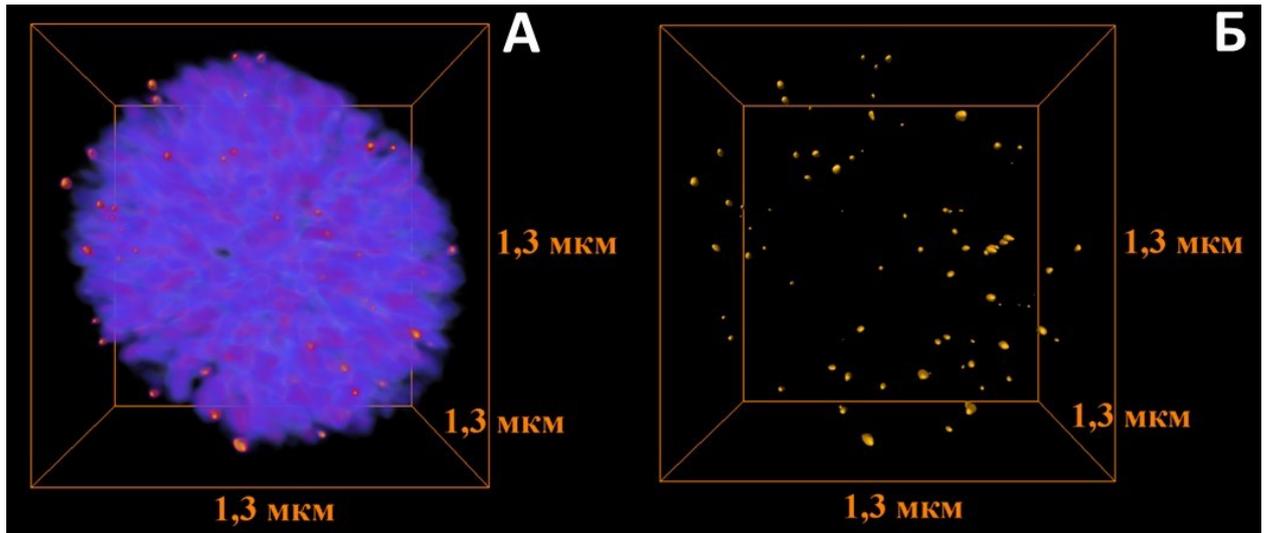


Рисунок 23. А - Объемная визуализация пористого контейнера (фиолетовый цвет) на основе CaCO_3 с наночастицами Ag (оранжевый цвет); Б - Трехмерная реконструкция поверхности наночастиц Ag.

3.3. Криоэлектронная томография и крио-ФИП

При изучении гидрозолей детонационных наноалмазов с положительным и отрицательным электрокинетическим ζ -потенциалом применение метода криоэлектронной томографии позволило охарактеризовать пространственное распределение наночастиц (рис. 24), оценить связность и фрактальность полученных структур, продемонстрировать формирование перколяционной сети и, наконец, объяснить реологические особенности гидрозолей, связанные с агрегацией наночастиц и образованием цепей [A7].

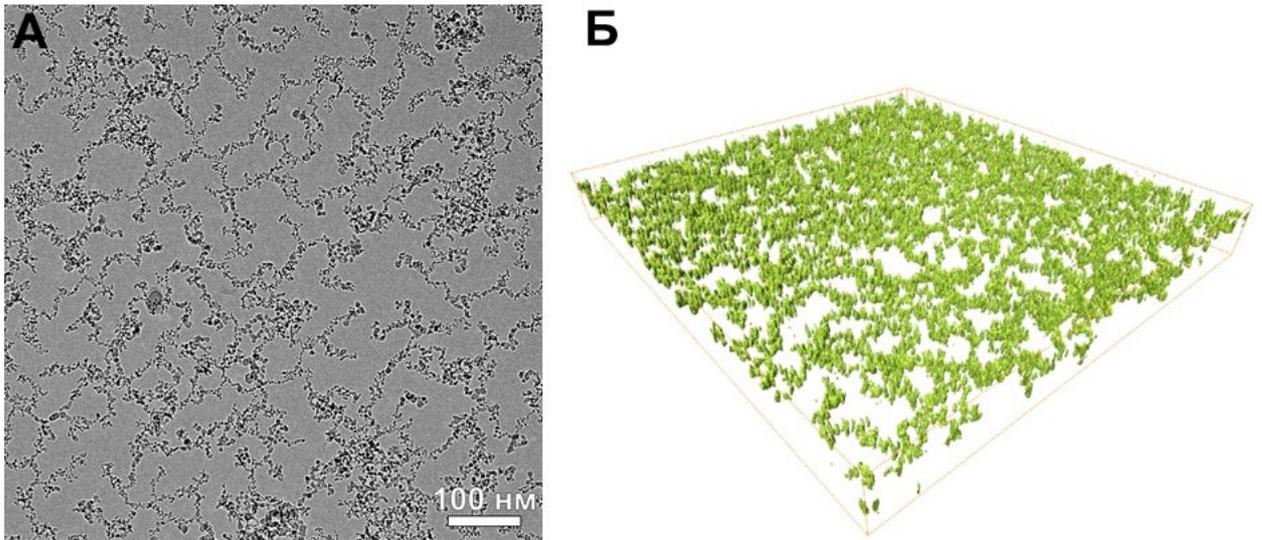


Рисунок 24. Крио-ПЭМ исследование 1 мас.% гидрозоль детонационных наноалмазов с положительным ζ -потенциалом. **А** – исходное крио-ПЭМ изображение исследуемой области; **Б** – полученная трехмерная реконструкция поверхности детонационных наноалмазов.

Отработка методик витрификации, приготовления тонких срезов с помощью крио-ФИП (рис. 25), а также получения и обработки экспериментальных данных крио-ЭТ также проводились на образцах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и кератиноцитов кожи человека (рис. 26) [A12].

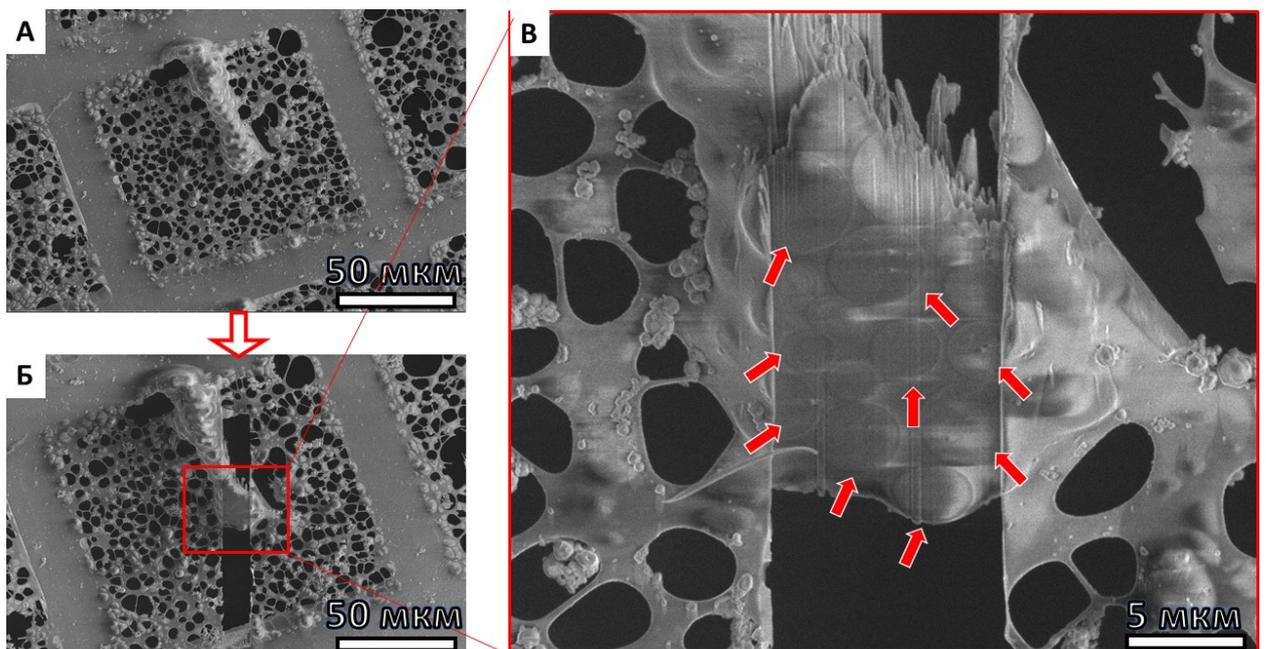


Рисунок 25. Пример крио-РЭМ изображения дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на поверхности электронно-микроскопической сетки. **А** – исходный образец; **Б-В** – тонкий срез клеток, полученный с помощью крио-ФИП. Красные стрелки указывают на клетки дрожжей.

Получены тонкие крио-ФИП срезы, толщиной 280 нм и 120 нм, соответственно. В результате сегментации полученных трехмерных реконструкций визуализированы митохондрии, рибосомы и ядерные поры (рис. 26, верхний ряд) в клетках дрожжей. Применение субтомографического усреднения позволило визуализировать наполнение кератиноцитов (рис. 26, нижний ряд), в частности, мембранные комплексы, рибосомы и микротрубочки.

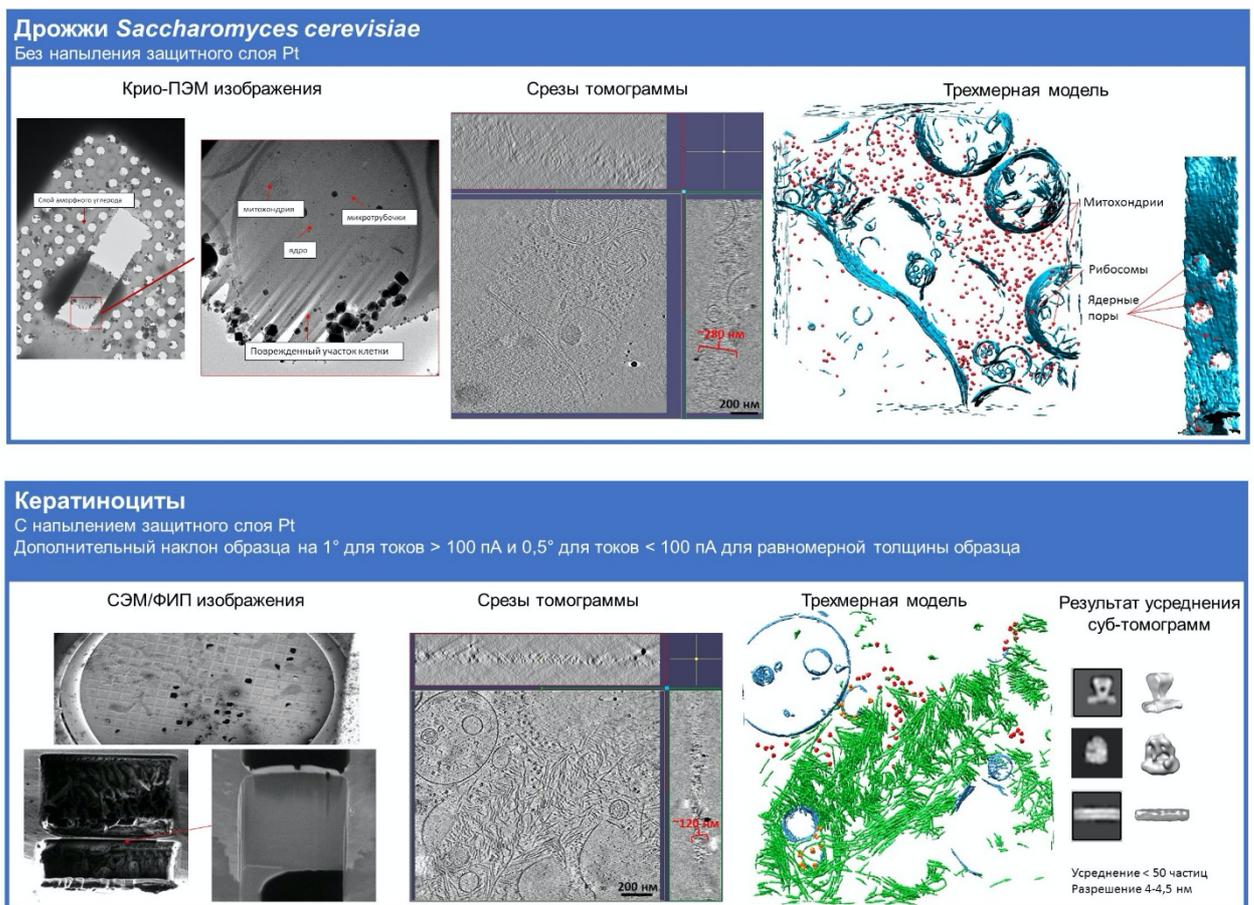


Рисунок 26. Получение трехмерных реконструкций витрифицированных препаратов дрожжей (верхний ряд) и кератиноцитов кожи человека (нижний ряд). Тонкие срезы препаратов были получены с использованием крио-ФИП.

Выявлено, что оптимальной для проведения крио-ФИП экспериментов является температура столика крио-РЭИМ в диапазоне $[-165^{\circ}\text{C}; -190^{\circ}\text{C}]$. Показано, что при использовании более высоких температур ($[-140^{\circ}\text{C}; -160^{\circ}\text{C}]$) происходит перекристаллизация жидкости в витрифицированных образцах, что приводит к нарушению их структуры. Одновременно, понижение температуры ниже -195°C может приводить к нарушению целостности системы азотного охлаждения крио-РЭИМ при наклоне столика в процессе травления. Также, установлен оптимальный диапазон углов наклона столика крио-РЭИМ для травления образцов с помощью крио-ФИП в условиях «скользящего пучка», который составил 12° - 17° .

Экспериментально определен оптимальный режим напыления платины. Определено, что оптимальным является применение 3-4 последовательных циклов напыления при температуре 26°C и продолжительностью не более 3-5 секунд каждое с паузой между напылениями не менее 10 секунд. При использовании более длительного времени напыления наблюдаются артефакты, характерные для образцов, подвергнутых облучению высокоэнергетичными электронами или ионами.

Отработанные методы всех этапов проведения экспериментов позволили исследовать биокристаллы Dps-ДНК *in vitro* и *in cellulo*, результаты исследований представлены в следующих главах.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1. Крио-ПЭМ исследование *in cellulo*

4.1.1. Морфология бактериальных клеток

В результате крио-ПЭМ исследования клеток *E.coli*, не подверженных предварительному стрессовому воздействию, продемонстрировано отсутствие формирования биокристаллов. На рис. 27 показан пример изображений подобных бактериальных клеток. Продольные размеры клеток составили 1,5 - 4 мкм, поперечные – 0,5 - 1,5 мкм. Отчетливо видна клеточная мембрана.

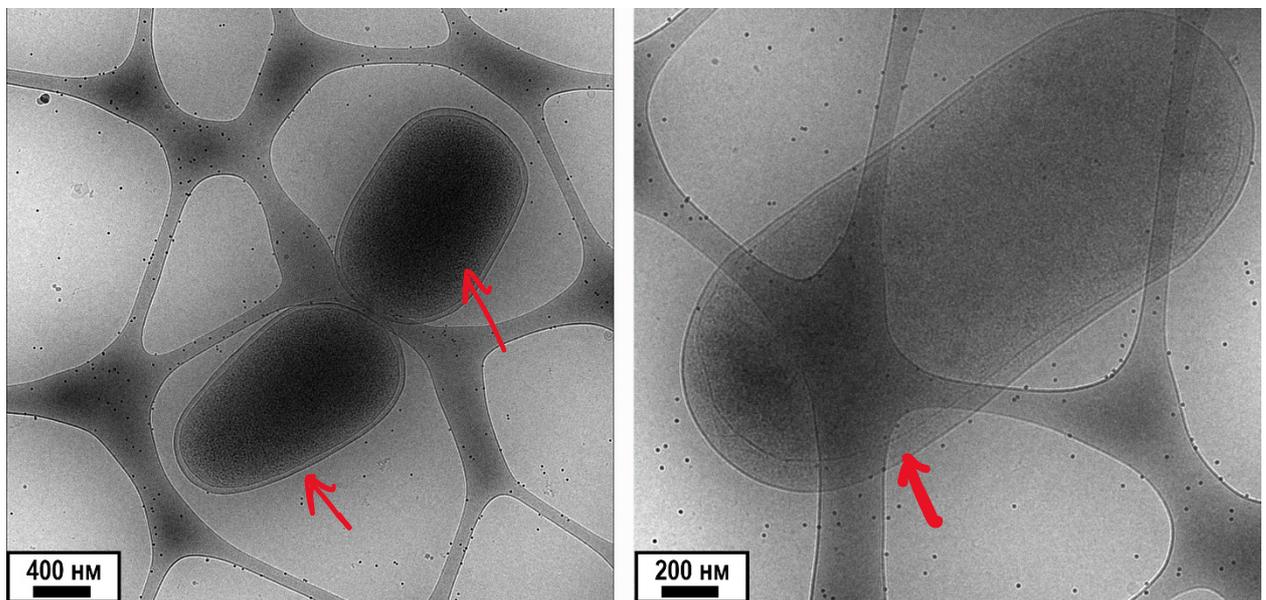


Рисунок 27- Крио-ЭМ изображения бактериальных клеток (отмечены стрелками), не подверженных стрессовому воздействию.

В результате исследования бактериальных клеток, подверженных стрессовому воздействию (рис. 28), обнаружено формирование биокристаллов.

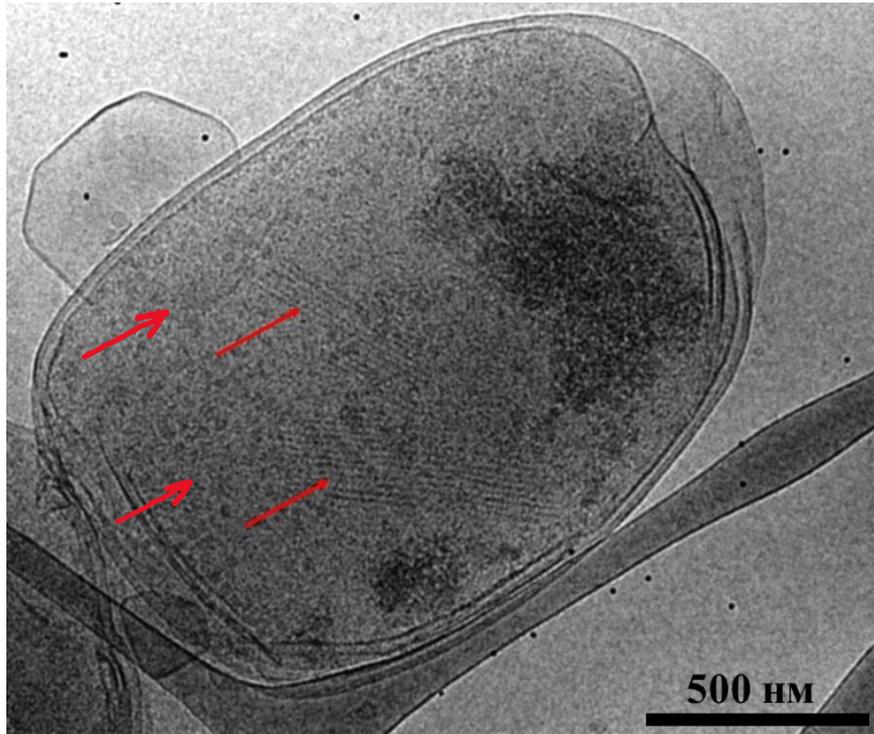


Рисунок 28. Пример крио-ПЭМ изображения клетки *E.coli*, подверженной стрессовому воздействию. Красными стрелками показаны наблюдаемые кристаллы.

На рисунке 29 показаны фрагменты биокристаллов, наблюдаемые в подобных образцах. Однако, стоит отметить, что большинство хорошо визуализируемых кристаллов наблюдались на тонких, и, по всей видимости поврежденных, клетках. Три наблюдаемые межплоскостные расстояния (5 ± 0.3 нм, 5.5 ± 0.3 нм, 9.5 ± 0.3 нм) и углы между кристаллическими плоскостями соответствуют кубической кристаллической решетке в разных проекциях. На двумерных спектрах Фурье рефлексы, которые запрещены для ОЦК, не проявляются.

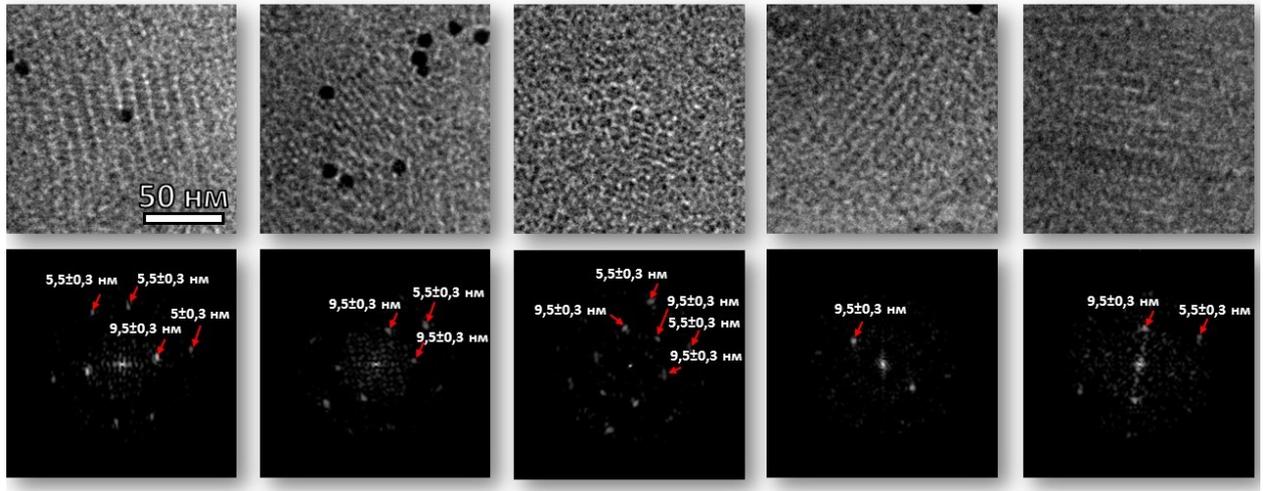


Рисунок 29. Крио-ПЭМ изображения фрагментов ко-кристаллов Dps-ДНК в клетках *E.coli* (верхняя строка) и соответствующие им двумерные Фурье-спектры (нижняя строка).

4.1.2. Криоэлектронная томография исходного препарата клеток *E.coli*

На рис. 30 продемонстрировано изображение томографического среза интактной бактериальной клетки, предварительно подверженной стрессовому воздействию. Отчетливо видна клеточная стенка и регулярные структуры – биокристаллы, заполняющие клетку (показаны стрелками).

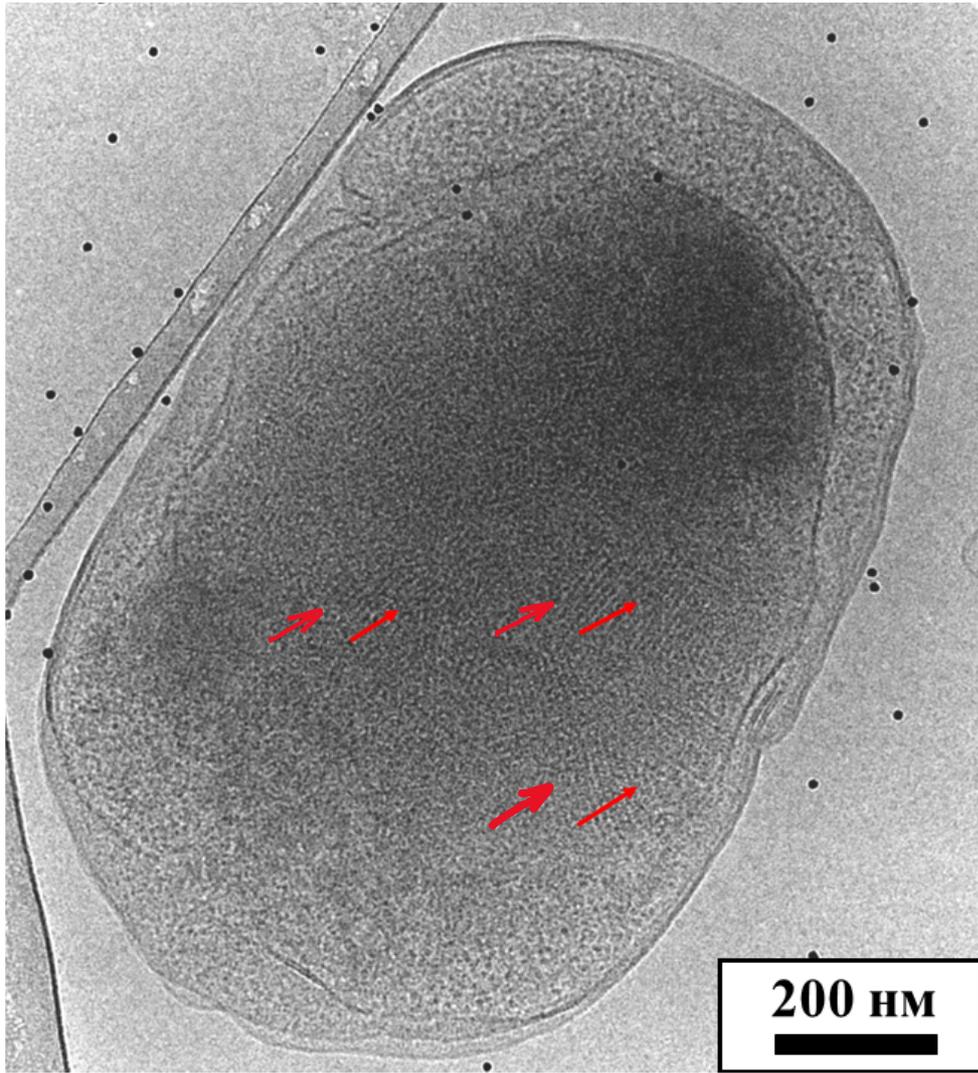


Рисунок 30. Изображение томографического среза бактериальной клетки с биокристаллами (показаны красными стрелками).

Для данной криотомографической серии проведена процедура трехмерной реконструкции, в соответствии с протоколом, описанным в разделе 2.4.1.3. Трехмерная модель бактериальной клетки с биокристаллами, полученная в результате реконструкции, показана на рис. 31. Клеточная стенка показана желтым, в то время как биокристаллы – фиолетовым. Межплоскостное расстояние наблюдаемых биокристаллов составило 9.5 ± 0.5 нм.

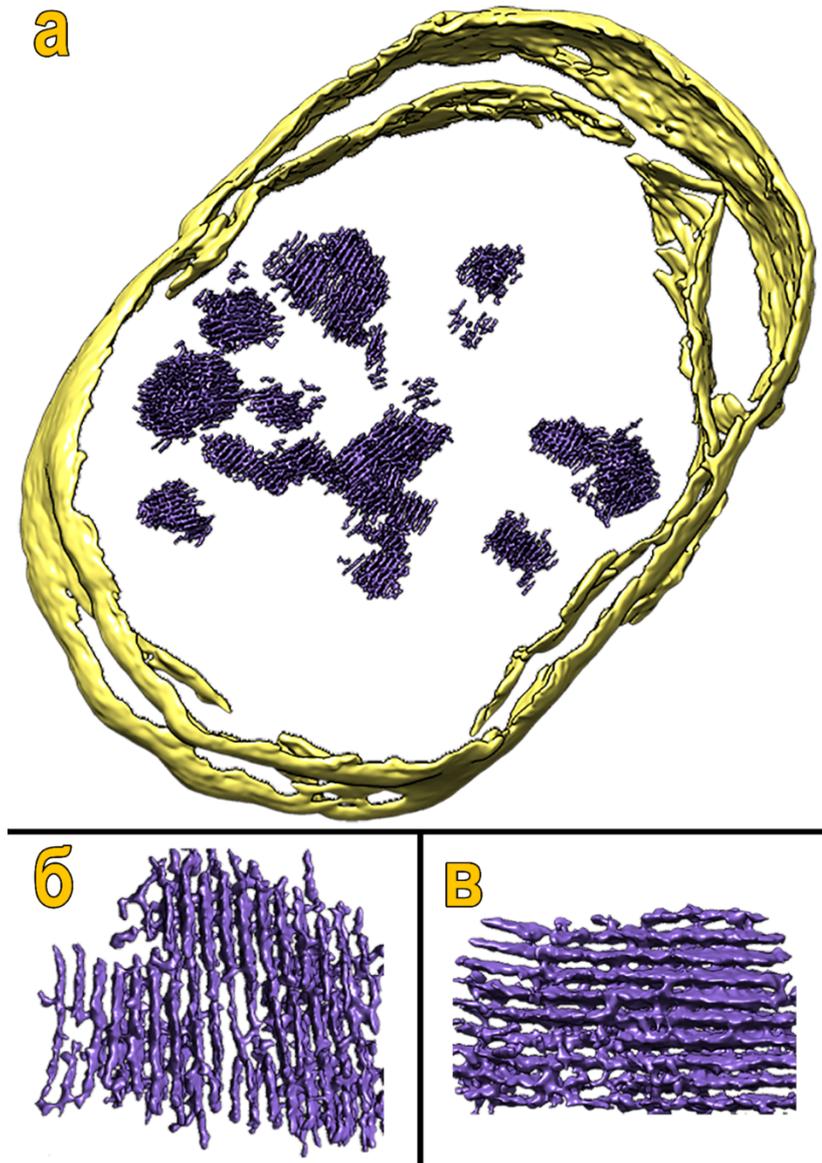


Рисунок 31. Трехмерная реконструкция бактериальной клетки и биокристаллов. Клеточная мембрана (а) показана желтым, биокристаллы (а - в) – фиолетовым.

Однако, относительно большая толщина клеточного образца явилась препятствием для прямой визуализации взаимодействия Dps и ДНК в клетке. В результате, для воссоздания структуры биокристаллов, проведено утонение подобных интактных клеток с помощью крио-ФИП (см раздел 4.1.3), а также *in vitro* крио-ЭМ исследование препаратов Dps-ДНК (см разделы 4.2, 4.3).

4.1.3. Крио-ЭМ исследование образцов, подвергнутых предварительному утонению с помощью крио-ФИП.

На рис. 32 представлены характерные крио-ПЭМ изображения тонких (толщина менее 200 нм) срезов витрифицированных клеток, подверженных стрессовому воздействию, полученных с помощью крио-ФИП [A11]. Отчетливо наблюдаются клеточные мембраны (красные стрелки на рис. 32 А-Б), а также частицы кристаллического льда на поверхности полученных срезов (синие стрелки на рис. 32 А-Б).

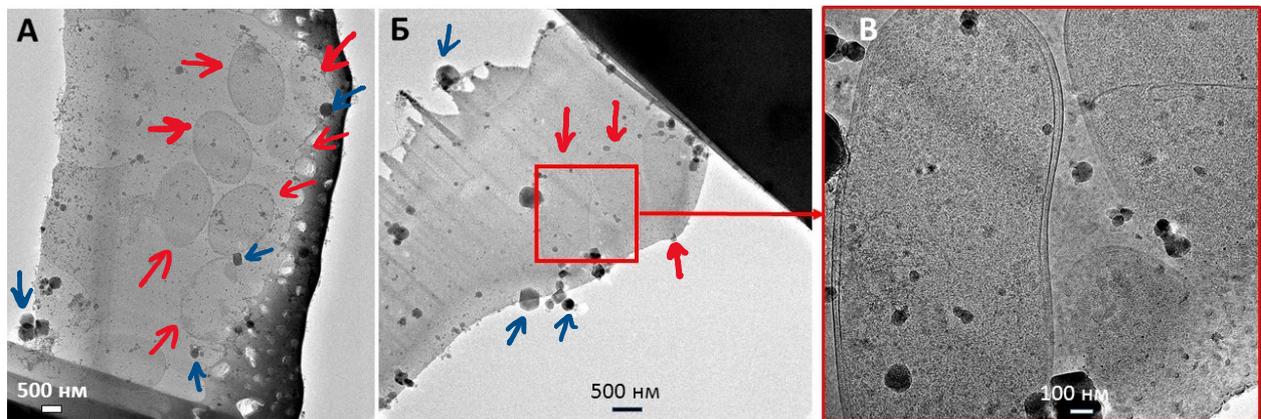


Рисунок 32. Характерное крио-ПЭМ изображение витрифицированных клеток после процедуры утонения с помощью крио-ФИП.

Стоит отметить, что не все клетки демонстрировали наличие кристаллов комплекса Dps-ДНК. На рисунках 33-34 показаны примеры томографических срезов *E.coli* BL21-Gold (DE3) pET-Dps с активацией экспрессии Dps (рис. 33) и без активации экспрессии (рис. 34), подвергнутых стрессовому воздействию, после проведения процедуры утонения с помощью крио-ФИП. В данном случае удалось визуализировать клеточные мембраны и кристаллические образования размерами до 50 нм внутри клеток. В обоих указанных случаях толщина полученных срезов оказалась недостаточной для получения изображений с высоким пространственным разрешением, а количество наблюдаемых биокристаллов, наряду с отсутствием золотых меток для выравнивания полученных угловых серий,

исключает возможность успешного проведения процедуры субтомографического усреднения. Тем не менее, удалось определить ширину рядов, предположительно состоящих из частиц Dps (12 ± 1 нм) и расстояния между центрами рядов (14 ± 1 нм и 22 ± 1 нм).

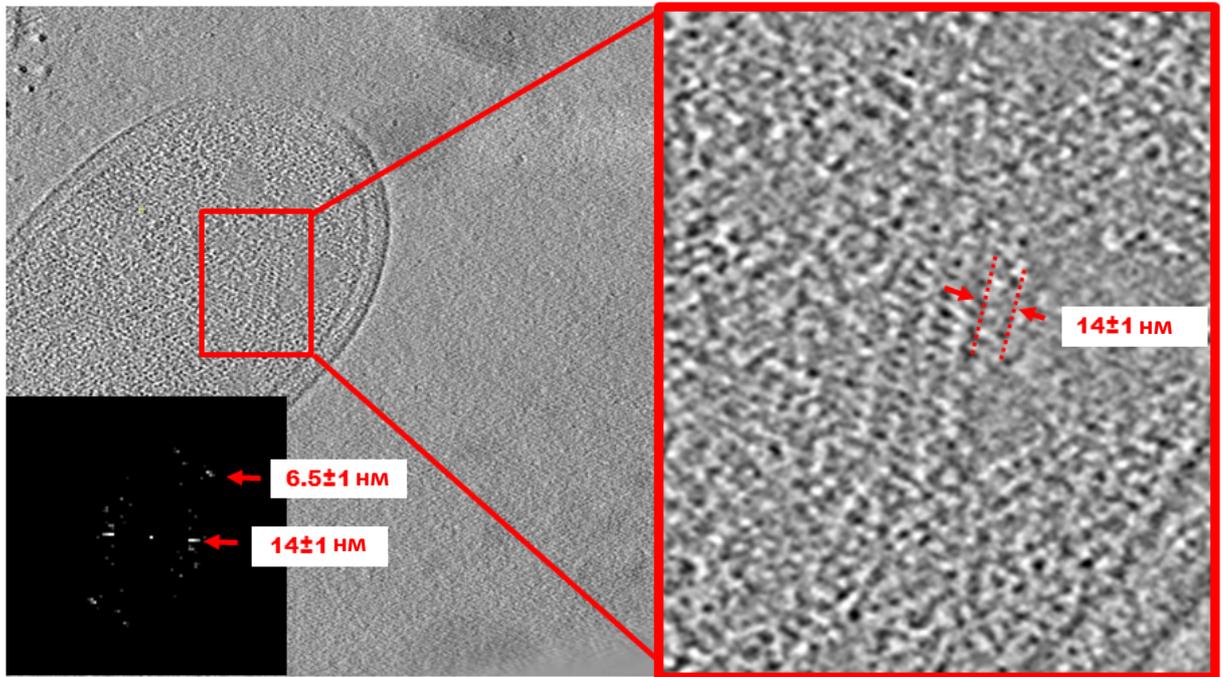


Рисунок 33. Томографический срез образца *E. coli* BL21-Gold (DE3) pET-Dps с активацией экспрессии.

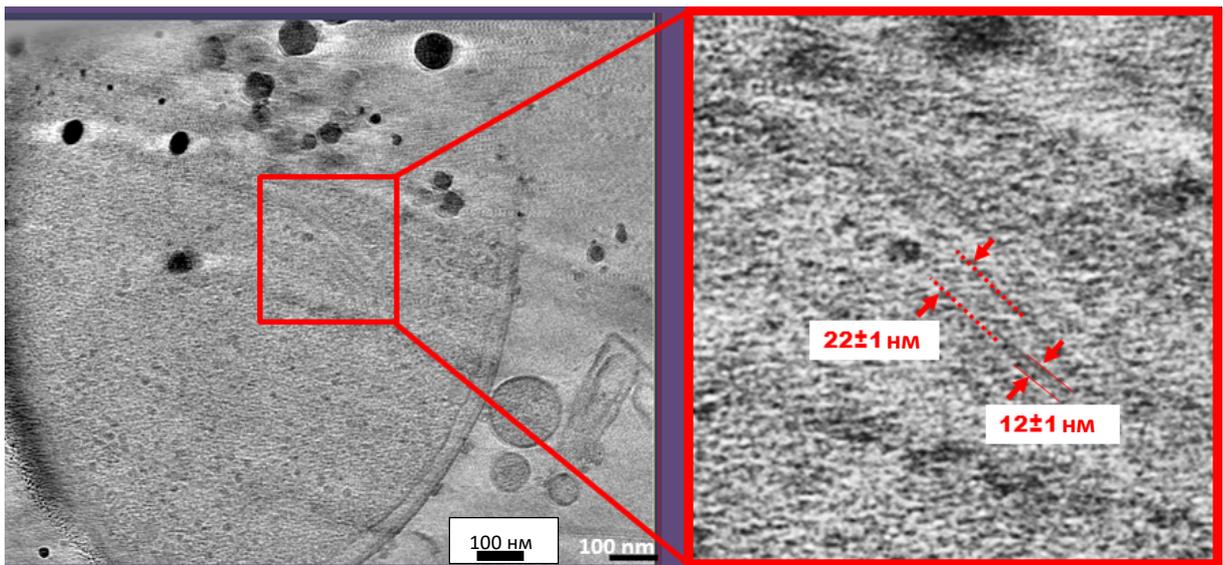


Рисунок 34. Томографический срез образца *E. coli* BL21-Gold (DE3) pET-Dps без активации экспрессии.

4.2. Крио-ПЭМ исследование морфологии образцов Dps и Dps-ДНК *in vitro*

При исследовании раствора чистого белка Dps обнаружено образование псевдогексагональной упаковки додекамеров белковых макромолекул. Примеры крио-ПЭМ изображений приведены на рис. 35.

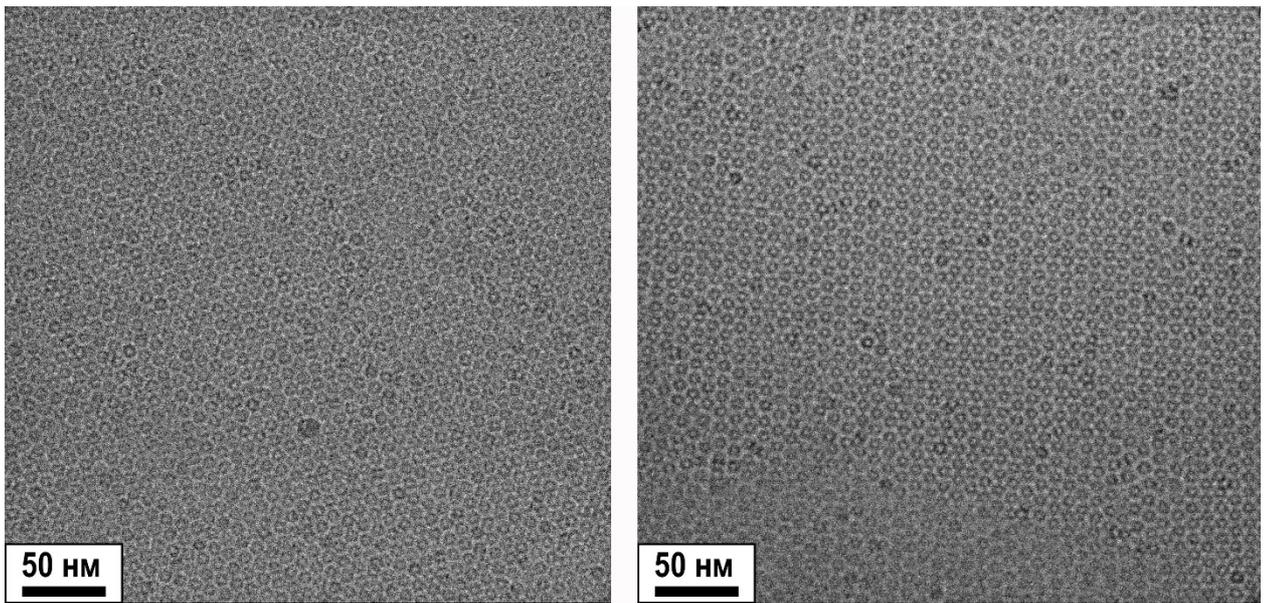


Рисунок 35. Кристо-ЭМ изображения раствора белка Dps.

При исследовании препарата Dps-ДНК, полученного путем смешения растворов Dps и ДНК в различных концентрациях, обнаружено образование биокристаллов со средним размером 40-300 нм. Пример изображения представлен на рис. 36, биокристаллы отмечены стрелками.

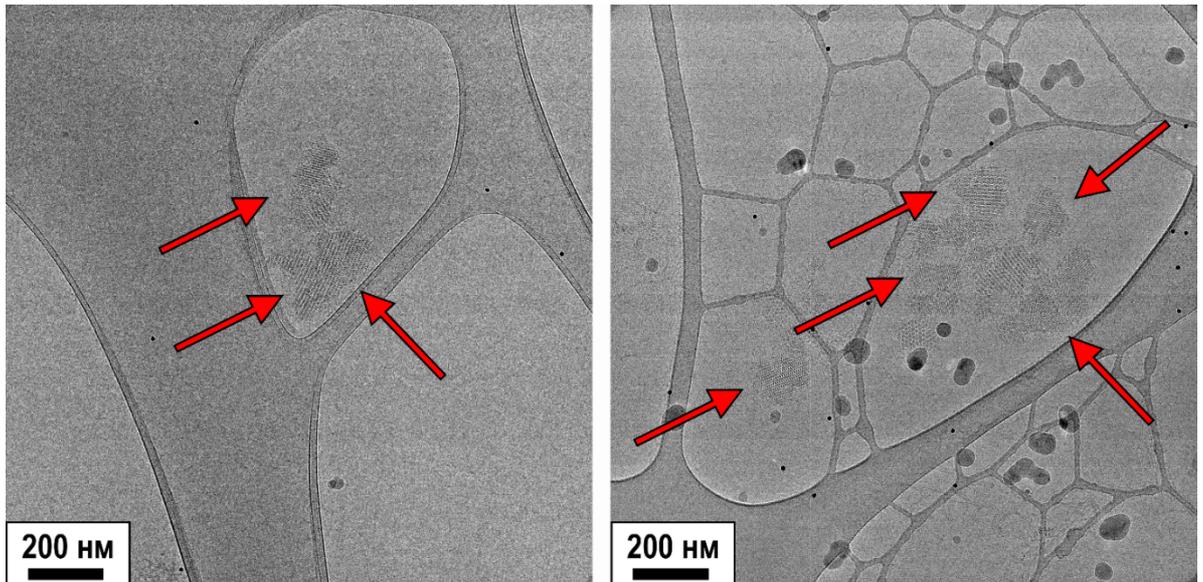


Рисунок 36. Крио-ЭМ изображения биокристаллов Dps-ДНК (показаны красными стрелками).

При смешивании растворов ДНК и Dps с избытком последнего, на границе раздела вода-воздух наблюдались монослои Dps, подобные представленным на рис. 35.

4.3. Криоэлектронная томография кристаллов, полученных *in vitro*

4.3.1. Кристаллы с триклинной элементарной ячейкой

Исследование образцов, описанных в разделе 2.2.4.1. с помощью крио-ЭТ продемонстрировало (рис. 37), что частицы Dps размером ~ 9 нм, формируют многослойные кристаллы с размером в диапазоне 40-300 нм. Кристаллы состоят из 3-8 слоев толщиной около 10 нм и обладают слоистой (пластинчатой) структурой с гранями, параллельными кристаллическим плоскостям с низким индексом.

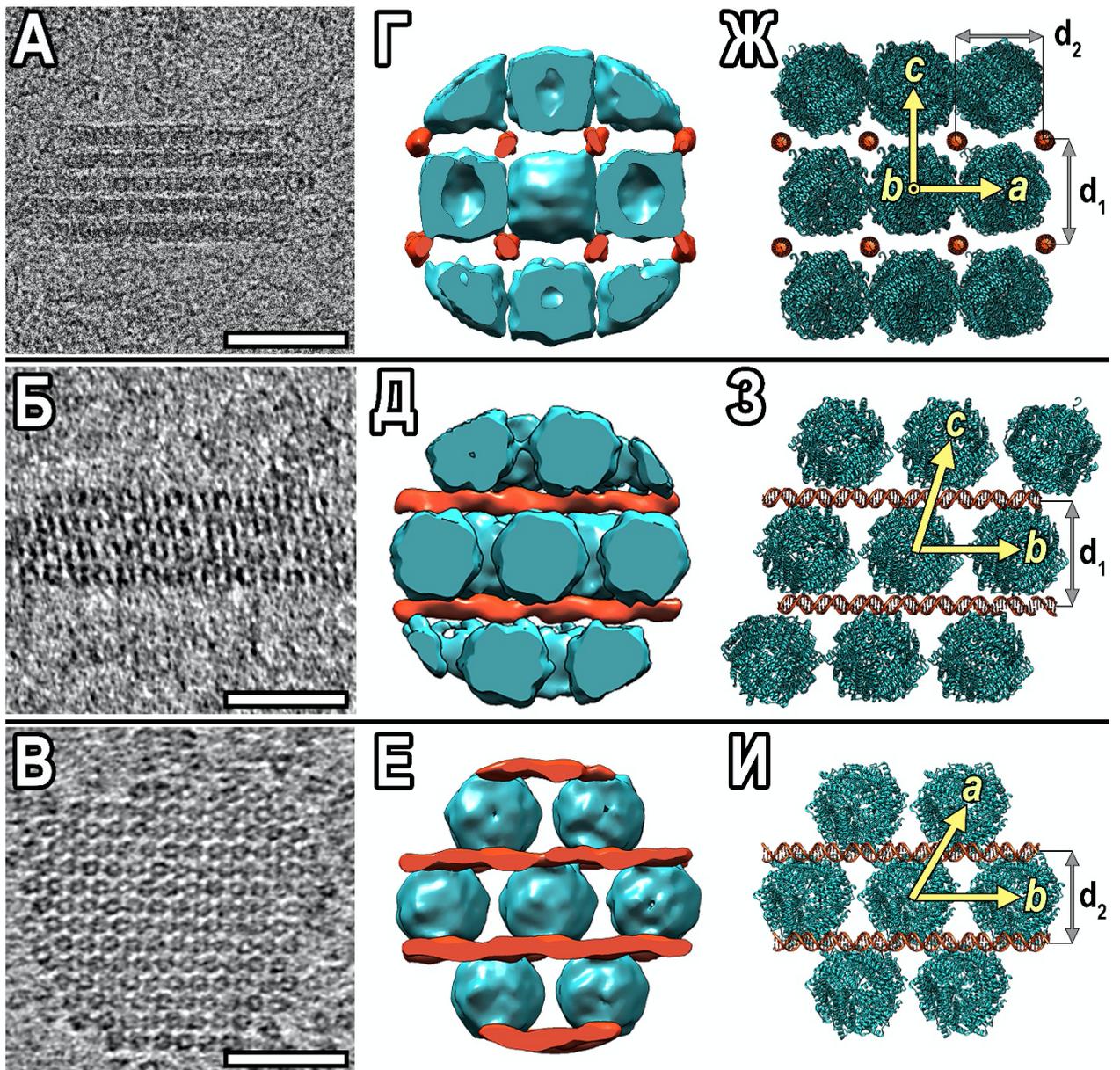


Рисунок 37. А–В - Томографические срезы ко-кристаллов Dps-ДНК в различных ориентациях. Масштабный отрезок 50 нм; Г–Е - Трехмерная реконструкция ко-кристаллов в соответствующих ориентациях. Частицы Dps показаны синим цветом, ДНК – красным; Ж–И Известные структуры Dps и ДНК, вписанные в полученные трехмерные реконструкции. Желтыми стрелками показаны базисные вектора элементарной ячейки.

Данные, полученные по результатам субтомографического усреднения, продемонстрировали, что кристаллы комплекса обладают центрально симметричной триклинной кристаллической решеткой (SG P1) с параметрами элементарной ячейки $a \approx b = 9.3 \pm 0.4$ нм, $c = 10.3 \pm 0.4$ нм, $\alpha = 73^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 60^\circ$ (рис.

37 Г-Е) и максимальными межплоскостными расстояниями $d_1 = 9.8 \pm 0.4$ нм и $d_2 = 8.0 \pm 0.4$ нм (рис. 37 Ж-И). Параметры элементарной ячейки определены по крио-ПЭМ изображениям и томографическим срезам ко-кристаллов Dps-ДНК. Погрешность соответствует размеру пикселя. Данный метод позволил провести прямую визуализацию ДНК в ко-кристалле.

Пластинчатая структура состоит из слоев, образованных Dps, перемежающихся со слоями цепочек ДНК. Частицы Dps демонстрируют псевдогексагональную упаковку внутри слоя, с углом $\gamma = 60^\circ$ между векторами элементарной ячейки \mathbf{a} и \mathbf{b} . Молекулы ДНК расположены в углублениях («канавках») между частицами Dps (рис. 37 Ж). Расстояние между тяжами ДНК составляет 8.0 ± 0.4 нм, что соответствует $\frac{|\mathbf{a}+\mathbf{b}|}{2}$. При этом, молекулы ДНК упакованы параллельно друг другу в одном направлении вдоль \mathbf{b} , что приводит к понижению симметрии с 6-ого порядка до P1. Каждый слой Dps сдвинут на 3.0 ± 0.4 нм относительно предыдущего вдоль направления \mathbf{b} . На рисунке 37 А-В продемонстрированы томографические срезы ко-кристаллов в различных ориентациях. Трехмерная реконструкция ко-кристаллов с разрешением 13.5 \AA (см. рис. 38) в соответствующих ориентациях (рис. 37 Г-Е), а также модели молекулы Dps (код PDB: 1Dps) и ДНК, вписанные в полученные плотности рассеивающего потенциала (рис. 37 Ж-И); наблюдаются зазоры величиной около 10 \AA между слоями Dps и около 5 \AA между частицами Dps и молекулами ДНК (рис. 37 Ж). Карта электронных плотностей нанокристаллов Dps-ДНК, полученные в результате выполнения данной работы, размещены в электронно-микроскопической базе данных (Electron Microscopy Data Bank) под номером EMD-4615.

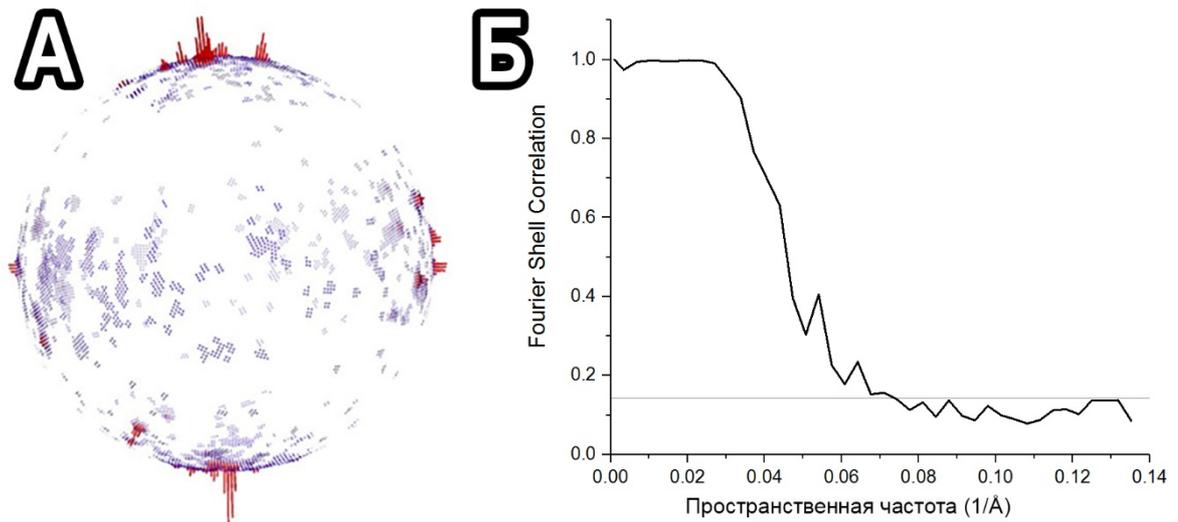


Рисунок 38. **А** - ориентационное распределение субтомограмм; **Б** – объемная корреляция Фурье (FSC) между двумя половинами реконструкций крио-ПЭМ карты ко-кристаллов Dps-ДНК. Сплошная серая линия - FSC = 0.143.

4.3.1.1. Обсуждение полученных результатов.

В отличие от модели комплекса, предложенной в работе Гранта и др. [5], в настоящей работе удалось продемонстрировать, что частицы Dps в ко-кристаллах упакованы в псевдогексагональные слои, параллельные (001), подобно кристаллам чистого Dps [33]. Несмотря на то, что модель предложенная в [33] предсказывала возможное увеличение межплоскостных расстояний и сдвиг слоев Dps, в настоящей работе удалось расширить и уточнить эту модель. Продемонстрировано, что сдвиг слоев Dps происходит только вдоль ДНК, обеспечивая формирование углублений для расположения ДНК. После определения параметров элементарной ячейки показано, что она содержит 1 частицу Dps и один тяж ДНК. Длина ДНК в элементарной ячейке составляет 9.3 ± 0.4 нм, что соответствует приблизительно 27 парам оснований. Самые большие кристаллы Dps–ДНК, обнаруженные в процессе исследования (см рис. 18), состоят из ~5000 частиц Dps, что соответствует приблизительно 14 тяжам ДНК с 9900 парами оснований. Показано, что ко-

кристаллы равномерно распределены в слое аморфного льда, с небольшим увеличением концентрации в центральной части образца. Таким образом, можно заключить что процедуры пробоподготовки не повлияли на размеры и форму кристаллов. Результаты крио-ЭТ получены при соотношении 1 частицы Dps на 66 пар оснований ДНК.

Таким образом, крио-ЭТ исследование позволило провести детальный анализ структуры комплекса Dps–ДНК. Однако, остается открытым вопрос о механизме взаимодействия Dps и ДНК в процессе кристаллизации. Известно, что формирование высокоупорядоченных комплексов происходит только при определенных условиях. Оптимальные условия для образования упорядоченных структур Dps-ДНК в растворе были определены с помощью исследования методом МУРР, результаты которого подробно описаны в работе [A2] и частично представлены в настоящем исследовании (рис. 39). В частности, данные МУРР продемонстрировали, что ко-кристаллизация не зависит от длины ДНК (рис. 39А), при условии, что последняя превышает 3000 пар оснований, а также от соотношений Dps к ДНК (рис. 39Б). Однако, стоит отметить что наиболее очевидное упорядочение наблюдается при использовании соотношения 1 додекамер Dps на 66 пар оснований ДНК [30, 175] (рис. 39Б, кривая 4). Указанные выше параметры элементарной ячейки биокристаллов Dps-ДНК были уточнены с помощью теоретических расчетов, исходя из положений пиков Брэгга на кривых МУРР и определенных по ним индексов Миллера и составили: $a = 9.1$ нм, $b = 9.5$ нм, $c = 10.4$ нм, $\alpha = 75.2^\circ$, $\beta = 88^\circ$, $\gamma = 59.8^\circ$.

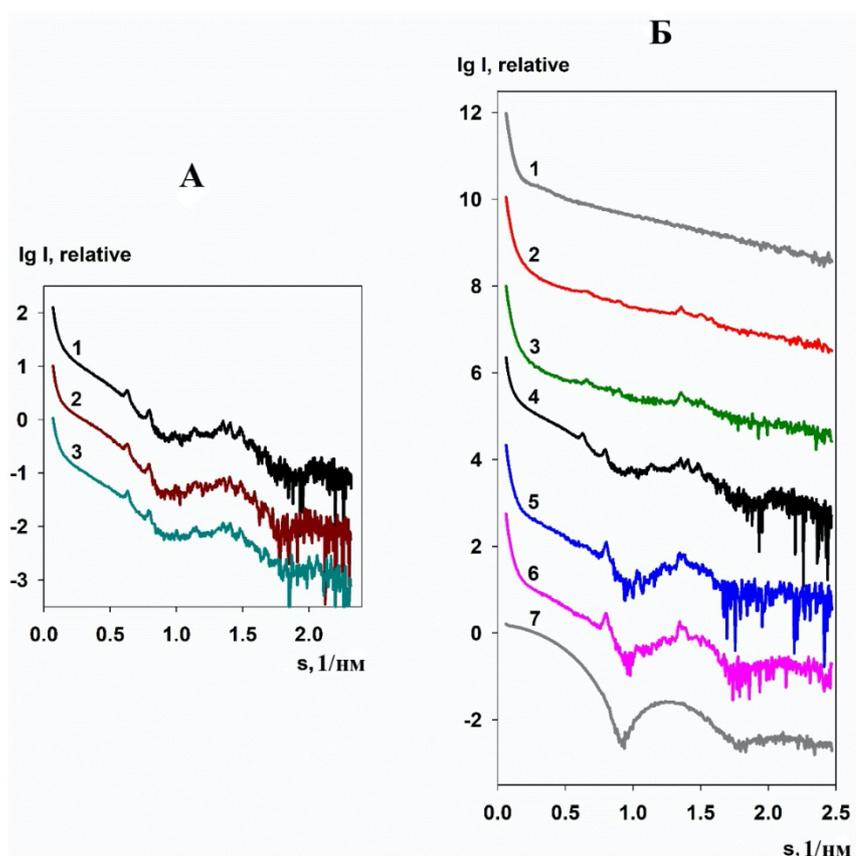


Рисунок 39. Сравнение кривых МУРР Dps-ДНК в растворе. А – ДНК длиной: (1) - 9900 п.н., (2) - 7715 п.н., (3) - 3130 п.н. Б – изменение концентрации ДНК при постоянной концентрации Dps. Номера кривых соответствуют следующим соотношениям Dps-ДНК: 1 - ДНК без Dps; 2 – 1 додекамер Dps на 300 п.н. ДНК; 3 - 1 додекамер Dps на 100 п.н. ДНК; 4 - 1 додекамер Dps на 60 п.н. ДНК; 5 - 1 додекамер Dps на 10 п.н. ДНК; 6 - 1 додекамер Dps на 5 п.н. ДНК; 7 - Dps без ДНК. Адаптировано из [A2].

В некоторых работах предполагалось, что Dps не вступает в непосредственный контакт с ДНК, и формирование комплекса в большой степени зависит от наличия ионов Mg^{2+} [13, 33]. Тем не менее, результаты, представленные в настоящей работе, демонстрируют образование комплекса в отсутствие ионов металлов. Полученные данные крио-ЭТ хорошо согласуются с результатами исследований методом МУРР и опубликованы в работе [A2].

4.3.2. Полимофизм ко-кристаллов Dps-ДНК. Кристаллы с кубической элементарной ячейкой

На рис. 40 показано крио-ПЭМ изображение ко-кристаллов Dps-ДНК (см. раздел 2.2.4.2), полученное с использованием фазовой пластины. Наблюдаются ко-кристаллы двух типов (показаны синими и красными стрелками) с размерами в диапазоне 40 нм - 300 нм. Красные стрелки на рисунке 41А указывают на многослойные кристаллы с ламеллярной морфологией (рис. 41 А-В, рис. 42 Д-Е) и аспектным соотношением сторон около 10. Синие стрелки показывают второй тип ко-кристаллов, меньшего размера и с аспектным соотношением до 2 (рис. 41 Г-Е, рис. 42 А-Г). На рис. 40 Б-В показаны увеличенные фрагменты ко-кристаллов. Кроме того, на рис. 40А наблюдаются несвязанные молекулы ДНК.

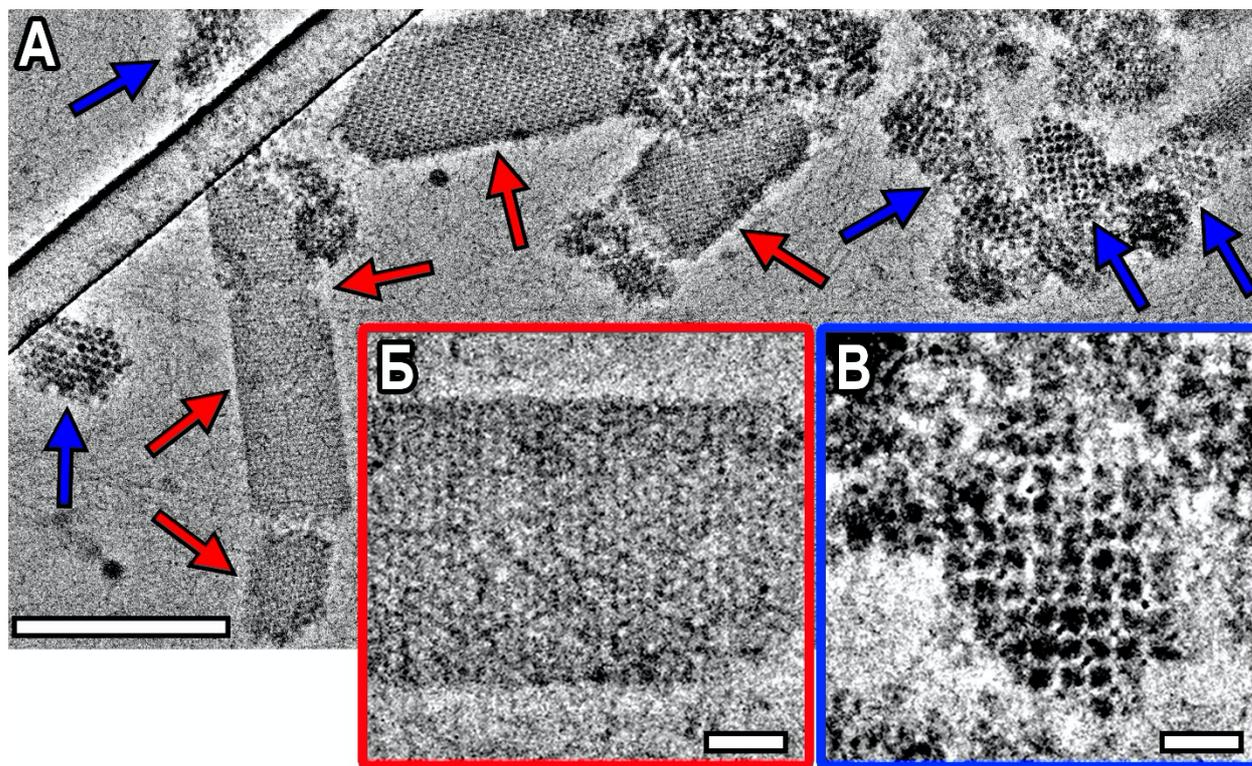


Рисунок 40. Крио-ЭМ изображения биокристаллов Dps-ДНК, полученные с использованием фазовой пластины. А — общий вид образца, синие и красные стрелки указывают на ко-кристаллы с различными типами кристаллической

структуры. Масштабный отрезок 200 нм; **Б, В** – примеры ко-кристаллов Dps-ДНК с триклинной (**Б**) и кубической (**В**) элементарной ячейкой Масштабный отрезок 20 нм.

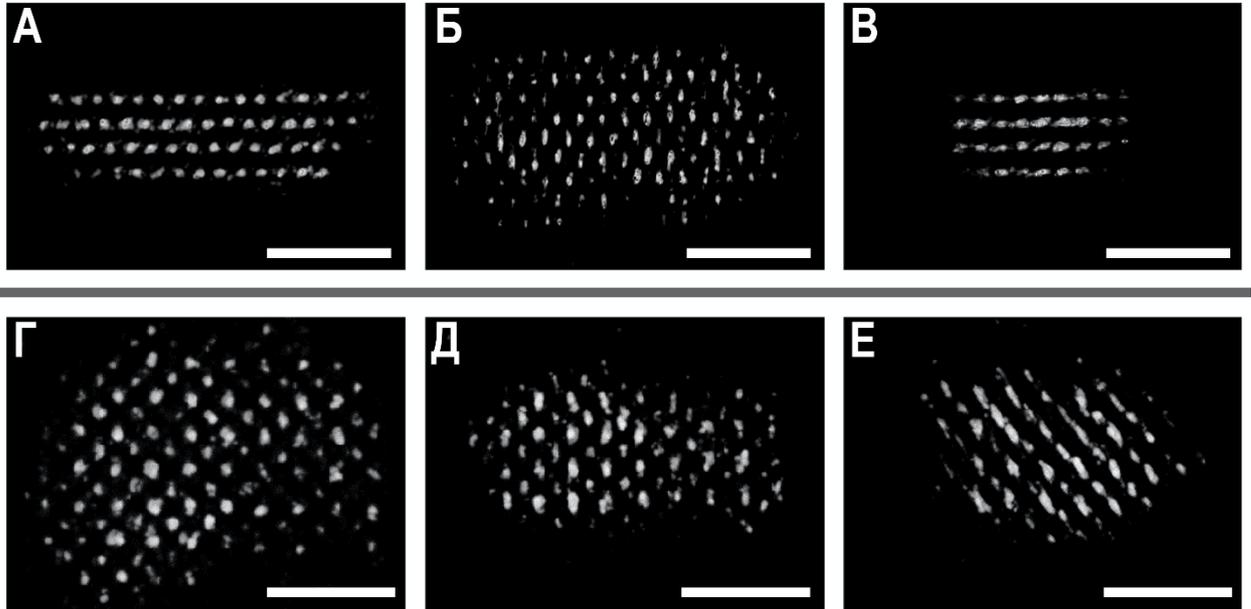


Рисунок 41. Ко-кристаллы Dps-ДНК с триклинной (**А–В**) и кубической (**Г–Е**) элементарной ячейкой в различных ориентациях. Белые пятна указывают на центры молекул Dps в сегментированных томограммах. Масштабный отрезок 50 нм.

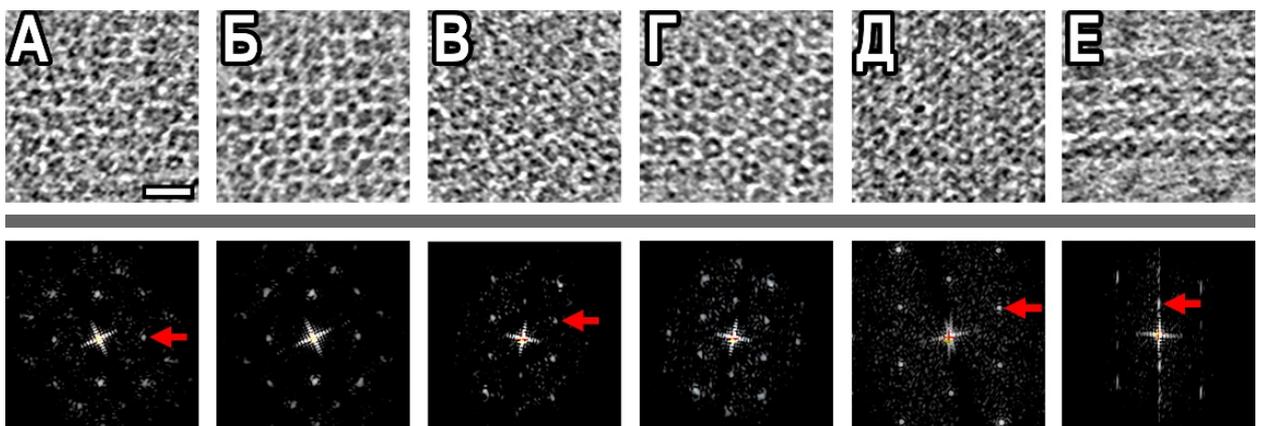


Рисунок 42. Томографические срезы (верхняя строка) и соответствующие им двумерные Фурье-спектры (нижняя строка) ко-кристаллов Dps-ДНК с кубической (**А–Г**) и триклинной (**Д–Е**) элементарной ячейкой в различных ориентациях. (**А, В**) – томографические срезы толщиной 5 нм для кристаллов с кубической

элементарной ячейкой; (Б, Г) - срезы толщиной 20 нм для кристаллов с кубической элементарной ячейкой; (Д) – срез толщиной 5 нм для кристалла с триклинной элементарной ячейкой; (Е) срез толщиной 20 нм для кристалла с триклинной элементарной ячейкой. Масштабный отрезок 20 нм. Красные стрелки на соответствующих Фурье-спектрах указывают на межплоскостные расстояния 9.2 ± 0.3 нм (А, В), 7.9 ± 0.3 нм (Г), 10 ± 0.3 нм (Е).

Детальный анализ результатов субтомографического усреднения, выполненный для ко-кристаллов обоих типов, подтвердил различия в их структуре. Стоит отметить, что данные крио-ЭТ для субтомографического усреднения получены с одной и той же сетки. Однако, можно утверждать, что результаты воспроизводимы, поскольку ко-кристаллы комплекса Dps-ДНК со схожей морфологией наблюдались в нескольких экспериментах, выполненных с различными параметрами витрификации и на различных сетках. Кристаллы первого типа (показаны красными стрелками на рис 37) обладают триклинной кристаллической решеткой (S.G. P1, параметры элементарной ячейки $a \approx b = 9.3 \pm 0.4$ нм, $c = 10.3 \pm 0.4$ нм, $\alpha = 73^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 60^\circ$, EMD-4615), подробно описанной в предыдущем разделе, а также в статье [A2].

Результаты субтомографического усреднения ко-кристаллов второго типа (рис. 44А, рис. 45 Г-Е) продемонстрировали, что они обладают кубической кристаллической ячейкой (рис. 44А) и состоят из молекул Dps (рис. 44Б), перемежающихся с взаимно перпендикулярными тяжами ДНК (рис. 45). Укладка молекул Dps в ко-кристаллах соответствует пространственной группе $Im\bar{3}m$, однако тяжи ДНК понижают симметрию до $Pm\bar{3}m$. Параметры элементарной ячейки ко-кристаллов были определены с помощью крио-ПЭМ изображений и томографических срезов: $a=b=c=13 \pm 1$ нм, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, максимальное межплоскостное расстояние 9 ± 1 нм. Погрешность оценивалась по ширине пика спектра FFT от ко-кристаллов на полувысоте. Установлено, что на каждую молекулу Dps в элементарной ячейке приходится 56 ± 3 пары оснований ДНК. Пространственное разрешение по критерию объемной корреляции Фурье

FSC=0.143 составило 13.5 Å (серая сплошная линия, рис. 43Б) и 22 Å по критерию FSC=0.5 (серая прерывистая линия, рис. 43Б). Полученная карта электронной плотности размещена в базу данных электронной микроскопии (EMDB) под номером EMD-10286.

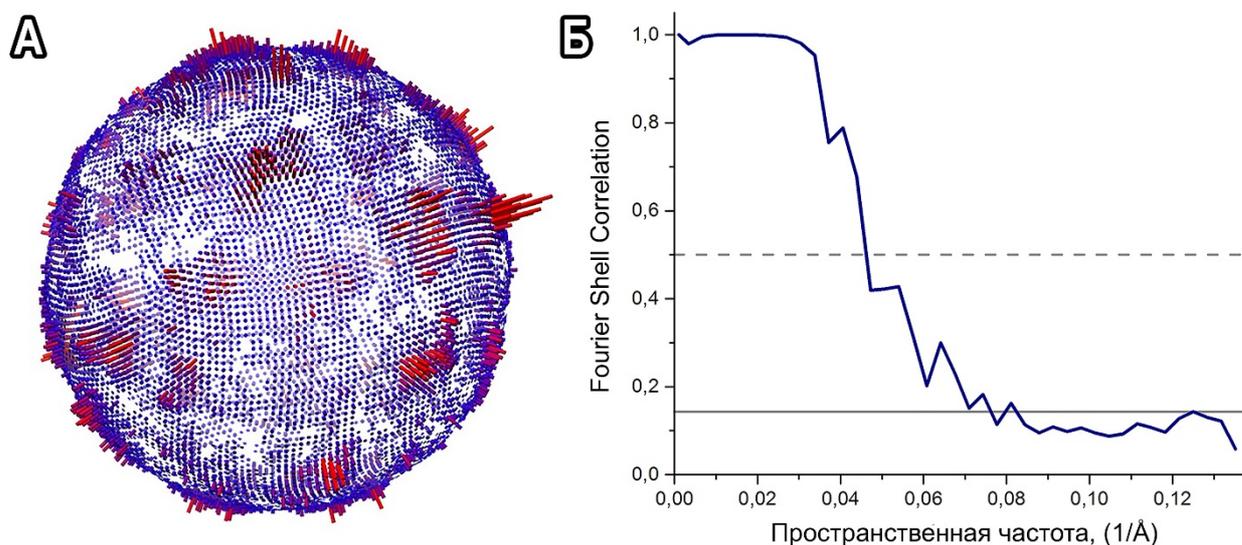


Рисунок 43. А - ориентационное распределение субтомограмм; Б – объемная корреляция Фурье (FSC) между двумя половинами реконструкций крио-ПЭМ карты ко-кристаллов Dps-ДНК. Сплошная серая линия—FCS = 0.143, прерывистая серая линия - FSC = 0.5.

Пространственное разрешение полученной крио-ПЭМ карты позволило визуализировать 4 поры в молекуле Dps. Одна из этих пор видна на рис. 44Б, в то время как три других поры расположены на нижней части молекулы Dps и не видны в настоящей проекции. Визуализация расположения пор привела к пониманию ориентации Dps в элементарной ячейке (рис. 44А). Выявлено, что элементарная ячейка содержит 2 молекулы Dps и три ДНК (рис. 44А). Каждая из молекул Dps взаимодействует с 6 тяжами ДНК (рис. 44А). Наблюдаемые поры центральной молекулы Dps в элементарной ячейке ориентированы к порам четырех молекул Dps в вершинах ячейки, которые повернуты на 90° по отношению к ориентации [001] центральной молекулы.

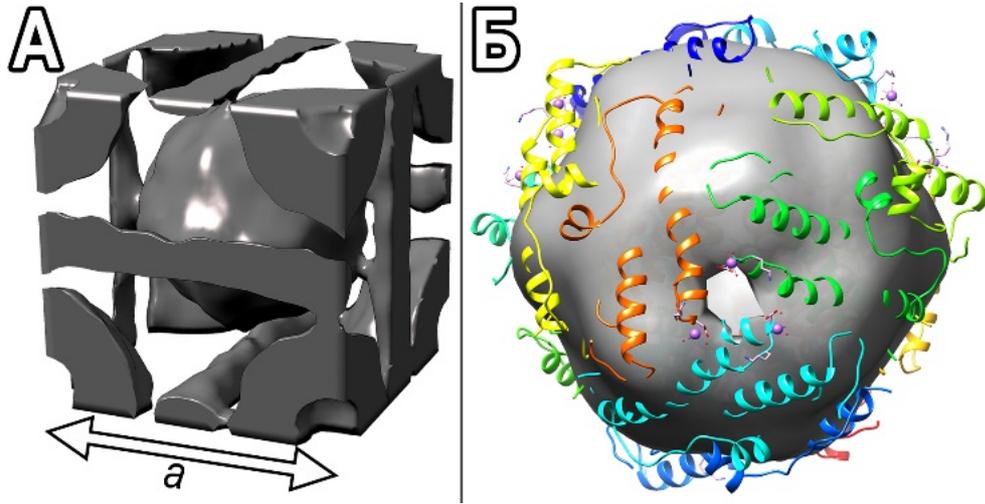


Рисунок 44. А – элементарная ячейка полученной кубической кристаллической решетки; Б – структура 1DPS [5], вписанная в полученную крио-ПЭМ карту. Для выявления пор в молекуле Dps выбран низкий порог визуализации изоповерхности крио-ПЭМ карты.

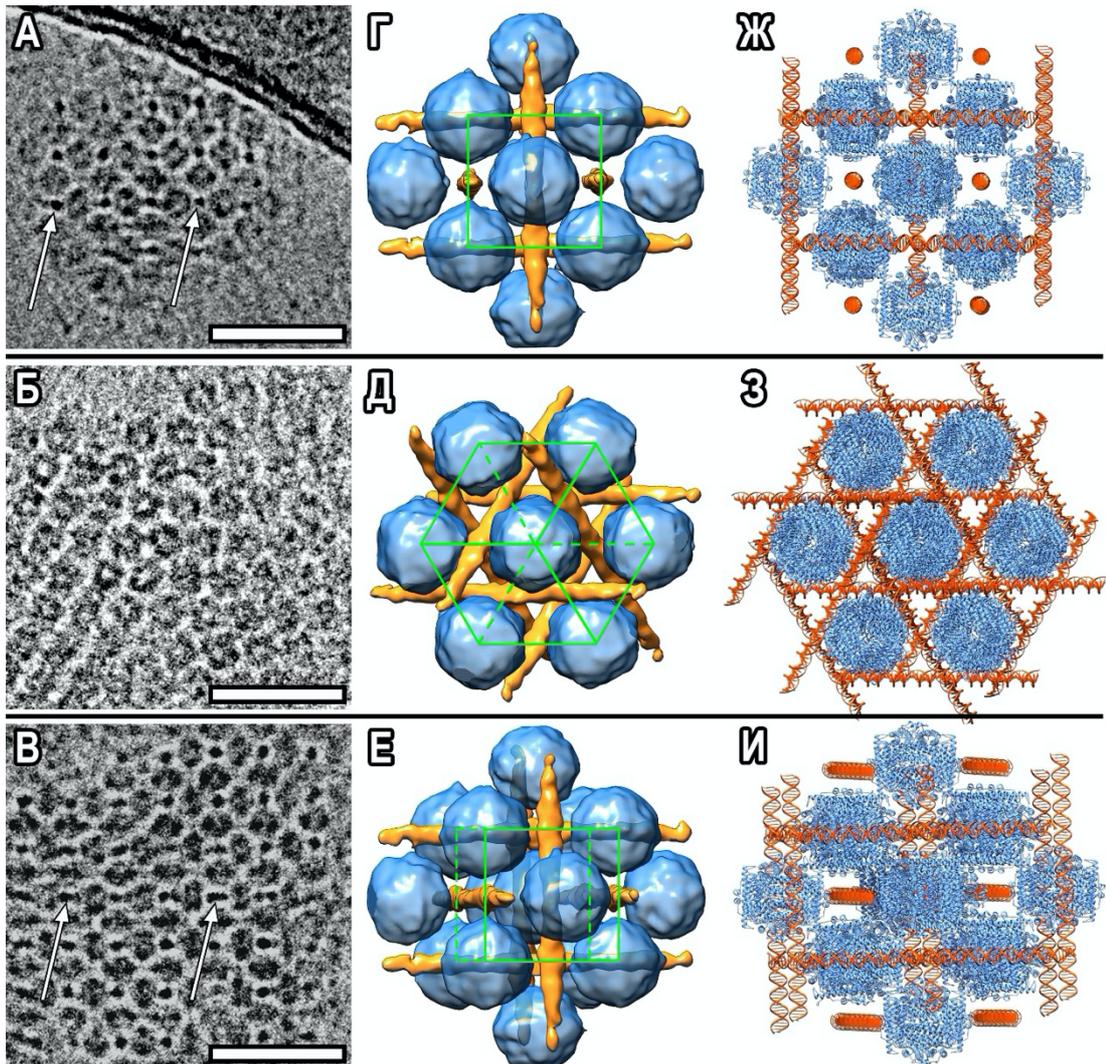


Рисунок 45. Ко-кристаллы Dps-ДНК с кубической элементарной ячейкой. **А-В** – Крио-ПЭМ изображения ко-кристаллов в различных ориентациях (**А** - [001], **Б** - [111], **В** - [001] под наклоном), масштабный отрезок 40 нм. Стрелки указывают на молекулы ДНК на крио-ПЭМ изображениях. **Г-Е** – Трехмерные реконструкции ко-кристаллов Dps-ДНК в соответствующих ориентациях. Синим показаны молекулы Dps, оранжевым – тяжи ДНК, зеленым – элементарная ячейка; **Ж-И** – Известные структуры Dps и ДНК, вписанные в полученные трехмерные реконструкции.

На рис. 45 А-В продемонстрированы крио-ПЭМ изображения ко-кристаллов в различных ориентациях (первый ряд – [001], второй ряд – [111], третий ряд – [001] под наклоном). Показаны трехмерная реконструкция соответствующих ориентаций ко-кристаллов (рис. 45 Г-Е), модели молекулы Dps (код PDB: 1DPS) [5] и ДНК, вписанные в соответствующие крио-ПЭМ плотности (рис. 45 Ж-И), а также зазор между молекулами Dps и ДНК величиной около 10 Å (рис. 45Ж, рис. 46). Порог визуализации изоповерхности (рис. 45 Г-Е) был выбран в соответствии с размером одиночной молекулы 1Dps [5].

Вписанная структура (рис. 45 Ж-И, рис. 46) показывает что E-спиральные концы (пучки) [5] в каждой молекуле Dps расположены по направлению к тяжам ДНК. Каждый додекамер Dps содержит 6 пар E-пучков, расположенных на одном и том же расстоянии от ДНК (рис. 46).

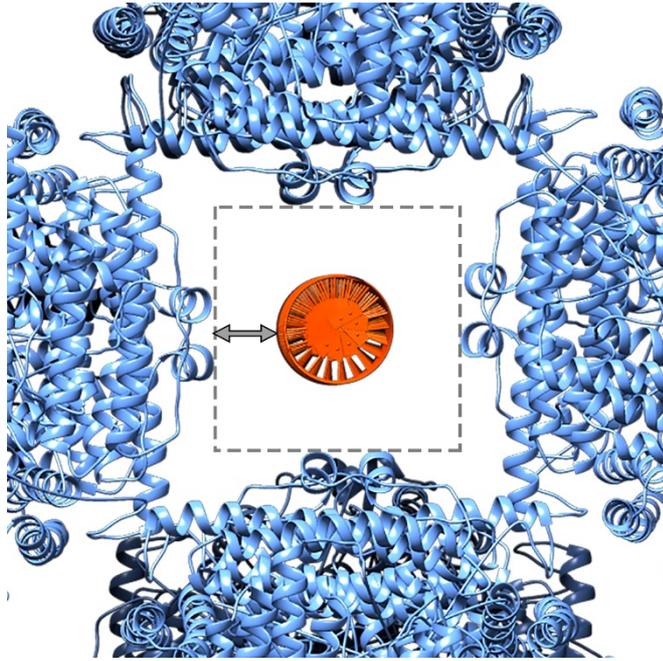


Рисунок 46. Иллюстрация свободного расстояния между Dps и ДНК (в центре, показана оранжевым цветом) в ко-кристалле с кубической кристаллической решеткой.

4.3.2.1. Обсуждение полученных результатов

Описанные выше результаты опубликованы в работе [A1], где впервые показано формирование взаимно-перпендикулярных тяжей ДНК в комплексах типа «белок-ДНК». Тем не менее, сходные структуры наблюдались в комплексах ДНК с липидами [176, 177], а морфология кристаллов Dps-ДНК с триклинной элементарной ячейкой, продемонстрированных в разделе 4.2.1.1 и работе [A2] схожа со структурой, предложенной в работе [33].

Формирование полиморфных структур Dps-ДНК можно объяснить неравновесными условиями при получении раствора. Стоит отметить, что процесс биокристаллизации *in vitro* происходит в течение секунд, в то время как в живых клетках этот процесс может занять часы, дни и даже месяцы [178]. В процессе *in vitro* кристаллизации существенно увеличивается локальная гетерогенность Dps и

ДНК, что в свою очередь может оказывать влияние на различия в кристаллических структурах.

В работе [30] указывается что симметричное расположение N-концов на поверхности додекамеров Dps приводит к формированию упорядоченных кристаллов, схожих с кристаллами в голодающих клетках *E. coli*. Однако, в вышеупомянутой работе не конкретизируется механизм взаимодействия Dps и ДНК. В настоящей работе, представленной к защите, показано, что додекамеры Dps в кубических кристаллах взаимодействуют с молекулами ДНК, при этом не взаимодействуя между собой. Молекулы Dps и ДНК отталкиваются электростатическими силами, формируя между собой зазор величиной около ~ 1 нм (рис. 45 Ж, рис. 46), в то время как контакт обеспечивается с помощью N-концов. Схожее поведение наблюдается в случае с триклинной решеткой, что продемонстрировано в разделе 4.2.1 и статье [A2]. Додекамер Dps на представленной выше трехмерной реконструкции окружен шестью тяжами ДНК, таким образом два N-конца могут быть вовлечены во взаимодействие с одной молекулой ДНК.

Различие в количестве ДНК на частицу Dps в ко-кристаллах с кубической (56 ± 3 пар оснований) и триклинной (27 ± 3 пар оснований) решетками может быть объяснено структурными особенностями: в кубических ко-кристаллах каждый додекамер Dps окружен шестью тяжами ДНК, в то время как в триклинной решетке – четырьмя тяжами ДНК (рис. 47). Таким образом, показано, что даже небольшие отличия в соотношении Dps-ДНК может привести к формированию различных кристаллических структур.

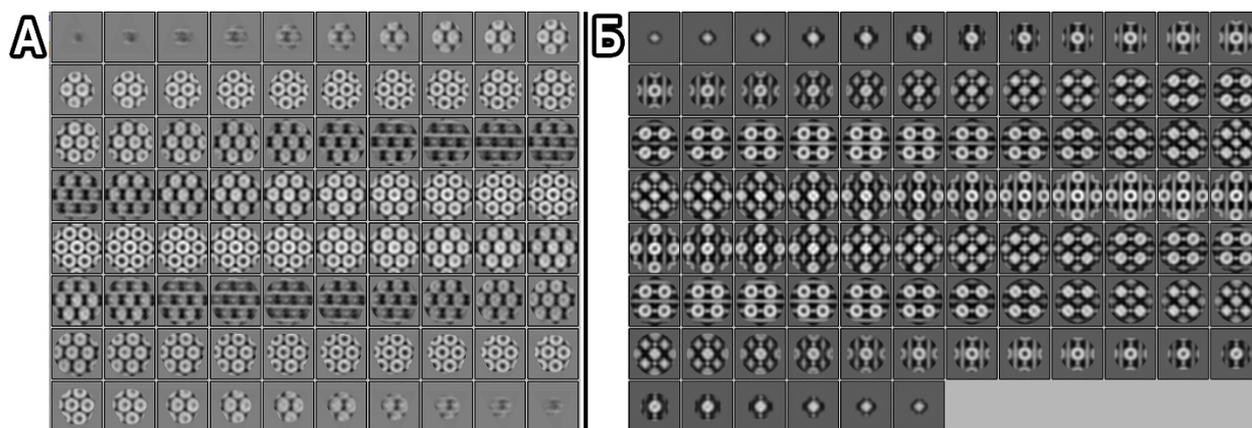


Рисунок 47. Томографические срезы усредненных субтомограмм кристаллов Dps-ДНК с триклинной (А) и кубической (Б) кристаллической решеткой.

Трехмерная реконструкция молекул ДНК на рис. 45 (Г-Е) демонстрирует линейные области последних. С учетом среднего размера наблюдаемых нанокристаллов, оценка длины линейного сектора ДНК не превышает 500 пар оснований (из 9900 пар оснований во всей молекуле).

Полученные в настоящей работе данные крио-ЭТ подтверждены и уточнены с помощью МУРР (рис. 48). Для сравнения с результатами, представленными в разделе 4.3.1 и в работе [A2], на рис. 48А представлены кривые МУРР для кристаллов Dps-ДНК в различных буферах (длина ДНК 9900 п.н.). Параметры элементарной ячейки для образца в буфере с рН 8, уточненные исходя из анализа взаимного расположения брэгговских пиков на кривых МУРР и определенных по ним индексов Миллера, – $a = 13.9$ нм, $\alpha = 90^\circ$ – с хорошей точности соответствуют данным крио-ЭТ [A1].

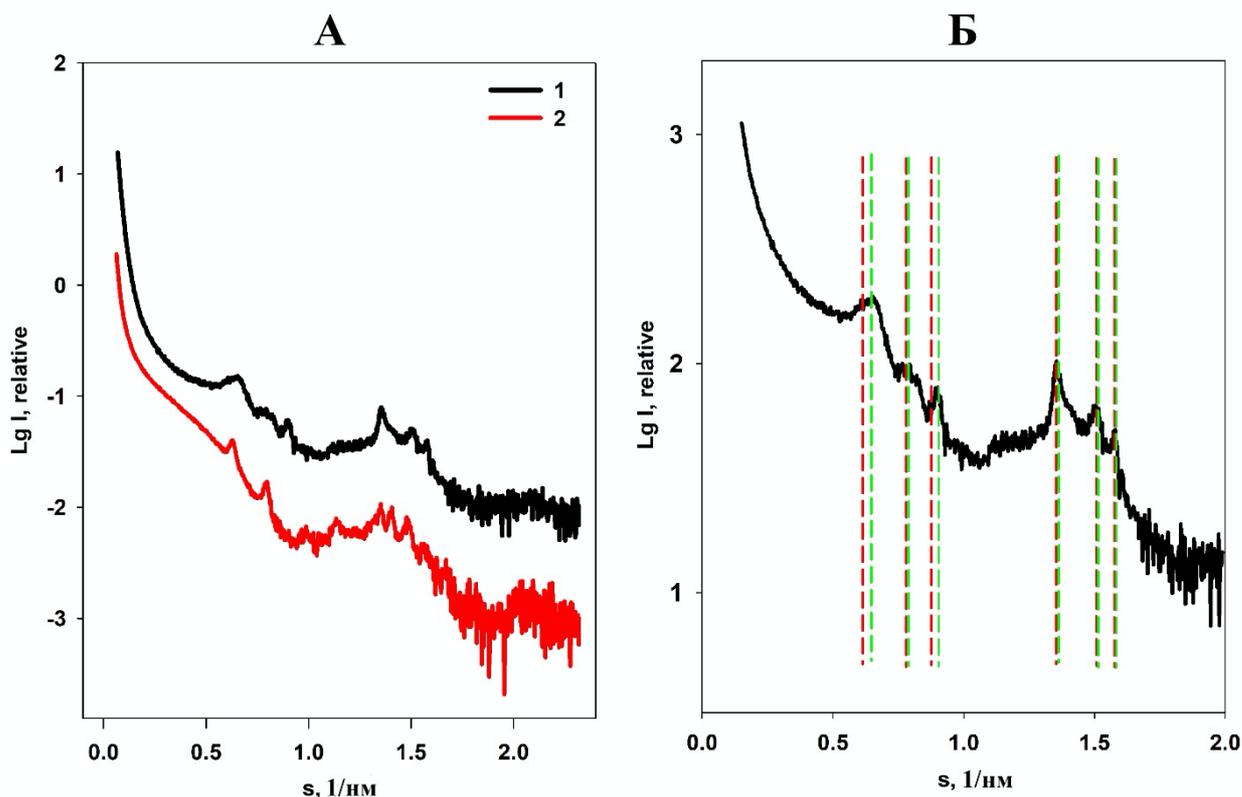


Рисунок 48. Экспериментальные данные кривых МУРР ко-кристаллов Dps-ДНК в растворах с различными буферами. 1 – рН 7.5, 10 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, 0.5 мМ ЭДТА; 2 – рН 8.0, 50 мМ Tris-HCl, 50 мМ NaCl, 0.5 мМ ЭДТА (А). Позиции пиков отмечены линиями в зависимости от типа элементарной ячейки кристаллов в буфере 1 (Б). Красные линии соответствуют кристаллам с триклинной элементарной ячейкой (первый пик соответствует $hkl=001$), зеленые линии – кристаллам с кубической элементарной ячейкой (первый пик соответствует $hkl=110$). Адаптировано из [A1].

В ранних *in vivo* исследованиях предполагалось, что ко-кристаллы Dps-ДНК состоят из тяжёлой ДНК, перемежающихся с псевдо-гексагональными слоями Dps [2], что хорошо соответствует триклинной структуре, полученной в данной работе. Кроме того, значения инвариантов и размеры областей кристалличности [A1] указывают на более плотную упаковку кристаллов с триклинной решеткой. Таким образом, может быть сделано предварительное заключение о том, что кристаллическая структура комплекса Dps-ДНК в живых клетках скорее соответствует триклинной решетке для более эффективной защиты генетического материала. Однако, обнаруженный полиморфизм структур и открытие кубической

кристаллической структуры комплекса поднимает вопрос о возможном формировании разных типов комплексов на различных стадиях биокристаллизации.

4.4. Исследование одиночных комплексов Dps-ДНК методом анализа проекций одиночных частиц

Для определения механизмов взаимодействия Dps-ДНК проведено исследование одиночных комплексов методом анализа проекций одиночных частиц. На рис. 49 показаны характерные крио-ПЭМ изображения, полученные в ходе скрининга подготовленных сеток и определения оптимальной концентрации образцов 1a-1b (здесь и далее нумерация образцов согласно Таблице 1). При смешении растворов Dps-ДНК в соотношении 1:1 без разбавления буфером на изображениях отчетливо наблюдаются частицы Dps и тяжи ДНК. При этом, образец 1a характеризуется существенным упорядочением и плотной упаковкой додекамеров Dps, в то время как на образце 1b частицы Dps расположены на некотором расстоянии друг от друга. В обоих случаях количество видимых частиц Dps значительно превышает количество частиц ДНК.

При исследовании образца 1a (5ДНК:1Dps):4(A), напротив, выявлено большое количество несвязанных частиц ДНК при полном отсутствии в поле зрения частиц Dps.

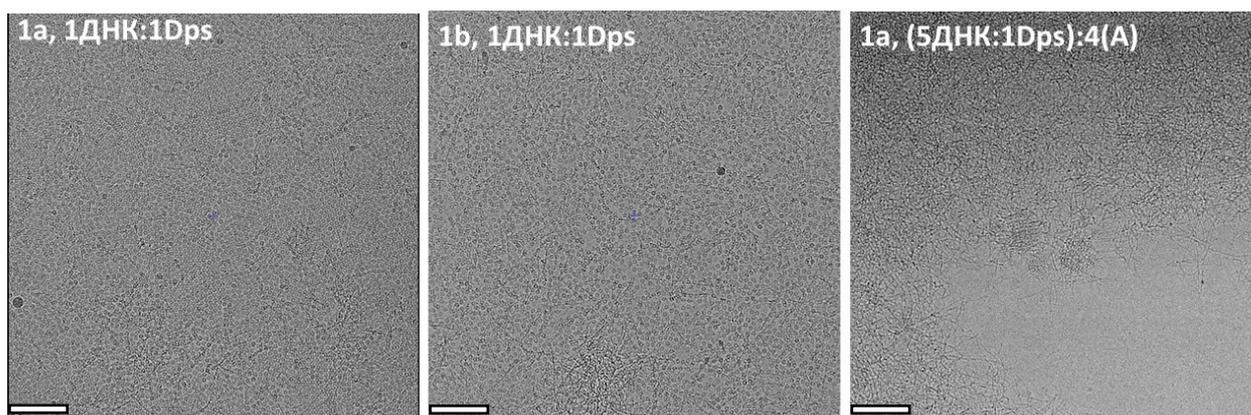


Рисунок 49. Характерные крио-ПЭМ изображения образцов 1a-1b. Масштабный отрезок 100 нм.

Для дальнейшего исследования методом анализа проекций одиночных частиц выбран образец 1b (1ДНК:1Dps). В результате полученный набор частиц состоял из двух основных классов изображений – одиночных частиц Dps и частиц Dps с фрагментами близлежащих тяжей ДНК.

На рисунке 50 представлен результат двумерной классификации 124 тысяч полученных проекций после отсеивания одиночных частиц Dps. На полученных классах отчетливо наблюдаются частицы Dps и линейный фрагмент ДНК. Несмотря на то, что на некоторых классах присутствует явно видимая вторичная структура додекамеров Dps, характерная для высокосимметричных одиночных частиц, изображение тяжа ДНК размыто, что может свидетельствовать о его высокой подвижности.

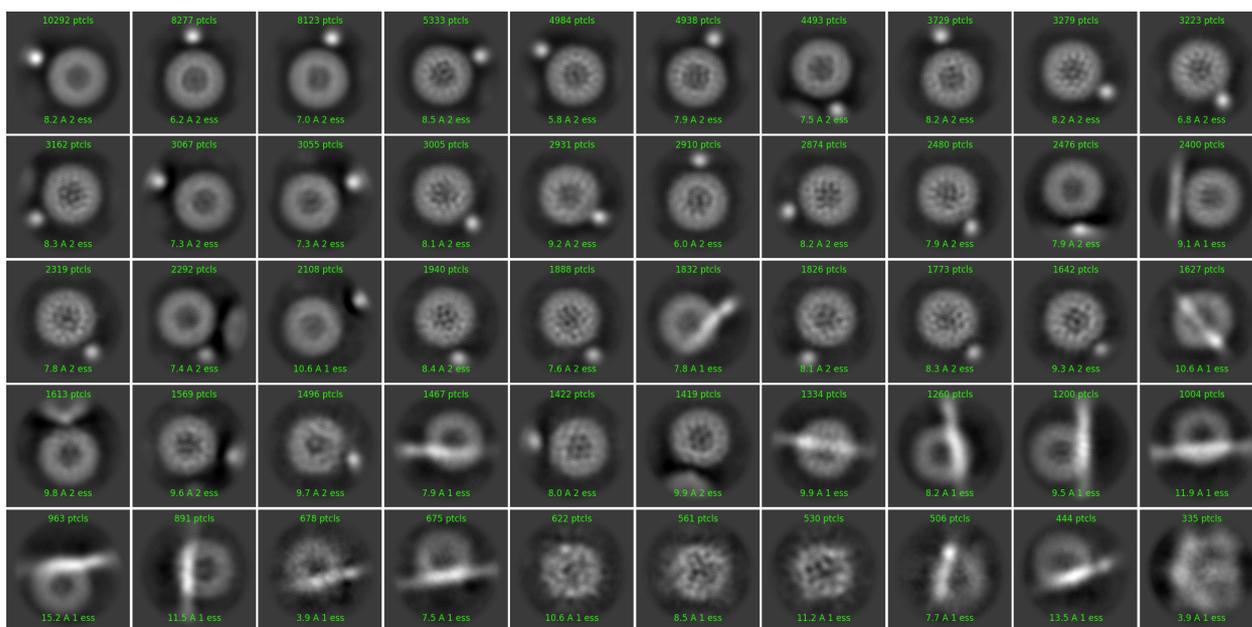


Рисунок 50. Результат 2D классификации частиц Dps с близлежащими фрагментами ДНК образца 1b (1ДНК:1Dps).

Проекции, принадлежащие к отобранным классам, были использованы для получения 3D реконструкции (3D рефайнмента) комплекса. В результате получена трехмерная реконструкция (рис. 51), на которой отчетливо различим фрагмент ДНК, расположенный рядом с частицей Dps. Однако, ввиду высокой подвижности комплекса, пространственного разрешения полученной 3D реконструкции недостаточно для определения вторичной структуры частиц и однозначной визуализации взаимодействия Dps и ДНК.

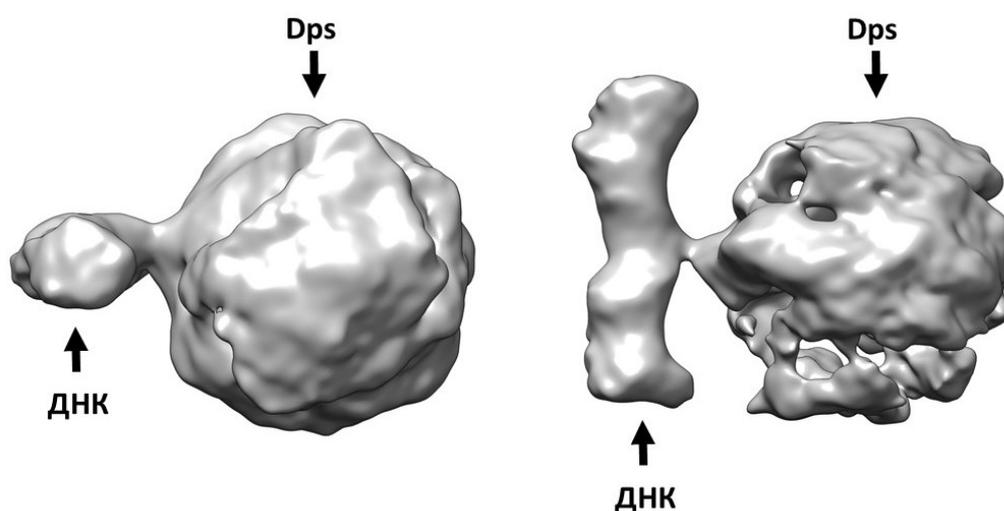


Рисунок 51. Трехмерная реконструкция комплекса Dps-ДНК в двух различных проекциях. Образец 1b (1ДНК:1Dps).

Методом анализа проекций одиночных частиц проведено исследование образца 3b (1ДНК:1Dps):4(B). На 2D классах (рис. 52) видны проекции частиц Dps с хорошо наблюдаемой вторичной структурой додекамеров, однако на большинстве классов отсутствуют дополнительные плотности, соответствующие тяжам ДНК.

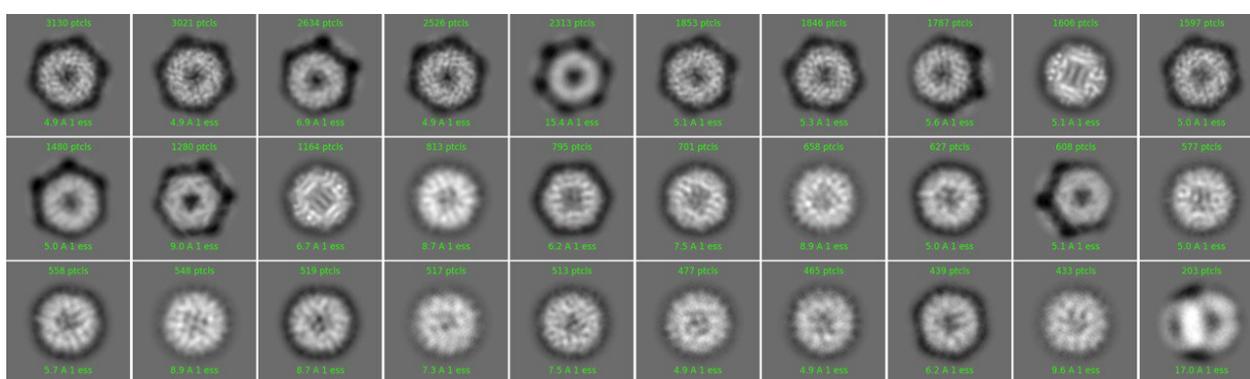


Рисунок 52. Результаты двумерной классификации проекций частиц образца 3b (1ДНК:1Dps):4(B).

На рис. 53 (А, Б) представлены 2 класса (из представленных на рис. 52), соответствующие плотноупакованным частицам Dps. При ближайшем рассмотрении этих классов между центральной частицей Dps и частицами, расположенными вокруг нее, видны дополнительные плотности (примеры указаны красным), которые, по всей видимости, соответствуют N-концам, впервые наблюдаемым в данной работе.

На рис. 53 (В, Г) представлены проекционные изображения трехмерных структур. Для реконструкции первой структуры (рис: 53 В) использованы только додекамеры Dps, принадлежащие классам с одиночными частицами. Для второй реконструкции (рис. 53 Г) также были использованы 2D классы, в которых, помимо центрального Dps, наблюдаются соседние молекулы из плотноупакованных псевдогексагональных 2D кристаллов.

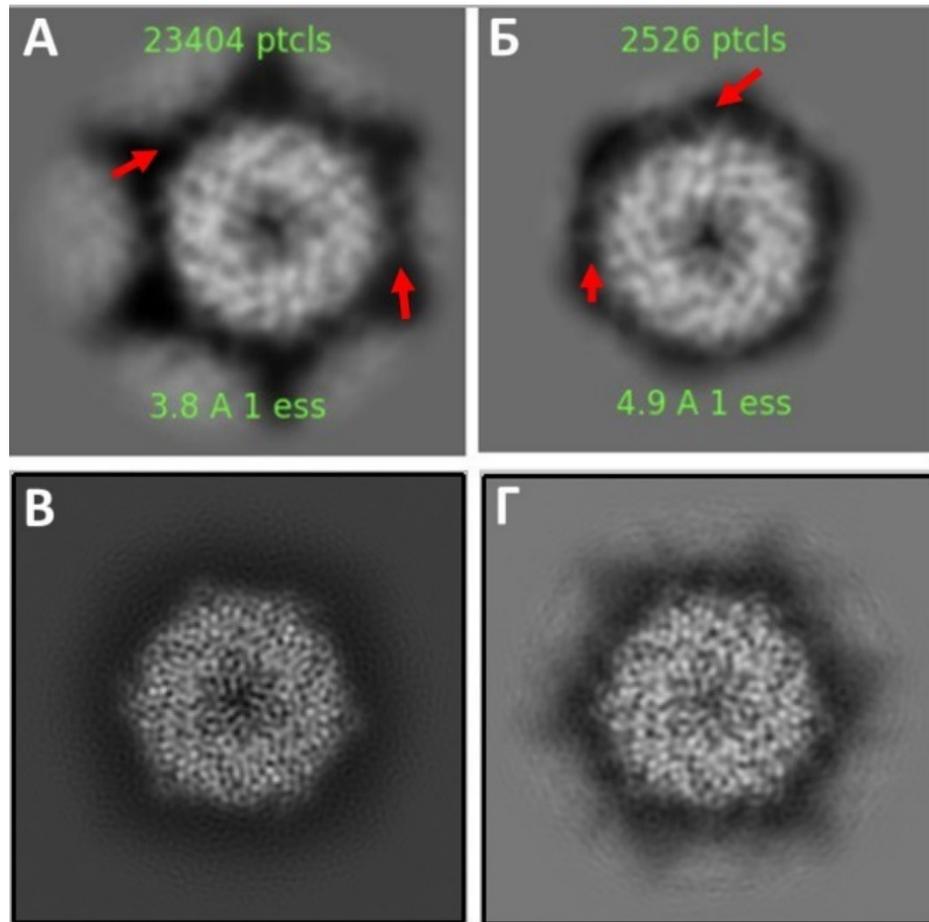


Рисунок 53. А, Б – 2D классы, соответствующие частицам Dps, со всех сторон окруженных соседними частицами (псевдогексагональная упаковка) с наблюдаемыми N-концами. В – проекционное изображения трехмерной структуры одиночной частицы Dps. Г – изображение трехмерной структуры частиц Dps в плотной упаковке.

На рис. 54 - 55 показаны характерные крио-ПЭМ изображения, полученное в ходе скрининга подготовленных сеток и определения оптимальной концентрации образцов 3a-3b. При смешении растворов Dps-ДНК в соотношении 1:1 без разбавления буфером на изображениях (Рис. 54) отчетливо наблюдаются частицы Dps и тяжи ДНК. При этом, образец 3a характеризуется большей плотностью частиц Dps. В обоих случаях количество видимых частиц Dps значительно превышает количество частиц ДНК.

При исследовании образцов 3а и 3b, разбавленных соответствующими буферами (рис. 55), наблюдаются как одиночные частицы Dps и ДНК, с преобладанием частиц Dps, так и упорядоченные слои Dps.

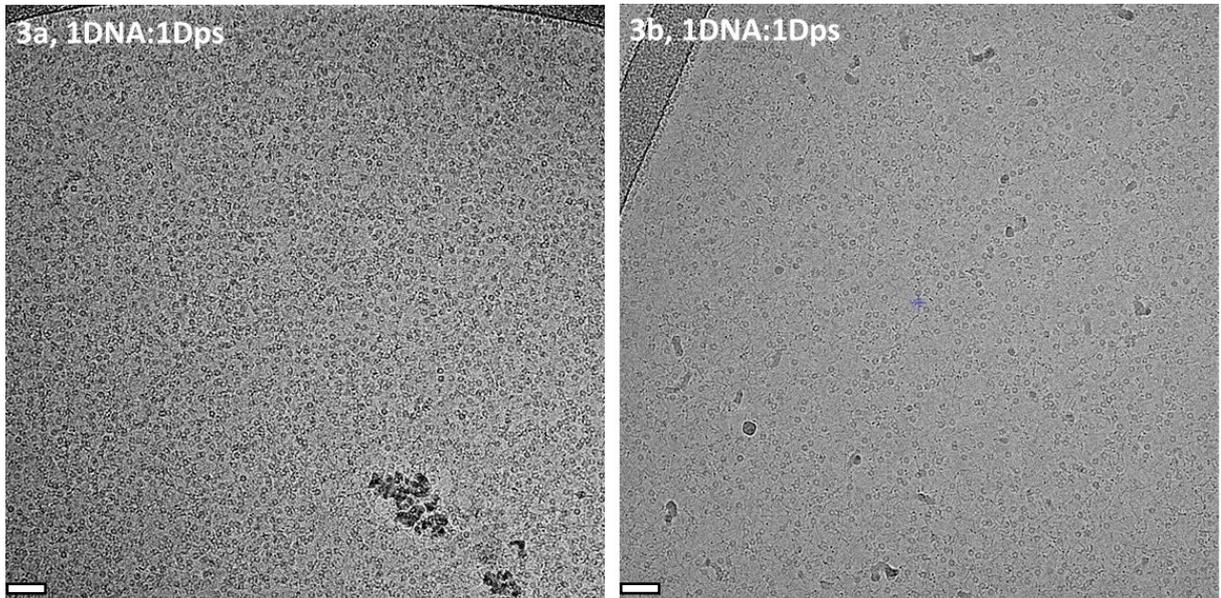


Рисунок 54. Характерные крио-ПЭМ изображения образцов 3а (1ДНК:1Dps) и 3b (1ДНК:1Dps). Масштабный отрезок 50 нм.

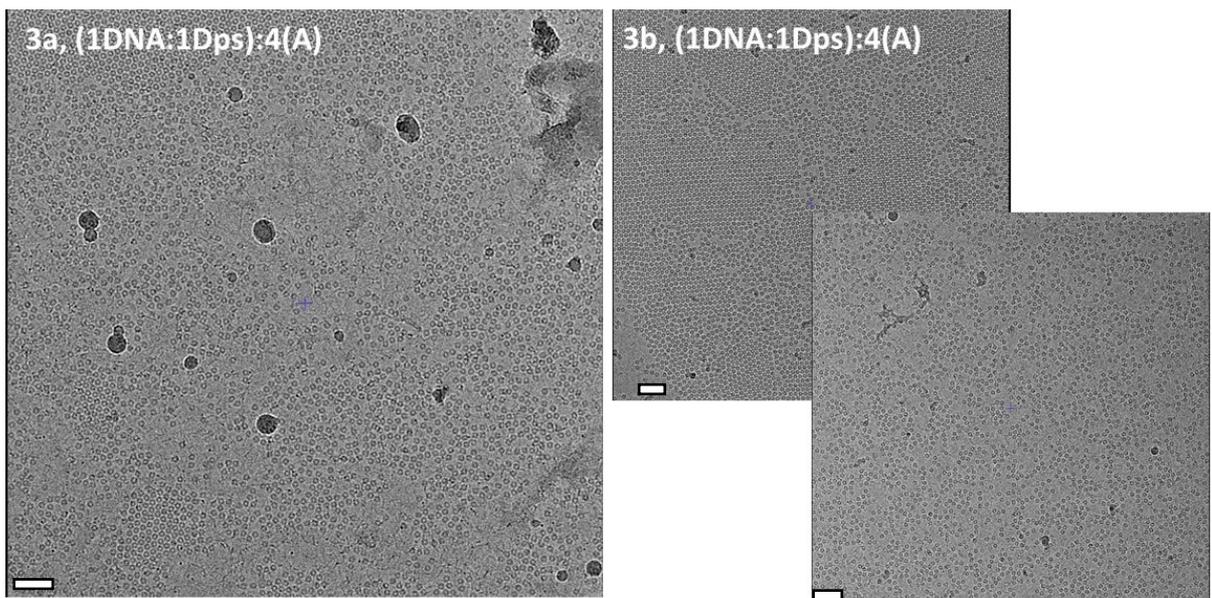


Рисунок 55. Характерные крио-ПЭМ изображения образцов 3a (1ДНК:1Dps):4(A) и 3b (1ДНК:1Dps):4(B). Масштабный отрезок 50 нм.

Для дальнейшего исследования методом анализа проекций одиночных частиц выбран образец 3a (1ДНК:1Dps), без разбавления буфером. Была проведена двумерная классификация 245 тысяч проекций одиночных частиц, выделенных из стеков исходных изображений (рис. 56). После нескольких этапов классификации проекции частиц были разделены на классы, содержащие только несвязанные частицы Dps (86 тысяч частиц) и классы, содержащие дополнительные плотности, предположительно соответствующие тьямам ДНК (32 тысячи частиц).

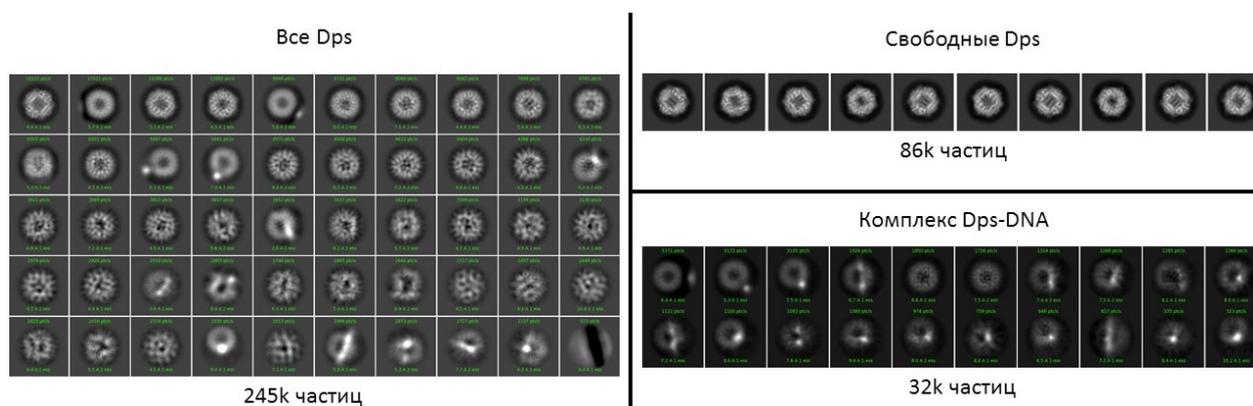


Рисунок 56. Результаты двумерной классификации проекций частиц образца 3a (1ДНК:1Dps).

Из рис. 56 видно, что на классах, соответствующих несвязанным частицам Dps, отчетливо наблюдается вторичная структура додекамеров, в то время как классы, соответствующие комплексу Dps-ДНК, обладают существенно худшим пространственным разрешением, что говорит о высокой подвижности комплекса и препятствует получению трехмерной структуры высокого разрешения.

Проекции, принадлежащие к отобранным классам несвязанных частиц Dps, в дальнейшем были использованы для 3D реконструкции (3D рефайнмента) с учетом тетраэдральной симметрии (Т-симметрии) объекта. В результате получена трехмерная реконструкция (рис. 57) с пространственным разрешением ~ 2.95 Å.

Оценка пространственного разрешения реконструкции проведена по критерию $FSC=0.143$.

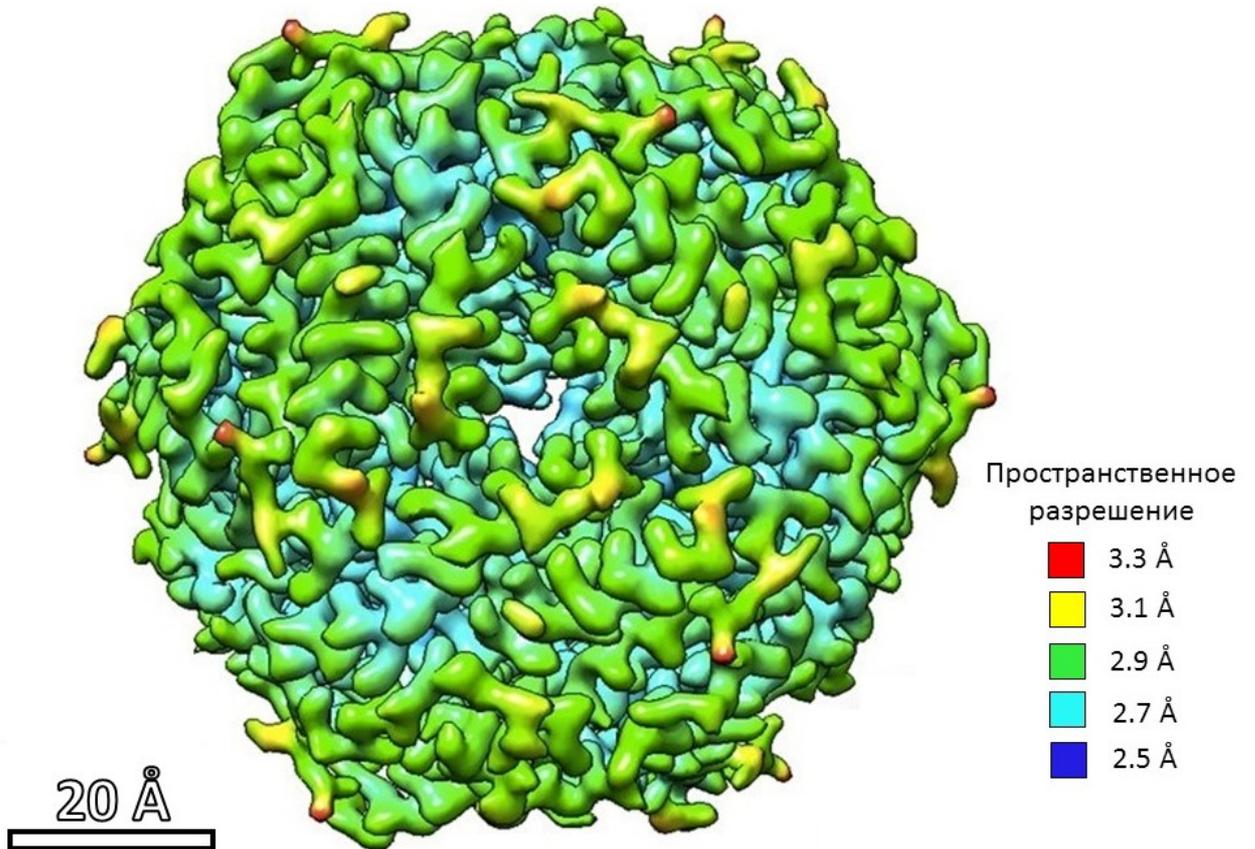


Рисунок 57. Трехмерная реконструкция несвязанных частиц Dps образца 3a (1ДНК:1Dps), полученная с применением T-симметрии.

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами крио-ПЭМ, в частности криоэлектронной томографии, проведено исследование структуры биокристаллов комплекса Dps-ДНК *in cellulo* и *in vitro*.

1. Впервые продемонстрирован полиморфизм кристаллов комплекса Dps-ДНК, полученных *in vitro*. Проведена трехмерная реконструкция и субтомографическое усреднение для исследуемых нанокристаллов. Показано формирование кристаллов двух различных типов с размерами в диапазоне 40 нм - 300 нм.
2. Обнаружена зависимость структуры комплекса Dps-ДНК от условий его формирования, то есть от состава буфера и pH. Впервые показано, что в буфере 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 7,5 образуется 2 типа со-кристаллов с различной морфологией.
3. Определено, что кристаллы комплекса первого типа обладают центрально симметричной триклинной элементарной ячейкой (SG P1) с параметрами $a \approx b = 9.3 \pm 0.4$ нм, $c = 10.3 \pm 0.4$ нм, $\alpha = 73^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 60^\circ$. Кристаллы обладают пластинчатой морфологией и состоят из слоев, образованных додекамерами Dps, перемежающихся со слоями тяжелой ДНК. Частицы Dps демонстрируют псевдогексагональную упаковку внутри слоя, с углом $\gamma = 60^\circ$ между векторами элементарной ячейки \mathbf{a} и \mathbf{b} . Молекулы ДНК, расстояние между которыми составляет 8.0 ± 0.4 нм, упакованы параллельно друг другу в одном направлении вдоль вектора \mathbf{b} в углублениях между частицами Dps. Каждый слой Dps сдвинут на 3.0 ± 0.4 нм относительно предыдущего вдоль направления \mathbf{b} . Установлено, что на каждую молекулу Dps в элементарной ячейке приходится 27 ± 3 пары оснований ДНК. Соответствующая карта плотности рассеивающего потенциала с пространственным разрешением 13.5 Å размещена в электронно-микроскопической базе данных под номером EMD-4615.

4. Определено, что ко-кристаллы второго типа состоят из додекамеров Dps, перемежающихся с взаимно перпендикулярными тяжами ДНК, и обладают кубической элементарной ячейкой ($Pm\bar{3}m$) с параметрами $a=b=c=13\pm 1$ нм, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$. Выявлено, что элементарная ячейка содержит 2 молекулы Dps и 3 ДНК. Каждая из молекул Dps взаимодействует с 6 тяжами ДНК. Наблюдаемые поры центральной молекулы Dps в элементарной ячейке ориентированы к порам четырех молекул Dps в вершинах ячейки, которые повернуты на 90° по отношению к ориентации $[001]$ центральной молекулы. Установлено, что на каждую молекулу Dps в элементарной ячейке приходится 56 ± 3 пары оснований ДНК. Полученная карта плотности рассеивающего потенциала с пространственным разрешением 13.5 \AA размещена в базу данных электронной микроскопии под номером EMD-10286.
5. Проведено сравнение бактериальных клеток до и после стрессового воздействия. Показано, что предварительное стрессовое воздействие на бактериальную клетку приводит к формированию биокристаллов. Впервые визуализировано пространственное положение биокристаллов в клетках *E.coli*.
6. С помощью анализа структуры индивидуальных частиц по данным крио-ПЭМ впервые визуализированы N-концевые фрагменты додекамеров Dps на двумерных классах изображений, а также взаимодействие Dps-ДНК. С разрешением 2.95 \AA получена структура отдельных додекамеров белка Dps с разупорядоченными N-концевыми фрагментами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор глубоко признателен научному руководителю Васильеву А.Л., а также сотрудникам ФНИЦ «Кристаллография и Фотоника» РАН Штыковой Э.В. и Дадиновой Л.А. за постановку задач, ценные обсуждения, помощь в интерпретации данных и внимание к работе; Дадиновой Л.А., Можяеву А.А., Лойко Н.Г., Манувера В.А., Лазареву В.Н. за предоставленные образцы; Дадиновой Л.А., Петухову М., Орлову И., Штыковой Э.В. за верификацию данных методом МУРР и трактовку полученных результатов. Автор также выражает глубокую признательность коллективу ресурсного центра зондовой и электронной микроскопии НИЦ «Курчатовский институт» за возможность проведения крио-ЭМ экспериментов, а также Чеснокову Ю.М. за помощь в проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

Крио-ПЭМ/Крио-ЭМ (Cryo-EM) – криогенная просвечивающая электронная микроскопия, cryo-electron microscopy

Dps-ДНК (Dps-DNA) – обозначение комплекса, образуемого гистоноподобным белком Dps и молекулами ДНК

Крио-ЭТ (Cryo-ET) – криогенная электронная томография, cryo-electron tomography

SPA – single particle analysis, метод анализа проекций одиночных частиц

ФИП (FIB) – фокусированный ионный пучок, focused ion beam

Крио-ФИП – фокусированный ионный пучок в криогенном режиме

КМОП (CMOS) - комплементарная структура металл-оксид-полупроводник, complementary metal-oxide-semiconductor structure

FEG – field emission gun, источник с полевой эмиссией

РЭМ (РЭИМ) – растровая электронная (электронно-ионная) микроскопия

Крио-РЭМ (Cryo-SEM) – криогенная растровая электронная микроскопия

SIRT – simultaneous iterative reconstruction technique, метод одновременной итерационной реконструкции

WBP – weighted-back projections, метод обратно-взвешенных проекций

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Субтомограмма: трехмерная область восстановленной томографической серии, содержащая объекты интереса.

Субтомографическое усреднение: усреднение субтомограмм для улучшения соотношения сигнал-шум и получения трехмерной реконструкции исследуемого объекта.

(Крио-)ФИП: процедура утонения образцов (при криогенных температурах) с использованием фокусированного ионного пучка.

Витрификация: сверхбыстрая заморозка (фиксация) образца в слое аморфного льда.

Tomography, IMOD, EMAN2.2, CTFFIND, Relion2, UCSF Chimera и др.: программные пакеты для получения, обработки и визуализации экспериментальных данных, полученных методом крио-ЭТ.

EPU, Warp, CryoSPARC, Relion2, UCSF Chimera и др.: – программные пакеты для получения, обработки и визуализации экспериментальных данных, полученных методом анализа проекций одиночных частиц.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- A1. **Kamyshinsky, R.** Polymorphic Protective Dps–DNA Co-Crystals by Cryo Electron Tomography and Small Angle X-Ray Scattering / R. Kamyshinsky, Y. Chesnokov, L. Dadinova, A. Mozhaev, I. Orlov, M. Petoukhov, A. Orekhov, E. Shtykova, A. Vasiliev // *Biomolecules* – 2020. – V.10 – №1 – 39.
- A2. Dadinova, L. A. Protective Dps–DNA co-crystallization in stressed cells: an in vitro structural study by small-angle X-ray scattering and cryo-electron tomography / L. A. Dadinova, Y. M. Chesnokov, **R. A. Kamyshinsky**, I. A. Orlov, M. V. Petoukhov, A. A. Mozhaev, E. Yu. Soshinskaya, V. N. Lazarev, V. A. Manuvera, A. S. Orekhov, A. L. Vasiliev, E. V. Shtykova // *FEBS Letters* – 2019. – V.593 – №12 – P.1360-1371.
- A3. **Камышинский, Р.А.** Криогенная электронная томография в исследованиях клеточных систем / Р.А. Камышинский, Ю.М. Чесноков, А.С. Орехов // *Кристаллография* – 2020. – Т.65 – №5 – С.774-779.
- A4. Emelyanov, A. Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles from cerebrospinal fluid / A. Emelyanov, T. Shtam, **R. Kamyshinsky**, L. Garaeva, N. Verlov, I. Miliukhina, A. Kudrevatykh, G. Gavrilov, Y. Zabrodsкая, S. Pchelina, A. Konevega // *Plos one* – 2020. – V.15 – №1 – e0227949.
- A5. Bogdanova, O. I. Effect of exfoliating agent on rheological behavior of β -chitin fibrils in aqueous suspensions and on mechanical properties of poly (acrylic acid)/ β -chitin composites / O. I. Bogdanova, A.P. Istomina, N.A. Glushkova, S.I. Belousov, N.M. Kuznetsov, D.K. Polyakov, S.N. Malakhov, S.V. Krashenninikov, A.V. Bakirov, **R.A. Kamyshinsky**, A.L. Vasiliev, D.R. Streltsov, S.N. Chvalun // *International journal of biological macromolecules* – 2019. – V.139. – P.161-169.
- A6. **Kamyshinsky, R.** Composite materials based on Ag nanoparticles in situ synthesised on the vaterite porous matrices / R. Kamyshinsky, I. Marchenko, B. Parakhonskiy, A. Yashchenok, Y. Chesnokov, A. Mikhutkin, D. Gorin, A. Vasiliev, T. Bukreeva // *Nanotechnology* – 2019. – V.30 – №3 – 035603.

- A7. Kuznetsov, N. M. Unique rheological behavior of detonation nanodiamond hydrosols: The nature of sol-gel transition / N. M. Kuznetsov, S. I. Belousov, A. V. Bakirov, S. N. Chvalun, **R. A. Kamyshinsky**, A. A. Mikhutkin, A. L. Vasiliev, P. M. Tolstoy, A. S. Mazur, E. D. Eidelman, E. B. Yudina, A. Ya. Vul // Carbon – 2020. – V.161. – P.486-494.

СПИСОК ТЕЗИСОВ КОНФЕРЕНЦИЙ

- A8. **Kamyshinsky, R.** Abstract OR-22: In vitro Cryo Electron Tomography study of protective Dps-DNA co-crystallization / R. Kamyshinsky, Y. Chesnokov, L. Dadinova, A. Mozhaev, A. Orekhov, E. Shtykova, A. Vasiliev // International Journal of Biomedicine – 2019. – V. 9 – Suppl_1 – P.S15.
- A9. Dadinova, L.A. Investigations of Dps/DNA crystallization conditions and the structure of biocrystals according to SAXS and cryo-electron microscopy data / L.A. Dadinova, Yu. M. Chesnokov, **R.A. Kamyshinsky**, A.S. Orekhov, M.V. Petoukhov, A.A. Mozhaev, E.Yu. Soshinskaya, A.L. Vasiliev, E.V. Shtykova // FEBS Open Bio – 2019. – V. 9 (1). – P.313.
- A10. **Камышинский, Р.А.** Определение структуры комплекса Dps-ДНК методами криоэлектронной томографии / Р.А Камышинский., Ю.М. Чесноков, Л.А. Дадинова, А.А. Можяев, М.В. Петухов, А.С. Орехов, Э.В. Штыкова, А.Л. Васильев // XXVIII Российская конференция по электронной микроскопии – Черногловка, 2020. – Т. 2. – С. 120.
- A11. **Камышинский, Р.А.** Исследования процессов формирования биокристаллов Dps-ДНК / Р.А. Камышинский, Ю.М. Чесноков, Л.А. Дадинова, А.А. Можяев, М.В. Петухов, А.С. Орехов, Э.В. Штыкова, А.Л. Васильев // Материалы XXI Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии. Тезисы докладов Молодежной конференции – Гатчина, 2020. – С. 97-98.

- A12. Чесноков, Ю.М. Оптимизация условий подготовки ультратонких клеточных срезов для криогенной электронной томографии методом фокусированного ионного пучка / Ю.М. Чесноков, **Р.А. Камышинский**, А.С. Орехов // Материалы XXI Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии. Тезисы докладов Молодежной конференции – Гатчина, 2020. – С. 228-229.
- A13. Дадинова, Л.А. Структурные аспекты механизма защиты бактериального генома по данным малоуглового рентгеновского рассеяния и криоэлектронной микроскопии / Л.А. Дадинова, А.А. Можаяев, **Р.А. Камышинский**, Ю.М. Чесноков, И.А. Орлов, Е.Ю. Сошинская, М.В. Петухов, А.С. Орехов, А.Л. Васильев, Э.В. Штыкова // XV международная научная конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2020» – Севастополь, 2020. – С. 29.
- A14. **Камышинский, Р.А.** Исследование процессов биокристаллизации для защиты генетического материала с помощью криоэлектронной томографии / Р.А. Камышинский, Ю.М. Чесноков, А.С. Орехов, А.Л. Васильев // Материалы XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии – Гатчина, 2019. – С. 144-145.
- A15. **Камышинский, Р.А.** Полиморфизм структур биокристаллов Dps-ДНК / Р.А. Камышинский, Ю.М. Чесноков, Д.А. Дадинова, А.А. Можаяев, И.А. Орлов, М.В. Петухов, А.С. Орехов, Э.В. Штыкова, А.Л. Васильев // Сборник аннотаций XVI Курчатовской междисциплинарной молодежной научной школы – Москва, 2019. – С.89.
- A16. **Камышинский, Р.А.** Исследование процессов биокристаллизации для защиты генетического материала с помощью криоэлектронной томографии / Р.А. Камышинский, Ю.М. Чесноков, А.С. Орехов, А.Л. Васильев // Материалы 61-й Всероссийской научной конференции МФТИ – Москва, 2018. – С. 33.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wolf, S.G. DNA protection by stress-induced biocrystallization / S.G. Wolf, D. Frenkiel, T. Arad, S.E. Finkel, R. Kolter, A. Minsky // *Nature* – 1999. – V. 400 – № 6739 – P.83–85.
2. Frenkiel-Krispin, D. Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria / D. Frenkiel-Krispin, I. Ben-Avraham, J. Englander, E. Shimoni, S.G. Wolf, A. Minsky // *Molecular Microbiology* – 2004. – V. 51 – № 2 – P.395–405.
3. Almiron, M. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. / M. Almiron, A.J. Link, D. Furlong, R. Kolter // *Genes & Development* – 1992. – V. 6 – № 12b – P.2646–2654.
4. Nair, S. Dps Protects Cells against Multiple Stresses during Stationary Phase / S. Nair, S.E. Finkel // *Journal of Bacteriology* – 2004. – V. 186 – № 13 – P.4192–4198.
5. Grant, R.A. The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA / R.A. Grant, D.J. Filman, S.E. Finkel, R. Kolter, J.M. Hogle // *Nature Structural Biology* – 1998. – V. 5 – № 4 – P.294–303.
6. Calhoun, L.N. Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: a review / L.N. Calhoun, Y.M. Kwon // *Journal of Applied Microbiology* – 2011. – V. 110 – № 2 – P.375–386.
7. Doye, J.P.K. Protein crystallization in vivo / J.P.K. Doye, W.C.K. Poon // *Current Opinion in Colloid and Interface Science* – 2006. – V. 11 – № 1 – P.40–46.
8. Pande, A. Crystal cataracts: Human genetic cataract caused by protein crystallization / A. Pande, J. Pande, N. Asherie, A. Lomakin, O. Ogun, J. King, G.B. Benedek // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2001. – V. 98 – № 11 – P.6116–6120.
9. Levin, B.R. Non-inherited antibiotic resistance / B.R. Levin, D.E. Rozen // *Nature Reviews Microbiology* – 2006. – V. 4 – № 7 – P.556–562.
10. Luijsterburg, M.S. The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: A molecular perspective / M.S. Luijsterburg, M.C.

- Noom, G.J.L. Wuite, R.T. Dame // *Journal of Structural Biology* – 2006. – V. 156 – № 2 – P.262–272.
11. Karas, V.O. The DNA-Binding Protein from Starved Cells (Dps) Utilizes Dual Functions To Defend Cells against Multiple Stresses / V.O. Karas, I. Westerlaken, A.S. Meyer // *Journal of Bacteriology* – 2015. – V. 197 – № 19 – P.3206–3215.
12. Ali Azam, T. Growth Phase-Dependent Variation in Protein Composition of the *Escherichia coli* Nucleoid / T. Ali Azam, A. Iwata, A. Nishimura, S. Ueda, A. Ishihama // *Journal of Bacteriology* – 1999. – V. 181 – № 20 – P.6361–6370.
13. Frenkiel-Krispin, D. Regulated phase transitions of bacterial chromatin: a non-enzymatic pathway for generic DNA protection / D. Frenkiel-Krispin // *The EMBO Journal* – 2001. – V. 20 – № 5 – P.1184–1191.
14. Colman, P.M. The Structure of Cucurbitin: Subunit Symmetry and Organization in situ / P.M. Colman, E. Suzuki, A. Donkelaar // *European Journal of Biochemistry* – 1980. – V. 103 – № 3 – P.585–588.
15. Müntz, K. Deposition of storage proteins / K. Müntz // *Plant Molecular Biology* – 1998. – V. 38 № 1–2 – P.77–99.
16. Dodson, G. The role of assembly in insulin's biosynthesis / G. Dodson, D. Steiner // *Current Opinion in Structural Biology* – 1998. – V. 8 – № 2 – P.189–194.
17. Veenhuis, M. Peroxisome assembly in yeast / M. Veenhuis, J.A.K.W. Kiel, I.J. Van der Klei // *Microscopy Research and Technique* – 2003. – V. 61 – № 2 – P.139–150.
18. Yuan, P. A HEX-1 crystal lattice required for Woronin body function in *Neurospora crassa* / P. Yuan, G. Jedd, D. Kumaran, S. Swaminathan, H. Shio, D. Hewitt, N.-H. Chua, K. Swaminathan // *Nature Structural & Molecular Biology* – 2003. – V. 10 – № 4 – P.264–270.
19. Sawaya, M.R. Protein crystal structure obtained at 2.9 Å resolution from injecting bacterial cells into an X-ray free-electron laser beam / M.R. Sawaya, D. Cascio, M. Gingery, J. Rodriguez, L. Goldschmidt, J.-P. Colletier, M.M. Messerschmidt, S. Boutet, J.E. Koglin, G.J. Williams, A.S. Brewster, K. Nass, J. Hattne, S. Botha, R.B. Doak, R.L. Shoeman, D.P. DePonte, H.-W. Park, B.A. Federici, N.K. Sauter, I. Schlichting, D.S.

Eisenberg // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2014. – V. 111 – № 35 – P.12769–12774.

20. Синицын, Д.О. Биокристаллизация нуклеоида бактерий в условиях стресса / Д.О. Синицын, Н.Г. Лойко, С.К. Гуларян, А.С. Степанов, К.Б. Терешкина, А.Л. Чуличков, Ю.А. Николаев, Г.И. Эль-Регистан, В.О. Попов, О.С. Соколова, К.В. Шайтан, А.Н. Попов, Ю.Ф. Крупянский // *Химическая физика* – 2017. – Т. 36 – № 9 – С.59–65.

21. Schönherr, R. Real-time investigation of dynamic protein crystallization in living cells / R. Schönherr, M. Klinge, J.M. Rudolph, K. Fita, D. Rehders, F. Lübber, S. Schneegans, I.V. Majoul, M. Duszenko, C. Betzel, A. Brandariz-Nuñez, Martinez- J. Costas, R. Duden, L. Redecke // *Structural Dynamics* – 2015. – V. 2 – № 4 – P.041712.

22. Pletnev, P.I. Survival guide: *Escherichia coli* in the stationary phase / P.I. Pletnev, I.A. Osterman, P.V. Sergiev, A.A. Bogdanov, O.A. Dontsova // *Acta Naturae* – 2015. – V. 7 – № 4 – P.22–33.

23. Soina, V.S. The Structure of Resting Bacterial Populations in Soil and Subsoil Permafrost / V.S. Soina, A.L. Mulyukin, E.V. Demkina, E.A. Vorobyova, G.I. El-Registan // *Astrobiology* – 2004. – V. 4 – № 3 – P.345–358.

24. De Bruijn, F.J. Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria / F. J. De Bruijn – Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2016. – V.1 – P.1–1382.

25. Wang, G. Bacterial histone-like proteins: roles in stress resistance / G. Wang, R.J. Maier // *Current Genetics* – 2015. – V. 61 – № 4 – P.489–492.

26. Chowdhury, R.P. Mycobacterial Stress Regulation: The Dps “Twin Sister” Defense Mechanism and Structure-Function Relationship / R.P. Chowdhury, R. Saraswathi, D. Chatterji // *IUBMB Life* – 2010. – V. 62 – № 1 – P.67–77.

27. Pesek, J. Structure and Mechanism of Iron Translocation by a Dps Protein from *Microbacterium arborescens* / J. Pesek, R. Büchler, R. Albrecht, W. Boland, K. Zeth // *Journal of Biological Chemistry* – 2011. – V. 286 – № 40 – P.34872–34882.

28. Kim, S. Crystal Structure of Dps-1, a Functionally Distinct Dps Protein from

- Deinococcus radiodurans / S. Kim, G. Bhattacharyya, A. Grove, Y. Lee // *Journal of Molecular Biology* – 2006. – V. 361 – № 1 – P.105–114.
29. Andrews, S.C. The Ferritin-like superfamily: Evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor / S.C. Andrews // *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* – 2010. – V. 1800 – № 8 – P.691–705.
30. Ceci, P. DNA condensation and self-aggregation of Escherichia coli Dps are coupled phenomena related to the properties of the N-terminus / P. Ceci // *Nucleic Acids Research* – 2004. – V. 32 – № 19 – P.5935–5944.
31. Algu, K. Dps confers protection of DNA sequence integrity in UV-irradiated Escherichia coli / K. Algu, V.S.C. Choi, R.S. Dhama, D.A.K. Duncan // *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* – 2007. – V. 11 – P.60–65.
32. Vtyurina, N.N. Hysteresis in DNA compaction by Dps is described by an Ising model / N.N. Vtyurina, D. Dulin, M.W. Docter, A.S. Meyer, N.H. Dekker, E.A. Abbondanzieri // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2016. – V. 113 – № 18 – P.4982–4987.
33. Ren, B. The Multi-layered Structure of Dps with a Novel Di-nuclear Ferroxidase Center / B. Ren, G. Tibbelin, T. Kajino, O. Asami, R. Ladenstein // *Journal of Molecular Biology* – 2003. – V. 329 – № 3 – P.467–477.
34. Frenkiel-Krispin, D. Nucleoid organization and the maintenance of DNA integrity in E. coli, B. subtilis and D. radiodurans / D. Frenkiel-Krispin, A. Minsky // *Journal of Structural Biology* – 2006. – V. 156 – № 2 – P.311–319.
35. Reich, Z. Liquid-crystalline mesophases of plasmid DNA in bacteria / Z. Reich, E. Wachtel, A. Minsky // *Science* – 1994. – V. 264 – № 5164 – P.1460–1463.
36. Gao, J.-L. The Role of Heme Binding by DNA-protective Protein from Starved Cells (Dps) in the Tolerance of Porphyromonas gingivalis to Heme Toxicity / J.-L. Gao, Y. Lu, G. Browne, B.C.M. Yap, J. Trewhella, N. Hunter, K.-A. Nguyen // *Journal of Biological Chemistry* – 2012. – V. 287 – № 50 – P.42243–42258.
37. Ceci, P. Reassessment of Protein Stability, DNA Binding, and Protection of Mycobacterium smegmatis Dps / P. Ceci, A. Ilari, E. Falvo, L. Giangiacomo, E.

- Chiancone // *Journal of Biological Chemistry* – 2005. – V. 280 – № 41 – P.34776–34785.
38. Gupta, S. Bimodal Protection of DNA by *Mycobacterium smegmatis* DNA-binding Protein from Stationary Phase Cells / S. Gupta, D. Chatterji // *Journal of Biological Chemistry* – 2003. – V. 278 – № 7 – P.5235–5241.
39. Bozzi, M. A Novel Non-heme Iron-binding Ferritin Related to the DNA-binding Proteins of the Dps Family in *Listeria innocua* / M. Bozzi, G. Mignogna, S. Stefanini, D. Barra, C. Longhi, P. Valenti, E. Chiancone // *Journal of Biological Chemistry* – 1997. – V. 272 – № 6 – P.3259–3265.
40. Papinutto, E. Structure of Two Iron-binding Proteins from *Bacillus anthracis* / E. Papinutto, W.G. Dundon, N. Pitulis, R. Battistutta, C. Montecucco, G. Zanotti // *Journal of Biological Chemistry* – 2002. – V. 277 – № 17 – P.15093–15098.
41. Zanotti, G. Structure of the Neutrophil-activating Protein from *Helicobacter pylori* / G. Zanotti, E. Papinutto, W.G. Dundon, R. Battistutta, M. Seveso, G. Del Giudice, R. Rappuoli, C. Montecucco // *Journal of Molecular Biology* – 2002. – V. 323 – № 1 – P.125–130.
42. Zeth, K. Dps biomineralizing proteins: multifunctional architects of nature / K. Zeth // *Biochemical Journal* – 2012. – V. 445 – № 3 – P.297–311.
43. Minsky, A. Stress, order and survival / A. Minsky, E. Shimoni, D. Frenkiel-Krispin // *Nature Reviews Molecular Cell Biology* – 2002. – V. 3 – № 1 – P.50–60.
44. Williams, D.B. *Transmission Electron Microscopy* / D. B. Williams, C. B. Carter – Boston, MA: Springer US, 2009. Second Edition – P.1-804.
45. Brenner, S. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses / S. Brenner, R.W. Horne // *Biochimica et Biophysica Acta* – 1959. – V. 34 – P.103–110.
46. Zhang, L. Optimized negative-staining electron microscopy for lipoprotein studies / L. Zhang, H. Tong, M. Garewal, G. Ren // *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* – 2013. – V. 1830 – № 1 – P.2150–2159.
47. De Carlo, S. Negative staining and cryo-negative staining of macromolecules and viruses for TEM / S. De Carlo, J.R. Harris // *Micron* – 2011. – V. 42 – № 2 – P.117–131.

48. Steven, A. Electron Microscopy and Image Processing: An Essential Tool for Structural Analysis of Macromolecules / A. Steven, D. Belnap // *Current Protocols in Protein Science* – 2005. – V. 42 – № 1 – P.17.2.1-17.2.39.
49. De Rosier, D.J. Reconstruction of Three Dimensional Structures from Electron Micrographs / D.J. De Rosier, A. Klug // *Nature* – 1968. – V. 217 – № 5124 – P.130–134.
50. Thompson, R.F. An introduction to sample preparation and imaging by cryo-electron microscopy for structural biology / R.F. Thompson, M. Walker, C.A. Siebert, S.P. Muench, N.A. Ranson // *Methods* – 2016. – V. 100 – P.3–15.
51. Ohi, M. Negative staining and image classification — powerful tools in modern electron microscopy / M. Ohi, Y. Li, Y. Cheng, T. Walz // *Biological Procedures Online* – 2004. – V. 6 – № 1 – P.23–34.
52. Taylor, K.A. Electron Diffraction of Frozen, Hydrated Protein Crystals / K.A. Taylor, R.M. Glaeser // *Science* – 1974. – V. 186 – № 4168 – P.1036–1037.
53. Taylor, K.A. Electron microscopy of frozen hydrated biological specimens / K.A. Taylor, R.M. Glaeser // *Journal of Ultrastructure Research* – 1976. – V. 55 – № 3 – P.448–456.
54. Nogales, E. The development of cryo-EM into a mainstream structural biology technique / E. Nogales // *Nature Methods* – 2016. – V. 13 – № 1 – P.24–27.
55. Dubochet, J. Electron microscopy of frozen water and aqueous solutions / J. Dubochet, J. Lepault, R. Freeman, J.A. Berriman, J.-C.-C. Homo // *Journal of Microscopy* – 1982. – V. 128 – № 3 – P.219–237.
56. Henderson, R. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy / R. Henderson, P.N.T. Unwin // *Nature* – 1975. – V. 257 – № 5521 – P.28–32.
57. Frank, J. Averaging of low exposure electron micrographs of non-periodic objects / J. Frank // *Ultramicroscopy* – 1975. – V. 1 – № 2 – P.159–162.
58. Van Heel, M. Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules / M. Van Heel, J. Frank // *Ultramicroscopy* – 1981. – V. 6 – № 1 – P.187–194.

59. Henderson, R. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy / R. Henderson, J.M. Baldwin, T.A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, K.H. Downing // *Journal of Molecular Biology* – 1990. – V. 213 – № 4 – P.899–929.
60. Schulz, E. Electron microscopy at molecular dimensions. State of the art and strategies for the future. / E. Schulz // *Acta Polymerica* – 1982. – V. 33 – № 2 – P.161.
61. Glaeser, R.M. How good can cryo-EM become? / R.M. Glaeser // *Nature Methods* – 2016. – V. 13 – № 1 – P.28–32.
62. Kühlbrandt, W. Cryo-EM enters a new era / W. Kühlbrandt // *eLife* – 2014. – V. 3 – P.e03678.
63. Danev, R. Using the Volta phase plate with defocus for cryo-EM single particle analysis / R. Danev, D. Tegunov, W. Baumeister // *eLife* – 2017. – V. 6 – P.1–9.
64. Khoshouei, M. Volta phase plate cryo-EM of the small protein complex Prx3 / M. Khoshouei, M. Radjainia, A.J. Phillips, J.A. Gerrard, A.K. Mitra, J.M. Plitzko, W. Baumeister, R. Danev // *Nature Communications* – 2016. – V. 7 – № 1 – P.10534.
65. Khoshouei, M. Cryo-EM structure of haemoglobin at 3.2 Å determined with the Volta phase plate / M. Khoshouei, M. Radjainia, W. Baumeister, R. Danev // *Nature Communications* – 2017. – V. 8 – № 1 – P.16099.
66. Liang, Y.-L. Phase-plate cryo-EM structure of a class B GPCR–G-protein complex / Y.-L. Liang, M. Khoshouei, M. Radjainia, Y. Zhang, A. Glukhova, J. Tarrasch, D.M. Thal, S.G.B. Furness, G. Christopoulos, T. Coudrat, R. Danev, W. Baumeister, L.J. Miller, A. Christopoulos, B.K. Kobilka, D. Wootten, G. Skiniotis, P.M. Sexton // *Nature* – 2017. – V. 546 – № 7656 – P.118–123.
67. Schweitzer, A. Structure of the human 26S proteasome at a resolution of 3.9 Å / A. Schweitzer, A. Aufderheide, T. Rudack, F. Beck, G. Pfeifer, J.M. Plitzko, E. Sakata, K. Schulten, F. Förster, W. Baumeister // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2016. – V. 113 – № 28 – P.7816–7821.
68. Kaledhonkar, S. Time-Resolved Cryo-electron Microscopy Using a Microfluidic Chip / S. Kaledhonkar, Z. Fu, H. White, J. Frank. In *Methods in Molecular Biology* –

Humana Press Inc., 2018. – V. 1764 – P. 59–71.

69. URL: http://www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb/statistics_main.html/.

70. McMullan, G. Comparison of optimal performance at 300keV of three direct electron detectors for use in low dose electron microscopy / G. McMullan, A.R. Faruqi, D. Clare, R. Henderson // *Ultramicroscopy* – 2014. – V. 147 – P.156–163.

71. Li, X. Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM / X. Li, P. Mooney, S. Zheng, C.R. Booth, M.B. Braunfeld, S. Gubbens, D.A. Agard, Y. Cheng // *Nature Methods* – 2013. – V. 10 – № 6 – P.584–590.

72. Campbell, M.G. Movies of Ice-Embedded Particles Enhance Resolution in Electron Cryo-Microscopy / M.G. Campbell, A. Cheng, A.F. Brilot, A. Moeller, D. Lyumkis, D. Veessler, J. Pan, S.C. Harrison, C.S. Potter, B. Carragher, N. Grigorieff // *Structure* – 2012. – V. 20 – № 11 – P.1823–1828.

73. Sigworth, F.J. A Maximum-Likelihood Approach to Single-Particle Image Refinement / F.J. Sigworth // *Journal of Structural Biology* – 1998. – V. 122 – № 3 – P.328–339.

74. Lyumkis, D. Likelihood-based classification of cryo-EM images using FREALIGN / D. Lyumkis, A.F. Brilot, D.L. Theobald, N. Grigorieff // *Journal of Structural Biology* – 2013. – V. 183 – № 3 – P.377–388.

75. Scheres, S.H.W. RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination / S.H.W. Scheres // *Journal of Structural Biology* – 2012. – V. 180 – № 3 – P.519–530.

76. Scheres, S.H.W. A Bayesian View on Cryo-EM Structure Determination / S.H.W. Scheres // *Journal of Molecular Biology* – 2012. – V. 415 – № 2 – P.406–418.

77. Fernandez, I.S. Molecular Architecture of a Eukaryotic Translational Initiation Complex / I.S. Fernandez, X.-C. Bai, T. Hussain, A.C. Kelley, J.R. Lorsch, V. Ramakrishnan, S.H.W. Scheres // *Science* – 2013. – V. 342 – № 6160 – P.1240585.

78. Kimanius, D. Accelerated cryo-EM structure determination with parallelisation using GPUs in RELION-2 / D. Kimanius, B.O. Forsberg, S.H.W. Scheres, E. Lindahl // *eLife*

– 2016. – V. 5 – P.1–21.

79. Punjani, A. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination / A. Punjani, J.L. Rubinstein, D.J. Fleet, M.A. Brubaker // *Nature Methods* – 2017. – V. 14 – № 3 – P.290–296.

80. Cheng, Y. A Primer to Single-Particle Cryo-Electron Microscopy / Y. Cheng, N. Grigorieff, P.A. Penczek, T. Walz // *Cell* – 2015. – V. 161 – № 3 – P.438–449.

81. Glaeser, R.M. Methods for imaging weak-phase objects in electron microscopy / R.M. Glaeser // *Review of Scientific Instruments* – 2013. – V. 84 – № 11 – P.111101.

82. Danev, R. Practical factors affecting the performance of a thin-film phase plate for transmission electron microscopy / R. Danev, R.M. Glaeser, K. Nagayama // *Ultramicroscopy* – 2009. – V. 109 – № 4 – P.312–325.

83. Danev, R. Cryo-EM single particle analysis with the Volta phase plate / R. Danev, W. Baumeister // *eLife* – 2016. – V. 5 – P.1–14.

84. Hall, R.J. Accurate modeling of single-particle cryo-EM images quantitates the benefits expected from using Zernike phase contrast / R.J. Hall, E. Nogales, R.M. Glaeser // *Journal of Structural Biology* – 2011. – V. 174 – № 3 – P.468–475.

85. Fukuda, Y. Electron cryotomography of vitrified cells with a Volta phase plate / Y. Fukuda, U. Laugks, V. Lučić, W. Baumeister, R. Danev // *Journal of Structural Biology* – 2015. – V. 190 – № 2 – P.143–154.

86. Yip, K.M. Breaking the next Cryo-EM resolution barrier – Atomic resolution determination of proteins ! / K.M. Yip, N. Fischer, E. Paknia, A. Chari, H. Stark // *bioRxiv preprint* – 2020.

87. Nakane, T. Single-particle cryo-EM at atomic resolution / T. Nakane, A. Kotecha, A. Sente, G. McMullan, P.M.G.E. Brown, I.T. Grigoras, L. Malinauskaite, E. De Jong, J. Keizer, M. Bischoff, A.R. Aricescu, S.H.W. Scheres // *bioRxiv preprint* – 2020.

88. Shen, P.S. The 2017 Nobel Prize in Chemistry: cryo-EM comes of age / P.S. Shen // *Analytical and Bioanalytical Chemistry* – 2018. – V. 410 – № 8 – P.2053–2057.

89. Баймухаметов, Т.Н. Пространственная структура цитохром с нитритредуктазы, полученная методом криоэлектронной микроскопии / Т.Н. Баймухаметов, Ю.М.

Чесноков, Е.Б. Пичкур, К.М. Бойко, Т.В. Тихонова, А.Г. Мясников, А.Л. Васильев, А.В. Липкин, В.О. Попов, М.В. Ковальчук // *Acta Naturae* – 2018. – Т. 10 – № 3(38) – С.51–60.

90. Grassucci, R.A. Preparation of macromolecular complexes for cryo-electron microscopy / R.A. Grassucci, D.J. Taylor, J. Frank // *Nature Protocols* – 2007. – V. 2 – № 12 – P.3239–3246.

91. Stewart, M. Transmission electron microscopy of vitrified biological macromolecular assemblies, in *Electron Microscopy in Biology. A Practical Approach* / M. Stewart / Ed. H. Harris. – IRL Press, Oxford, 1991. – P.1–229.

92. Fernandez-Leiro, R. Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy / R. Fernandez-Leiro, S.H.W. Scheres // *Nature* – 2016. – V. 537 – № 7620 – P.339–346.

93. Noble, A.J. Routine single particle CryoEM sample and grid characterization by tomography / A.J. Noble, V.P. Dandey, H. Wei, J. Brasch, J. Chase, P. Acharya, Y.Z. Tan, Z. Zhang, L.Y. Kim, G. Scapin, M. Rapp, E.T. Eng, W.J. Rice, A. Cheng, C.J. Negro, L. Shapiro, P.D. Kwong, D. Jeruzalmi, A. des Georges, C.S. Potter, B. Carragher // *eLife* – 2018. – V. 7. – P.e34257.

94. Glaeser, R.M. Opinion: hazards faced by macromolecules when confined to thin aqueous films / R.M. Glaeser, B.-G. Han // *Biophysics Reports* – 2017. – V. 3 – № 1–3 – P.1–7.

95. Glaeser, R.M. Proteins, interfaces, and cryo-EM grids / R.M. Glaeser // *Current Opinion in Colloid & Interface Science* – 2018. – V. 34 – P.1–8.

96. Jain, T. Spotiton: A prototype for an integrated inkjet dispense and vitrification system for cryo-TEM / T. Jain, P. Sheehan, J. Crum, B. Carragher, C.S. Potter // *Journal of Structural Biology* – 2012. – V. 179 – № 1 – P.68–75.

97. Razinkov, I. A new method for vitrifying samples for cryoEM / I. Razinkov, V.P. Dandey, H. Wei, Z. Zhang, D. Melnekoff, W.J. Rice, C. Wigge, C.S. Potter, B. Carragher // *Journal of Structural Biology* – 2016. – V. 195 – № 2 – P.190–198.

98. Jiang, W. Atomic cryo-EM structures of viruses / W. Jiang, L. Tang // *Current Opinion*

in *Structural Biology* – 2017. – V. 46 – P.122–129.

99. Bremer, A. Has negative staining still a place in biomacromolecular electron microscopy? / A. Bremer, C. Henn, A. Engel, W. Baumeister, U. Aebi // *Ultramicroscopy* – 1992. – V. 46 – № 1–4 – P.85–111.

100. Zheng, S.Q. MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy / S.Q. Zheng, E. Palovcak, J.-P. Armache, K.A. Verba, Y. Cheng, D.A. Agard // *Nature Methods* – 2017. – V. 14 – № 4 – P.331–332.

101. Zhang, K. Gctf: Real-time CTF determination and correction / K. Zhang // *Journal of Structural Biology* – 2016. – V. 193 – № 1 – P.1–12.

102. Rohou, A. CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs / A. Rohou, N. Grigorieff // *Journal of Structural Biology* – 2015. – V. 192 – № 2 – P.216–221.

103. Tang, G. EMAN2: An extensible image processing suite for electron microscopy / G. Tang, L. Peng, P.R. Baldwin, D.S. Mann, W. Jiang, I. Rees, S.J. Ludtke // *Journal of Structural Biology* – 2007. – V. 157 – № 1 – P.38–46.

104. Tegunov, D. Real-time cryo-electron microscopy data preprocessing with Warp / D. Tegunov, P. Cramer // *Nature Methods* – 2019. – V. 16 – № 11 – P.1146–1152.

105. Grant, T. cisTEM, user-friendly software for single-particle image processing / T. Grant, A. Rohou, N. Grigorieff // *eLife* – 2018. – V. 7 – P.e35383.

106. Winn, M.D. Overview of the CCP4 suite and current developments / M.D. Winn, C.C. Ballard, K.D. Cowtan, E.J. Dodson, P. Emsley, P.R. Evans, R.M. Keegan, E.B. Krissinel, A.G.W. Leslie, A. McCoy, S.J. McNicholas, G.N. Murshudov, N.S. Pannu, E.A. Potterton, H.R. Powell, R.J. Read, A. Vagin, K.S. Wilson // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* – 2011. – V. 67 – № 4 – P.235–242.

107. Koning, R.I. Advances in cryo-electron tomography for biology and medicine / R.I. Koning, A.J. Koster, T.H. Sharp // *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* – 2018. – V. 217 – P.82–96.

108. Baker, L.A. Electron cryo-tomography captures macromolecular complexes in native environments / L.A. Baker, M. Grange, K. Grünewald // *Current Opinion in*

Structural Biology – 2017. – V. 46 – P.149–156.

109. Erdmann, P.S. Addressing cellular compartmentalization by in situ cryo-electron tomography / P.S. Erdmann, J.M. Plitzko, W. Baumeister // *Current Opinion in Colloid & Interface Science* – 2018. – V. 34 – P.89–99.

110. Guo, Q. In Situ Structure of Neuronal C9orf72 Poly-GA Aggregates Reveals Proteasome Recruitment / Q. Guo, C. Lehmer, A. Martínez-Sánchez, T. Rudack, F. Beck, H. Hartmann, M. Pérez-Berlanga, F. Frottin, M.S. Hipp, F.U. Hartl, D. Edbauer, W. Baumeister, R. Fernández-Busnadiego // *Cell* – 2018. – V. 172 – № 4 – P.696–705.e12.

111. Sigworth, F.J. Principles of cryo-EM single-particle image processing / F.J. Sigworth // *Microscopy* – 2016. – V. 65 – № 1 – P.57–67.

112. Nudelman, F. Cryo-electron tomography: 3-dimensional imaging of soft matter / F. Nudelman, G. de With, N.A.J.M. Sommerdijk // *Soft Matter* – 2011. – V. 7 – № 1 – P.17–24.

113. Koster, A.J. Perspectives of Molecular and Cellular Electron Tomography / A.J. Koster, R. Grimm, D. Typke, R. Hegerl, A. Stoschek, J. Walz, W. Baumeister // *Journal of Structural Biology* – 1997. – V. 120 – № 3 – P.276–308.

114. Crowther, R.A. The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its application to electron microscopy / R.A. Crowther, D.J. DeRosier, A. Klug // *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Biological sciences* – 1972. – V. 317 – P.319–340.

115. Radermacher, M. Three-Dimensional reconstruction of single particles from random and nonrandom tilt series / M. Radermacher // *Journal of Electron Microscopy Technique* – 1988. – V. 9 – № 4 – P.359–394.

116. Frank, J. Electron tomography: Methods for three-dimensional visualization of structures in the cell. / J. Frank. – New York, NY: Springer New York, 2006. – V. 9780387690087 – P.1–455.

117. Lanzavecchia, S. Conical tomography of freeze-fracture replicas: a method for the study of integral membrane proteins inserted in phospholipid bilayers / S. Lanzavecchia, F. Cantele, P.L. Bellon, L. Zampighi, M. Kreman, E. Wright, G.A. Zampighi // *Journal*

of Structural Biology – 2005. – V. 149 – № 1 – P.87–98.

118. Schmid, M.F. Methods for aligning and for averaging 3D volumes with missing data / M.F. Schmid, C.R. Booth // Journal of Structural Biology – 2008. – V. 161 – № 3 – P.243–248.

119. Schur, F.K.M. An atomic model of HIV-1 capsid-SP1 reveals structures regulating assembly and maturation / F.K.M. Schur, M. Obr, W.J.H. Hagen, W. Wan, A.J. Jakobi, J.M. Kirkpatrick, C. Sachse, H.-G. Kräusslich, J.A.G. Briggs // Science – 2016. – V. 353 – № 6298 – P.506–508.

120. Grange, M. Cellular electron cryo tomography and in situ sub-volume averaging reveal the context of microtubule-based processes / M. Grange, D. Vasishtan, K. Grünewald // Journal of Structural Biology – 2017. – V. 197 – № 2 – P.181–190.

121. Fontana, J. Structural Changes in Influenza Virus at Low pH Characterized by Cryo-Electron Tomography / J. Fontana, G. Cardone, J.B. Heymann, D.C. Winkler, A.C. Steven // Journal of Virology – 2012. – V. 86 – № 6 – P.2919–2929.

122. Liu, J. Visualization of bacteriophage P1 infection by cryo-electron tomography of tiny Escherichia coli / J. Liu, C.-Y. Chen, D. Shiomi, H. Niki, W. Margolin // Virology – 2011. – V. 417 – № 2 – P.304–311.

123. Hu, G.-B. Electron cryo-tomographic structure of cystovirus ϕ 12 / G.-B. Hu, H. Wei, W.J. Rice, D.L. Stokes, P. Gottlieb // Virology – 2008. – V. 372 – № 1 – P.1–9.

124. Hsieh, C. Practical workflow for cryo focused-ion-beam milling of tissues and cells for cryo-TEM tomography / C. Hsieh, T. Schmelzer, G. Kishchenko, T. Wagenknecht, M. Marko // Journal of Structural Biology – 2014. – V. 185 – № 1 – P.32–41.

125. Grimm, R. Electron Tomography of Ice-Embedded Prokaryotic Cells / R. Grimm, H. Singh, R. Rachel, D. Typke, W. Zillig, W. Baumeister // Biophysical Journal – 1998. – V. 74 – № 2 – P.1031–1042.

126. Asano, S. A molecular census of 26S proteasomes in intact neurons / S. Asano, Y. Fukuda, F. Beck, A. Aufderheide, F. Forster, R. Danev, W. Baumeister // Science – 2015. – V. 347 – № 6220 – P.439–442.

127. Weber, M. Cellular and Structural Studies of Eukaryotic Cells by Cryo-Electron

- Tomography / M. Weber, M. Wojtynek, O. Medalia // *Cells* – 2019. – V. 8 – № 1 – P.57.
128. Delgado, L. Cryo-electron tomography of plunge-frozen whole bacteria and vitreous sections to analyze the recently described bacterial cytoplasmic structure, the Stack / L. Delgado, G. Martínez, C. López-Iglesias, E. Mercadé // *Journal of Structural Biology* – 2015. – V. 189 – № 3 – P.220–229.
129. Bharat, T.A.M. Structure of the hexagonal surface layer on *Caulobacter crescentus* cells / T.A.M. Bharat, D. Kureisaite-Ciziene, G.G. Hardy, E.W. Yu, J.M. Devant, W.J.H. Hagen, Y.V. Brun, J.A.G. Briggs, J. Löwe // *Nature Microbiology* – 2017. – V. 2 – № 7 – P.17059.
130. Melia, C.E. Locating macromolecules and determining structures inside bacterial cells using electron cryotomography / C.E. Melia, T.A.M. Bharat // *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* – 2018. – V. 1866 – № 9 – P.973–981.
131. Fischer, A.H. Cryosectioning Tissues / A.H. Fischer, K.A. Jacobson, J. Rose, R. Zeller // *Cold Spring Harbor Protocols* – 2008. – V. 3 – № 8.
132. Pierson, J. Improving the technique of vitreous cryo-sectioning for cryo-electron tomography: Electrostatic charging for section attachment and implementation of an anti-contamination glove box / J. Pierson, J.J. Fernández, E. Bos, S. Amini, H. Gnaegi, M. Vos, B. Bel, F. Adolfsen, J.L. Carrascosa, P.J. Peters // *Journal of Structural Biology* – 2010. – V. 169 – № 2 – P.219–225.
133. Alamoudi, A. Cutting artefacts and cutting process in vitreous sections for cryo-electron microscopy / A. Alamoudi, D. Studer, J. Dubochet // *Journal of Structural Biology* – 2005. – V. 150 – № 1 – P.109–121.
134. Richter, K. Cutting artefacts on ultrathin cryosections of biological bulk specimens / K. Richter // *Micron* – 1994. – V. 25 – № 4 – P.297–308.
135. Atherton, J. Microtubule architecture in vitro and in cells revealed by cryo-electron tomography / J. Atherton, M. Stouffer, F. Francis, C.A. Moores // *Acta Crystallographica Section D Structural Biology* – 2018. – V. 74 – № 6 – P.572–584.
136. Afonina, Z.A. Formation of circular polyribosomes on eukaryotic mRNA without cap-structure and poly(A)-tail: a cryo electron tomography study / Z.A. Afonina, A.G.

- Myasnikov, V.A. Shirokov, B.P. Klaholz, A.S. Spirin // *Nucleic Acids Research* – 2014. – V. 42 – № 14 – P.9461–9469.
137. Li, S. Three-dimensional structure of basal body triplet revealed by electron cryotomography / S. Li, J.-J. Fernandez, W.F. Marshall, D.A. Agard // *The EMBO Journal* – 2012. – V. 31 – № 3 – P.552–562.
138. Pfeffer, S. Structure of the native Sec61 protein-conducting channel / S. Pfeffer, L. Burbaum, P. Unverdorben, M. Pech, Y. Chen, R. Zimmermann, R. Beckmann, F. Förster // *Nature Communications* – 2015. – V. 6 – № 1 – P.8403.
139. Pigino, G. Cryoelectron tomography of radial spokes in cilia and flagella / G. Pigino, K.H. Bui, A. Maheshwari, P. Lupetti, D. Diener, T. Ishikawa // *Journal of Cell Biology* – 2011. – V. 195 – № 4 – P.673–687.
140. Nesterov, S.V. Oligomeric hypercomplex of the complete oxidative phosphorylation system in heart mitochondria / S.V. Nesterov, Y.M. Chesnokov, R.A. Kamyshinsky, A.A. Panteleeva, K.G. Lyamzaev, R.G. Vasilov, L.S. Yaguzhinsky // *bioRxiv* – 2020. – P.2020.08.17.253922.
141. Rigort, A. Cryo-focused-ion-beam applications in structural biology / A. Rigort, J.M. Plitzko // *Archives of Biochemistry and Biophysics* – 2015. – V. 581 – № February – P.122–130.
142. MoberlyChan, W.J. Cryo-FIB for Thinning Cryo-TEM samples and Evading Ice During Cryo-Transfer / W.J. MoberlyChan, M. Marko, C.-E. Hsieh // *Microscopy and Microanalysis* – 2005. – V. 11 – № S02 – P.854–855.
143. Giannuzzi, L.A. FIB Lift-Out Specimen Preparation Techniques / L. A. Giannuzzi, B.W. Kempshall, S.M. Schwarz, J.K. Lomness, B.I. Prentzer, F.A. Stevie. In *Introduction to Focused Ion Beams: Instrumentation, Theory, Techniques and Practice* – Boston, MA: Springer US, 2005. – P. 201–228.
144. Schaffer, M. Optimized cryo-focused ion beam sample preparation aimed at in situ structural studies of membrane proteins / M. Schaffer, J. Mahamid, B.D. Engel, T. Laugks, W. Baumeister, J.M. Plitzko // *Journal of Structural Biology* – 2017. – V. 197 – № 2 – P.73–82.

145. Schaffer, M. Cryo-focused Ion Beam Sample Preparation for Imaging Vitreous Cells by Cryo-electron Tomography / M. Schaffer, B. Engel, T. Laugks, J. Mahamid, J. Plitzko, W. Baumeister // *BIO-PROTOCOL* – 2015. – V. 5 – № 17 – P.e1575.
146. Koning, R.I. Correlative Cryo-Fluorescence Light Microscopy and Cryo-Electron Tomography of *Streptomyces* / R.I. Koning, K. Celler, J. Willemse, E. Bos, G.P. van Wezel, A.J. Koster. In *Methods in Cell Biology*. – Academic Press Inc., 2014. – P. 217–239.
147. URL: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/improve-cryo-electron-tomography-workflow/>.
148. Cai, S. The in situ structures of mono-, di-, and trinucleosomes in human heterochromatin / S. Cai, D. Böck, M. Pilhofer, L. Gan // *Molecular Biology of the Cell* – 2018. – V. 29 – № 20 – P.2450–2457.
149. Bharat, T.A.M. Resolving macromolecular structures from electron cryotomography data using subtomogram averaging in RELION / T.A.M. Bharat, S.H.W. Scheres // *Nature Protocols* – 2016. – V. 11 – № 11 – P.2054–2065.
150. Fernandez, J.-J. Cryo-tomography tilt-series alignment with consideration of the beam-induced sample motion / J.-J. Fernandez, S. Li, T.A.M. Bharat, D.A. Agard // *Journal of Structural Biology* – 2018. – V. 202 – № 3 – P.200–209.
151. Amat, F. Alignment of Cryo-Electron Tomography Datasets / F. Amat, D. Castaño-Diez, A. Lawrence, F. Moussavi, H. Winkler, M. Horowitz. In *Methods in Enzymology* – Academic Press, 2010. – V. 482 – P. 343–367.
152. Sorzano, C.O.S. Marker-free image registration of electron tomography tilt-series / C.O.S. Sorzano, C. Messaoudi, M. Eibauer, J. Bilbao-Castro, R. Hegerl, S. Nickell, S. Marco, J. Carazo // *BMC Bioinformatics* – 2009. – V. 10 – № 1 – P.124.
153. Penczek, P.A. Fundamentals of Three-Dimensional Reconstruction from Projections / P.A. Penczek. In *Methods in Enzymology* – Academic Press Inc., 2010. – V. 482 – P.1–33.
154. Radermacher, M. Weighted Back-projection Methods / M. Radermacher. In *Electron Tomography: Methods for Three-Dimensional Visualization of Structures in the Cell* –

Springer New York, 2007. – V. 9780387690087, P. 245–273.

155. Gilbert, P. Iterative methods for the three-dimensional reconstruction of an object from projections / P. Gilbert // *Journal of Theoretical Biology* – 1972. – V. 36 – № 1 – P.105–117.

156. Wan, W. Cryo-Electron Tomography and Subtomogram Averaging / W. Wan, J. A. G. Briggs. In *Methods in Enzymology* – Academic Press Inc., 2016. – V. 579 – P. 329–367.

157. Frangakis, A.S. Identification of macromolecular complexes in cryoelectron tomograms of phantom cells / A.S. Frangakis, J. Böhm, F. Förster, S. Nickell, D. Nicastro, D. Typke, R. Hegerl, W. Baumeister // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2002. – V. 99 – № 22 – P.14153–14158.

158. Martinez-Sanchez, A. Robust membrane detection based on tensor voting for electron tomography / A. Martinez-Sanchez, I. Garcia, S. Asano, V. Lucic, J.-J. Fernandez // *Journal of Structural Biology* – 2014. – V. 186 – № 1 – P.49–61.

159. Nicastro, D. The Molecular Architecture of Axonemes Revealed by Cryoelectron Tomography / D. Nicastro // *Science* – 2006. – V. 313 – № 5789 – P.944–948.

160. Galaz-Montoya, J.G. Single particle tomography in EMAN2 / J.G. Galaz-Montoya, J. Flanagan, M.F. Schmid, S.J. Ludtke // *Journal of Structural Biology* – 2015. – V. 190 – № 3 – P.279–290.

161. Castaño-Díez, D. Dynamo: A flexible, user-friendly development tool for subtomogram averaging of cryo-EM data in high-performance computing environments / D. Castaño-Díez, M. Kudryashev, M. Arheit, H. Stahlberg // *Journal of Structural Biology* – 2012. – V. 178 – № 2 – P.139–151.

162. Förster, F. Visual Proteomics / F. Förster, B. G. Han, M. Beck. In *Methods in Enzymology* – Academic Press Inc., 2010. – V. 483 – P. 215–243.

163. Chen, M. Convolutional neural networks for automated annotation of cellular cryo-electron tomograms / M. Chen, W. Dai, S.Y. Sun, D. Jonasch, C.Y. He, M.F. Schmid, W. Chiu, S.J. Ludtke // *Nature Methods* – 2017. – V. 14 – № 10 – P.983–985.

164. Kremer, J.R. Computer Visualization of Three-Dimensional Image Data Using

IMOD / J.R. Kremer, D.N. Mastronarde, J.R. McIntosh // *Journal of Structural Biology* – 1996. – V. 116 – P.71–76.

165. Pettersen, E.F. UCSF Chimera: A visualization system for exploratory research and analysis / E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin // *Journal of Computational Chemistry* – 2004. – V. 25 – № 13 – P.1605–1612.

166. Briggs, J.A. Structural biology in situ—the potential of subtomogram averaging / J.A. Briggs // *Current Opinion in Structural Biology* – 2013. – V. 23 – № 2 – P.261–267.

167. Hutchings, J. Subtomogram averaging of COPII assemblies reveals how coat organization dictates membrane shape / J. Hutchings, V. Stancheva, E.A. Miller, G. Zanetti // *Nature Communications* – 2018. – V. 9 – № 1 – P.4154.

168. Hagen, W.J.H. Implementation of a cryo-electron tomography tilt-scheme optimized for high resolution subtomogram averaging / W.J.H. Hagen, W. Wan, J.A.G. Briggs // *Journal of Structural Biology* – 2017. – V. 197 – № 2 – P.191–198.

169. Turoňová, B. Efficient 3D-CTF correction for cryo-electron tomography using NovaCTF improves subtomogram averaging resolution to 3.4 Å / B. Turoňová, F.K.M. Schur, W. Wan, J.A.G. Briggs // *Journal of Structural Biology* – 2017. – V. 199 – № 3 – P.187–195.

170. Tegunov, D. Multi-particle cryo-EM refinement with M visualizes ribosome-antibiotic complex at 3.7 Å inside cells / D. Tegunov, L. Xue, C. Dienemann, P. Cramer, J. Mahamid // *bioRxiv preprint* – 2020.

171. Harauz, G. Exact filters for general geometry three dimensional reconstruction / G. Harauz, M. Van Heel // *Optik* – 1986. – V. 73 – № 4 – P.146–156.

172. Van Heel, M. Fourier shell correlation threshold criteria / M. van Heel, M. Schatz // *Journal of Structural Biology* – 2005. – V. 151 – № 3 – P.250–262.

173. Rosenthal, P.B. Optimal Determination of Particle Orientation, Absolute Hand, and Contrast Loss in Single-particle Electron Cryomicroscopy / P.B. Rosenthal, R. Henderson // *Journal of Molecular Biology* – 2003. – V. 333 – № 4 – P.721–745.

174. Mozhaev, A.A. The Hybrid Protein of the Alkaline Sensor IRR and the Fluorescent

Protein GFP Retains the Functional Activity of the Receptor / A.A. Mozhaev, O.V. Serova, A.N. Orsa, A.A. Boyko, A.S. Goryashchenko, I.E. Deyev, A.G. Petrenko // Russian Journal of Bioorganic Chemistry – 2019. – V. 45 – № 2 – P.179–182.

175. Antipov, S.S. The nucleoid protein Dps binds genomic DNA of Escherichia coli in a non-random manner / S.S. Antipov, M.N. Tutukina, E.V. Preobrazhenskaya, F.A. Kondrashov, M.V. Patrushev, S.V. Toshchakov, I. Dominova, U.S. Shvyreva, V.V. Vrublevskaya, O.S. Morenkov, N.A. Sukharicheva, V.V. Panyukov, O.N. Ozoline // PLOS ONE – 2017. – V. 12 – № 8 – P.e0182800.

176. Bilalov, A. A cubic DNA-lipid complex / A. Bilalov, U. Olsson, B. Lindman // Soft Matter – 2009. – V. 5 – № 20 – P.3827.

177. Bilalov, A. DNA–lipid self-assembly: phase behavior and phase structures of a DNA–surfactant complex mixed with lecithin and water / A. Bilalov, U. Olsson, B. Lindman // Soft Matter – 2011. – V. 7 – № 2 – P.730–742.

178. Moiseenko, A. Projection structures reveal the position of the DNA within DNA-Dps Co-crystals / A. Moiseenko, N. Loiko, K. Tereshkina, Y. Danilova, V. Kovalenko, O. Chertkov, A.V. Feofanov, Y.F. Krupyanskii, O.S. Sokolova // Biochemical and Biophysical Research Communications – 2019. – V. 517 – № 3 – P.463–469.