

## СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 620.187

### КРИОГЕННАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ ТОМОГРАФИЯ В ИССЛЕДОВАНИЯХ КЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМ

© 2020 г. Р. А. Камышинский<sup>1,2</sup>, Ю. М. Чесноков<sup>1,2</sup>, А. С. Орехов<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

\*E-mail: Orekhov.anton@gmail.com

Поступила в редакцию 05.02.2020 г.

После доработки 05.03.2020 г.

Принята к публикации 17.03.2020 г.

Криогенная электронная томография является мощным методом определения трехмерных структур макромолекулярных комплексов в их естественном окружении. Минимизация внешних воздействий на исследуемые объекты, возможность проведения экспериментов *in vitro* и *in cellulo*, получение данных об образцах, находящихся в условиях, близких к нативным, и высокое пространственное разрешение получаемых трехмерных реконструкций делают криогенную электронную томографию одним из самых перспективных методов для изучения большого класса объектов в областях структурной биологии и визуальной протеомики. Рассмотрены основные аспекты криогенной электронной томографии применительно к исследованиям клеточных систем.

DOI: 10.31857/S0023476120050094

#### ВВЕДЕНИЕ

Развитие методов криогенной электронной микроскопии (**крио-ЭМ**), столь заметное в последние годы [1], привело к существенному росту числа расшифрованных структур макромолекул с околоатомным разрешением. Наиболее известный метод крио-ЭМ — анализ одиночных частиц (**SPA** — *Single Particle Analysis*) — завоевал популярность как мощный инструмент изучения одиночных белков и белковых комплексов в состоянии, близком к нативному. В названии метода отражен основной сценарий его использования — изучение множественных копий одиночных белковых макромолекул массой 100 кДа–100 мДа [2] в различных ориентациях, усреднение полученных данных (десятки тысяч изображений проекций объекта интереса) и воссоздание трехмерной структуры высокого разрешения на их основе.

Одновременно существенное развитие получил метод крио-электронной томографии (**крио-ЭТ**), обеспечивающий уникальную возможность прямой визуализации молекулярных структур в их естественном функциональном окружении [3]. Данный метод направлен в основном на изучение сложных макромолекулярных комплексов с вариативной морфологией, а также вирусов, бактериофагов и клеток.

Крио-ЭТ применяется к объектам, структурная информация для которых по ряду причин не может быть получена другими методами в силу,

например, некристаллизуемости, большого размера, трудностей выделения и очистки образцов. Применение крио-ЭТ, в свою очередь, позволяет изучать комплексы, которые сложно воспроизвести и выделить, непосредственно в клетках [4], а также их конформации, взаимные ориентации и взаимодействия. 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.

Применение комплекса методов, таких как витрификация, криогенная флуоресцентная микроскопия, криогенная растровая электронно-ионная микроскопия (**крио-РЭИМ**) и крио-ЭТ, делает возможным получение трехмерных структур клеток, включая их внутреннее наполнение, а также изучение межклеточных контактов и контактов клетка–матрикс в нативном состоянии на разных пространственных масштабах. В ближайшие годы можно ожидать применения крио-ЭТ в качестве одного из основных структурных методов

клеточной биологии. *In situ* крио-ЭТ способна объединить большинство существующих подходов к изучению микроструктуры клеток, при этом обеспечивая высокое пространственное разрешение для макромолекул в неповрежденном клеточном окружении. В комбинации с современными методами приготовления образцов с помощью процедур витрификации и использования фокусированного ионного пучка (**крио-ФИП**) для получения тонких срезов замороженных образцов, а также применением новейшего программного обеспечения для обработки данных использование крио-ЭТ несомненно приведет к открытию новых макромолекулярных и супрамолекулярных структур.

## МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КРИОГЕННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ ТОМОГРАФИИ

Основная идея метода крио-ЭТ заключается в том, что из серии достаточно большого количества проекционных изображений объекта, полученных в широком диапазоне углов наклона, можно реконструировать трехмерную структуру объекта [5]. Данный метод используется в основном для исследований существенно гетерогенных объектов с разнообразной морфологией [6]. Применение субтомографического усреднения для повторяющихся структурных элементов [7] обеспечивает возможность получения трехмерных реконструкций объекта с суб-нанометровым разрешением [8]. Данный подход не только демонстрирует прекрасные результаты при изучении структурных особенностей относительно больших объектов, таких как клетки [9] и вирусы [10], но и позволяет изучать механизмы взаимодействия последних с бактериями [1], а также визуализировать некоторые белки на поверхности бактериофагов [10].

## СТАНДАРТНАЯ ПРОБОПОДГОТОВКА И МОДИФИКАЦИИ

На первом этапе пробоподготовки электронно-микроскопические сетки, покрытые, как правило, слоем аморфного углерода с регулярными отверстиями, подвергаются обработке тлеющим разрядом для придания гидрофильных свойств их поверхности. Далее 2–3 мкл раствора, содержащего исследуемый образец, наносят на подготовленную сетку, излишки раствора снимают фильтровальной бумагой, оставляя тонкий слой жидкости на поверхности сетки, и с помощью автоматизированных систем проводят процедуру витрификации – сверхбыстрой заморозки объекта интереса в этане или смеси этан/пропан, сконденсированной при температуре жидкого азота. В результате происходит формирование тонкого слоя аморфного льда, толщина которого поддается регулировке и имеет критическое значение для

дальнейшего эксперимента. Например, при работе с массивными объектами, такими как клетки, во избежание их уплощения и нарушения целостности необходимо использовать достаточно толстый слой льда, толщиной до нескольких микрометров.

Автоматизированная процедура витрификации, с одной стороны, позволяет зафиксировать исследуемый препарат в состоянии, близком к нативному, и минимизировать радиационные повреждения в процессе получения экспериментальных данных, а с другой – стандартизировать процедуру пробоподготовки, обеспечивая воспроизводимость результатов.

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 [11]. Для подобных объектов осуществляется культивирование клеточных систем непосредственно на подложках сеток [12]. Однако некоторые клетки хуже прикрепляются к сеткам, чем к культуральному пластику. Чтобы повысить адгезионные свойства, проводится модификация поверхности сеток, например, поли-L-лизинном [13]. При этом часто используются золотые сетки, которые в отличие от более традиционных медных или никелевых сеток не являются токсичными для клеток [14].

## ОГРАНИЧЕНИЕ НА РАЗМЕР ИЗУЧАЕМЫХ ОБЪЕКТОВ

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 в аморфном льду, равную ~350 нм при использовании ускоряющего напряжения 300 кэВ [17, 18], стандартного для крио-ЭМ. 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 [17, 18] и некоторые бактерии [19–21]. В результате возникает вопрос: как проводить дополнительную пробоподготовку для получения достаточно тонких (электроннопрозрачных) образцов.

Применение метода крио-ультрамикротомирования [22], используемого для получения ультратонких срезов биологических тканей [23], в

случае приготовления срезов замороженных клеток [24] сопряжено с определенными сложностями, такими как подготовка блока с клетками, точность позиционирования алмазного ножа и перенос 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 [25].

В настоящее время некоторыми научными группами проводится оптимизация утонения образцов с помощью крио-РЭИМ, а именно посредством крио-ФИП [28, 29] – модификации популярного метода приготовления образцов для просвечивающей электронной микроскопии [28]. Данный подход заключается в утонении области интереса образца с помощью ионов  $Ga^+$  при последовательном понижении ускоряющего напряжения. Приготовление тонких срезов замороженных клеточных систем с помощью крио-ФИП обеспечивает высокую точность позиционирования утоняемой области клетки и позволяет минимизировать радиационные повреждения образца, сохраняя полученный срез в состоянии, близком к нативному [29].

Альтернативой описанным выше способам утонения образцов для исследования клеточных систем *in cellulo* является их исследование *in vitro* [30–32]. Так, после лизирования интактных клеток может проводиться крио-ЭТ-изучение отдельных структур клеточного наполнения [33–35].

## ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

Разработка новых чувствительных и быстрых детекторов электронов на основе комплементарной структуры металл–оксид–полупроводник (КМОП) [36–38] позволила значительно улучшить соотношение сигнал–шум в процессе получения экспериментальных данных и одновременно снизить время экспозиции, тем самым минимизируя радиационные повреждения и сохраняя нативную структуру биологических объектов.

Поскольку основное влияние на формирование изображений в крио-ЭМ оказывает фазовый контраст, стандартный подход подразумевает получение изображений в некотором диапазоне значений дефокусировки объективной линзы. Однако одновременно с улучшением соотношения сигнал–шум на низких пространственных частотах увеличение значений дефокуса приводит к ухудшению этого соотношения на высоких пространственных частотах, что делает практически невозможным исследование частиц с молекулярной массой ниже 200 кДа [39]. Альтернативный способ создания фазового контраста – использо-

вание фазовых пластин, широко применяемых в микроскопии оптического диапазона и теоретически способных существенно улучшить соотношение сигнал–шум [40], – до недавнего времени не давал практического эффекта [43]. Появление фазовых пластин нового поколения [41] позволило значительно улучшить контрастность экспериментальных изображений, что особенно актуально при изучении гетерогенных объектов и комплексов с подвижными частями [42]. Использование фазовых пластин позволяет снизить значения дефокусировки в процессе получения экспериментальных данных, что обеспечивает возможность изучения белков с молекулярной массой от 60 кДа и положительно сказывается на финальном разрешении трехмерных реконструкций [43–46].

Существенное увеличение контраста экспериментальных данных при использовании фазовой пластины было показано на примере магнитотактной бактерии и культуры нейронов [47]: 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.

Комбинация получения электроннопрозрачных срезов с помощью крио-ФИП с дальнейшим проведением крио-ЭТ экспериментов с применением фазовой пластины позволила провести масштабное исследование структуры хроматина HeLa [48]: удалось однозначно идентифицировать как мегадальтонные комплексы, так и макромолекулы массой до 200 кДа, такие как нуклеосомы. Последнее стало возможным благодаря применению субтомографического усреднения с проведением дополнительных этапов трехмерной классификации согласно шаблону [49].

## ТРЕХМЕРНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ И АНАЛИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

*Кросс-корреляционное выравнивание.* На первом этапе трехмерной реконструкции проводится кросс-корреляционное выравнивание стека изображений, полученного в результате крио-ЭТ.

При изучении объектов, подвергнутых процедуре заморозки без дополнительной пробоподготовки (клеточные системы, бактериальные клетки, вирусы), выравнивание угловой серии изображений осуществляется при помощи наночастиц коллоидного золота, добавляемых в исследуемый препарат перед проведением процедуры витрификации [50]. В случае проведения эксперимента с массивными интактными образцами, приготовленными методом крио-ФИП, выравнивание то-

мографического стека, как правило, осуществляется без помощи золотых меток. Это становится возможным благодаря применению фазовой пластины. Однако фазовая пластина чувствительна к заряду полученной крио-ФИП ламели, что требует напыления дополнительного проводящего слоя [29] перед проведением крио-ЭТ-экспериментов.

*Трехмерная реконструкция* томограммы может проводиться посредством использования различных алгоритмов, таких как взвешенная обратная проекция [51] (WBP), одновременная итерационная реконструкция [52] (SIRT) и др. 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 суб-томографического усреднения большого числа идентичных макромолекул [53].

*Аннотация и сегментация данных.* На следующем этапе проводится определение положения макромолекул на томограммах с помощью шаблонов [54]. Сегментация и аннотация томографических стеков проводятся в полуавтоматическом режиме и, как правило, требуют применения нескольких программных пакетов. Так, для сегментации мембран часто используется программа TomoSegMemTV [55], для микротрубочек – XTracing Module в программном пакете Amira. Положение и ориентация различных макромолекул могут определяться в автоматическом режиме посредством использования трехмерных шаблонов этих молекул (PEET [56], EMAN2 [57], Dynamo [58]). Шаблоны могут создаваться на основе известной трехмерной структуры данных макромолекул, определенной методами рентгеноструктурного анализа или с помощью метода анализа одиночных частиц [39, 59] в крио-ЭМ. Однако существенная гетерогенность макромолекул и наличие ложно выбранных координат требуют последующей итерационной трехмерной классификации и усреднения небольших участков томограммы (так называемых суб-томограмм), содержащих отдельные макромолекулы [17]. Развитие машинного зрения привело к появлению инструментов для автоматической аннотации и сегментации множества объектов на основе небольшого набора томографических срезов, сегментированных в ручном режиме [60].

*Суб-томографическое усреднение высокого разрешения.* Финальное пространственное разрешение трехмерной реконструкции в большой степени зависит от толщины исследуемого образца, точности выравнивания, шага по углу и углового диапазона в процессе эксперимента, а также от

используемых алгоритмов обработки данных. Пространственное разрешение томографической реконструкции ограничивается 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 суб-томографического усреднения. Для этого на реконструированной томограмме в ручном или автоматическом режиме определяются положения объектов интереса (IMOD [61]) и проводится экстракция соответствующих им участков томограммы (RELION [62]). На следующем шаге выполняются оценка значений дефокусировки каждого изображения (CTFFIND4 [63]) и построение трехмерной модели функции передачи контраста. Далее проводятся извлечение суб-томограмм, их выравнивание и последующее усреднение, что позволяет увеличить соотношение сигнал–шум и, как следствие, пространственное разрешение объекта [49], а также финальная визуализация трехмерных реконструкций (UCSF Chimera [64]).

На данный момент высокое (суб-нанометровое) пространственное разрешение макромолекул с помощью крио-ЭТ удалось получить только для высокоупорядоченных структур *in vitro*, таких как капсиды вирусов [8] или белки, уложенные в цилиндры [68]. Высокое пространственное разрешение (лучше 4 Å) обеспечивается использованием большого числа макромолекул для суб-томографического усреднения, превышающего 100000, что сопоставимо с числом частиц для SPA-эксперимента. Также необходимо соблюдение следующих условий: симметричная по дозе схема наклона при записи томографической серии [65], использование ускоряющего напряжения 300 кэВ, детектора на основе КМОП (Gatan K2xp) в *counting*-режиме, применение энергетического фильтра, коррекция дрейфа для 10 суб-фреймов. Дополнительное улучшение разрешения обеспечивается новыми методами коррекции функции передачи контраста [66].

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 получено разрешение 11 Å [4].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрены основные подходы современной криогенной электронной томографии. Крио-ЭТ является крайне перспективным методом для исследований клеточных систем в нативном окружении.

Применение комплекса таких методов, как витрификация, приготовление электроннопрозрачных образцов с помощью крио-ФИП, использование высокочувствительных детекторов в процессе получения экспериментальных данных и улучшение контраста с помощью фазовой пластины в совокупности с бурным развитием алгоритмов обработки данных, открывает окно в *in situ*-визуальную протеомику.

Работа выполнена при поддержке НИЦ “Курчатовский институт” (приказ от 24.10.2018 № 2659) и Российского научного фонда (проект № 18-74-10071).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shen P.S.* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. V. 410. № 8. P. 2053.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-0899-8>
2. *Jiang W., Tang L.* // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2017. V. 46. P. 122.  
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.07.002>
3. *Erdmann P.S., Plitzko J.M., Baumeister W.* // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2018. V. 34. P. 89.  
<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2018.05.003>
4. *Guo Q., Lehmer C., Martínez-Sánchez A. et al.* // *Cell.* 2018. V. 172. № 4. P. 696.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.030>
5. *Sigworth F.J.* // *Reprod. Syst. Sex. Disord.* 2016. V. 65. № 1. P. 57.  
<https://doi.org/10.1093/jmicro/dfv370>
6. *Baker L.A., Grange M., Grünewald K.* // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2017. V. 46. P. 149.  
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.08.005>
7. *Schmid M.F., Booth C.R.* // *J. Struct. Biol.* 2008. V. 161. № 3. P. 243.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.09.018>
8. *Schur F.K.M., Obr M., Hagen W.J.H. et al.* // *Science.* 2016. V. 353. № 6298. P. 506.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaf9620>
9. *Grange M., Vasishthan D., Grünewald K.* // *J. Struct. Biol.* 2017. V. 197. № 2. P. 181.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.06.024>
10. *Hu G. Bin, Wei H., Rice W.J. et al.* // *Virology.* 2008. V. 372. № 1. P. 1.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.10.013>
11. *Lepper S., Merkel M., Sartori A. et al.* // *J. Microsc.* 2010. V. 238. № 1. P. 21.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03327.x>
12. *Resch G.P., Brandstetter M., Wonesch V.I. et al.* // *Cold Spring Harb. Protoc.* 2011. V. 6. № 7. P. 815.  
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot5643>
13. *Mazia D., Schatten G., Sale W.* // *J. Cell Biol.* 1975. V. 66. № 3. P. 198.
14. *Koning R.I., Koster A.J.* // *Methods Mol. Biol.* 2013. V. 950. P. 227.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-62703-137-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-137-0_14)
15. *Hsieh C., Schmelzer T., Kishchenko G. et al.* // *J. Struct. Biol.* 2014. V. 185. № 1. P. 32.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.10.019>
16. *Grimm R., Singh H., Rachel R. et al.* // *Biophys. J.* 1998. V. 74. P. 1031.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)74028-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)74028-7)
17. *Asano S., Fukuda Y., Beck F. et al.* // *Science.* 2015. V. 347. № 6220. P. 439.  
<https://doi.org/10.1126/science.1261197>
18. *Weber M., Wojtynek M., Medalia O.* // *Cells.* 2019. V. 8. № 1. P. 57.  
<https://doi.org/10.3390/cells8010057>
19. *Delgado L., Martínez G., López-Iglesias C. et al.* // *J. Struct. Biol.* 2015. V. 189. № 3. P. 220.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.01.008>
20. *Bharat T.A.M., Kureisaite-Cizjane D., Hardy G.G. et al.* // *Nat. Microbiol.* 2017. V. 2. P. 1.  
<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.59>
21. *Melia C.E., Bharat T.A.M.* // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 2018. V. 1866. № 9. P. 973.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2018.06.003>
22. *Fischer A.H., Jacobson K.A., Rose J. et al.* // *Cold Spring Harb. Protoc.* 2008. V. 3. № 8.  
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot4991>
23. *Pierson J., Fernández J.J., Bos E. et al.* // *J. Struct. Biol.* 2010. V. 169. № 2. P. 219.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.10.001>
24. *Al-Amoudi A., Studer D., Dubochet J.* // *J. Struct. Biol.* 2005. V. 150. № 1. P. 109.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.01.003>
25. *Richter K.* // *Micron.* 1994. V. 25. № 4. P. 297.  
[https://doi.org/10.1016/0968-4328\(94\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0968-4328(94)90001-9)
26. *Rigort A., Plitzko J.M.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 2015. V. 581. № February. P. 122.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.02.009>
27. *MoberlyChan W.J., Marko M., Hsieh C.-E.* // *Microsc. Microanal.* 2005. V. 11. № S02. P. 854.  
<https://doi.org/10.1017/s1431927605504057>
28. *Giannuzzi L.A., Kempshall B.W., Schwarz S.M. et al.* // *Introduction to Focused Ion Beams.* Boston, MA: Springer US, 2005. P. 201.  
[https://doi.org/10.1007/0-387-23313-X\\_10](https://doi.org/10.1007/0-387-23313-X_10)
29. *Schaffer M., Mahamid J., Engel B.D. et al.* // *J. Struct. Biol.* 2017. V. 197. № 2. P. 73.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.07.010>
30. *Atherton J., Stouffer M., Francis F. et al.* // *Acta Cryst. D.* 2018. V. 74. № 6. P. 572.  
<https://doi.org/10.1107/S2059798318001948>
31. *Afonina Z.A., Myasnikov A.G., Shirokov V.A. et al.* // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. № 14. P. 9461.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gku599>
32. *Dadinova L.A., Chesnokov Y.M., Kamyshinsky R.A. et al.* // *FEBS Lett.* 2019. V. 593. № 12. P. 1360.  
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.13439>
33. *Li S., Fernandez J.J., Marshall W.F. et al.* // *EMBO J.* 2012. V. 31. № 3. P. 552.  
<https://doi.org/10.1038/emboj.2011.460>
34. *Pfeffer S., Burbaum L., Unverdorben P. et al.* // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 1.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms9403>
35. *Pigino G., Bui K.H., Maheshwari A. et al.* // *J. Cell Biol.* 2011. V. 195. № 4. P. 673.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.201106125>

36. *Kühlbrandt W.* // *Elife*. 2014. V. 3. P. e03678.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.03678>
37. *McMullan G., Faruqi A.R., Clare D. et al.* // *Ultramicroscopy*. 2014. V. 147. P. 156.  
<https://doi.org/10.1016/j.ultramicro.2014.08.002>
38. *Li X., Mooney P., Zheng S. et al.* // *Nat. Methods*. 2013. V. 10. № 6. P. 584.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2472>
39. *Cheng Y., Grigorieff N., Penczek P.A. et al.* // *Cell*. 2015. V. 161. № 3. P. 438.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.050>
40. *Glaeser R.M.* // *Rev. Sci. Instrum.* 2013. V. 84. № 11.  
<https://doi.org/10.1063/1.4830355>
41. *Danev R., Baumeister W.* // *Elife*. 2016. V. 5. P. 1.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.13046>
42. *Hall R.J., Nogales E., Glaeser R.M.* // *J. Struct. Biol.* 2011. V. 174. № 3. P. 468.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.03.020>
43. *Danev R., Tegunov D., Baumeister W.* // *Elife*. 2017. V. 6. P. 1.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.23006>
44. *Khoshouei M., Radjainia M., Phillips A.J. et al.* // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 1.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms10534>
45. *Khoshouei M., Radjainia M., Baumeister W. et al.* // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 1.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms16099>
46. *Liang Y.L., Khoshouei M., Radjainia M. et al.* // *Nature*. 2017. V. 546. № 7656. P. 118.  
<https://doi.org/10.1038/nature22327>
47. *Fukuda Y., Laugks U., Lučić V. et al.* // *J. Struct. Biol.* 2015. V. 190. № 2. P. 143.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.03.004>
48. *Cai S., Böck D., Pilhofer M. et al.* // *Mol. Biol. Cell*. 2018. V. 29. № 20. P. 2450.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.E18-05-0331>
49. *Bharat T.A.M., Scheres S.H.W.* // *Nat. Protoc.* 2016. V. 11. № 11. P. 2054.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2016.124>
50. *Fernandez J.J., Li S., Bharat T.A.M. et al.* // *J. Struct. Biol.* 2018. V. 202. № 3. P. 200.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2018.02.001>
51. *Crowther R.A., DeRosier D.J., Klug A.* // *Proc. R. Soc. London. Ser. A. Biol. Sci.* 1972. V. 317. P. 319.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.1970.0119>
52. *Gilbert P.* // *J. Theor. Biol.* 1972. V. 36. № 1. P. 105.  
[https://doi.org/10.1016/0022-5193\(72\)90180-4](https://doi.org/10.1016/0022-5193(72)90180-4)
53. *Wan W., Briggs J.A.G.* // *Methods in Enzymology*. 1st ed. Elsevier Inc., 2016. V. 579. P. 329.  
<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.04.014>
54. *Frangakis A.S., Böhm J., Förster F. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. V. 99. № 22. P. 14153.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.172520299>
55. *Martinez-Sanchez A., Garcia I., Asano S. et al.* // *J. Struct. Biol.* 2014. V. 186. № 1. P. 49.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.02.015>
56. *Nicastro D., Schwartz C., Pierson J. et al.* // *Science*. 2006. V. 313. № 5789. P. 944.  
<https://doi.org/10.1126/science.1128618>
57. *Galaz-Montoya J.G., Flanagan J., Schmid M.F. et al.* // *J. Struct. Biol.* 2015. V. 190. № 3. P. 279.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.04.016>
58. *Castañón-Díez D., Kudryashev M., Arbeit M. et al.* // *J. Struct. Biol.* 2012. V. 178. № 2. P. 139.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.12.017>
59. *Förster F., Han B.G., Beck M.* // *Methods Enzymol.* 2010. V. 483. № C. P. 215.  
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)83011-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)83011-3)
60. *Chen M., Dai W., Sun S.Y. et al.* // *Nat. Methods*. 2017. V. 14. № 10. P. 983.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4405>
61. *Kremer J.R., Mastronarde D.N., McIntosh J.R.* // *J. Struct. Biol.* 1996. V. 116. P. 71. 1047-8477/96.
62. *Scheres S.H.W.* // *J. Struct. Biol.* 2012. V. 180. № 3. P. 519.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.09.006>
63. *Rohou A., Grigorieff N.* // *J. Struct. Biol.* 2015. V. 192. № 2. P. 216.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.08.008>
64. *Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C. et al.* // *J. Comput. Chem.* 2004. V. 25. № 13. P. 1605.  
<https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
65. *Hagen W.J.H., Wan W., Briggs J.A.G.* // *J. Struct. Biol.* 2017. V. 197. № 2. P. 191.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.06.007>
66. *Turoňová B., Schur F.K.M., Wan W. et al.* // *J. Struct. Biol.* 2017. V. 199. № 3. P. 187.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2017.07.007>