

УДК 539.27; 577.322.54; 620.187.3

Пространственная структура цитохром с нитритредуктазы, полученная методом криоэлектронной микроскопии

Т. Н. Баймухаметов¹, Ю. М. Чесноков¹, Е. Б. Пичкур¹, К. М. Бойко^{1,2}, Т. В. Тихонова², А. Г. Мясников^{3,4,5}, А. Л. Васильев^{1,6}, А. В. Липкин¹, В. О. Попов^{1,2*}, М. В. Ковальчук^{1,6}

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123098, Москва, пл. Академика Курчатова, 1, Россия

²Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2, Россия

³University of California San Francisco Mission Bay, 94158-2517, Genentech Hall, San Francisco, CA, USA

⁴Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 188300, Ленинградская обл., Гатчина, мкр. Орлова роща, 1, Россия

⁵Centre for Integrative Biology, Department of Integrated Structural Biology, Institute of Genetics and of Molecular and Cellular Biology, 67404, 1 rue Laurent Fries, Illkirch, France

⁶Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН, 119333, Москва, Ленинский просп., 59, Россия

*E-mail: vpopov@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 05.02.2018

Принята к печати 02.06.2018

РЕФЕРАТ Методом криоэлектронной микроскопии получена структура цитохром с нитритредуктазы из бактерии *Thioalkalivibrio nitratireducens* с разрешением 2.56 Å. Проверена возможная структурная гетерогенность фермента, показано отсутствие значимых различий как в ходе полипептидной цепи, так и в ориентации боковых групп модели, полученной на основании данных криоэлектронной микроскопии, относительно структуры высокого разрешения, полученной методом рентгеноструктурного анализа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА анализ проекций одиночных частиц, криоэлектронная микроскопия высокого разрешения, структурная биология, цитохром с нитритредуктаза.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОПРЕДЕЛЕНИЙ TvNiR – цитохром с нитритредуктаза из бактерии *Thioalkalivibrio nitratireducens*; крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия; крио-ПЭМ – просвечивающий криоэлектронный микроскоп; РСА – рентгеноструктурный анализ; КМОП – комплементарная структура металл-оксид-полупроводник (CMOS – complementary metal-oxide-semiconductor); ФПК – функция передачи контраста (CTF – contrast transfer function); FSC (Fourier Shell Correlation) – функция корреляции, используемая для оценки разрешения. *Стек изображений* – единица исходных данных, массив из n 16-битных изображений размера 4096×4096 пикселей, детектируемых от одной области образца в течение всего времени экспозиции. В данной работе $n = 30$, типичный объем стека с учетом всех метаданных при этом составляет ~ 1 ГБ. *Частица (изображение частицы)* – одиночная проекция объекта на детектируемом изображении. *Карта плотности* – функция плотности распределения эффективного рассеивающего потенциала объекта.

ВВЕДЕНИЕ

Прогресс последних лет в области криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ), связанный с увеличением пространственного разрешения и снижением молекулярной массы исследуемых объектов, вплотную приближает данный метод к возможностям

рентгеноструктурного анализа [1, 2]. Уникальная способность получать структурную информацию о гетерогенных объектах в состоянии, близком к нативному, относительная простота подготовки образцов [3] делают крио-ПЭМ мощным инструментом современной структурной биологии [4, 5]. Целый

ряд задач, связанных с трудностями, возникающими при кристаллизации большинства мембранных белков или при поиске различных переходных состояний молекулярных комплексов, сегодня могут быть решены только методами крио-ПЭМ, составляя при этом полную комплементарность классическим рентгеновским методам [6].

В настоящей работе с использованием приборных и вычислительных мощностей Курчатовского научного центра пространственная структура фермента цитохром с нитритредуктазы из бактерии *Thioalkalivibrio nitratireducens* (TvNiR) [7] впервые исследована методом анализа проекций одиночных частиц (Single Particle Analysis) [8] – основным подходом криоэлектронной микроскопии для объектов подобной природы. Этот фермент катализирует реакцию окисления нитрита до аммония без вывода промежуточных продуктов реакции за пределы активного центра [7]. В растворе и в кристалле фермент находится в состоянии стабильного гексамера, имеющего форму бипирамиды с характерной высотой ~150 Å и основанием ~120 Å [9]. Симметрия молекулы гексамера принадлежит группе D₃, а молекулярная масса объекта составляет ~360 кДа, что делает TvNiR весьма удобным объектом исследования методом крио-ЭМ. Задача настоящего исследования состояла в получении методом крио-ЭМ структурных данных для TvNiR и их сравнении с данными РСА высокого разрешения, полученными ранее [9–11].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение и очистка белка

Выделение и очистку нативной TvNiR проводили двустадийно в соответствии с описанной ранее процедурой [7]. Анионообменную хроматографию проводили на колонке с сорбентом DEAE-сефароза (Fast Flow) объемом 35 мл при 4°C на хроматографе BioLogic LP (BioRad, США). Колонка была предварительно уравновешена 25-мМ калий-фосфатным буфером, pH 7.0. После нанесения экстракта и промывки колонки тем же буфером белок элюировали линейным градиентом концентрации NaCl 0–1.0 М. Гель-фильтрационную хроматографию проводили на хроматографе АКТА FPLC (Amersham Biosciences, США) с использованием колонки Superdex™200 10/300, уравновешенной 50-мМ калий-фосфатным буфером, pH 7.0, содержащим 0.15 М NaCl. Для структурных экспериментов белок был сконцентрирован до концентрации 10 мг/мл.

Подготовка образцов для крио-ЭМ

При подборе оптимальной концентрации белка в растворе тестировали концентрации в диапазоне от 0.1

до 6 мг/мл, нанесенные на сетки Lacey Carbon 300 mesh (Ted Pella, США). Для сбора экспериментальных данных применяли сетки Quantifoil R1.2/1.3 300 mesh (Quantifoil, Германия) с углеродной подложкой, имеющей массив регулярных отверстий диаметром 1.2 мкм и периодом 2.5 мкм. Сетки в течение 30 с обрабатывали тлеющим разрядом в установке для гидрофилизации PELCO easyGlow (Ted Pella, США) при давлении в камере 0.26 мбар и силе тока 25 мА. Препарат (3 мкл, 6 мг/мл) наносили на сетки и замораживали в жидком этане в установке для витрификации Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, США) при следующих параметрах: сила сжатия при промакивании 6 у.е., время промокания 1 с, температура климатической камеры 4°C, влажность $98 \pm 2\%$.

Криоэлектронная просвечивающая микроскопия

Подготовленные сетки были перенесены при температуре жидкого азота в криоэлектронный просвечивающий микроскоп Titan Krios 60-300 (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенный источником полевой эмиссии электронов типа Шоттки (FEI XFEG, Нидерланды), корректором сферических аберраций (CEOS GmbH, Германия) и КМОП (CMOS) – устройством прямого детектирования электронов Falcon II (Thermo Fisher Scientific, США). В автоматическом режиме с помощью программного обеспечения EPU (версия 1.9.1.16REL) (Thermo Fisher Scientific, США) получено 3055 стеков изображений, детектируемых в течение времени экспозиции 1.5 с. Микроскоп работал при ускоряющем напряжении 300 кВ, увеличении $\times 75000$ и соответствующем размере пикселя 0.86 Å на уровне образца, объективной линзой в режиме дефокусировки со значениями из интервала от -0.5 до -1.5 мкм с шагом 0.1 мкм и величиной суммарной дозы $\sim 100e^-/\text{Å}^2$, равномерно распределенной по всему стеку изображений. Основные параметры набора данных сведены в таблицу, общие характеристики данных показаны на рис. 1А–Г.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Реконструкция карты плотности

Экспериментальные данные обрабатывали в несколько последовательных этапов, представленных на рис. 2, на базе высокопроизводительного вычислительного кластера Курчатовского центра обработки данных, оснащенного графическими ускорителями Nvidia Tesla K80. Для основных процедур использовали следующее программное обеспечение: Motioncor2 (версия 1.0.5) [12], Gctf (версия 1.18) [13], Gautomatch (версия 0.56) (K. Zhang, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK, <http://www>.

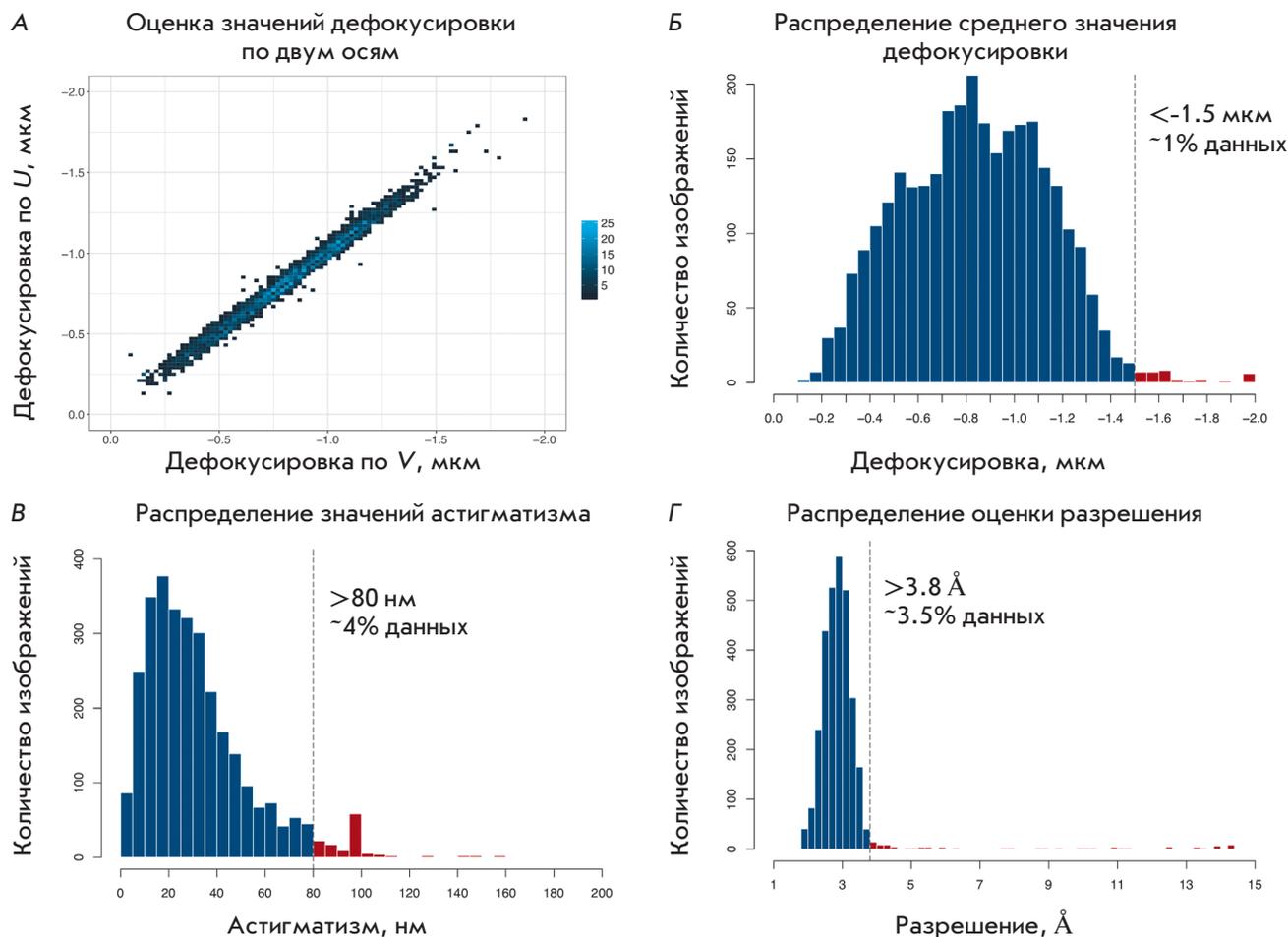


Рис. 1. Общие характеристики исходных данных по результатам оценки параметров ФПК в программе Gctf. А – распределение оценки значений дефокусировки по двум ортогональным осям, цвет соответствует плотности значений в заданной координате. Б–Г – распределения среднего значения дефокусировки, величины астигматизма и оценки максимального разрешения соответственно, а также выбранные пороговые значения. Данные с параметрами, лежащими в диапазонах, отмеченных красным, исключались из дальнейшей обработки

mrc-lmb.cam.ac.uk/kzhang/Gautomatch) и Relion (версия 2.1) [14], оптимизированное для вычислений на графических процессорах.

На первом этапе (рис. 2) для каждого из 3055 исходных стеков изображений проводилась последовательная коррекция анизотропного дрейфа в программе Motioncor2. Были получены два усредненных и скорректированных набора изображений: с учетом фильтрации сигнала в зависимости от поглощенной образцом дозы электронов (Dose Weighting) [15], используемый для процедур классификации и уточнения, а также без фильтрации, который применяли для оценки параметров функций передачи контраста (ФПК). На втором этапе (рис. 2) параметры ФПК оценивали с помощью программы Gctf. По аппроксимации колец Тона на Фурье-спектрах для каждого

изображения были определены величины информационного предела (оценка максимального разрешения), дефокусировки и астигматизма. Из дальнейшей обработки были исключены данные, лежащие на краях распределений в соответствии с пороговыми значениями, показанными на рис. 1Б–Г.

Таким образом, на всех последующих этапах использовали 2851 отобранное изображение с величинами дефокусировки, астигматизма и разрешения, не превышающими -1.5 мкм (по модулю), 80 нм и 3.8 Å соответственно. Характерное изображение после процедуры коррекции дрейфа приведено на рис. 3.

На третьем этапе (рис. 2) определяли положение частиц с помощью программы Gautomatch. Первоначально процедуру применяли для поднабора данных с высоким значением дефокусировки.

Параметры сбора экспериментальных данных, реконструкции карты плотности и статистика уточнения структуры TvNiR

Сбор данных	
Ускоряющее напряжение, кВ	300
Увеличение	75000
Размер пикселя, Å	0.86
Время экспозиции, с	1.5
Количество стеков изображений	3055
Суммарная доза на стек, $e^-/\text{Å}^2$	~100
Количество изображений в стек	30
Интервал значений дефокусировки, мкм	[-1.5; -0.5]
Шаг изменения значения дефокусировки, мкм	0.1
Параметры реконструкции карты плотности	
Финальное количество изображений частиц	33891
Группа симметрии	D3
FSC _{0.5} (с маской / без маски)	2.86 / 3.19
FSC _{0.143} (с маской / без маски)	2.56 / 2.82
Разрешение (среднее), Å	2.56
Уточнение структуры	
FSC _{average}	0.8679
R _i (взвешенный, общий), %	28.70
Средний тепловой фактор (B-factor), Å ²	80.08
Среднеквадратичное отклонение по длинам связей (R.m.s.d), Å ²	0.018
Среднеквадратичное отклонение по углам (R.m.s.d.)	1.989
Показатель MolProbity (score), %	2.55
Clashscore (по всем атомам), %	13.31
Хорошие ротамеры (Good rotamers), %	91.68
Запрещенные конформации (Ramachandran outliers), %	0.19
Код депонирования в EMDB	EMD-0020

В качестве шаблона использовали двумерную гауссову функцию с полушириной, соответствующей характерному размеру объекта. Полученный таким образом набор частиц подвергали двумерной классификации в пакете Relion. Классы, содержащие проекции объекта, использовали в качестве шаблонов для поиска на полном наборе данных. Таким образом,

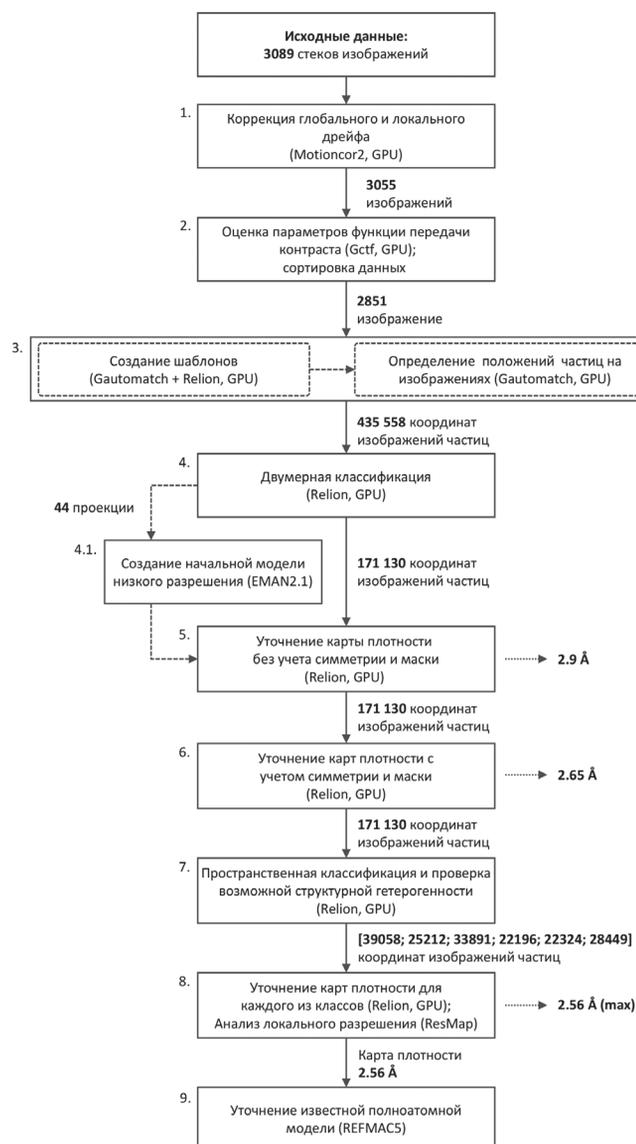


Рис. 2. Основные этапы обработки данных

было получено 435558 координат возможных положений частиц.

На четвертом этапе (рис. 2) производили две последовательные процедуры классификации. На первой изображения частиц были разбиты на 40 различных классов. Далее из набора данных исключали изображения, объединенные в классы, не содержащие проекций объекта либо содержащие изображения частиц льда, загрязнения поверхности образца, а также границы углеродной подложки. На второй процедуре классификации оставшиеся изображения разбивали на 50 классов с последующим исключением из обработки изображений частиц, принадлежащих классам, на которых не наблюдались четкие границы объекта рис. 4А,Б.

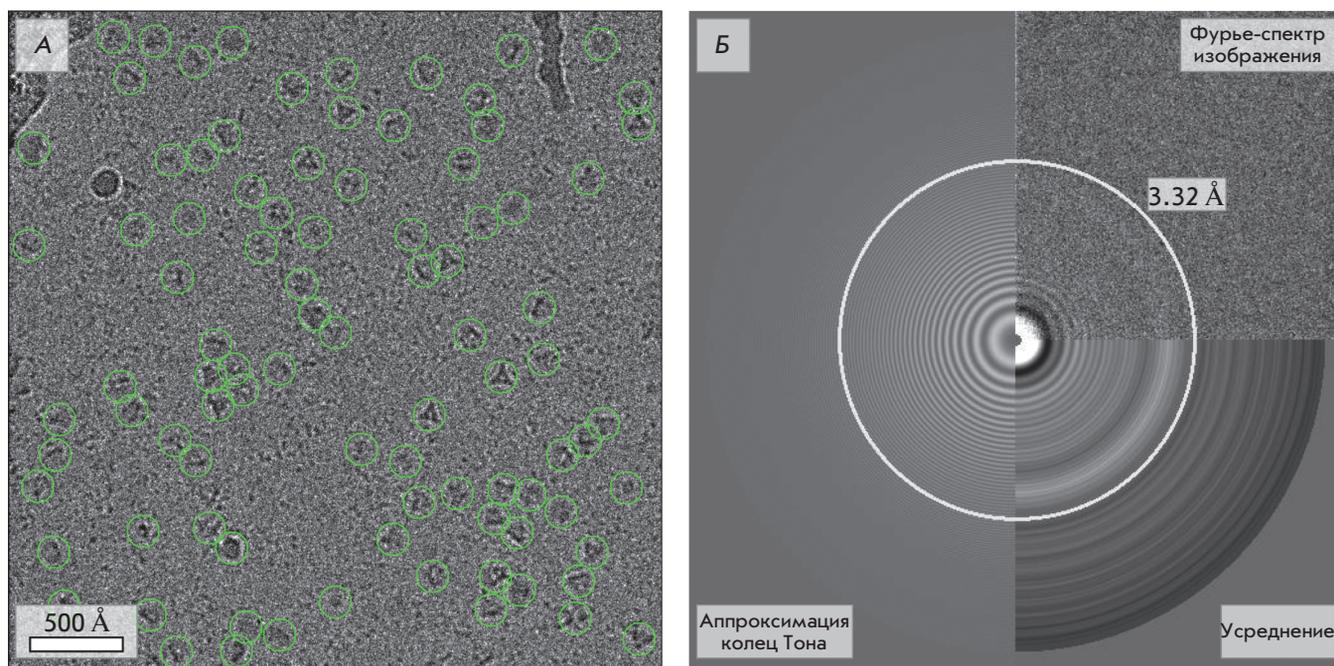


Рис. 3. Результаты первичной обработки данных после коррекции дрейфа и оценки параметров ФПК. А – пример изображения с выделенными проекциями объекта по данным Gautomatch. Б – в правой верхней части – Фурье-спектр данного изображения; в правой нижней – усреднение спектра (rotational average); в левой – аппроксимация колец Тона. Выделена окружность, радиус которой в прямом пространстве соответствует оценке максимального разрешения – 3.32 Å

Проведенная таким образом классификация позволила отобрать 171130 изображений частиц, несущих информацию о структуре объекта. Начальная модель с низким разрешением была построена в пакете EMAN2 [16] методом Монте-Карло с учетом известной симметрии объекта на основании 44 проекций, каждая из которых являлась усреднением изображений, содержащихся в наиболее населенных классах второй процедуры классификации (рис. 4Б).

На пятом этапе (рис. 2) модель низкого разрешения уточняли путем переопределения углов Эйлера и коррекции положения проекции объекта относительно получаемой карты плотности на каждой следующей итерации реализованного в пакете Relion EM-алгоритма [17–19]. Уточнение (3D Auto-Refine) без использования априорных знаний о симметрии объекта после операции постобработки (Postprocessing) с учетом бинарной маски, определяющей граничные условия для вычисления значений функции кросс-корреляции между двумя независимо уточняемыми картами плотности [20], позволило получить карту плотности с разрешением 2.9 Å в соответствии с критерием FSC = 0.143 [21].

Учет симметрии объекта на шестом этапе (рис. 2) привел к улучшению результата до 2.65 Å. Тот же

набор частиц на седьмом этапе (рис. 2) подвергался пространственной классификации [22, 23] на шесть классов (рис. 5) без поиска по углам и трансляциям с применением той же маски согласно процедуре, описанной в [24]. Далее на восьмом этапе (рис. 2) для каждого класса повторно уточняли карты плотности. Этот подход позволил выделить поднабор данных величиной 33891 изображение частиц (с медианным значением дефокусировки -0.86 мкм при интервале значений от -1.48 до -0.18 мкм по оценке программы Gctf), соответствующий третьему пространственному классу и приводящий к карте с наилучшим разрешением 2.56 Å (рис. 5). Для повышения разрешения этапы 6–8 (рис. 2) проводили с применением симметрии D3 и бинарной маски (рис. 6А), для создания которой использовали следующие параметры: изотропное расширение на 5 пикселей, сглаживание границ на 5 пикселей, порог построения изоповерхности 0.02.

Уточнение модели в программном пакете REFMAC5

В качестве исходной модели для уточнения использовали установленную ранее методом рентгеноструктурного анализа кристаллическую структуру TvNiR с наилучшим разрешением – 1.4 Å (код в бан-

ке данных RCSB – 3FO3). Из димера, находящегося в независимой части элементарной ячейки кристаллической структуры, были удалены молекулы растворителя за исключением тех, которые соответствовали пикам экспериментальной плотности. С использованием операций симметрии был построен гексамер TvNiR, использованный в уточнении. Уточнение проводилось в программе REFMAC5 [25] из пакета CCP-EM [26].

В качестве экспериментальной карты плотности использовали карту третьего пространственного класса (рис. 5), имеющую наилучшее разрешение. Во избежание эффекта переуточнения (overfitting) модели использовали подход [27], при котором экспериментальные данные, на которых построена суммарная карта плотности, разделялись случайным образом на два поднабора, используемых в дальнейшем для построения независимых карт и кросс-валидации. Высокое разрешение экспериментальных данных позволило проводить уточнение без введения дополнительных ограничений (restraints) за исключением ограничений на максимальные отклонения длин связей от среднего значения (опция jelly-body [25]). Для более правильной оценки стерических ограничений в процессе уточнения модель дополняли атомами водорода в фиксированных положениях. После 30 циклов уточнения проводили визуальный анализ соответствия полученной после уточнения модели и экспериментальной плотности с использованием программы Coot [28]. Оценка влияния размытия (sharpness / blur) карты плотности на ход уточнения была проведена при помощи серии уточнений с различным значением степени размытия: от -150 до +150. Последующий выбор режима уточнения был сделан на основании наилучших полученных значений R_i и FSC, которые соответствовали значению параметра blur -80. Помимо визуального анализа качество уточненной модели оценивали по данным сервиса Molprobity [29], а ее сравнение с кристаллической структурой белка проводили с использованием сервиса PDBeFOLD [30]. Анализ графика Рамачандрана показал, что остатки Gly285 и His361 во всех субъединицах лежат вне разрешенной области, однако все эти остатки описываются хорошей экспериментальной плотностью.

ОБСУЖДЕНИЕ

Пространственная классификация не показала значимой структурной гетерогенности в образце на уровне достигнутого разрешения, однако позволила выделить поднабор проекций объекта, несущий информацию о высоких пространственных частотах и обеспечивающий максимальное разрешение итоговой карты плотности (рис. 6Б,В).

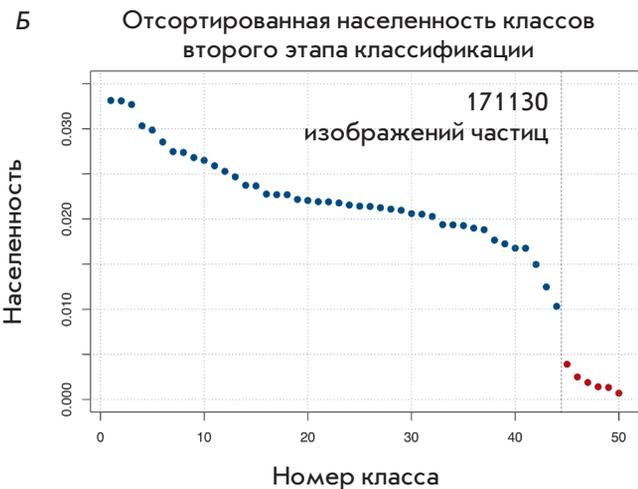
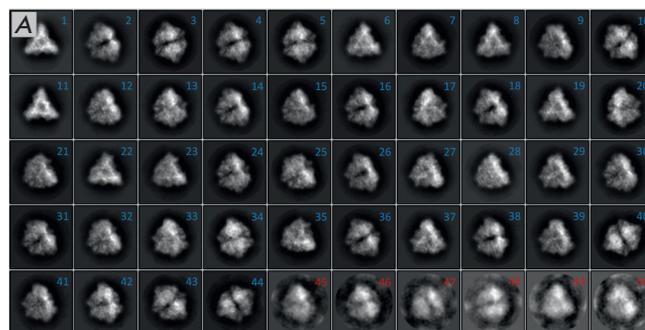


Рис. 4. Результаты четвертого этапа обработки данных. А – изображения, усредненные по каждому классу, второй процедуры классификации. Изображения частиц, принадлежащие классам с 1 по 44 (пронумерованы синим), были использованы для дальнейшего анализа и построения карты плотности. Изображения частиц, принадлежащие классам с 45 по 50 (пронумерованы красным), приводящие к эффектам переобучения алгоритмов реконструкции, исключались из дальнейшей обработки данных. Б – населенность классов. Цвет точек соответствует цвету нумерации на панели А

Распределение проекций для углового разбиения, используемого при уточнении карты плотности без учета симметрии и карты плотности 3-го пространственного класса приведено на рис. 6Г. Можно видеть, что объект не имеет предпочтительных ориентаций в слое аморфного льда. Оценка среднего разрешения на основе критериев $FSC = 0.143$ и $FSC = 0.5$ по результатам процедуры постобработки приведена на рис. 7.

Высокая симметрия объекта значительно упрощает задачу реконструкции в криоэлектронной микроскопии, компенсируя сравнительно малое количество

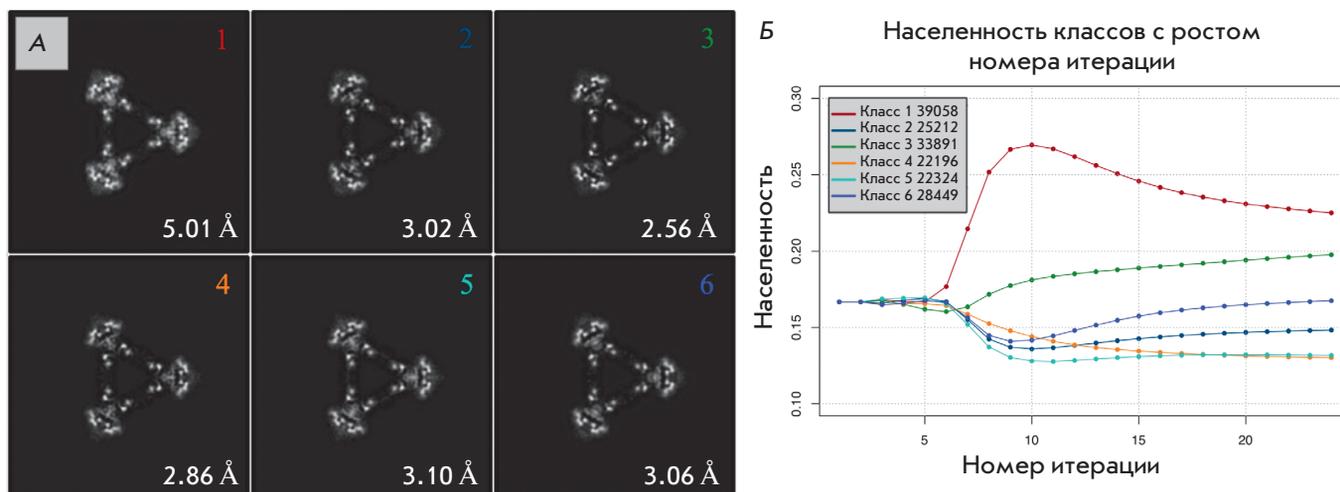


Рис. 5. Результаты пространственной классификации. А – центральные срезы полученных классов. Б – изменение населенности классов в зависимости от шага итерации

проекций с относительно высоким информационным пределом для данного эксперимента, а также низкое соотношение сигнал-шум, связанные с малой молекулярной массой объекта. Результаты уточнения в пакете Relion 2.1, выполненного после пространственной классификации, наглядно демонстрируют влияние качества данных на итоговое разрешение. С учетом симметрии объекта для создания структурной модели потребовалось порядка 34000 изображений частиц, принадлежащих к пространственному классу, имеющему максимальное разрешение 2.56 Å (рис. 5).

Докинг модели фермента, полученной на основании данных рентгеноструктурного анализа (код в банке данных RCSB – 3FO3), в экспериментальную карту плотности при разрешении 2.56 Å, полученную методом крио-ЭМ, и последующее уточнение позволили получить финальную структуру, имеющую индекс Molprobity 2.55 и следующие значения параметров: $R_f = 28.70$, $FSC_{average} = 0.8679$ (таблица). Высокое качество карты плотности позволило установить не только ход полипептидной цепи фермента, но и идентифицировать боковые группы аминокислотных остатков (рис. 8А), включая уникальную ковалентную связь между остатками тирозина и цистеина (рис. 8Б) в активном центре фермента и боковые группы ряда остатков, расположенных на поверхности молекулы и невидимых в кристаллической структуре: Arg52, Arg316 и Lys456. В активном цен-

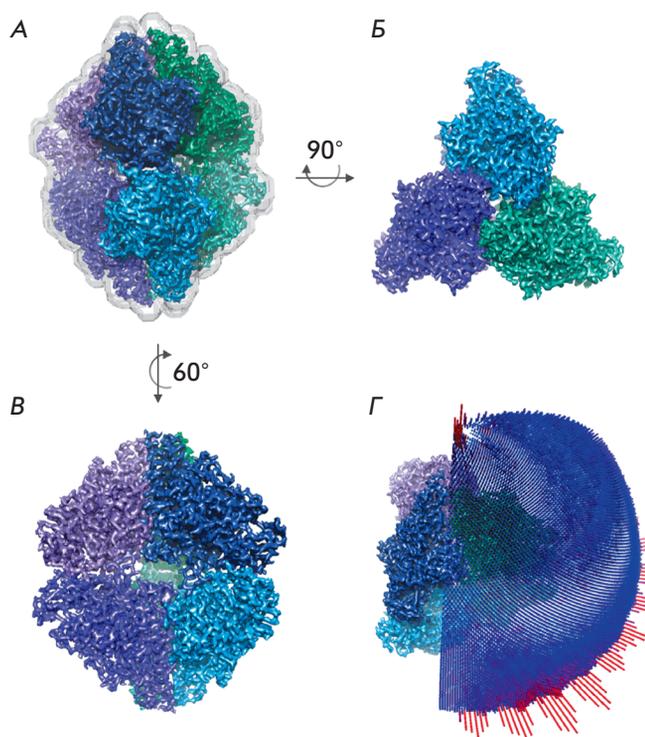


Рис. 6. Итоговая карта плотности наилучшего разрешения 2.56 Å. А – маска, используемая при реконструкции и оценке разрешения, показана серой полупрозрачной изоповерхностью. Б–В – карта плотности в различных проекциях, цветом выделены отдельные субъединицы гексамера белка. Г – распределение проекций для используемого углового разбиения

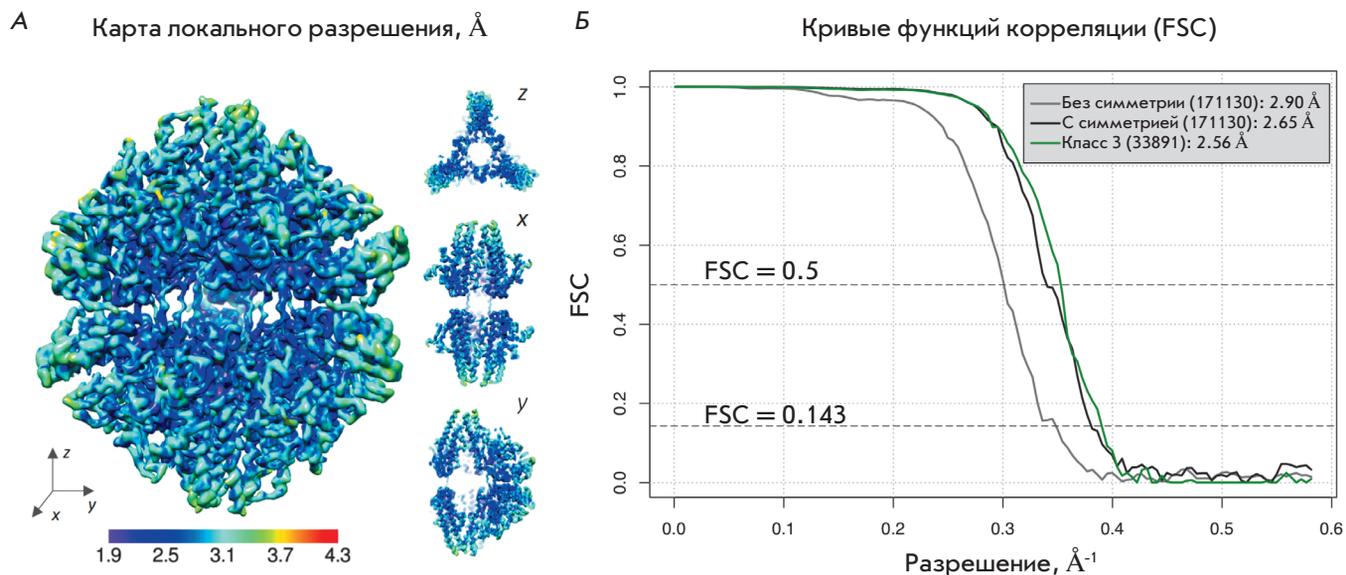


Рис. 7. Оценка разрешения. А – анализ локального разрешения для карты плотности третьего пространственного класса по данным программного пакета MonoRes [31]. Б – кривые функций корреляции (FSC) для карт плотности без учета симметрии (серая кривая), с учетом симметрии для полного набора изображений частиц (черная кривая) и для набора частиц, принадлежащего третьему классу (зеленая кривая)

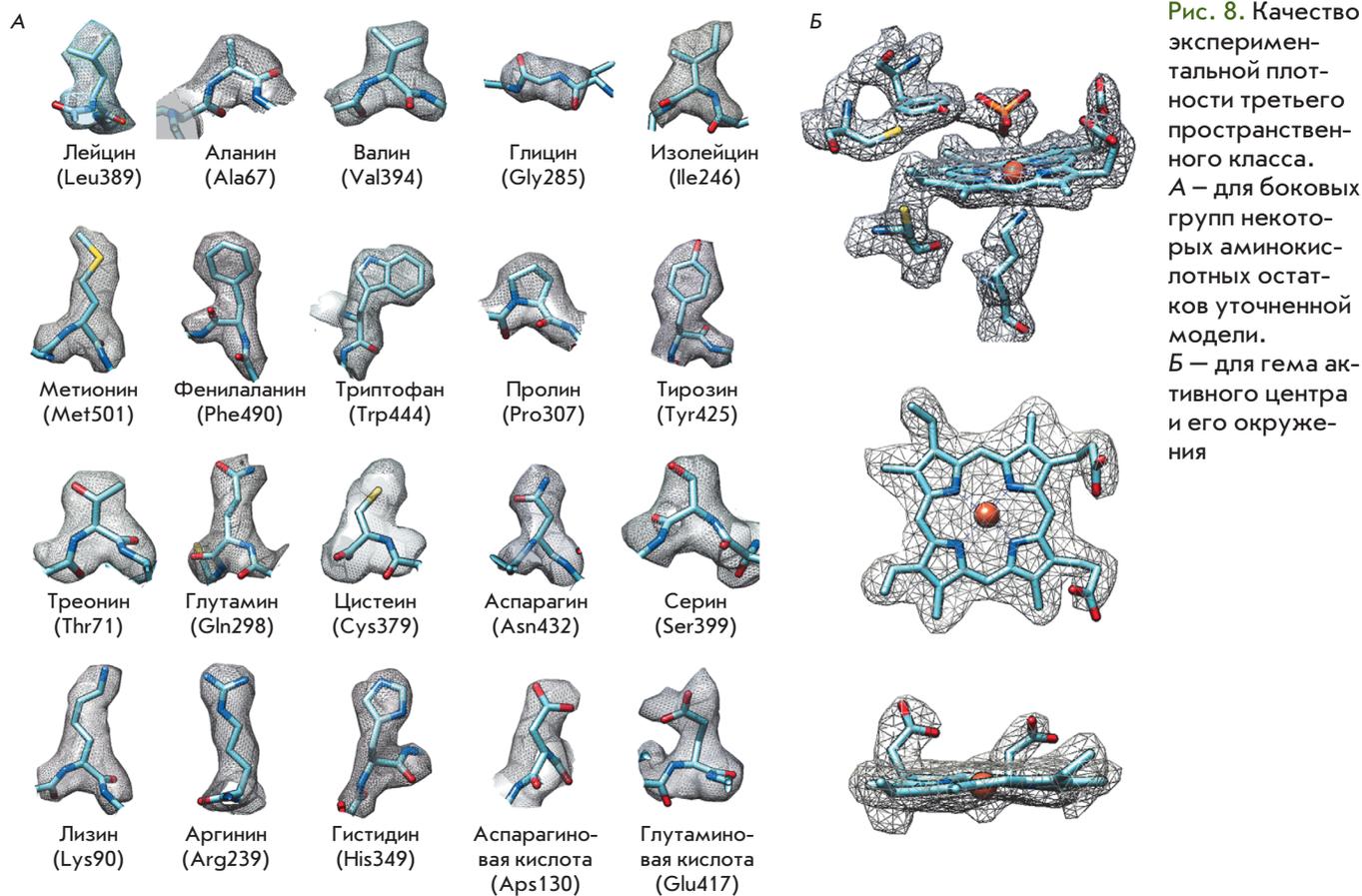


Рис. 8. Качество экспериментальной плотности третьего пространственного класса. А – для боковых групп некоторых аминокислотных остатков уточненной модели. Б – для гема активного центра и его окружения

тре фермента также обнаружена плотность, которая, исходя из состава буфера, идентифицирована как молекула фосфата (рис. 8Б). Связывание неорганических анионов является характерным свойством активного центра TvNiR, хорошо известным из рентгеноструктурных исследований [9, 10].

Наложение уточненной по экспериментальным данным крио-ЭМ структуры и исходной кристаллической структуры показало отсутствие значимых различий в ходе полипептидной цепи. Ориентация боковых групп также совпадает за исключением некоторых боковых групп остатков, расположенных на поверхности фермента, например Asp40, Arg51, Glu337, Glu341 и др., что может быть связано с их относительной подвижностью. Среднеквадратичные отклонения по C_α-атомам сравниваемых структур не превышают 0.36 Å. Таким образом, структура TvNiR, полученная методом крио-ЭМ, хорошо согласуется с кристаллической структурой фермента, полученной ранее и независимо методом рентгеноструктурного анализа. Экспериментальная плотность депонирована в банк данных EMDB с кодом EMD-0020.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное в настоящей работе исследование структуры цитохром с нитритредуктазы из бактерии *T. nitratireducens* методом крио-ЭМ с помощью анализа проекций одиночных частиц позволи-

ло получить карту плотности с разрешением 2.56 Å и построить соответствующую пространственную модель. Определен оптимальный алгоритм сбора и обработки данных для достижения высокого разрешения. Сравнение пространственных структур TvNiR, полученных методами рентгеноструктурного анализа (1.40 Å) и крио-ЭМ (2.56 Å), не выявило между ними значимых различий. Показано также, что на уровне достигнутого методом крио-ЭМ разрешения TvNiR не обладает структурной гетерогенностью. ●

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Комплекс моделирования и обработки данных исследовательских установок мега-класса» НИЦ «Курчатовский институт» <http://скр.nrcki.ru> (субсидия Минобрнауки, идентификатор работ RFMEFI62117X0016), оборудования Ресурсного центра «Зондовой и электронной микроскопии» КК НБИКС-т НИЦ «Курчатовский институт», а также при поддержке грантов Российского научного фонда № 18-41-06001 (в части получения и обработки экспериментальных данных) и № 14-24-00172 (в части очистки и выделения фермента) и Государственного задания № 01201351365 (в части наработки организма-продуцента фермента).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Callaway E. // Nature. 2015. V. 525. P. 172–174.
- Merk A., Bartesaghi A., Banerjee S., Falconieri V., Rao P., Davis M.I., Prangani R., Boxer M.B., Earl L.A., Milne J.L.S., et al. // Cell. 2016. V. 165. № 7. P. 1698–1707.
- Iancu C.V., Tivol W.F., Schooler J.B., Dias D.P., Henderson G.P., Murphy G.E., Wright E.R., Li Z., Yu Z., Briegel A., et al. // Nat. Protoc. 2007. V. 1. № 6. P. 2813–2819.
- Cheng Y. // Cell. 2015. V. 161. № 3. P. 450–457.
- Gelfand A. // Biomedical Computation Review. 2016. V. 1. P. 13–21.
- Bai X., McMullan G., Scheres S.H.W. // Trends Biochem. Sci. 2015. V. 40. № 1. P. 49–57.
- Tikhonova T.V., Slutsky A., Antipov A.N., Boyko K.M., Polyakov K.M., Sorokin D.Y., Zvyagilskaya R.A., Popov V.O. // Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics. 2006. V. 1764. № 4. P. 715–723.
- Frank J., Zhu J., Penczek P., Li Y., Srivastava S., Verschoor A., Radermacher M., Grassucci R., Lata R.K., Agrawal R.K. // Nature. 1995. V. 376. № 6539. P. 441–444.
- Polyakov K.M., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Slutsky A., Antipov A.N., Zvyagilskaya R.A., Popov A.N., Bourenkov G.P., Lamzin V.S., Popov V.O. // J. Mol. Biol. 2009. V. 389. № 5. P. 846–862.
- Trofimov A.A., Polyakov K.M., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Safonova T.N., Tikhonov A.V., Popov A.N., Popov V.O. // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 2010. V. 66. № 10. P. 1043–1047.
- Trofimov A.A., Polyakov K.M., Boiko K.M., Filimonenkov A.A., Dorovatovskii P.V., Tikhonova T.V., Popov V.O., Koval'chuk M.V. // Crystallogr. Reports. 2010. V. 55. № 1. P. 61–67.
- Zheng S., Palovcak E., Armache J.-P., Cheng Y., Agard D. // bioRxiv. 2016. P. 1–30.
- Zhang K. // J. Struct. Biol. 2016. V. 193. № 1. P. 1–12.
- Kimanius D., Forsberg B.O., Scheres S.H.W., Lindahl E. // Elife. 2016. V. 5.
- Grant T., Grigorieff N. // Elife. 2015. V. 4. e06980.
- Tang G., Peng L., Baldwin P.R., Mann D.S., Jiang W., Rees I., Ludtke S.J. // J. Struct. Biol. 2007. V. 157. № 1. P. 38–46.
- Dempster A.P.A., Laird N.M.N., Rubin D.D.B. // J. Royal Statistical Society. Series B (methodological). 1977. P. 1–38.
- Scheres S.H.W. // J. Struct. Biol. 2012. V. 180. № 3. P. 519–530.
- Scheres S.H.W. // J. Mol. Biol. 2012. V. 415. № 2. P. 406–418.
- Chen S., McMullan G., Faruqi A.R., Murshudov G.N., Short J.M., Scheres S.H.W., Henderson R. // Ultramicroscopy. 2013. V. 135. P. 24–35.
- Rosenthal P.B., Henderson R. // J. Mol. Biol. 2003. V. 333. № 4. P. 721–745.
- Scheres S.H.W. // Methods in Enzymology. 2016. V. 579. P. 125–157.
- Ludtke S.J. // Methods in Enzymology. 2016. V. 579. P. 159–189.
- Hirschi M., Herzik M.A., Wie J., Suo Y., Borschel W.F., Ren D., Lander G.C., Lee S.Y. // Nature. 2017. V. 550. № 7676.
- Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A., Pannu N.S.,

- Steiner R.A., Nicholls R.A., Winn M.D., Long F., Vagin A.A.
// *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2011. V. 67. № 4.
P. 355–367.
26. Wood C., Burnley T., Patwardhan A., Scheres S., Topf
M., Roseman A., Winn M. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol.
Crystallogr.* 2015. V. 71. P. 123–126.
27. Brown A., Long F., Nicholls R.A., Toots J., Emsley P.,
Murshudov G. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*
2015. V. 71. P. 136–153.
28. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. // *Acta
Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. № 4. P. 486–
501.
29. Chen V.B., Arendall W.B., Headd J.J., Keedy D.A.,
Immormino R.M., Kapral G.J., Murray L.W., Richardson J.S.,
Richardson D.C. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*
2010. V. 66. № 1. P. 12–21.
30. Krissinel E., Henrick K. // *Acta Crystallogr. Sect. D.* 2004.
V. 60. № 12-1. P. 2256–2268.
31. Vilas J.L., Gómez-Blanco J., Conesa P., Melero R., Miguel de
la Rosa-Trevín J., Otón J., Cuenca J., Marabini R., Carazo J.M.,
Vargas J., et al. // *Structure.* 2018. V. 26. № 2. P. 337–344. e4.