

УДК 57.086.3:537.533.33

О.В. Градов^{1*}, М.А. Градова²

Криоэлектронная микроскопия как инструмент системной биологии, структурного анализа и экспериментального воздействия на клетки. Комплексный аналитический обзор новейших работ

UDC 57.086.3:537.533.33

O.V. Gradov^{1*}, M.A. Gradova²

Cryo-electron Microscopy as a Functional Instrument for Systems Biology, Structural Analysis and Experimental Manipulations with Living Cells. A Comprehensive Analytical Review of the Current Works

Реферат: Целью настоящей работы является демонстрация нового взгляда на криоэлектронную микроскопию биологических структур как на простой многофакторный инструмент системной биологии, допускающий применение его для ультраструктурного позиционно-чувствительного и динамического анализа в молекулярной цитоморфологии и смежных дисциплинах. Рассматриваются различные методы криоэлектронной аналитики и соответствующие системно-биологические интерпретации, систематизация которых может быть полезна для начальной постановки прогрессивных задач при исследованиях данными методами и последующей обработке полученных результатов. Показано, что системность методологии криоэлектронной микроскопии напрямую коррелирует с системностью и многопараметрическим характером её аналитов в рамках системной биологии. Приводятся данные по использованию криоэлектронной микроскопии в микроструктурной обработке и микроманипуляциях на клетках (т. н. *micromachining*), а также в разработке молекулярных машин. Приведенные в настоящем аналитическом обзоре сведения основаны на данных криоэлектронной микроскопии последних лет.

Ключевые слова: криоэлектронная микроскопия, криоэлектронная томография, системная биология, локаломика, динамомика, структурный анализ, *in silico*, микромашининг.

Реферат: Метою даної роботи є демонстрація нового погляду на криоелектронну мікроскопію біологічних структур як на простий багатофакторний інструмент системної біології, який допускає застосування його для ультраструктурного позиційно-чутливого, а також динамічного аналізу в молекулярній цитоморфології та суміжних дисциплінах. Розглядаються різні методи криоелектронної аналітики та відповідні системно-біологічні інтерпретації, систематизація яких може бути корисною для початкової постановки прогресивних задач під час досліджень цими методами та наступної обробки отриманих результатів. Показано, що системність методології криоелектронної мікроскопії прямо кореспондує зі системністю та багатопараметричним характером її аналітів у рамках системної біології. Наведено дані щодо використання криоелектронної мікроскопії у мікроструктурній обробці та микроманипуляціях на клітинах (т. зв. *micromachining*), а також у розробці молекулярних машин. У цьому аналітичному обзорі наведено відомості на основі даних криоелектронної мікроскопії останніх років.

Ключові слова: криоелектронна мікроскопія, криоелектронна томографія, системна біологія, локаломіка, динаміка, структурний аналіз, *in silico*, мікромашинінг.

Abstract: The aim of this paper is to give an introductory review of the cryo-electron microscopy as a complex data source for most of the system biology branches, including the most perspective non-local approaches known as localomics and dynamomics. A brief summary of various cryo-electron microscopy methods and corresponding system biological approaches is given in the text. The above classification can be considered as a useful framework for the primary comprehensions about cryo-electron microscopy aims and instrumental tools. We do not discuss any of these concepts in details, but merely point out that their methodological complexity follows only from the structure-functional complexity of biological systems which are investigated in this manner. We also postulate that one can employ some of the cryo-electron microscopic techniques not only for observation, but also for modification and structural refunctionalization of some biological and similar soft matter objects and microscopic samples. In other words, we start with the cryoelectron microscopy as a tool for the system biology and progress to its applying as an instrument for system biology and functional biomimetics. All these conclusions can be deduced from the most recent works of the latest years.

Key words: cryo-electron microscopy, cryo-electron tomography, system biology, localomics, dynamomics, micromachining, structural analysis, *in silico*, molecular machines.

¹Институт энергетических проблем химической физики РАН, г. Москва, Российская Федерация

²Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, г. Москва, Российская Федерация

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: Ленинский пр-т, д. 38, кв. 2, г. Москва, Российская Федерация, 119334 В-334; тел.: (+7 915) 492-29-43, электронная почта: o.v.gradov@gmail.com

Поступила 20.01.2014

Принята в печать 26.02.2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т.24, №3. – С. 193–211. © 2014 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

¹Institute for Energy Problems of Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

²N.N. Semenov Institute of Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

*To whom correspondence should be addressed: 38/2 Leninsky prospect, Moscow, Russian Federation 119334 В-334. Tel.: +7 915 492 2943; e-mail: o.v.gradov@gmail.com

Received January, 20, 2014

Accepted February, 26, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014. 24(3): 193–211.

© 2014 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Технологические возможности криоэлектронной микроскопии

Возникшая более 30 лет назад [31] криоэлектронная микроскопия сейчас является одним из наиболее функциональных методов исследования живого вещества и его физиолого-биохимических изменений на различных иерархических уровнях, начиная от морфологии крупных клеток млекопитающих [108] и заканчивая наноструктурами [69] и структурой биомолекул, воспроизводимой с разрешением, близким к атомарному [19], т. е. фактически в полноатомном «исполнении» [72]. В новейших работах с использованием криоэлектронной микроскопической техники было достигнуто полезное разрешение до единиц ангстрем [12, 71, 130], а в трехмерном воспроизведении – порядка единиц нанометров (2–5 нм) [29]. На данный момент структурными методами криоэлектронной микроскопии исследовано множество супрамолекулярных структур, комплексов: от достаточно хорошо изученных фибриллярных структур коллагена [92], инфрафлагеллярных комплексов простейших [91], тубулина микротрубочек [125] и ряда других нитевидных и фибриллярных структур массой порядка гигадалтон [101] до таких достаточно тонких элементов биологической машинерии, как рибосомальные комплексы (например, при транслокации и котрансляционном фолдинге [62]), элементы вторичной [95] и супервторичной структуры белков [7], а также конформационные эффекты в молекулярных механизмах их фолдинга [25] и механизмах экспрессии в комплексах кодирующих семантид [109] (в терминах Цукеркандла-Полинга [133]). Кроме обычной криоэлектронной микроскопии, в структурном анализе и, в частности, при определении вторичной структуры белков используется ее прецизионный трехмерный аналог – криоэлектронная томография [9], имеющая, помимо молекулярного уровня применимости, большой масштаб-диапазон визуализируемых размеров структур, включая полноклеточные отображения [88] и анализ «наноразмерной» цитофизиологической ультраструктуры (наноимэджинг) [63]. Кроме того, существует смежный метод криотомографии – рентгеновская томография с охлаждением под высоким давлением [123], позволяющая добиваться приблизительно такого же метрологического качества.

Алгоритмические средства криоэлектронной микроскопии

Необходимо отметить, что сверхвысокая точность измерений требует применения математического аппарата и алгоритмической обработки высокого уровня: даже так называемые «прямые»

Technical applications of cryoelectron microscopy

Since its development in early 1980s [31] cryoelectron microscopy has become one of the most functional research methods providing the study of physiological and biochemical changes in living matter at various hierarchical levels from single mammalian cell morphology [108] to nanostructures [69] and even the structure of biomacromolecules with a near-atomic resolution [19], *i.e.* at an all-atom configuration reconstruction [72]. In recent papers the cryo-electron microscopic techniques were reported to achieve the effective resolution up to several angstroms [12, 71, 130] and about 2–5 nm in a 3D representation [29]. To date the structural methods of cryo-electron microscopy have been involved in characterization of a number of supramolecular structures and complexes: from the well-studied fibrillar collagen structures [92], intraflagellar transport complexes of protozoa [91], tubulin in microtubules [125] and some other fibrillar and filamentous structures with the relative molecular weight of about gigadalton [101] up to such subtle elements of biological machinery as ribosomal complexes (*e.g.* those involved in cotranslational folding and translocation [62]), elements of secondary [95] and supersecondary protein structure [7], as well as the conformational effects in molecular mechanisms of their folding [25] and the mechanisms of expression in the complexes of encoding semantides [109] (in terms of Zuckerkandl and Pauling [133]). In addition to the conventional cryo-electron microscopy, modern structural analysis, particularly the determination of the protein secondary structure, requires the use of its precision 3D analog, the cryo-electron tomography [9], which enables structure visualization at a wide scale/range of sizes, including the all-atom mapping [88] and a nanoscale cytophysiological ultrastructure analysis (so-called nanoimaging [63]). There is also an inherently close method of cryo-tomography, the X-ray tomography with cooling under high pressure [123], which demonstrates approximately the same metrological characteristics.

Algorithmic tools for cryo-electron microscopy

It is noteworthy that the ultra-high measurement accuracy requires the use of advanced mathematical apparatus and algorithmic processing: even the so-called direct methods of improving the image quality in cryo-electron microscopy are implemented only through the optimization of the number of summed and corresponding files with the unary cryo-electron micrographs [46, 65]. This procedure involves a significant amount of computer time and robust high-performance mathematical processing systems. The modern trend



методы улучшения качества в криоэлектронной микроскопии реализуются исключительно путем оптимизации количества суммируемых и сопоставляемых друг с другом файлов с записью унарных криоэлектронных микрофотографий [65, 46]. Это требует существенных затрат машинного времени и робастных высокопроизводительных систем математической обработки: аппаратный аспект такой обработки смещен в сторону CUDA-технологий с применением видеокарт или графических процессоров, обеспечивающих повышение производительности вычислений [52], в то время как для программного анализа данных криоэлектронной микроскопии, помимо стандартных принципов машинного обучения при распознавании образов [85, 105], приходится использовать нижеследующие подходы: 1) гибкие варианты подгонки параметров, например фитирование (от англ. *fitting*), достигаемые путем переобучения в ходе поиска экстремумов [3]; 2) вероятностные байесовские подходы в криоэлектронном структурном анализе [97]; 3) алгоритмы субтомографического анализа и усреднения в криоэлектронной томографии [15, 54]; 4) айген-анализ с поиском айген-векторов (собственных векторов, преобразования которых дают коллинеарные векторы, т. е. векторы, умноженные на скалярное значение собственных чисел, называемые айген-значением) для классификаций криоэлектронных изображений по угловым характеристикам [106]; 5) вейвлетные методы с использованием многомерных функций и структур Теплица [115] и т.д.

Кроме указанных, широко используются обычные методы структурно-химического профилирования («ультрамалоугловая криоэлектронная микротомия») [45] и другие им подобные методы, лежащие в основе подходов CEDX – количественной криоаналитической сканирующей электронной микроскопии [78]. Иначе говоря, методы современной криоэлектронной микроскопии – это в большей степени автоматизированная интерпретация и обработка данных, чем, собственно, их получение.

Этот факт можно пояснить иллюстративно, пользуясь данными М. Stowell из Colorado University. Из рис. 1 видно, что даже эквивалентные по биолого-морфометрическим характеристикам структуры могут иметь высокую дисперсию геометрических характеристик, а в случае различных итераций математико-статистической расшифровки данных исследователь ожидаемо получает различные морфологии (и даже топологии – по числу связности!) реконструируемого объекта. Динамика увеличения точности измерений и морфологической детализации в реконструкции структур с 1990

in the hardware for such a processing places a special emphasis on the CUDA technologies using video cards/graphics processing units (GPUs) providing the improvement of calculations [52], while for the purposes of data processing in cryo-electron microscopy in addition to the standard principles of machine learning in the pattern recognition [85, 105] the following approaches are useful to be applied: 1) flexible variants of the parameter fitting achieved by retraining during the search for extremes [3]; 2) Bayesian probabilistic approaches in cryo-electron structural analysis [97]; 3) algorithms of subtomogram analysis and averaging in cryo-electron tomography [15, 54]; 4) eigen analysis with the search for eigenvectors in order to enable classification of the cryoelectron images upon their angular characteristics [106]; 5) wavelet methods using multivariate functions and the Toeplitz structures [115], *etc.*

Except the above mentioned methods there is also a number of widely used conventional methods of structural and chemical profiling (*e.g.* ‘cryo-ultra-low-angle microtomy’) [45] and other similar methods, underlying the CEDX (quantitative cryo-analytical scanning electron microscopy) approaches [78]. In other words, modern cryo-electron microscopic techniques are mostly automated data processing and interpretation methods, rather than data acquisition tools.

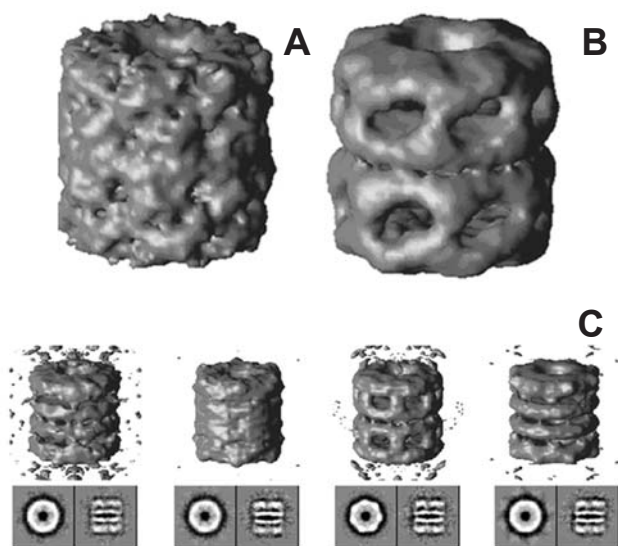
The above statement can be illustrated using the data provided by M. Stowell from the Colorado University. Fig. 1 shows that even the similar structures with the equivalent morphometric parameters can demonstrate a high dispersion of geometrical characteristics, and in the case of different iterations of the mathematical and statistical data processing one can expect to obtain different morphologies and even different topologies (according to the number of connections) of the object under 3D reconstruction. The dynamics of an increase in accuracy of the measurements and morphological reconstructions from 1990 to 2000 was demonstrated by J. Frank in 2006 (Fig. 2), which might be attributed to the improvement of the mathematical data processing methods. Thus, it is clear that the ambiguity of the structures’ morphology after reconstruction in cryo-electron microscopy and tomography is characterized not only by quantitative (morphometric), but also by qualitative (geometric and topological) transformations.

Moreover, an ambiguous data interpretation in cryo-electron microscopic structure analysis necessitates the use of various mathematical models which determine the morphostructural representation of the result obtained, *i.e.* the above models may be one-to-one corresponded to the methods of data processing. Thus, there are several reports on cryo-electron microscopy using molecular dynamics simulations corres-



Рис. 1. Различия морфологических и топологических характеристик реконструкций структур в зависимости от параметров цифровой обработки и дисперсии в морфометрии выборки объектов. Одна и та же структура в первой (А) и третьей (В) итерациях цифровой реконструкции; С – четыре различные версии реконструируемой в 3D структуры, полученные при обработке данных криоэлектронной микроскопии, зависят не только от выборки исходных данных, но и от процедур цифровой обработки (M. Stowell, MCDDB B231). Изображения приводятся с разрешения автора.

Fig. 1. The difference in morphological and topological characteristics of the structures under reconstruction depending on the digital processing parameters and the dispersion of the sample morphometry. The same structure at the first (A) and third (B) iterations of digital reconstruction; C – four different variants of 3D reconstruction in cryo-electron microscopic data processing, which depend both on the dataset size and the digital processing procedures (M. Stowell, MCDDB B231). The figures are published by the courtesy of the author.



по 2000 гг. продемонстрирована J. Frank в 2006 г. (рис. 2), что также можно связать с улучшением математической обработки данных. Таким образом, на практике очевидно, что неоднозначность морфологии реконструируемых структур в криоэлектронной микроскопии и томографии характеризуется не только количественными, но и качественными переходами (т. е. не только морфометрическими, но и геометрическими или топологическими).

Более того, вследствие получения неоднозначно интерпретируемых данных структурный анализ при криоэлектронной микроскопии требует использования различных математических моделей, от выбора которых зависит морфоструктурная репрезентация получаемого результата, т. е. формируемые модели могут быть однозначно соотносены с методами обработки данных. Так, существуют работы по криоэлектронной микроскопии с моделированием методами молекулярной динамики, сопоставимыми с гибкими методами фитирования [23]; псевдоатомные модели, сопоставимые разным способом расшифровки полноатомного структурного анализа при работе на ангстремном разрешении [84]; вероятностные трехмерные модели одиночных частиц, сопоставимые вероятностным (отчасти, байесовским) методам обработки данных [35] и т. д. Моделирование должно учитывать или выводить *ab initio* как характеристики образца (например, его сольватной оболочки или гидратного слоя [100]), так и симуляцию шумов и коррекцию метрологического дрейфа показаний [102] при описании процесса фиксации изображений [116]. По мере вхождения модельной интерпретации в тренд расшифровки результатов криоэлект-

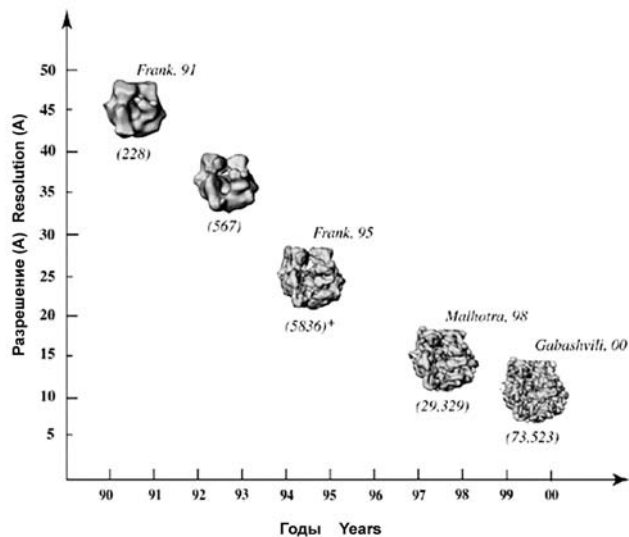


Рис. 2. Точность детализации формы реконструируемых методами криоэлектронной томографии структур в зависимости от года сбора и обработки данных, а также соответствующего уровня разрешения и дискретности цифровых вычислений. Фигуры приводятся с любезного разрешения проф. Joachim Frank (CryoEM: L. Biophys. Chem., 2006).

Fig. 2. Accuracy of the structure detalization during 3D reconstruction in cryo-electron tomography depending on year of data collection and processing, as well as on the corresponding resolution level and the discreteness of the digital calculations. The figures are published by the permission of Prof. Frank (CryoEM: L. Biophys. Chem., 2006).

ponding to flexible fitting methods [23]; pseudoatomic models corresponding to various approaches to the interpretation of full-atom structural analysis data on the angstrom resolution [84]; probabilistic 3D models of single particles, corresponding to the probabilistic (partly Bayesian) methods of data processing [35], etc.



ронной микроскопии [76] растет сопряжение между моделированием, докингом (в рус. биохим. жарг. «стыковка», т. е. подбор наиболее выгодной для сборки устойчивого комплекса ориентации молекул) и фитирование полноатомных биомолекулярных структур в трехмерном картировании [4] (рис. 3), включающее в себя подходы и алгоритмы так называемого циклического или, иначе говоря, итерационного рефайнмента (рис. 4, 5) [127].

Криоэлектронная микроскопия как инструмент системной биологии

Можно заключить, что метод криоэлектронной микроскопии, равно как и криоэлектронной томографии, совмещают принципы системно-биологического компьютерного и структурно-биологического анализов *in silico*, *ex vivo* [81] и *in situ* [75]. Действительно, из множества структурно-биологических «-омик», т. е. дисциплин, системно изучающих отдельные классы органических химических веществ в соответствии с их биологической ролью, криоэлектронная микроскопия и электронная криотомография способны работать практически со всеми классами, причем в наиболее информативном и полностью отражающем изучаемую структуру варианте – в динамическом и объемном, что в корреляционной микроскопии часто называют *localomics microscopy* и *dynamomics* (по классификации Дж. Паркинсона). Речь идет не только об изучении разных фаз развития или жизненных циклов отдельных объектов [80], но и о картировании ряда характеристик динамики молекул в ансамбле, визуализируемых с использованием метода максимального правдоподобия [120], корреляционной микроскопии для 3D – структурного анализа динамики взаимодействий в клетке с применением криоэлектронной томографии [59] и так называемой четырехмерной криоэлектронной микроскопии белков [37]. Кроме того, если говорить об иммуномике [16, 112], то, учитывая традиционную применимость синхронной цейтраферной кинематографической техники в иммуноэлектронной микроскопии [8], рационально признать допустимость динамических криоэлектронных измерений в криоиммуноэлектронной микроскопии [89], что одновременно позволит избавиться от артефактов «смазывания» изображения, используя предшествующие кадры развертки как опорные («референсные») для восстановления формы объекта [18].

Имеет смысл привести еще несколько иллюстраций применимости криоэлектронной микроскопии как многофакторного инструмента системной биологии. Прежде всего речь идет об исследова-

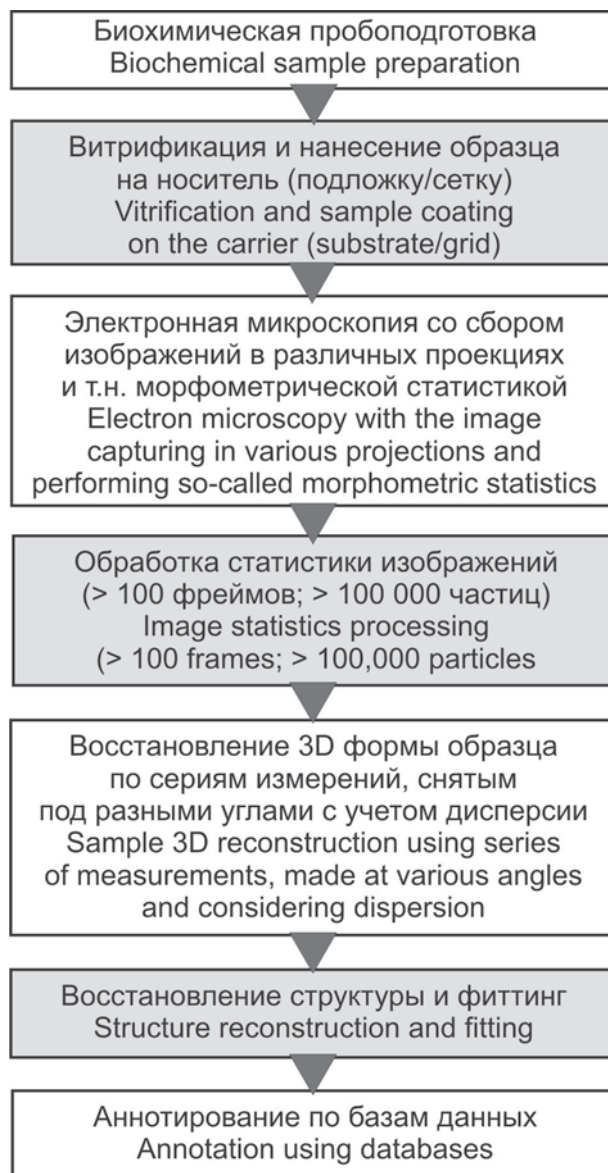


Рис. 3. Общая структура технологии криоэлектронно-микроскопического 3D-анализа.

Fig. 3. Schematic structure of the 3D cryo-electron microscopic analysis technique.

The simulation process should consider or derive *ab initio* the sample characteristics (namely, its solvation shell or a hydration layer [100]), as well as the noise simulation and the correction of the metrological readings drift [102] considering the process of image capturing [116]. With the increasing role of the model interpretation in cryo-EM data processing [76] there is a significant increase in the level of conjugation between modeling, docking (selection of the most favorable molecular orientation for the stable complex formation) and fitting of the full-atomic biomolecular structures in 3D mapping [4] (see Fig. 3), including the approaches and algorithms of the so-called cyclic or iterative refinement (see Fig. 4, 5) [127].

ниях в области мембраномики и виромтики. Ультраструктурные исследования мембраномов [103] с использованием криоэлектронной микроскопии [70] (несмотря на липидный/фосфолипидный состав анализируемых мембран [26], изучаемых в рамках классической липидологии) не могут быть напрямую отнесены к компетенции липидомтики и фосфолипидомтики [68, 124], равно как и к липопротеомике [53] (несмотря на возможность криоэлектронно-микроскопического анализа липопротеидных структур [128] и мембранных белков [33]), поскольку рассматривают больше ультраструктурный морфофизиологический уровень организации, чем непосредственный химизм образца. Помимо указанного приложения к объектам, входящим в компетенцию мембраномтики, криоэлектронная микроскопия и томография включают исследования мембранных цитоплазматических органелл [28, 50], в том числе эндосом и аутофагосом, участвующих в рециркуляции мембранного материала и его рециклизации как морфофункционального целого [32]. С точки зрения компьютерной липидомтики [38], учитывающей динамические изменения в липидном составе мембраны в процессе проведения сигнала, принципиально значимой проблематикой, успешно решаемой лишь криоэлектронными методами, является определение полезной нагрузки нановезикулярных переносимых образований и клатриновых пузырьков в функциональной активности мозга [51]. Исследования в области системно-биологической и прикладной виромтики [77] также не могут быть сведены к обычной вирусной геномике [60] в силу фокусирования на структурном аспекте интерпретации данных криоэлектронной микроскопии и конвенционных методов [22]. Так, делается акцент на строении вирусных комплексов с экзогенными факторами, такими как мембранный белок DAF [127], конформационных изменениях полиовирусных антигенов [74], структурном анализе капсид [131], субвирусных частиц в мембранах [44] и полноценных вирусных частиц [2], а также исследованиях их структурно-биохимической аффинности с использованием специфически-селективных решеток [61]. В то же время в ходе таких исследований генетический аспект вирусного строения не рассматривается, из чего следует их несводимость к структурной геномике. Иначе говоря, существуют особые области применимости криоэлектронной микроскопии в системной биологии, для которых не может быть найдено более специфически пригодного инструмента аналитики, чем мультипараметрическая расшифровка данных криоэлектронной микроскопии на ЭВМ. Исходя из этого системность множеств отраслей,

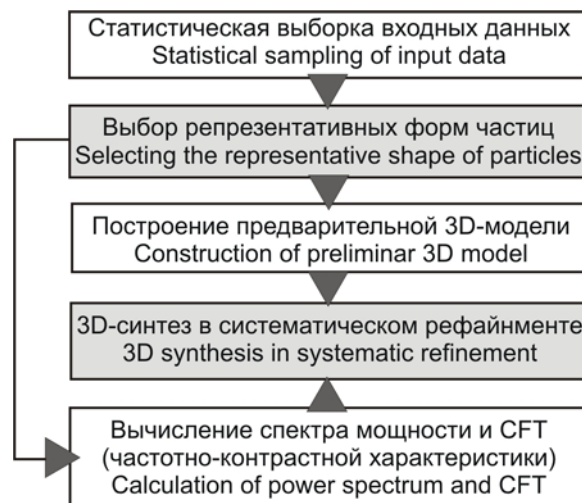


Рис. 4. Структура процесса реконструкции с петлей обратной связи (т.н. рефайнмент, от англ. *refinement*).

Fig. 4. Scheme of the reconstruction process with the feedback loop (so-called 'refinement').

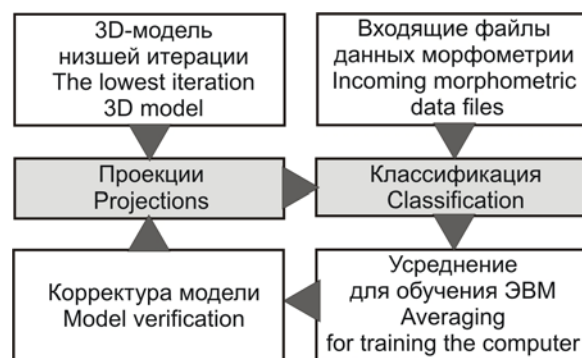


Рис. 5. Верификация структуры в процессе циклического (итеративного) рефайнмента.

Fig. 5. Structure verification during the cyclic (iterative) refinement process.

Cryo-electron microscopy as a tool for systems biology

Cryo-electron microscopy, as well as cryo-electron tomography combine the principles of the computer systems-biological and structural-biological analyses *in silico*, *ex vivo* [81] and *in situ* [75]. Actually, among the numerous structural-biological '-omics', *i. e.* disciplines systematically studying individual classes of organic compounds in accordance with their biological role, cryo-electron microscopy and cryo-electron tomography can provide comprehensive 3D dynamical structural information about almost all of them, that in correlation microscopy is often called 'localomics microscopy' and 'dynamics' (according to the classification of J. Parkinson). These methods allow to study not only the different development phases or life cycles of individual biological objects [80], but also to perform



в рамках которых ставится задача, взаимно обуславливает существование системности изучаемых параметров.

Многофакторная взаимная верификация как другая сторона системности

Для подтверждения системности описываемого подхода нужно продемонстрировать совместимость криоэлектронной микроскопии со смежными методами структурного анализа с целью «кросс-валидации» их результатов при сопоставлении с данными криоэлектронного метода и наоборот [36]. В качестве примеров такого сопоставления, проводимого в рамках единой работы, можно представить корреляции результатов криоэлектронной и оптической микроскопии [14, 129], гибридизацию криоэлектронной микроскопии с флуоресцентными методиками [57, 96], а также Рамановской спектроскопией на установках лазерного захвата (лазерных пинцетах) [110]. Можно также указать на сопоставимость данных криоэлектронной микроскопии как тонкого структурного метода с данными альтернативных видов структурного анализа (таких как малоугловое рассеяние нейтронов [11]) и спектроскопическими методами, имеющими значение для определения молекулярной / надмолекулярной структуры.

Криоэлектронная микроскопия как инструмент структурной микрообработки

Работа с микроскопируемым биологическим образцом на уровне самого электронного разрешения обеспечивает возможность обработки его электронным или ионным пучком *in situ*, как это было сделано в недавно опубликованной работе, описывающей воздействие сфокусированного ионного микропучка (*focused ion beam micromachining*) на эукариотические клетки (*Dictyostelium discoideum*) при криоэлектронной томографии [93]. Основным трендом данного подхода является схема эксперимента, при которой совместно производится имэджинг (формирование изображения) и *micromachining* (воздействие пучком) [94], а перспективы такого сопряжения дают возможность создавать молекулярные машины (как миметики молекулярной машинерии клетки [34]) и производить исследовательские манипуляции с ними с использованием криоэлектронной микроскопии [27, 39]. Эти контролируемые микроманипуляции становятся возможными благодаря тому, что учет иницированной пучками частиц микромасштабной подвижности структур на разрешении, близком к атомному, уже достигнут в криоэлектронной микроскопии [73], то есть имеется возможность внедрения обратной связи между системами ре-

direct mapping of several characteristics of the molecule dynamics in molecular assemblies, visualized using the maximum-likelihood method [120], correlation microscopy for 3D structural analysis of the intracellular dynamic interactions using cryo-electron tomography [59] and a so-called '4D cryo-electron microscopy of proteins' [37]. Furthermore, in immunomics [16, 112], considering the traditional use of a synchronous time-lapse cinematographic equipment in immuno-electron microscopy [8], it is reasonable to introduce dynamic cryo-electron measurements into cryo-immuno-electron microscopy [89], which at the same time will allow to avoid the image 'blurring' artifacts by using the previous frames as the references for the reconstruction of the object shape and structure [18].

It would be also useful to consider some more examples illustrating the applicability of cryo-electron microscopy as a multivariate instrument in systems biology. First of all, it concerns the investigations in membranomics and viromics. Ultrastructural studies of membranomes [103] using cryo-electron microscopy [70] (despite the lipid/phospholipid composition of the membranes [26], studied in the framework of classical lipidology) can not be directly attributed to the area of lipidomics or phospholipidomics [68, 124], as well as lipoproteomics [53] (although it is possible to perform cryo-electron microscopic analysis of the lipoprotein structures [128] and membrane proteins [33]), since they predominantly consider the ultrastructural morphophysiological level of organization rather than the chemical composition of the sample. In addition to the applicability in membranomics, cryo-electron microscopy and tomography allow the study of membranous cytoplasmic organelles [28, 50], including endosomes and autophagosomes involved in the recycling of the membrane material and its recyclization as a whole [32]. From the standpoint of computer lipidomics [38], concerning the dynamic changes in the membrane lipid content under signal transduction, of great significance is the problem of determination of the payload in the transport nanovesicles and clathrin-coated vesicles in the brain functional activity, successfully performed by cryo-electron tomography [51]. Current research in the field of system-biological and applied viromics [77] also can not be reduced to a common viral genomics [60] due to the main focus on the structural aspects of data interpretation in cryo-electron microscopy, tomography and similar conventional methods [22]. Emphasis is placed on the structure of the viral complexes with exogenous factors, such as the membrane protein DAF [127], conformational shift in a poliovirus antigen [74], capsid structural analysis [131], subvirus particles in membranes [44] and the entire virus particles [2], as well as on the studies of structural and biochemical affinity using specific



гистрации и регулирования воздействий микропучком. Существенных ограничений по составу ни у криоэлектронной микроскопии, ни у методов, формируемых на ее основе, не имеется. Исследованию могут быть подвержены как органические биологические структуры, так и объекты биоминерализации и биомиметики – магнетосомы [1], цвиттерионные системы абиогенного и небиологического происхождения, такие как бинарные сурфактанты [86] и т. д., в связи с чем ограничений по составу структур, формируемых под криогенным электронно-микроскопическим воздействием также, очевидно, не существует.

Картирование распределений и визуализация дескрипторов в феномах

Следствием системно-биологического подхода в криоэлектронной микроскопии и отсутствия деления на соответствующие по химизму классы продуктов микрообработки и микроструктурирования (*micromachining*), выполняемого с ее использованием, должна быть возможность картирования и получения качественных распределений разнообразных аналитов как относящихся к компетенции тех или иных отраслей системной биологии или «-омик» [5], так и неспецифических. На данный момент в качестве визуализирующих агентов для криоэлектронной микроскопии применяются множественные синтетические агенты биохимического и небиологического плана [13, 87], но даже в типично биологических и биомиметических исследованиях цель совмещенного структурно-химического анализа ведет к задаче неразрушающего контроля – визуализации ультраструктуры без модифицирующих ее химизм специфических меток-маркеров [43].

Картирование (*mapping*) может быть осуществлено в отсутствие внешних контрастирующих и визуализирующих агентов – по экстинкционной (электронная или оптическая плотность) характеристике с применением резольвометрии и выдачей количественных данных в численной форме [64] с использованием валидации на модельных выкладках [30]. При этом так как одиночные значения без учета контекстной цифровой информации не являются достаточными с метрологических позиций [20], целью соотносительного картирования (с принятием некоторых точек за опорные по плотности) может являться анализ локальных вариаций электронной плотности образца (и, как следствие, оптической плотности изображения) и градиентов распределения, сбор данных о которых для ряда задач (в частности – анализа структуры белка по криокартам с использованием гибких методов подгонки [90]) может быть автомати-

selective affinity grids [61]. The above studies do not concern the genetic aspects of the viral structure, hence they can not be reduced to the structural genomics. In other words, there are specific areas of application for cryo-electron microscopy in systems biology, which fail to find a more suitable analytical tool than cryo-electron microscopy with further multiparametric (multivariate) data interpretation on a computer. Therefore, the complexity of many areas concerning the problem under investigation determines the complexity of the parameters studied.

Multiparametric cross-verification as a consequence of the complexity

To confirm the systems nature of the approach proposed it is necessary to demonstrate the compatibility of cryo-electron microscopy with the other methods of structural analysis in order to provide a comparative cross-validation of the results obtained [36]. Let us consider such an approach with reference to the comparative studies using cryo-electron and optical microscopy [14, 129], hybridization of cryo-electron microscopy with fluorescent techniques [57, 96] and Raman microspectroscopy with laser tweezers [110]. It is also noteworthy that cryo-electron microscopic data should be comparable with the results of other fine methods of structural analysis, such as small-angle neutron scattering [11] and spectrochemical methods important in the determination of molecular/supramolecular structure.

Cryo-electron microscopy as a tool for structural micromachining

Structural analysis of a biological sample at the electron microscope resolution provides its electron or ion beam micromachining *in situ*, as reported in a recent paper describing the focused ion beam micromachining of the eukaryotic cells (*Dictyostelium discoideum*) under cryo-electron tomography [93]. The major trend of this approach is experimental scheme which allows a simultaneous imaging and micromachining [94], and the prospects of such a hybridization make it possible to design molecular machines (mimetics for molecular cell machinery [34]) and perform various research manipulations with them using cryo-electron microscopy [27, 39]. Such controlled micro-manipulations become possible due to the fact that the registration of the particle beam-induced microscale structure mobility at a near-atomic resolution has already been achieved in cryo-electron microscopy [73], providing a feedback between the registration systems and the controller of the microbeam impact. Neither cryo-electron microscopy itself, nor the similar methods based on it poses significant restrictions on the chemical composition of the samples. Both organic biological structures and



зирова́н и частично делегирован вычислительным машинам, подключенным к сетевым серверам, на которых располагаются базы данных с библиотеками для идентификации.

Существует ли альтернатива целевому картированию и контрасту?

Также как и в случае конфокальной микроскопии, в которой при отсутствии метки с флуоресцентными свойствами для некоторого локализованного в клетке анализа можно использовать нефлуоресцентный тип регистрации, основанный на собственных свойствах объекта и пучка (например, дифференциальный интерференционный контраст), в криоэлектронной микроскопии существуют методы достижения визуализации объектов, неоптимальных для криоэлектронного наблюдения. Это, прежде всего, фазовый контраст по Цернике, используемый как в криоэлектронной микроскопии, так и в криоэлектронной томографии [41, 118], либо аналогичный результат, который можно получить на замороженных водосодержащих биологических структурах с использованием фазовой пластинки Берша [10, 117]. Следует отметить, что схожим образом фазовый контраст Цернике достигается в рентгеновском криомикроскопе [121], визуализация микрообъектов и в том, и в другом случае приводит к математически-подобным результатам и может быть обработана с помощью компьютерных алгоритмов, аналогичных тем, что используются для результатов регистрации конфокальных «томографических» изображений различных масштабов в видимом, ультрафиолетовом, ближнем инфракрасном диапазонах [66, 67]. В таком случае при обработке необходимо не только избавляться от стандартных для криоэлектронной микроскопии и томографии артефактов цифровой регистрации [107], но и устранять мешающий контрасту ореол-размытие («блюринг») [83]. Для улучшения качества изображения также используют алгоритмы оценки дефокусирования и астигматизма через функцию передачи модуляции – частотно-контрастную характеристику [114] (*contrast transfer function (CTF)*), т. е. функция передачи контраста, оптическая передаточная функция), основываясь на анализе спектров мощности при помощи квадратурного фильтра, что напрямую связано с природой фазового контраста [132].

От системной к синтетической биологии через манипуляции в криосреде

Различного рода понижения четкости снижают аналитическое качество объемных изображений, получаемых в ходе криоэлектронной микроскопии, и, в конечном итоге, их эвристическую ценность и

biomineralized or biomimetic objects, the magnetosomes [1], and even non-biological zwitterionic systems such as binary surfactants [86] can be successfully studied by cryo-electron microscopy. Therefore, there are also no restrictions on the composition of the structures formed under cryogenic electron microscopic micromachining.

The analyte distribution mapping and the descriptor imaging in phenomes

A system-biological approach in cryo-electron microscopy together with the absence of the cryo-EM-micromachining and microstructuring product classification according to their chemical composition are expected to provide mapping and qualitative distribution of various analytes, both specific within the particular area of systems biology or ‘-omics’ [5] and nonspecific. To date, numerous synthetic compounds of either biochemical or non-biological nature are used as imaging agents in cryo-electron microscopy [13, 87], but even in pure biological and biomimetic research the main aim of the combined structural and chemical analysis is to perform non-destructive testing, *i.e.* ultrastructure visualization without any chemical modifiers and specific markers [43].

Meanwhile, the mapping procedure can be easily performed without any external imaging agents: according to the sample extinction parameters (electron or optical density) controlled by resolvometry with the quantitative data output in numerical form [64] using model validation [30]. Since the single values without considering the context digital information are insufficient from the metrological standpoint [20], the comparative mapping (which assumes several points as references in density) may be aimed at the analysis of the local sample electron density variations (and, hence, the image optical density) and distribution gradients. The corresponding data acquisition for some purposes (in particular, the protein structure analysis with cryo-EM maps using flexible fitting methods [90]) can be easily automated and partially delegated to the PC connected to the network servers with databases and libraries for the structure analysis and identification.

Are there any alternatives to the target mapping and contrast?

By analogy with the confocal microscopy which allows using a non-fluorescent imaging for intracellular components in the absence of fluorescent labels, based on the intrinsic properties of the sample and the light beam (*e.g.*, differential interference contrast), in cryo-electron microscopy there is a number of methods which allow the imaging of samples inappropriate for cryo-EM studies. One of them is Zernike phase contrast method which is used both in cryo-electron

точность позиционирования FIB (сфокусированного ионного пучка при модификации биообъектов под криоэлектронной фиксацией), в частности в методологии *cryo-FIB* (с криоэлектронной микроскопией на регистрирующей части экспериментальной установки) [119] и ее квинтэссенции – *cryo-FIB-SEM* [98]. Разработка качественных систем с синхронизацией регистрирования и модифицирования объектов хорошо совмещается с современным трендом на сопряжение системной биологии как аналитического подхода с обратным конструкционным подходом – синтетической биологией или же конструированием неких произвольных искусственных биоструктур. Так, анализ естественных структур (жгутиков или цилиарных структур протистов [17]) и полусинтетических (биохимических по составу, но созданных в условиях, далеких от нативных) объектов, таких как трехмерные кристаллы белков, выращенные в целях кристаллографического исследования [82], формирует базис для криоэлектронного объемно-морфологического анализа искусственных ДНК-оригами [6] и еще более функционально сложных искусственных модельных структур (например, искусственного синапса [43]). Несмотря на то, что в ряде подобных случаев в силу планарного 2D-характера объекта можно обойтись меньшей размерностью анализа (криоэлектронной микроскопией, а не криоэлектронной томографией) [58,126], как правило, повышение размерности на единицу увеличивает массив данных, а значит – информативность анализа качественно, на порядок, давая новые возможности для количественного анализа [113].

Перспективы методического упрощения и повсеместного внедрения метода

Вследствие перечисленных выше обстоятельств распространенность криоэлектронной микроскопии в ЕС, США, Японии и Китае, а также количество выполняемых с ее использованием исследований, непрерывно растет, многие технологические элементы соответствующих установок, как и основанные на их использовании методы конца прошлого века, вспоминаются только в ретроспективном контексте [111]. Речь в настоящее время идет о создании системной инфраструктуры для пользователей высокоразрешающей криоэлектронной микроскопии [104], разработке и внедрении новых технологических инструментов, таких, например, как техника самообеспечиваемой по давлению криофиксации *SPRF* (*self-pressurized rapid freezing*) [49]; портативные плунжеры, пригодные для криоэлектронной микроскопии, с возможностью работы с образцами, фиксированными

микроскопии и cryo-electron tomography [41, 118]. A similar result can be obtained using the frozen-hydrated biological samples with a Boersch phase plate [10, 117]. It should be noted that Zernike phase contrast is achieved in a similar way in X-ray cryomicroscopy [121], so the microparticle visualization in both cases leads to mathematically similar results and can be subjected to computer processing using the algorithms similar to those applied for the confocal ‘tomographic’ images of various scales in visible, ultraviolet and near-infrared spectral ranges [66, 67]. In this case during the image processing one needs not only to eliminate the digital registration artifacts obvious in cryo-electron microscopy and tomography [107], but also to avoid the beam-induced blurring reducing the image contrast [83]. The image quality can be also improved by using the algorithms of astigmatism and defocus estimation through the modulation transfer function – contrast transfer function (CTF) [114], based on the power spectra analysis with a quadrature filter, which is directly related to the nature of the phase contrast [132].

From systems to synthetic biology through cryo-electron micromachining

Various factors reducing the image clarity obviously reduce the analytical quality of the 3D cryo-EM images and the focused ion beam (FIB) positioning accuracy during the biological object modification under cryo-electron fixation, particularly in ‘cryo-FIB’ technique with cryo-EM registration [119] and its quintessence – ‘cryo-FIB-SEM’ [98]. The development of complex systems with a synchronized sample analysis and modification is expected within the modern tendency to the combination of the systems biology as an analytical approach with the reverse constructive approach - synthetic biology or the design of some arbitrary artificial biological/biomimetic structures. Thus, the analysis of natural biological structures (*e.g.* flagella and ciliary structures of the protozoa [17]) and semi-synthetic objects (those synthesized artificially from the biochemical components), such as 3D protein crystals for crystallographic studies [82], lays the foundation for cryo-electron 3D-morphological analysis of synthetic DNA-origami [6] and even more complex hybrid artificial structures, such as an artificial synaps [43]. Despite the fact that in some cases due to the planar 2D structure of the sample less dimensional analysis may be sufficient enough to obtain the morphological data (cryo-electron microscopy instead of cryo-tomography) [58, 126], the increase in the analysis dimension generally leads to the enlargement of the data amount, and hence, improves its heuristic value, providing new opportunities for the quantitative analysis [113].



в естественной среде [24], и ряд аппаратуры лабораторного сопряжения известного оборудования с криоэлектронными микроскопическими и томографическими системами. В последнем направлении прорывом стала разработка метода коррелятивной рентгеновской криогенной томографии в сочетании с оптической криомикроскопией и криоэлектронной микроскопией [21], используемого в лабораторных исследованиях в различных целях. Вследствие роста инфраструктуры и технико-методической доступности криоэлектронной технологии возникает потребность в популяризации всего комплекса подобных методов для биологов, медиков и других специалистов, непосредственно не связанных с криогенной или криоэлектронной микроскопией. В рамках удовлетворения данной потребности выпускаются статьи («праймеры») [79], конкретные рекомендации по организации рабочих потоков в случае сопряжения методов клеточного или тканевого анализа и модифицирования [55], отдельные молекулярно-биологические протоколы для анализа специфичных для разных «-омик» типов соединений посредством криоэлектронной микроскопии [42], методики подготовки решеток для фиксации препаратов в поле микроскопии [48], основанные на носящих комбинаторно-технологический характер апробациях различного типа составов и проб-подготовок. Реализуются задачи биологически неразрушающего анализа, безопасного как для самого предмета интереса, так и для его окружения, доступным и рациональным инструментом для осуществления которых являются малодозовые техники [40].

Выводы

Криоэлектронная микроскопия становится из экзотического вполне обычным методом биологических исследований (и, во многих случаях, биоинженерного ультраструктурного контроля), специализируемым под конкретные параметры исследовательской задачи. Достижимое на современном этапе улучшение качества изображения, пространственного разрешения и чувствительности имеет утилитарный характер [99] и не затрагивает физико-технических и инженерно-физических основ метода. Дополнение криоэлектронной микроскопии новыми осями, источниками и системами сбора данных [47] аналогично такому же процессу в микроскопии оптической, в которой возникают двух-, трех-, четырехобъективные многоосные системы, для которых увеличение размерности становится не инновацией, а нормой прогресса в сформировавшемся тренде количественного

The prospects of further development, simplification and implementation of the method

As a result of the above advantages the prevalence of cryo-electron microscopy in Europe, the USA, Japan and China, as well as the number of studies performed using cryo-EM has been continuously increasing recently, and most of the corresponding methods and setups developed at the end of the last century are retrospectively considered now [111]. Creating a system infrastructure for high-throughput high-resolution cryogenic electron microscopy [104], implementation of novel advanced analytical methods, such as self-pressurized rapid freezing (SPRF) technique [49]; design of portable plungers for intact cryo-electron microscopy sample preparation in natural environments [24] and development of hybrid instruments for complex structural analysis based on cryo-EM and cryo-tomographic techniques are among the most recent problems to be addressed in this area. A breakthrough in the above research was the development of correlative cryogenic X-ray tomography with cryo-light and electron microscopy [21]. As a result of the increasing infrastructure and technical availability of cryo-electron techniques there is a strong need in popularization of these methods for biologists, physicians and other specialists who are not directly engaged in working with cryogenic or cryoelectron microscopy. For this purpose there is a special kind of papers, the 'primers' [79] with specific recommendations on the organization of research work using combined methods of cell or tissue analysis and modification [55], individual molecular biological protocols for the analysis of particular compounds specific for different '-omics' by cryo-electron microscopy [42], guidelines for grid preparation for the sample fixation [48], based on the combinatorial testing of various sample compositions and preparations. Biological non-destructive analysis safe for both the sample and its environment using low dose techniques and cryo-electron microscopy has been also successfully performed [40].

Conclusions

Nowadays cryo-electron microscopy has become a routine method of biological research and ultrastructural control in bioengineering adapted for specific parameters under investigation. The already achieved image quality, spatial resolution and sensitivity is of applied character [99] and does not affect the physical, technical and engineering basis of the method. The introduction of additional axes, sources and data acquisition systems [47] to the basic construction is similar to the same process in optical microscopy, where the two-, three- and even four-objective multi-axis sys-



наращивания возможностей [56, 122]. Согласно частным сообщениям западных коллег, новые достижения могут быть связаны с изменением и варьированием среды нахождения образца, давления в камере, подборкой комбинаций форм детектирования и визуализации, энергетической оптимизацией установок и новыми робастными алгоритмами адаптивного управления манипуляциями. Также будут созданы сканирующие криогенные системы, выдающие результат развертки по иным переменным: криоскопические эквиваленты магнитных Лоренцевских микроскопов, которые позволят работать с магнетосомами на уровне картирования их фундаментальных характеристик; ускорительные «синхро-крио-микро-масс-спектрометры», которые позволят определять химизм образца *in situ* при получении данных о его структуре и манипуляциях с ним; аналоги сканирующей тепловой и термоэлектрической микроскопии, выполненные на градиентах термических и динамических свойств при пониженных температурах, которые позволят отличать живое от неживого на субмикронном размерном диапазоне (на относительно малых временах от начала препарирования образца) и т. д. Как одну из перспектив вышеуказанных конструктивных работ можно рассматривать задачу перевода криобиологии на супрамолекулярный уровень дискретизации ее исследований и системно-биологическое расширение круга задач, решаемых в рамках компетенции электронно-микроскопической криобиологии, за счет методов многофакторного биофизического скрининга.

Авторы выражают благодарность американским и европейским партнерам за активную дискуссию, предоставление текстов своих опубликованных и неопубликованных (in press) работ, а также за разрешение на использование оригинальных иллюстраций.

Литература

1. Abreu F., Sousa A.A., Aronova M.A. et al. Cryo-electron tomography of the magnetotactic vibrio *Magnetovibrio blakemorei*: insights into the biomineralization of prismatic magnetosomes // *Journ. Struct. Biol.* – 2013. – Vol. 181, №2. – P. 162–168.
2. Agirre J., Goret G., LeGoff M. et al. Cryo-electron microscopy reconstructions of triatoma virus particles: a clue to unravel genome delivery and capsid disassembly // *Journ. Gen. Virol.* – 2013. – Vol. 94. – P. 1058–1068.
3. Ahmed A., Whitford P.C., Sanbonmatsu K.Y., Tama F. Consensus among flexible fitting approaches improves the interpretation of cryo-EM data // *Journ. Struct. Biol.* – 2012. – Vol. 177, №2. – P. 561–570.

tems have recently emerged due to the progressive tendency of the image dimension increase providing a quantitative empowerment of the known method [56, 122]. According to private communications of the foreign colleagues, the new achievements in cryo-electron microscopy may be attributed to the variations of the sample environment, the chamber pressure, selection of useful combinations of detecting and imaging methods, the operation parameter optimization for the instrumentation and new robust algorithms of adaptive manipulation control. There is also a prospect of designing novel scanning cryogenic systems with the sweep output using alternative variables: cryoscopic analogs of Lorenzian magnetic microscopes capable of single magnetosome mapping; accelerator ‘synchro-cryo-micro-mass-spectrometers’ which allow to determine the sample composition *in situ* during its structure analysis and/or micromanipulations with it; functional analogs of scanning thermal and thermoelectric microscopy based on the gradients of thermal and dynamic properties under low temperatures, allowing to distinguish between the living and non-living objects on a submicron scale and at the relatively short time intervals from the start of the sample preparation), *etc.* One of the most promising prospects of the aforementioned research is to develop cryobiology at a supramolecular level and to expand the range of problems in systems biology addressed within the electron microscopic cryobiology using the methods of multivariate biophysical screening.

The authors are grateful to their colleagues from Europe and the USA for helpful discussions, providing the full texts of their papers (including the unpublished ones) and for their kind permission to use original illustrations in our review.

References

1. Abreu F., Sousa A.A., Aronova M.A. et al. Cryo-electron tomography of the magnetotactic vibrio *Magnetovibrio blakemorei*: insights into the biomineralization of prismatic magnetosomes. *Journ Struct Biol* 2013; 181(2): 162–168.
2. Agirre J., Goret G., LeGoff M. et al. Cryo-electron microscopy reconstructions of triatoma virus particles: a clue to unravel genome delivery and capsid disassembly. *Journ Gen Virol* 2013; 94: 1058–1068.
3. Ahmed A., Whitford P.C., Sanbonmatsu K.Y., Tama F. Consensus among flexible fitting approaches improves the interpretation of cryo-EM data. *Journ Struct Biol* 2012; 177(2): 561–570.
4. Allen G.S., Stokes D.L. Modeling, docking, and fitting of atomic structures to 3D maps from cryo-electron microscopy. *Meth Mol Biol* 2013; 955: 229–241.
5. Azuaje F. *Bioinformatics and Biomarker Discovery: "Omic" Data Analysis for Personalized Medicine*. Hoboken, New Jersey; 2010.



4. Allen G.S., Stokes D.L. Modeling, docking, and fitting of atomic structures to 3D maps from cryo-electron microscopy // *Meth. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 955. – P. 229–241.
5. Azuaje F. *Bioinformatics and Biomarker Discovery: «Omic» Data Analysis for Personalized Medicine.* – Hoboken, New Jersey, 2010. – 230 p.
6. Bai X.C., Martin T.G., Scheres S.H., Dietz H. Cryo-EM structure of a 3D DNA-origami object // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2012. – Vol. 109, №49. – P. 20012–20017.
7. Bajaj C., Goswami S., Zhang Q. Detection of secondary and supersecondary structures of proteins from cryo-electron microscopy // *Journ. Struc. Biol.* – 2012. – Vol. 177, №2 – P. 367–381.
8. Balfour B.M., Goscicka T., MacKenzie J.L. et al. Combined time-lapse cinematography and immuno-electron microscopy // *Anat. Rec.* – 1990. – Vol. 226, №4. – P. 509–514.
9. Bartesaghi A., Lecumberry F., Sapiro G., Subramaniam S. Protein secondary structure determination by constrained single-particle cryo-electron tomography // *Structure.* – 2012. – Vol. 20, №12. – P. 2003–2013.
10. Barton B., Rhinow D., Walter A. et al. In-focus electron microscopy of frozen-hydrated biological samples with a Boersch phase plate // *Ultramicroscopy.* – 2011. – Vol. 111, №12. – P. 1696–1705.
11. Bergström L.M., Skoglund S., Edwards K. et al. Self-assembly in mixtures of an anionic and a cationic surfactant: a comparison between small-angle neutron scattering and cryo-transmission electron microscopy // *Langmuir.* – 2013. – Vol. 29, №38. – P. 11834–11848.
12. Bharat T.A., Davey N.E., Ulbrich P. et al. Structure of the immature retroviral capsid at 8Å resolution by cryo-electron microscopy // *Nature.* – 2012. – Vol. 487, № 7407. – P. 385–389.
13. Bouchet-Marquis C., Pagratis M., Kirmse R., Hoenger A. Metallothionein as a clonable high-density marker for cryo-electron microscopy // *Journ. Struc. Biol.* – 2012. – Vol. 177, №1. – P. 119–127.
14. Briegel A., Chen S., Koster A.J. et al. Correlated light and electron cryo-microscopy // *Meth. Enzymol.* – 2010. – Vol. 481. – P. 317–341.
15. Briggs J.A. Structural biology in situ – the potential of subtomogram averaging // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2013. – Vol. 23, №2 – P. 261– 267.
16. Brusuc V. From immunoinformatics to immunomics // *Journ. Bioinform. Comput. Biol.* – 2003. – Vol. 1. – P. 179–181.
17. Bui K.H., Ishikawa T. 3D structural analysis of flagella/cilia by cryo-electron tomography // *Meth. Enzymol.* – 2013. – Vol. 524. – P. 305–323.
18. Campbell M.G., Cheng A., Brilot A.F. et al. Movies of ice-embedded particles enhance resolution in electron cryo-microscopy // *Structure.* – 2012. – Vol. 20, №11. – P. 1823–1828.
19. Cao C., Dong X., Wu X. et al. Conserved fiber-penton base interaction revealed by nearly atomic resolution cryo-electron microscopy of the structure of adenovirus provides insight into receptor interaction // *Journ. Virol.* – 2012. – Vol. 86, №22. – P. 12322–12329.
20. Cardone G., Heymann J.B., Steven A.C. One number does not fit all: Mapping local variations in resolution in cryo-EM reconstructions // *Journ. Struc. Biol.* – 2013. – Vol. 184, №2 – P. 226–236.
21. Carlson D.B., Gelb J., Palshin V., Evans J.E. Laboratory-based cryogenic soft X-ray tomography with correlative cryo-light and electron microscopy // *Micros. Microanal.* – 2013. – Vol. 19, №1. – P. 22–29.
22. Caston J.R. Conventional electron microscopy, cryo-electron microscopy and cryo-electron tomography of viruses // *Subcell. Biochem.* – 2013. – Vol. 68. – P. 79–115.
23. Chan K.Y., Trabuco L.G., Schreiner E., Schulten K. Cryo-electron microscopy modeling by the molecular dynamics flexible fitting method // *Biopolymers.* – 2012. – Vol. 97, №9. – P. 678–686.
24. Bai X.C., Martin T.G., Scheres S.H., Dietz H. Cryo-EM structure of a 3D DNA-origami object. *Proc Nat Acad Sci USA* 2012; 109(49): 20012–20017.
25. Bajaj C., Goswami S., Zhang Q. Detection of secondary and supersecondary structures of proteins from cryo-electron microscopy. *Journ Struc Biol* 2012; 177(2): 367–381.
26. Balfour B.M., Goscicka T., MacKenzie J.L. et al. Combined time-lapse cinematography and immuno-electron microscopy. *Anat Rec* 1990; 226(4): 509–514.
27. Bartesaghi A., Lecumberry F., Sapiro G., Subramaniam S. Protein secondary structure determination by constrained single-particle cryo-electron tomography. *Structure* 2012; 20(12): 2003–2013.
28. Barton B., Rhinow D., Walter A. et al. In-focus electron microscopy of frozen-hydrated biological samples with a Boersch phase plate. *Ultramicroscopy* 2011; 111(12): 1696–1705.
29. Bergström L.M., Skoglund S., Edwards K. et al. Self-assembly in mixtures of an anionic and a cationic surfactant: a comparison between small-angle neutron scattering and cryo-transmission electron microscopy. *Langmuir* 2013; 29(38): 11834–11848.
30. Bharat T.A., Davey N.E., Ulbrich P. et al. Structure of the immature retroviral capsid at 8Å resolution by cryo-electron microscopy. *Nature* 2012; 487(7407): 385–389.
31. Bouchet-Marquis C., Pagratis M., Kirmse R., Hoenger A. Metallothionein as a clonable high-density marker for cryo-electron microscopy. *Journ Struc Biol* 2012; 177(1): 119–127.
32. Briegel A., Chen S., Koster A.J. et al. Correlated light and electron cryo-microscopy. *Meth Enzymol* 2010; 481: 317–341.
33. Briggs J.A. Structural biology in situ – the potential of subtomogram averaging. *Curr Opin Struct Biol* 2013; 23(2): 261–267.
34. Brusuc V. From immunoinformatics to immunomics. *Journ Bioinform Comput Biol* 2003; 1: 179–181.
35. Bui K.H., Ishikawa T. 3D structural analysis of flagella/cilia by cryo-electron tomography. *Meth Enzymol* 2013; 524: 305–323.
36. Campbell M.G., Cheng A., Brilot A.F. et al. Movies of ice-embedded particles enhance resolution in electron cryo-microscopy. *Structure* 2012; 20(11): 1823–1828.
37. Cao C., Dong X., Wu X. et al. Conserved fiber-penton base interaction revealed by nearly atomic resolution cryo-electron microscopy of the structure of adenovirus provides insight into receptor interaction. *Journ Virol* 2012; 86(22): 12322–12329.
38. Cardone G., Heymann J.B., Steven A.C. One number does not fit all: Mapping local variations in resolution in cryo-EM reconstructions. *Journ Struc Biol* 2013; 184(2): 226–236.
39. Carlson D.B., Gelb J., Palshin V., Evans J.E. Laboratory-based cryogenic soft X-ray tomography with correlative cryo-light and electron microscopy. *Micros Microanal* 2013; 19(1): 22–29.
40. Caston J.R. Conventional electron microscopy, cryo-electron microscopy and cryo-electron tomography of viruses // *Subcell. Biochem.* – 2013. – Vol. 68. – P. 79–115.
41. Chan K.Y., Trabuco L.G., Schreiner E., Schulten K. Cryo-electron microscopy modeling by the molecular dynamics flexible fitting method // *Biopolymers.* – 2012. – Vol. 97, №9. – P. 678–686.
42. De Winter D.A., Mesman R.J., Hayles M.F. et al. In-situ integrity control of frozen-hydrated, vitreous lamellas prepared by the



24. Comolli L.R., Duarte R., Baum D. et al. A portable cryo-plunger for on-site intact cryo-genic microscopy sample preparation in natural environments // *Microsc. Res. Tech.* – 2012 – Vol. 75, №6 – P. 829–836.
25. Cong Y., Schröder G.F., Meyer A.S. et al. Symmetry-free cryo-EM structures of the chaperonin TRiC along its ATPase-driven conformational cycle // *EMBO Journ.* – 2012. – Vol. 31, №3. – P. 720–730.
26. Crauste-Manciet S., Larquet E., Khawand K. et al. Lipidic spherulites: Formulation optimisation by paired optical and cryo-electron microscopy // *Eur. Journ. Pharm. Biopharm.* – 2013. – Vol. 85, №3. – P. 1088–1094.
27. De Vries S.J., Zacharias M. ATTRACT-EM: a new method for the computational assembly of large molecular machines using cryo-EM maps // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, №12. – Art. Nee49733. – P. 1–18.
28. De Winter D.A., Mesman R.J., Hayles M.F. et al. In-situ integrity control of frozen-hydrated, vitreous lamellas prepared by the cryo-focused ion beam scanning electron microscope // *Journ. Struct. Biol.* – 2013. – Vol. 183, №1. – P. 11–18.
29. Diebolder C.A., Koster A.J., Koning R.I. Pushing the resolution limits in cryoelectron tomography of biological structures // *Journ. Microsc.* – 2012. – Vol. 248, №1. – P. 1–5.
30. DiMaio F., Zhang J., Chiu W., Baker D. Cryo-EM model validation using independent map reconstructions // *Prot. Sci.* – 2013. – Vol. 22, №6. – P. 865–868.
31. Dubochet J. Cryo-EM – the first thirty years // *Journ. Microsc.* – 2012. – Vol. 245, №3 – P. 221–224.
32. Duke E.M., Razi M., Weston A. et al. Imaging endosomes and autophagosomes in whole mammalian cells using correlative cryo-fluorescence and cryo-soft X-ray microscopy (cryo-CLXM) // *Ultramicroscopy.* – 2014. – Vol. 143, – P. 77–87.
33. Eibauer M., Hoffmann C., Plitzko J.M. et al. Unraveling the structure of membrane proteins in situ by transfer function corrected cryo-electron tomography // *Journ. Struct. Biol.* – 2012. – Vol. 180, №3. – P. 488–496.
34. Elber R. Watching biomolecular machines in action // *Structure.* – 2010. – Vol. 18, №4. – P. 415–416.
35. Elmlund H., Elmlund D., Bengio S. PRIME: probabilistic initial 3D model generation for single-particle cryo-electron microscopy // *Structure.* – 2013. – Vol. 21, № 8. – P. 1299–1306.
36. Falkner B., Schröder G.F. Cross-validation in cryo-EM-based structural modeling // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2013. – Vol. 110, №22. – P. 8930–8935.
37. Fitzpatrick A.W., Lorenz U.J., Vanacore G.M., Zewail A.H. 4D cryo-electron microscopy of proteins // *Journ. Am. Chem. Soc.* – 2013. – Vol. 135, №51. – P. 19123–19126.
38. Forrester J.S., Milne S.B., Ivanova P.T., Brown H.A. Computational lipidomics: a multi-plexed analysis of dynamic changes in membrane lipid composition during signal transduction // *Mol. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 65, №4. – P. 813–821.
39. Frank J. Story in a sample – the potential (and limitations) of cryo-electron microscopy applied to molecular machines // *Biopolymers.* – 2013. – Vol. 99, №11. – P. 832–836.
40. Fujiyoshi Y. Low dose techniques and cryo-electron microscopy // *Meth. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 974. – P. 103–118.
41. Fukuda Y., Nagayama K. Zernike phase contrast cryo-electron tomography of whole mounted frozen cells // *Journ. Struct. Biol.* – 2012. – Vol. 177, №2. – P. 484–489.
42. Garewal M., Zhang L., Ren G. Optimized negative-staining protocol for examining lipid-protein interactions by electron microscopy // *Meth. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 974. – P. 111–118.
43. Gopalakrishnan G., Yam P.T., Madwar C. et al. Label-free visualization of ultrastructural features of artificial synapses via cryo-EM // *ACS Chem. Neurosci.* – 2011. – Vol. 2, №12. – P. 700–704.
44. Grélard A., Guichard P., Bonnafous P. et al. Hepatitis B subvirus particles display both a fluid bilayer membrane and a strong resistance to freeze drying: a study by solid-state NMR, light scattering, and cryo-electron microscopy/ cryo-focused ion beam scanning electron microscope. *Journ Struct Biol* 2013; 183(1): 11–18.
45. Greunz T., Strauß B., Schausberger S.E. et al. Cryo ultra-low-angle microtomy for XPS-depth profiling of organic coatings. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405(22): 7153–7160.
46. Grigorieff N. Direct detection pays off for electron cryo-microscopy. *ELIFE* 2013; 2: e00573.
47. Guesdon A., Blestel S., Kervrann C., Chrétien D. Single versus dual-axis cryo-electron tomography of microtubules assembled in vitro: limits and perspectives. *Journ Struct Biol* 2013; 181(2): 169–178.
48. Gyobu N. Grid preparation for cryo-electron microscopy. *Meth Mol Biol* 2013; 955: 119–128.
49. Han H.M., Bouchet-Marquis C., Huebinger J., Grabenbauer M. Golgi apparatus analyzed by cryo-electron microscopy. *Histochem Cell Biol* 2013; 140(4): 369–381.
50. Han H.M., Huebinger J., Grabenbauer M. Self-pressurized rapid freezing (SPRF) as a simple fixation method for cryo-electron microscopy of vitreous sections. *Journ Struct Biol* 2012; 178(2): 84–87.



- tomography // *FASEB Journ.* – 2013. – Vol. 27, №10. – P. 4316–4326.
45. Greunz T., Strauß B., Schausberger S.E. et al. Cryo ultra-low-angle microtomy for XPS-depth profiling of organic coatings // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2013. – Vol. 405, №22. – P. 7153–7160.
 46. Grigorieff N. Direct detection pays off for electron cryo-microscopy // *ELIFE.* – 2013. – Vol. 2, Art. Nee00573. – P. 1–3.
 47. Guesdon A., Blestel S., Kervran C., Chrétien D. Single versus dual-axis cryo-electron tomography of microtubules assembled in vitro: limits and perspectives // *Journ. Struct. Biol.* – 2013. – Vol. 181, №2. – P. 169–178.
 48. Gyobu N. Grid preparation for cryo-electron microscopy // *Meth. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 955. – P. 119–128.
 49. Han H.M., Bouchet-Marquis C., Huebinger J., Grabenbauer M. Golgi apparatus analyzed by cryo-electron microscopy // *Histochem. Cell. Biol.* – 2013. – Vol. 140, №4. – P. 369–381.
 50. Han H.M., Huebinger J., Grabenbauer M. Self-pressurized rapid freezing (SPRF) as a simple fixation method for cryo-electron microscopy of vitreous sections // *Journ. Struct. Biol.* – 2012. – Vol. 178, №2. – P. 84–87.
 51. Heymann J.B., Winkler D.C., Yim Y.I. et al. Clathrin-coated vesicles from brain have small payloads: a cryo-electron tomographic study // *Journ. Struct. Biol.* – 2013. – Vol. 184, №1. – P. 43–51.
 52. Hoang T.V., Cavin X., Schultz P., Ritchie D.W. gEMpicker: A highly parallel GPU-accelerated particle picking tool for cryo-electron microscopy // *BMC Struct. Biol.* – 2013. – Vol. 13, №25. – P. 1–10.
 53. Hoofnagle A.N., Heinecke J.W. Lipoproteomics: using mass spectrometry-based proteomics to explore the assembly, structure, and function of lipoproteins // *Journ. Lipid. Res.* – 2009. – Vol. 50, №10. – P. 1967–1975.
 54. Hrabe T., Chen Y., Pfeffer S. et al. PyTom: a python-based toolbox for localization of macromolecules in cryo-electron tomograms and subtomogram analysis // *Journ. Struct. Biol.* – 2012. – Vol. 178, №2. – P. 177–188.
 55. Hsieh C., Schmelzer T., Kishchenko G. et al. Practical workflow for cryo focused-ion-beam milling of tissues and cells for cryo-TEM tomography // *Journ. Struct. Biol.* – 2014. – Vol. 185, №1. – P. 32–41.
 56. Huisken J., Stainier D.Y. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology // *Development.* – 2009 – Vol. 136, №12. – P. 1963–1975.
 57. Iijima H., Fukuda Y., Arai Y. et al. Hybrid fluorescence and electron cryomicroscopy for simultaneous electron and photon imaging // *Journ. Struct. Biol.* – 2014. – Vol. 185, №1. – P. 107–115.
 58. Johnson M.C., Schmidt-Krey I. Two-dimensional crystallization by dialysis for structural studies of membrane proteins by the cryo-EM method electron crystallography // *Meth. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 113. – P. 325–337.
 59. Jun S., Zhao G., Ning J. et al. Correlative microscopy for 3D structural analysis of dynamic interactions // *Journ. Vis. Exp.* – 2013. – №76 (Code: e50386).
 60. Kim J.J. Using viral genomics to develop viral gene products as a novel class of drugs to treat human ailments // *Biotech. Lett.* – 2001. – Vol. 23, №13. – P. 1015–1020.
 61. Kiss G., Chen X., Brindley M.A. et al. Capturing enveloped viruses on affinity grids for downstream cryo-electron microscopy applications // *Microsc. Microanal.* – 2014. – Vol. 20, №1. – P. 164–174.
 62. Knoop K., Schoehn G., Schaffitzel C. Cryo-electron microscopy of ribosomal complexes in cotranslational folding, targeting, and translocation // *Wil. Interdisc. Rev. RNA* – 2012. – Vol. 3, №3. – P. 429–441.
 63. Koning R.I., Koster A.J. Cellular nanoimaging by cryo-electron tomography // *Meth. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 950. – P. 227–251.
 64. Kucukelbir A., Sigworth F.J., Tagare H.D. Quantifying the local resolution of cryo-EM density maps // *Nat. Meth.* – 2014. – Vol. 11, №1. – P. 63–65.
 51. Heymann J.B., Winkler D.C., Yim Y.I. et al. Clathrin-coated vesicles from brain have small payloads: a cryo-electron tomographic study. *Journ Struct Biol* 2013; 184(1): 43–51.
 52. Hoang T.V., Cavin X., Schultz P., Ritchie D.W. gEMpicker: A highly parallel GPU-accelerated particle picking tool for cryo-electron microscopy. *BMC Struct Biol* 2013; 13(25): 1–10.
 53. Hoofnagle A.N., Heinecke J.W. Lipoproteomics: using mass spectrometry-based proteomics to explore the assembly, structure, and function of lipoproteins. *Journ Lipid Res* 2009; 50(10): 1967–1975.
 54. Hrabe T., Chen Y., Pfeffer S. et al. PyTom: a python-based toolbox for localization of macromolecules in cryo-electron tomograms and subtomogram analysis. *Journ Struct Biol* 2012; 178(2): 177–188.
 55. Hsieh C., Schmelzer T., Kishchenko G. et al. Practical workflow for cryo focused-ion-beam milling of tissues and cells for cryo-TEM tomography. *Journ Struct Biol* 2014; 185(1): 32–41.
 56. Huisken J., Stainier D.Y. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development* 2009; 136(12): 1963–1975.
 57. Iijima H., Fukuda Y., Arai Y. et al. Hybrid fluorescence and electron cryo-microscopy for simultaneous electron and photon imaging. *Journ Struct Biol* 2014; 185(1): 107–115.
 58. Johnson M.C., Schmidt-Krey I. Two-dimensional crystallization by dialysis for structural studies of membrane proteins by the cryo-EM method electron crystallography. *Meth Cell Biol* 2013; 113: 325–337.
 59. Jun S., Zhao G., Ning J. et al. Correlative microscopy for 3D structural analysis of dynamic interactions. *Journ Vis Exp* 2013; 76: e50386.
 60. Kim J.J. Using viral genomics to develop viral gene products as a novel class of drugs to treat human ailments. *Biotech Lett* 2001; 23(13): 1015–1020.
 61. Kiss G., Chen X., Brindley M.A. et al. Capturing enveloped viruses on affinity grids for downstream cryo-electron microscopy applications. *Microsc Microanal* 2014; 20(1): 164–174.
 62. Knoop K., Schoehn G., Schaffitzel C. Cryo-electron microscopy of ribosomal complexes in cotranslational folding, targeting, and translocation. *Wil Interdisc Rev RNA* 2012; 3(3): 429–441.
 63. Koning R.I., Koster A.J. Cellular nanoimaging by cryo electron tomography. *Meth Mol Biol* 2013; 950: 227–251.
 64. Kucukelbir A., Sigworth F.J., Tagare H.D. Quantifying the local resolution of cryo-EM density maps. *Nat Meth* 2014; 11(1): 63–65.
 65. Kudryashev M., Stahlberg H., Castaño-Díez D. Assessing the benefits of focal pair cryo-electron tomography. *Journ Struct Biol* 2012; 178(2): 88–97.
 66. Kwon S., Choi S.B., Park M.G. et al. Extraction of three-dimensional information of biological membranous tissue with scanning confocalinfrared laser microscope tomography. *Microsc Microanal* 2013; 19 (Suppl 5): 194–197.
 67. Kymionis G.D., Grentzelos M.A., Plaka A.D. et al. Correlation of the corneal collagen cross-linking demarcation line using confocal microscopy and anterior segment optical coherence tomography in keratoconic patients. *Am Journ Ophthalmol* 2014; 157(1): 110–115.
 68. Lagarde M., Gélöën A., Record M. et al. Lipidomics is emerging. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1634(3): 61.
 69. Lee J., Saha A., Pancera S.M. et al. Shear free and blotless cryo-TEM imaging: a new method for probing early evolution of nanostructures. *Langmuir* 2012; 28(9): 4043–4046.
 70. Leforestier A., Lemerrier N., Livolant F. Contribution of cryoelectron microscopy of vitreous sections to the understanding of biological membrane structure. *Proc Nat Acad Sci USA* 2012; 109(23): 8959–8964.
 71. Lerch T.F., O'Donnell J.K., Meyer N.L. et al. Structure of AAV-DJ, a retargeted gene therapy vector: cryo-electron microscopy at 4.5Å resolution. *Structure* 2012; 20(8): 1310–1320.
 72. Li M., Zheng W. All-atom structural investigation of kinesin-microtubule complex constrained by high-quality cryo-



65. Kudryashev M., Stahlberg H., Castaño-Díez D. Assessing the benefits of focal pair cryo-electron tomography // *Journ. Struct. Biol.* – 2012. – Vol. 178, №2. – P. 88–97.
66. Kwon S., Choi S.B., Park M.G. et al. Extraction of three-dimensional information of biological membranous tissue with scanning confocal infrared laser microscope tomography // *Microsc. Microanal.* – 2013. – Vol. 19, Supplement 5. – P. 194–197.
67. Kymionis G.D., Grentzelos M.A., Plaka A.D. et al. Correlation of the corneal collagen cross-linking demarcation line using confocal microscopy and anterior segment optical coherence tomography in keratoconic patients // *Am. Journ. Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 157, №1. – P. 110–115.
68. Lagarde M., Gélóën A., Record M. et al. Lipidomics is emerging // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2003. – Vol. 1634, №3. – P. 61.
69. Lee J., Saha A., Pancera S.M. et al. Shear free and blotless cryo-TEM imaging: a new method for probing early evolution of nanostructures // *Langmuir.* – 2012. – Vol. 28, №9. – P. 4043–4046.
70. Leforestier A., Lemerrier N., Livolant F. Contribution of cryoelectron microscopy of vitreous sections to the understanding of biological membrane structure // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2012. – Vol. 109, №23. – P. 8959–8964.
71. Lerch T.F., O'Donnell J.K., Meyer N.L. et al. Structure of AAV-DJ, a retargeted gene therapy vector: cryo-electron microscopy at 4.5 Å resolution // *Structure.* – 2012. – Vol. 20, №8. – P. 1310–1320.
72. Li M., Zheng W. All-atom structural investigation of kinesin-microtubule complex constrained by high-quality cryo-electron microscopy maps // *Biochemistry.* – 2012. – Vol. 51, №25. – P. 5022–5032.
73. Li X., Mooney P., Zheng S. et al. Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM // *Nat. Meth.* – 2013. – Vol. 10, №6. – P. 584–590.
74. Lin J., Cheng N., Hogle J.M. et al. Conformational shift of a major poliovirus antigen confirmed by immuno-cryogenic electron microscopy // *Journ. Immunol.* – 2013. – Vol. 191, №2. – P. 884–891.
75. Lučić V., Rigort A., Baumeister W. Cryo-electron tomography: the challenge of doing structural biology in situ // *Journ. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 202, №3. – P. 407–419.
76. Ludtke S.J., Lawson C.L., Kleywegt G.J. et al. The 2010 cryo-EM modeling challenge // *Biopolymers.* – 2012. – Vol. 97, №9. – P. 651–654.
77. Martínez J.M., Swan B.K., Wilson W.H. Marine viruses, a genetic reservoir revealed by targeted viromics // *ISME Journ.* – 2014. – Vol. 8, №5. – P. 1079–1088.
78. McCully M., Canny M. Quantitative cryo-analytical scanning electron microscopy (CEDX): an important technique useful for cell-specific localization of salt // *Meth. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 913. – P. 137–148.
79. Milne J.L., Borgnia M.J., Bartesaghi A. et al. Cryo-electron microscopy – a primer for the non-microscopist // *FEBS Journ.* – 2013. – Vol. 280, №1. – P. 28–45.
80. Miyazaki N., Nakagawa A., Iwasaki K. Life cycle of phyto-reoviruses visualized by electron microscopy and tomography // *Front. Microb.* – 2013. – Vol. 4, Art. №306. – P. 1–9.
81. Müllertz A., Fatouros D.G., Smith J.R. et al. Insights into intermediate phases of human intestinal fluids visualized by atomic force microscopy and cryo-transmission electron microscopy ex vivo // *Mol. Pharm.* – 2012. – Vol. 9, №2. – P. 237–247.
82. Nederlof I., Li Y.W., van Heel M., Abrahams J.P. Imaging protein three-dimensional nanocrystals with cryo-EM // *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* – 2013. – Vol. 69. – P. 852–859.
83. Nejadasl F.K., Karuppasamy M., Newman E.R. et al. Non-rigid image registration to reduce beam-induced blurring of cryo-electron microscopy images // *Journ. Synchrotron Radiat.* – 2013. – Vol. 20. – P. 58–66.
84. electron-microscopy maps. *Biochemistry* 2012; 51(25): 5022–5032.
73. Li X., Mooney P., Zheng S. et al. Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM. *Nat Meth* 2013; 10(6): 584–590.
74. Lin J., Cheng N., Hogle J.M. et al. Conformational shift of a major poliovirus antigen confirmed by immuno-cryogenic electron microscopy. *Journ Immunol* 2013; 191(2): 884–891.
75. Lučić V., Rigort A., Baumeister W. Cryo-electron tomography: the challenge of doing structural biology in situ. *Journ Cell Biol* 2013; 202(3): 407–419.
76. Ludtke S.J., Lawson C.L., Kleywegt G.J. et al. The 2010 cryo-EM modeling challenge. *Biopolymers* 2012; 97(9): 651–654.
77. Martínez J.M., Swan B.K., Wilson W.H. Marine viruses, a genetic reservoir revealed by targeted viromics. *ISME Journ* 2014; 8(5): 1079–1088.
78. McCully M., Canny M. Quantitative cryo-analytical scanning electron microscopy (CEDX): an important technique useful for cell-specific localization of salt. *Meth Mol Biol* 2012; 913: 137–148.
79. Milne J.L., Borgnia M.J., Bartesaghi A. et al. Cryo-electron microscopy – a primer for the non-microscopist. *FEBS Journ* 2013; 280(1): 28–45.
80. Miyazaki N., Nakagawa A., Iwasaki K. Life cycle of phyto-reoviruses visualized by electron microscopy and tomography. *Front Microb* 2013; 4(306): 1–9.
81. Müllertz A., Fatouros D.G., Smith J.R. et al. Insights into intermediate phases of human intestinal fluids visualized by atomic force microscopy and cryo-transmission electron microscopy ex vivo. *Mol Pharm* 2012; 9(2): 237–247.
82. Nederlof I., Li Y.W., van Heel M., Abrahams J.P. Imaging protein three-dimensional nano-crystals with cryo-EM. *Acta Crystallogr D: Biol. Crystallogr* 2013; 69: 852–859.
83. Nejadasl F.K., Karuppasamy M., Newman E.R. et al. Non-rigid image registration to reduce beam-induced blurring of cryo-electron microscopy images. *Journ Synchrotron Radiat* 2013; 20: 58–66.
84. Noble A.J., Zhang Q., O'Donnell J. et al. A pseudoatomic model of the COPII cage obtained from cryo-electron microscopy and mass spectrometry. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20(2): 167–173.
85. Norousi R., Wickles S., Leidig C. et al. Automatic post-picking using MAPPOS improves particle image detection from cryo-EM micrographs. *Journ Struct Biol* 2013; 182(2): 59–66.
86. Nyuta K., Yoshimura T., Tsuchiya K. et al. Zwitterionic heterogemini surfactants containing ammonium and carboxylate headgroups 2: aggregation behavior studied by SANS, DLS, and cryo-TEM. *Journ Colloid Interface Sci* 2012; 370(1): 80–85.
87. Oda T., Kikkawa M. Novel structural labeling method using cryo-electron tomography and biotin-streptavidin system. *Journ Struc Biol* 2013; 183(3): 305–311.
88. Ounjai P., Kim K.D., Lishko P.V., Downing K.H. Three-dimensional structure of the bovine sperm connecting piece revealed by electron cryotomography. *Biol Reprod* 2012; 87(3): 1–9.
89. Paessens L.C., Fluitsma D.M., van Kooyk Y. Haematopoietic antigen-presenting cells in the human thymic cortex: evidence for a role in selection and removal of apoptotic thymocytes. *Journ Pathol* 2008; 214(1): 96–103.
90. Pandurangan A.P., Topf M. RIBFIND: a web server for identifying rigid bodies in protein structures and to aid flexible fitting into cryo EM maps. *Bioinformatics* 2012; 28(18): 2391–2393.
91. Pigino G., Cantele F., Vannuccini E. et al. Electron tomography of IFT particles. *Meth Enzymol* 2013; 524: 325–342.
92. Quan B.D., Sone E.D. Cryo-TEM analysis of collagen fibrillar structure. *Meth Enzymol* 2013; 532: 189–205.
93. Rigort A., Bäuerlein F.J., Villa E. et al. Focused ion beam micro-machining of eukaryotic cells for cryoelectron tomography. *Proc Nat Acad Sci USA* 2012; 109(12): 4449–4454.
94. Rigort A., Villa E., Bauerlein F.J. et al. Integrative approaches for cellular cryo-electron tomography: correlative imaging and



84. Noble A.J., Zhang Q., O'Donnell J. et al. A pseudoatomic model of the COPII cage obtained from cryo-electron microscopy and mass spectrometry // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 20, №2. – P. 167–173.
85. Norousi R., Wickles S., Leidig C. et al. Automatic post-picking using MAPPOS improves particle image detection from cryo-EM micrographs // *Journ. Struct. Biol.* – 2013. – Vol. 182, №2. – P. 59–66.
86. Nyuta K., Yoshimura T., Tsuchiya K. et al. Zwitterionic heterogemini surfactants containing ammonium and carboxylate headgroups 2: aggregation behavior studied by SANS, DLS, and cryo-TEM // *Journ. Colloid. Interface Sci.* – Vol. 370, №1. – P. 80–85.
87. Oda T., Kikkawa M. Novel structural labeling method using cryo-electron tomography and biotin-streptavidin system // *Journ. Struct. Biol.* – 2013. – Vol. 183, №3. – P. 305–311.
88. Ounjai P., Kim K.D., Lishko P.V., Downing K.H. Three-dimensional structure of the bovine sperm connecting piece revealed by electron cryotomography // *Biol. Reprod.* – 2012. – Vol. 87, №3, Art. №73. – P. 1–9.
89. Paessens L.C., Fluitsma D.M., van Kooyk Y. Haematopoietic antigen-presenting cells in the human thymic cortex: evidence for a role in selection and removal of apoptotic thymocytes // *Journ. Pathol.* – 2008. – Vol. 214, №1. – P. 96–103.
90. Pandurangan A.P., Topf M. RIBFIND: a web server for identifying rigid bodies in protein structures and to aid flexible fitting into cryo-EM maps // *Bioinformatics.* – 2012. – Vol. 28, №18. – P. 2391–2393.
91. Pignino G., Cantele F., Vannuccini E. et al. Electron tomography of IFT particles // *Meth. Enzymol.* – 2013. – Vol. 524. – P. 325–342.
92. Quan B.D., Sone E.D. Cryo-TEM Analysis of Collagen Fibrillar Structure // *Meth. Enzymol.* – 2013. – Vol. 532. – P. 189–205.
93. Rigort A., Bäuerlein F.J., Villa E. et al. Focused ion beam micromachining of eukaryotic cells for cryoelectron tomography // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2012. – Vol. 109, №12. – P. 4449–4454.
94. Rigort A., Villa E., Bäuerlein F.J. et al. Integrative approaches for cellular cryo-electron tomography: correlative imaging and focused ion beam micromachining // *Meth. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 111. – P. 259–281.
95. Rusu M., Wriggers W. Evolutionary bidirectional expansion for the tracing of alpha helices in cryo-electron microscopy reconstructions // *Journ. Struct. Biol.* – 2012. – Vol. 177, №2. – P. 410–419.
96. Schellenberger P., Kaufmann R., Siebert C.A. et al. High-precision correlative fluorescence and electron cryo-microscopy using two independent alignment markers // *Ultramicroscopy.* – 2014. – Vol. 143. – P. 41–51.
97. Scheres S.H. A Bayesian view on cryo-EM structure determination // *Journ. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 415, №2. – P. 406–418.
98. Schertel A., Snaidero N., Han H.M. et al. Cryo FIB-SEM: Volume imaging of cellular ultra-structure in native frozen specimens // *Journ. Struct. Biol.* – 2013. – Vol. 184, №2. – P. 355–360.
99. Schorb M., Briggs J.A. Correlated cryo-fluorescence and cryo-electron microscopy with high spatial precision and improved sensitivity // *Ultramicroscopy.* – 2014. – Vol. 143. – P. 24–32.
100. Shang Z., Sigworth F.J. Hydration-layer models for cryo-EM image simulation // *Journ. Struct. Biol.* – 2012. – Vol. 180, №1. – P. 10–16.
101. Sharp T.H., Bruning M., Mantell J. et al. Cryo-transmission electron microscopy structure of a gigadalton peptide fiber of de novo design // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2012. – Vol. 109, №33. – P. 13266–13271.
102. Shigematsu H., Sigworth F.J. Noise models and cryo-EM drift correction with a direct-electron camera // *Ultramicroscopy.* – 2013. – Vol. 131. – P. 61–69.
103. Shimanouchi T., Oyama E., Ishii H. et al. Membranomics research on interactions between liposome membranes with
- focused ion beam micromachining. *Meth Cell Biol* 2012; 111: 259–281.
104. Shrum D.C., Woodruff B.W., Stagg S.M. Creating an infrastructure for high-throughput high-resolution cryogenic electron microscopy. *Journ Struct Biol* 2012; 180(1): 254–258.
105. Si D., Ji S., Nasr K.A., He J. A machine learning approach for the identification of protein secondary structure elements from electron cryo-microscopy density maps. *Biopolymers* 2012; 97(9): 698–708.
106. Singer A., Zhao Z., Shkolnisky Y., Hadani R. Viewing angle classification of cryo-electron microscopy images using eigenvectors. *SIAM Journ Imaging Sci* 2011; 4(2): 723–759.
107. Song K., Comolli L.R., Horowitz M. Removing high contrast artifacts via digital inpainting in cryo-electron tomography: an application of compressed sensing. *Journ Struct Biol* 2012; 178(2): 108–120.
108. Strunk K.M., Wang K., Ke D. et al. Thinning of large mammalian cells for cryo-TEM characterization by cryo-FIB milling. *Journ Microsc* 2012; 247(3): 220–227.
109. Sun J., Kawakami H., Zech J. et al. Cdc6-induced conformational changes in ORC bound to origin DNA revealed by cryo-electron microscopy. *Structure* 2012; 20(3): 534–544.
110. Tatischeff I., Larquet E., Falcón-Pérez J.M. et al. Fast characterisation of cell-derived extracellular vesicles by nanoparticles tracking analysis, cryo-electron microscopy, and Raman tweezers microspectroscopy. *Journ Extracell Vesicles* 2012; 1–11.
111. Taylor K.A., Glaeser R.M. Retrospective on the early development of cryoelectron microscopy of macromolecules and a prospective on opportunities for the future. *Journ Struct Biol* 2008; 163(3): 214–223.
112. Tremoulet A.H., Albani S. Immunomics in clinical development: bridging the gap. *Exp Rev Clin Immunol* 2005; 1(1): 3–6.
113. Vahedi-Faridi A., Jastrzebska B., Palczewski K., Engel A. 3D imaging and quantitative analysis of small solubilized membrane proteins and their complexes by transmission electron microscopy. *Microscopy* 2013; 62(1): 95–107.
114. Vargas J., Otón J., Marabini R. et al. FASTDEF: fast defocus and astigmatism estimation for high-throughput transmission electron microscopy. *Journ Struct Biol* 2013; 181(2): 136–148.
115. Vonesch C., Wang L., Shkolnisky Y., Singer A. Fast wavelet-based single-particle reconstruction in cryo-EM. *Proceedings*

- membrane chip analysis // *Membrane*. – 2009. – Vol. 34, №6. – P. 342–350.
104. Shrum D.C., Woodruff B.W., Stagg S.M. Creating an infrastructure for high-throughput high-resolution cryogenic electron microscopy // *Journ. Struct. Biol.* – 2012. – Vol. 180, №1. – P. 254–258.
105. Si D., Ji S., Nasr K.A., He J. A machine learning approach for the identification of protein secondary structure elements from electron cryo-microscopy density maps // *Biopolymers*. – 2012. – Vol. 97, №9. – P.698–708.
106. Singer A., Zhao Z., Shkolnisky Y., Hadani R. Viewing angle classification of cryo-electron microscopy images using eigenvectors // *SIAM Journ. Imaging Sci.* – 2011. – Vol. 4, №2. – P. 723–759.
107. Song K., Comolli L.R., Horowitz M. Removing high contrast artifacts via digital inpainting in cryo-electron tomography: an application of compressed sensing // *Journ. Struct. Biol.* – 2012. – Vol. 178, №2. – P. 108–120.
108. Strunk K.M., Wang K., Ke D. et al. Thinning of large mammalian cells for cryo-TEM characterization by cryo-FIB milling // *Journ. Microsc.* – 2012. – Vol. 247, №3. – P. 220–227.
109. Sun J., Kawakami H., Zech J. et al. Cdc6-induced conformational changes in ORC bound to origin DNA revealed by cryo-electron microscopy // *Structure*. – 2012. – Vol. 20, №3. – P. 534–544.
110. Tatischeff I., Larquet E., Falcón-Pérez J.M. et al. Fast characterisation of cell-derived extracellular vesicles by nanoparticles tracking analysis, cryo-electron microscopy, and Raman tweezers microspectroscopy // *Journ. Extracell. Vesicles*. – 2012. – Vol. 1, Art. № 19179. – P. 1–11.
111. Taylor K.A., Glaeser R.M. Retrospective on the early development of cryoelectron microscopy of macromolecules and a prospective on opportunities for the future // *Journ. Struct. Biol.* – 2008. – Vol. 163, №3. – P. 214–223.
112. Tremoulet A.H., Albani S. Immunomics in clinical development: bridging the gap // *Exp. Rev. Clin. Immunol.* – 2005. – Vol. 1, №1. – P. 3–6.
113. Vahedi-Faridi A., Jastrzebska B., Palczewski K., Engel A. 3D imaging and quantitative analysis of small solubilized membrane proteins and their complexes by transmission electron microscopy // *Microscopy*. – 2013. Vol. 62, №1. – P. 95–107.
114. Vargas J., Otón J., Marabini R. et al. FASTDEF: fast defocus and astigmatism estimation for high-throughput transmission electron microscopy // *Journ. Struct. Biol.* – 2013. – Vol. 181, №2. – P. 136–148.
115. Vonesch C., Wang L., Shkolnisky Y., Singer A. Fast wavelet-based single-particle reconstruction in cryo-EM // *Proc. 8th IEEE Int. Symp. on Biomed. Imaging: From Nano to Macro*. – Chicago, Illinois, 2011. – P. 1950–1953.
116. Vulović M., Ravelli R.B., van Vliet L.J. et al. Image formation modeling in cryo-electron microscopy // *Journ. Struct. Biol.* – 2013. – Vol. 183, №1. – P. 19–32.
117. Walter A., Muzik H., Vieker H. et al. Practical aspects of Boersch phase contrast electron microscopy of biological specimens // *Ultramicroscopy*. – 2012. – Vol. 116. – P. 62–72.
118. Wang J., Yin C. A Zernike-moment-based non-local denoising filter for cryo-EM images // *Sci. Ch. Life Sci.* – 2013. – Vol. 56, №4. – P. 384–390.
119. Wang K., Strunk K., Zhao G. et al. 3D structure determination of native mammalian cells using cryo-FIB and cryo-electron tomography // *Journ. Struct. Biol.* – 2012. – Vol. 180, №2. – P. 318–326.
120. Wang Q., Matsui T., Domitrovic T. et al. Dynamics in cryo EM reconstructions visualized with maximum-likelihood derived variance maps // *Journ. Struct. Biol.* – 2013. – Vol. 181, №3. – P. 195–206.
121. Wang Z., Gao K., Chen J. et al. Advantages of intermediate X-ray energies in Zernike phase contrast X-ray microscopy // *Biotech. Adv.* – 2013. – Vol. 31, №3. – P. 387–392.
- of the 8th IEEE Int Symp on Biomed. Imaging: From Nano to Macro; 2011; Chicago, Illinois. p. 1950–1953.
116. Vulović M., Ravelli R.B., van Vliet L.J. et al. Image formation modeling in cryo-electron microscopy. *Journ Struct Biol* 2013; 183(1): 19–32.
117. Walter A., Muzik H., Vieker H. et al. Practical aspects of Boersch phase contrast electron microscopy of biological specimens. *Ultramicroscopy* 2012; 116: 62–72.
118. Wang J., Yin C. A Zernike-moment-based non-local denoising filter for cryo-EM images. *Sci Ch Life Sci* 2013; 56(4): 384–390.
119. Wang K., Strunk K., Zhao G. et al. 3D structure determination of native mammalian cells using cryo-FIB and cryo-electron tomography. *Journ Struct Biol* 2012; 180(2): 318–326.
120. Wang Q., Matsui T., Domitrovic T. et al. Dynamics in cryo EM reconstructions visualized with maximum-likelihood derived variance maps. *Journ Struct Biol* 2013; 181(3): 195–206.
121. Wang Z., Gao K., Chen J. et al. Advantages of intermediate X-ray energies in Zernike phase contrast X-ray microscopy. *Biotech Adv* 2013; 31(3): 387–392.
122. Weber M., Huisken J. Omnidirectional microscopy. *Nat Meth* 2012; 9: 656–657.
123. Weiner A., Kapishnikov S., Shimoni E. et al. Vitrification of thick samples for soft X-ray cryo-tomography by high pressure freezing. *Journ Struct Biol* 2013; 181(1): 77–81.
124. Willmann J., Leibfritz D., Thiele H. Hyphenated tools for phospholipidomics. *Journ Biomol Tech* 2008; 19(3): 211–216.
125. Yajima H., Ogura T., Nitta R. et al. Conformational changes in tubulin in GMPCPP and GDP-taxol microtubules observed by cryoelectron microscopy. *Journ Cell Biol* 2012; 198(3): 315–322.
126. Yang F., Abe K., Tani K., Fujiyoshi Y. Carbon sandwich preparation preserves quality of two-dimensional crystals for cryo-electron microscopy. *Microscopy* 2013; 62(6): 597–606.
127. Yoder J.D., Cifuentes J.O., Pan J. et al. The crystal structure of a coxsackievirus B3-RD variant and a refined 9-angstrom cryo-electron microscopy reconstruction of the virus complexed with decay-accelerating factor (DAF) provide a new footprint of DAF on the virus surface. *Journ Virol* 2012; 86(23): 12571–12581.
128. Zhang L., Tong H., Garewal M., Ren G. Optimized negative-staining electron microscopy for lipoprotein studies. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830(1): 2150–2159.
129. Zhang P. Correlative cryo-electron tomography and optical microscopy of cells. *Curr Opin Struct Biol* 2013; 23(5): 763–770.
130. Zhang X., Ge P., Yu X. et al. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20(1): 105–110.
131. Zhao G., Perilla J.R., Yufenyuy E.L. et al. Mature HIV-1 capsid structure by cryo-electron microscopy and all-atom molecular dynamics. *Nature* 2013; 497(7451): 643–646.
132. Zou X., Hovmöller S., Oleynikov P. Phase contrast, contrast transfer function (CTF) and high-resolution electron microscopy (HRTEM). In: *Electron Crystallography: Electron Microscopy and Electron Diffraction*. Oxford, New York 2011: 131–155.
133. Zuckerkandl E., Pauling L. Molecules as documents of evolutionary history. *Journ Theor Biol* 1965; 8(2): 357–366.



122. Weber M., Huisken J. Omnidirectional microscopy // *Nat. Meth.* – 2012. – Vol. 9. – P. 656–657.
123. Weiner A., Kapishnikov S., Shimoni E. et al. Vitrification of thick samples for soft X-ray cryo-tomography by high pressure freezing // *Journ. Struc. Biol.* – 2013. – Vol. 181, №1. – P. 77–81.
124. Willmann J., Leibfritz D., Thiele H. Hyphenated tools for phospholipidomics // *Journ. Biomol. Tech.* – 2008. – Vol. 19, №3. – P. 211–216.
125. Yajima H., Ogura T., Nitta R. et al. Conformational changes in tubulin in GMPCPP and GDP-taxol microtubules observed by cryoelectron microscopy // *Journ. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 198, №3. – P. 315–322.
126. Yang F., Abe K., Tani K., Fujiyoshi Y. Carbon sandwich preparation preserves quality of two-dimensional crystals for cryoelectron microscopy // *Microscopy.* – 2013. – Vol. 62, №6. – P. 597–606.
127. Yoder J.D., Cifuentes J.O., Pan J. et al. The crystal structure of a coxsackievirus B3-RD variant and a refined 9-angstrom cryo-electron microscopy reconstruction of the virus complexed with decay-accelerating factor (DAF) provide a new footprint of DAF on the virus surface // *Journ. Virol.* – 2012. – Vol. 86, №23. – P. 12571–12581.
128. Zhang L., Tong H., Garewal M., Ren G. Optimized negative-staining electron microscopy for lipoprotein studies // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1830, №1. – P. 2150–2159.
129. Zhang P. Correlative cryo-electron tomography and optical microscopy of cells // *Curr. Opin. Struc. Biol.* – 2013. – Vol. 23, №5. – P. 763–770.
130. Zhang X., Ge P., Yu X. et al. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution // *Nat. Struc. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 20, №1. – P. 105–110.
131. Zhao G., Perilla J.R., Yufenyuy E.L. et al. Mature HIV-1 capsid structure by cryo-electron microscopy and all-atom molecular dynamics // *Nature.* – 2013. – Vol. 497, №7451. – P. 643–646.
132. Zou X., Hovmöller S., Oleynikov P. Phase contrast, contrast transfer function (CTF) and high-resolution electron microscopy (HRTEM) // *Electron Crystallography: Electron Microscopy and Electron Diffraction.* – Oxford, New York, 2011. – P. 131–155.
133. Zuckerkandl E., Pauling L. Molecules as documents of evolutionary history // *Journ. Theor. Biol.* – 1965. – Vol. 8, №2. – P. 357–366.