

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

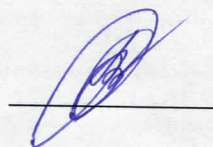
Направление: 03.04.02 — Физика

Профиль. медицинская физика

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

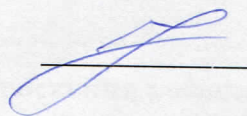
Определение пространственной структуры комплекса 30S субъединицы
рибосомы с белком RbfA *Staphylococcus aureus* на основе данных
криоэлектронной микроскопии

Студент 2 курса
группы 06-119
«16» июня 2023 г



(Глазырин М.С.)

Научный руководитель
д.ф.-м.н., профессор
«16» июня 2023 г



(Усачев К.С.)

Научный консультант
научный сотрудник НИЛ
«Структурная биология», КФУ
«16» июня 2023 г



(Бикмуллин А.Г.)

Заведующий кафедрой медицинской физики
д.х.н., профессор
«16» июня 2023 г



(Аганов А.В.)

Казань — 2023

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Патогенная бактерия <i>Staphylococcus aureus</i>	6
1.1.1 Белоксинтезирующий аппарат бактерий.....	6
1.1.2 Структура и функции 30S субъединицы рибосомы	8
1.1.3 Фактор сборки рибосомы RbfA. Структура и функции.....	10
1.2. Криоэлектронная микроскопия.....	13
1.2.1 Криоэлектронная микроскопия	13
1.2.2 Устройство электронного микроскопа	14
1.2.3 Подготовка образцов для криоэлектронной микроскопии	20
1.2.4 Принципы получения изображения в криоэлектронной микроскопии	23
1.3 Методы анализа и визуализации данных криоэлектронной микроскопии.....	26
1.3.1 Relion 3.1.....	26
1.3.2 Coot.....	35
1.3.3 Chimera X.....	36
1.3.4 PHENIX	37
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	38
2.1 Материалы и методы	38
2.1.1 Выделение и очистка RbfA.....	38
2.1.2 Выделение 30S субъединицы рибосомы	40
2.1.3 Формирование комплекса 30S с RbfA.....	42
2.1.4 Криоэлектронная микроскопия	43
2.2 Обработка данных криоэлектронной микроскопии комплекса 30S с RbfA <i>S. aureus</i>	43
2.2.1 Обработка микрографий комплекса 30S с RbfA <i>S. aureus</i> в Relion 3.1.....	43
2.2.2 Модель комплекса 30S с RbfA и её встраивание в крио-ЭМ карту с использованием PHENIX и Coot.....	44
2.2.3 Анализ структуры RbfA из <i>S. aureus</i> и его влияния на 30S субъединицу.....	53
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	60
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	61

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

S. aureus — *Staphylococcus aureus*

RbfA — Ribosome binding factor (фактор связывания рибосомы)

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК — рибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

рРНК — рибосомные рибонуклеиновая кислота

тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота

РК – рентгеновская кристаллография

крио-ЭМ — криоэлектронная микроскопия

ИФ – инициаторный фактор

ВВЕДЕНИЕ

На данный момент проблема резистентности патогенных микроорганизмов вызывает серьезные опасения [1, 2]. Так, согласно статистическим прогнозам в Индии к 2050 году из-за заболеваний, вызванных устойчивыми к антибиотикам патогенами, в год будет умирать порядка 20 миллионов человек [3]. И это проблема не только развивающихся густонаселённых стран, но и прогрессивных стран, находящихся на острие научного знания [3 - 6].

Грамположительная бактерия золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) является одним из наиболее опасных и распространенных патогенных микроорганизмов, вызывающих многочисленные инфекции сердечно-сосудистой системы [7]. *S. aureus* обладает высокой устойчивостью к стрессовым условиям, что обеспечивает быстрое формирование резистентности к антибиотикам у данного патогена. Масштаб существующей проблемы и потенциальных катастрофических последствий приводит к необходимости поиска и синтеза противомикробных агентов, нарушающих синтез белка в клетке, действуя на её белоксинтезирующий аппарат, ключевым элементом которого является макромолекулярный РНК-белковый комплекс - рибосома [8].

Процесс сборки рибосомы и синтеза белка представляет собой сложный многоступенчатый процесс, протекающий в присутствии дополнительных биологических агентов. Так, например, формирование рибосомы осуществляется в присутствии белкового фактора сборки RbfA, обеспечивающего правильную укладку 16S рРНК малой 30S субъединицы рибосомы. Это позволяет белоксинтезирующему аппарату клетки корректно сформироваться.

Решение структуры комплекса 30S субъединицы рибосомы с белком RbfA методом криоэлектронной микроскопии позволит понять роль белка RbfA в созревании 30S субъединицы и разработать противомикробные

агенты, влияющие на процесс сборки рибосомы и трансляции *S. aureus*, что будет способствовать прекращению выделения им факторов патогенности.

Таким образом, целью данной работы было решение структуры комплекса 30S субъединицы рибосомы с белком RbfA методом криоэлектронной микроскопии. Для её достижения были поставлены следующие задачи:

1. Оптимизация условий экспрессии и очистки белка RbfA и 30S субъединицы рибосомы из *S. aureus* для структурных исследований
2. *In vitro* реконструкция комплекса 30S-RbfA из *S. aureus*
3. Восстановление трехмерной карты плотности распределения потенциала.
4. Получение структуры комплекса 30S-RbfA из *S. aureus*
5. Анализ структуры белка RbfA и комплекса 30S-RbfA из *S. aureus*

В результате были обработаны крио-ЭМ данные, на основании которых была получена трёхмерная карта распределения потенциала комплекса 30S субъединицы рибосомы *S. aureus* с белком RbfA с разрешением 2,9 Å.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Патогенная бактерия *Staphylococcus aureus*

S. aureus — грамположительные бактерии, являющиеся возбудителями большого круга внутри и внебольничных инфекционных заболеваний. Появление новых штаммов *S. aureus* с множественной устойчивостью (VRSA — ванкомицин-резистентный золотистый стафилококк, MRSA — мецитиллин-резистентный золотистый стафилококк, GISA — гликопептид-резистентный золотистый стафилококк) значительно затрудняет лечение инфекций [7, 9].

1.1.1 Белоксинтезирующий аппарат бактерий

Согласно центральной догме молекулярной биологии процесс перехода информации описывается следующей схемой: ДНК → РНК → БЕЛОК. Первоначально на этапе транскрипции происходит «запись» генетической информации с ДНК на мРНК, и синтез последней на матрице ДНК. Далее в процессе трансляции на матрице мРНК происходит биосинтез белка из аминокислот в специальной органелле — рибосоме. Бактериальные рибосомы состоят из двух субъединиц (30S (малой) и 50S (большой)) и представляют собой комплекс рРНК, специфически связанной с рибосомными белками (р-белками) (рисунок 1). В отсутствие процесса трансляции в клетке, субъединицы рибосомы находятся в диссоциированном состоянии и не взаимодействуют друг с другом [8, 10].

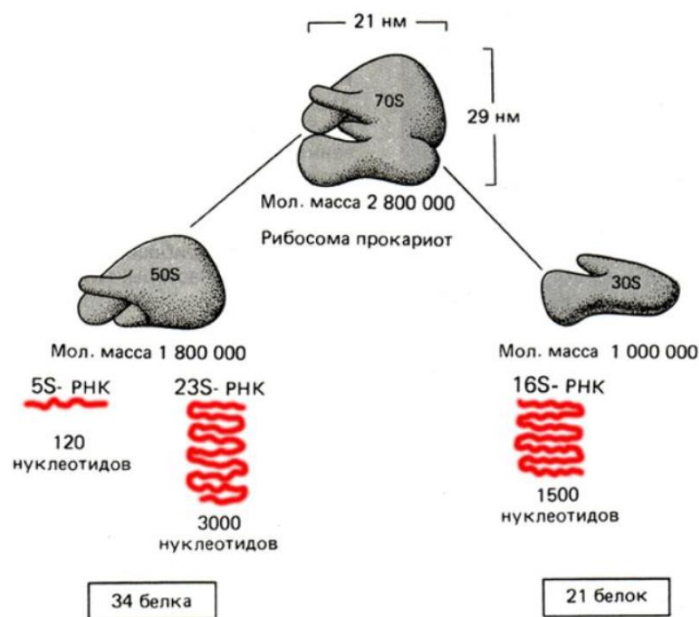


Рисунок 1 – Схематическое представление структуры 70S рибосомы [8]

Биосинтез белка состоит из трёх этапов: инициация, элонгация и терминация трансляции. На первом этапе 30S и 50S субъединицы соединяются на участке связывания рибосомы, находящемся на мРНК, при участии инициаторных факторов (ИФ). За счёт гидролиза ГТФ и диссоциации ИФ происходит окончательная сборка 70S рибосомы. Далее на этапе элонгации мРНК «протягивается» через рибосому на три нуклеотида за один раз. Одновременно с этим, тРНК с комплементарной к мРНК последовательностью антикодонов доставляет в рибосому новую аминокислоту для её присоединения к полипептидной цепи. Терминация трансляции происходит по достижении рибосомой стоп-кодона на мРНК. Полипептидная цепь отсоединяется от рибосомы, а последняя диссоциирует на отдельные субъединицы (30S и 50S) (рисунок 2).

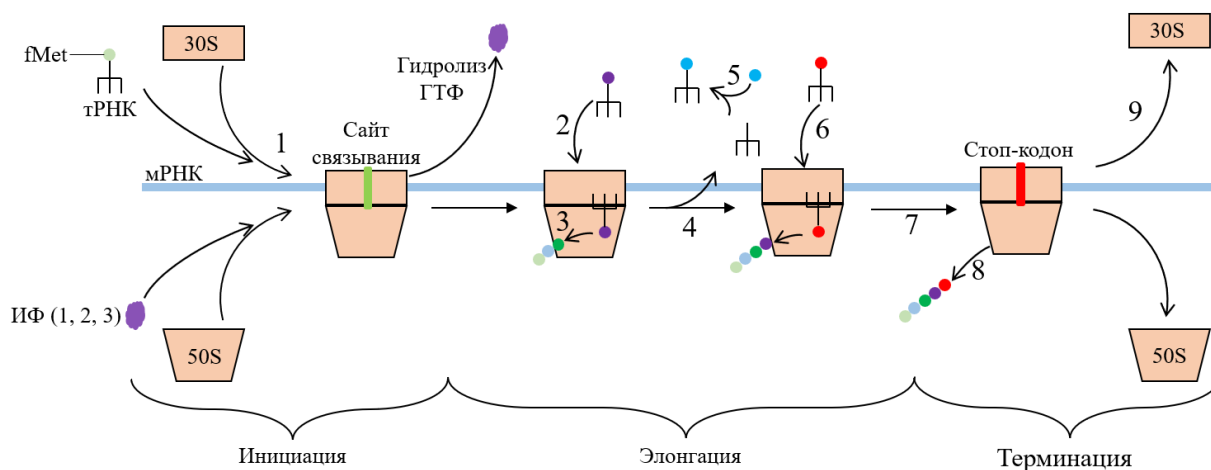


Рисунок 2 – Схематическое изображение процесса трансляции прокариот. 1 – связывание субъединиц рибосомы на мРНК, 2 – перенос аминокислот тРНК к 70S рибосоме, 3 – формирование белковой цепи из аминокислот, 4 – протяжка рибосомы по мРНК и диссоциация тРНК, 5 – связывание новой аминокислоты с тРНК, 6 – продолжение процесса элонгации, 7 – достижение рибосомой стоп-кодона, 8 – диссоциация полипептидной цепи, 9 – диссоциация 70S рибосомы на отдельные субъединицы

Процесс трансляции крайне важен для жизнедеятельности бактериальных клеток. За счёт него клетка способна реализовывать свою генетическую информацию и синтезировать жизненно важные белки.

1.1.2 Структура и функции 30S субъединицы рибосомы

Малая (30S) субъединица рибосомы состоит из 16S рРНК и 21 рибосомного белка, имеет молекулярную массу 1 МДа и делится на нескольких доменов [11 – 13]. Схематично структура 30S субъединицы приведена на рисунке 3.

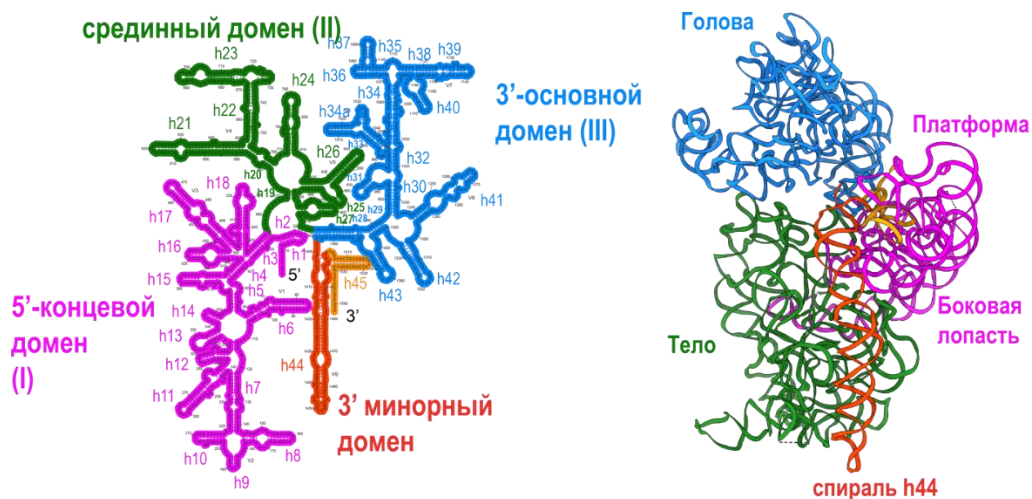


Рисунок 3 – Описание структуры 30S субъединицы рибосомы. Слева диаграмма вторичной структуры 16S рРНК. Нумерация и диаграмма соответствуют последовательности *E. Coli*. Справа третичная структура 16S РНК. Цвета доменов совпадают с таковыми для левой части рисунка. [13]

Вторичная структура 16S рРНК малой субъединицы рибосомы делится на 4 домена (выделены цветом на рисунке 3): 5'-концевой домен, срединный домен, 3'-основной и 3'-минорный домены (рисунок 3). Данные домены 16S рРНК особенно тесно связаны в области шеи 30S субъединицы, расположенной возле спирали h45 (рисунок 3, выделена оранжевым). Этот регион называется декодирующим центром и является наиболее функционально важным участком 30S субъединицы рибосомы для процесса биосинтеза белка. Располагается он в 3'-минорном домене [13].

Как отмечалось ранее, в состав малой субъединицы входит также и 21 рибосомный белок. Их распределение на рРНК в 30S субъединице асимметрично. Они сосредоточены преимущественно в верхней, боковых и задней частях малой субъединицы рибосомы. Такое расположение обусловлено специфичностью взаимодействия р-белков с участками 16S рРНК и необходимо для корректного выполнения ими своих функций (рисунок 4) [13, 14].

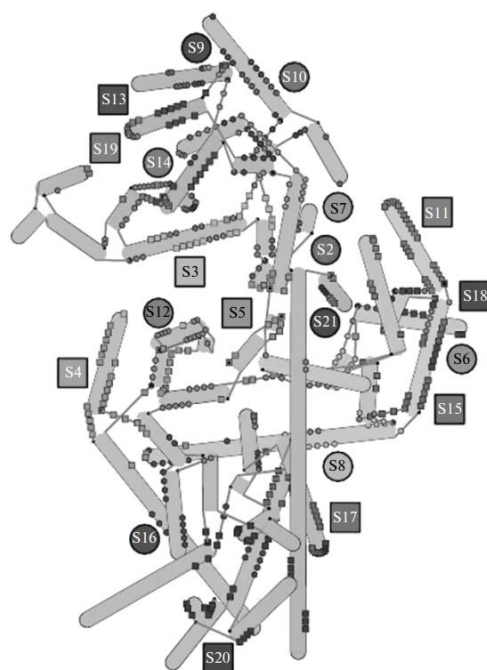


Рисунок 4 – Специфичность контактов р-белков и 16S рРНК. Представлена плоская схема укладки 16S рРНК [14]

Основной функцией 30S субъединицы рибосомы является точное позиционирование мРНК в декодирующем центре и обеспечение правильного прочтения генетического кода. Следовательно, при нарушении конформации 16S рРНК, неправильном позиционировании р-белков на её поверхности и при прочих возможных нарушениях, процесс трансляции значительно затрудняется или же вовсе прекращается. Поэтому в процессе формирования малой субъединицы рибосомы принимают участие множество факторов сборки, обеспечивающих стабильность данного процесса на всём его протяжении. Одним из таких факторов является белок RbfA, который более подробно будет обсуждаться в следующем разделе.

1.1.3 Фактор сборки рибосомы RbfA. Структура и функции

RbfA – белок холодового шока, обеспечивающий рост клеток при температурах 10-15 °С [11, 15, 16]. Структура данного фактора сборки

рибосомы включает от 90 до 128 аминокислотных остатков, его молекулярная масса, находится в диапазоне 12 – 21 кДа (в зависимости от рода бактерий).

Ранее структура RbfA была определена для некоторых прокариот (*T. thermophilus* (PDB: 2DYJ), *E. coli* (PDB: 1KKG), *S. aureus* (PDB: 8BXA), *H. influenzae* (PDB: 1JOS)) методами рентгеновской кристаллографии и спектроскопии ЯМР. Их сравнение позволяет заключить, что несмотря на различия в аминокислотном составе, фактор RbfA является высоко консервативным белком в прокариотах с высокой гомологией по структуре. (рисунок 5).

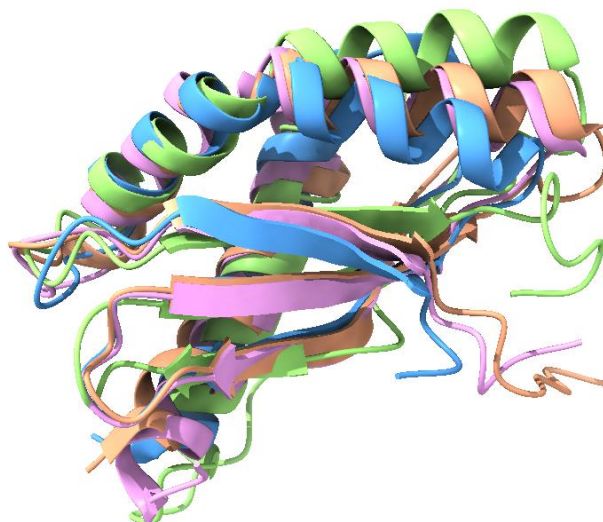


Рисунок 5 – Сравнение структур RbfA для *T. thermophilus* (синий, РСА, PDB: 2DYJ), *E. coli* (зелёный, ЯМР, PDB: 1KKG), *S. aureus* (розовый, РСА, PDB: 8BXA), *H. influenzae* (оранжевый, РСА, PDB: 1JOS)

Аббревиатурой РСА на рисунке 5 обозначены структуры, полученные методом рентгеноструктурного анализа, ЯМР – методами ядерно-магнитного резонанса.

Анализ аминокислотной последовательности и положений элементов вторичной структуры RbfA для указанных на рисунке 5 прокариот также подтверждает структурную консервативность фактора холодового шока

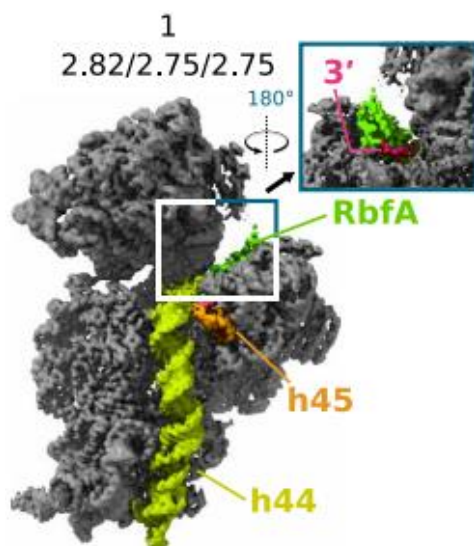


Рисунок 7 – Крио-ЭМ структура 30S субъединицы *E. coli* с фактором сборки RbfA [15]

Также предполагается, что после формирования 16S рРНК RbfA участвует в процессе стабилизации малой субъединицы рибосомы [11, 14].

1.2. Криоэлектронная микроскопия

1.2.1 Криоэлектронная микроскопия

Криоэлектронная микроскопия (крио-ЭМ) – это метод определения трехмерных структур методом электронной микроскопии на основе анализа проекционных изображений молекулярных комплексов, замороженных в «нативном», некристаллическом состоянии ультратонких электроннопрозрачных образцов. Увеличенное изображение объекта получается с использованием пучка электронов с $E \sim 10^2\text{-}10^3$ кЭв. В отличие от электронной микроскопии, в которой исследуемый образец находится при комнатной температуре, что значительно вредит объекту исследования, крио-ЭМ подразумевает заморозку образца при низких температурах ($T \sim 4$ К), что

сохраняет образец в стабильном состоянии. Этим методом можно получать структуры биомолекул размером от ~ 50 кДа.

1.2.2 Устройство электронного микроскопа

Для того, чтобы понять принцип формирования увеличенного изображения объекта в криоэлектронной микроскопии, необходимо рассмотреть устройство электронного микроскопа, представленное на рисунке 8.

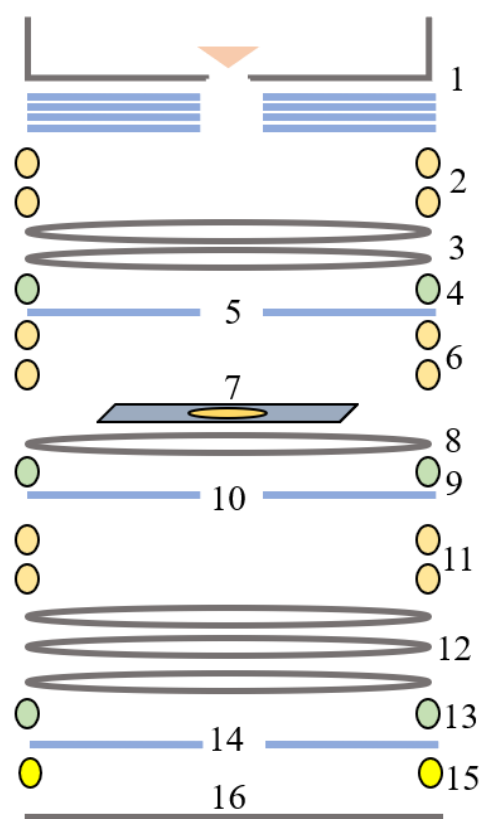


Рисунок 8 – Схема электронного микроскопа. 1 – электронная пушка, 2 – дефлекторы пушки, 3 – конденсаторные линзы, 4 – конденсаторные стигматоры, 5 – конденсаторная диафрагма, 6 – лучевые дефлекторы, 7 – подложка с образцом, 8 – линза объектива, 9 – стигматоры объектива, 10 – диафрагма объектива, 11 – дефлекторы изображения, 12 – промежуточные линзы, 13 – дифракционные стигматоры, 14 – диафрагма, 15 – проекционные дефлекторы, 16 – экран с детекторами

Электронный микроскоп, схема которого приведена на рисунке 8, состоит из 16 структурных элементов. Электронная пушка (рисунок 8, (1)) является источником электронов, вырывающихся с поверхности вольфрамовой нити за счёт явления термоэлектронной эмиссии. Электронная пушка состоит из раскалённого катода (вольфрамовая нить) с температурой $T \sim 3000 \text{ K}$, анода и цилиндра Венельта, который играет роль модулятора для первичной фокусировки пучка электронов. Фокусировка пучка обеспечивается подачей на модулятор отрицательного напряжения $U \sim -300 \text{ кВ}$, относительно катода. Это обеспечивает формирование электрического поля, отталкивающего электроны, для большинства областей катода, что приводит к эмиссии электронов лишь из области наконечника вольфрамовой нити катода (рисунок 9).

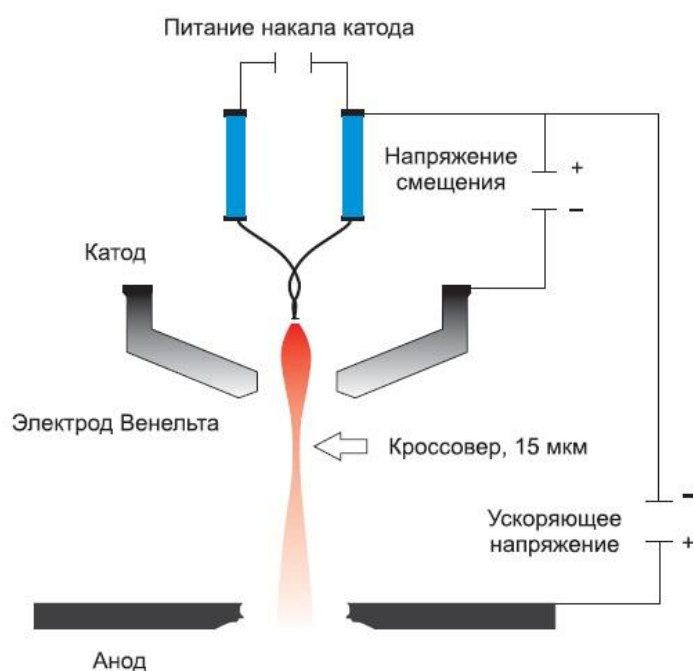


Рисунок 9 – Схема электронной пушки с указанием основных её составляющих

После прохождения электронами модулятора пушки, в пучке образуется кроссовер (точка минимального сечения электронного пучка) (рисунок 9). Диаметр электронного пучка в кроссовере составляет 15-20 мкм.

Такое сужение обусловлено взаимодействием электронов с электрическим полем цилиндра Венельта. Между анодом и катодом электронной пушки имеется постоянное электрическое поле, за счёт которого электроны ускоряются и перемещаются через выходное отверстие анода в ускоряющую структуру электронного микроскопа.

Качественное увеличенное изображение обеспечивают два параметра электронного пучка: пространственная и временная когерентности. Чем лучше пространственная когерентность, тем большее количество электронов пучка двигаются вдоль одной траектории и попадают на образец под одним углом. Так, например, если часть электронов движется вдоль оси микроскопа и «падает» на образец под прямым углом, а другая часть электронов перемещается по искривлённой траектории и попадает на объект исследования под углом $\alpha \neq 90^\circ$ (относительно горизонта), то датчики регистрируют электроны, прошедшие сквозь образец под разными углами. Дальнейший анализ сигналов, зафиксированных датчиками, в таком случае приведёт к формированию двух изображений образца с различных углов обзора. Их объединение приведёт к ухудшению качества увеличенного изображения объекта. Частично данная проблема решается усреднением по большому количеству изображений, однако подстройка магнитных линз, обеспечивающих низкую ширину и прямолинейность распространения пучка, вносит более весомый вклад в корректировку пространственной когерентности. Высокая временная когерентность подразумевает одинаковую скорость электронов эмиссии. Так, если часть электронов пучка обладает большей энергией, чем другая, то она будет фокусироваться магнитными линзами в другой точке (до плоскости образца или после неё), что приведет к дефектам в изображении [17].

Для корректировки временной когерентности в электронном микроскопе есть дефлекторы (рисунок 8, (2)). Это катушки или системы электромагнитных линз (рисунок 8, (3-5)), расположенные так, что их ось симметрии перпендикулярна направлению распространения электронного

пучка, корректировку которого они и выполняют [18]. Далее ускоренные электроны с исправленной траекторией попадают в систему конденсорных линз, с помощью которых варьируется толщина пучка (рисунок 10).

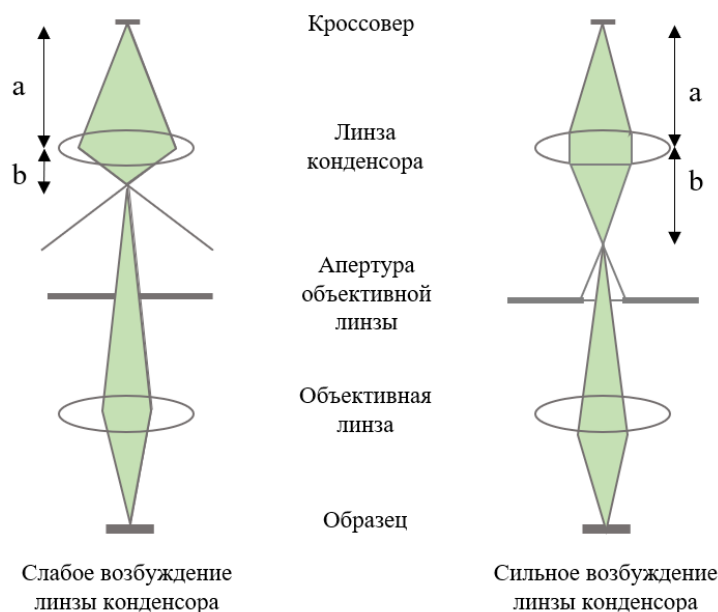


Рисунок 10 – Формирование электронного пучка электромагнитными линзами (стигматоры не изображены) для сканирующей электронной микроскопии

При увеличении возбуждения линзы конденсора диаметр электронного пучка, падающего на апертуру, снижается.

В том случае, когда микроскоп обладает низкой пространственной когерентностью, и пучок электронов после прохождения конденсорных линз отклонён от оси микроскопа, может возникнуть астигматизм электронного пучка. Данная aberrация приводит к отличающимся фокусным расстояниям для разных направлений в плоскости сканирования. С целью предотвращения астигматизма в системе электромагнитных линз имеется конденсорный стигматор (4). Искажения, вызванные астигматизмом, могут быть описаны формулой (1):

$$R_a = \beta \Delta f, \quad (1)$$

где R_a – радиус абберационного диска, β – угол раскрытия линзы, Δf – максимальная разница в фокусе, возникшая из-за астигматизма.

Помимо астигматизма, часто встречаются дефекты сферической и хроматической аббераций. Первая проявляется в неспособности линзы сфокусировать пучок электронов от точечного источника, за который принимаем катод, в одну точку пространства. Связано возникновение сферической абберации с неоднородным воздействием магнитного поля линзы на электроны вдали от линзы. Радиус абберационного диска описывается формулой (2):

$$R_a = C_s \beta^3, \quad (2)$$

где R_a – радиус абберационного диска, C_s – коэффициент сферической абберации, β – угол раскрытия линзы.

Согласно выражению (2), чем дальше электрон будет находиться от оси электронного микроскопа, тем меньше будет его фокусное расстояние, что приводит к дисковидному изображению.

Хроматическая абберация, в свою очередь, обусловлена низкой временной когерентностью электронного микроскопа, что также приводит к формированию дискового искажения на изображении. Радиус абберационного диска описывается формулой (3):

$$R_c = C_s \beta \Delta E, \quad (3)$$

где R_c – радиус абберационного диска, C_s – коэффициент хроматической абберации, β – угол раскрытия линзы, ΔE – отклонение энергии электрона от среднего значения.

После корректировки толщины пучка за счёт конденсорных линз, электроны попадают на конденсорную диафрагму (рисунок 8, (5)), пропускающую лишь часть электронного пучка. Диафрагма необходима для снижения влияния сферических аббераций. Через неё должна проходить только та часть электронного пучка, которая движется вдоль оси линзы объектива. Таким образом формируется электронный пучок определённого

диаметра, который затем попадает на сетку держателя (рисунок 8, (7)), на которой и находится образец (рисунок 8, (7)).

После рассеяния на образце электроны проходят через ряд дефлекторов, стигматоров, линз и диафрагм, чтобы в конечном итоге попасть на экран, содержащий на себе детекторы (рисунок 8, (16)). Последние могут быть самыми различными: флуоресцентный экран, ПЗС-детектор (детектор на основе прибора с зарядовой связью) или прямой детектор. Наиболее удобным является именно прямой детектор, поскольку на ПЗС-датчике электроны сильно рассеиваются, что приводит к разным «весам» отдельных электронов при обработке изображения [18].

Важной особенностью любого электронного микроскопа является наличие вакуума в его колонне. Это необходимо, чтобы нивелировать рассеяние электронов на частицах воздуха, а также снизить влияние окружающей среды на объект исследования. Вакуум в колонне создается системой из трех типов насосов: механический, масляный диффузионный и ионный насосы [19, 20]. Помимо них в структуре электронного микроскопа присутствуют энергетические фильтры, регулирующие энергию электронов, поступающих на детектор [21].

Взаимодействие первичных электронов с образцом приводит к выходу из объекта исследования электронов и электромагнитного излучения (рисунок 11). В зависимости от используемых детекторов, их расположения, а также области взаимодействия пучка электронов с образцом, выделяют несколько видов электронной микроскопии: сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ), сканирующая просвечивающая электронная микроскопия (СПЭМ). Для различных видов электронной микроскопии необходимы микроскопы с различным внутренним устройством.

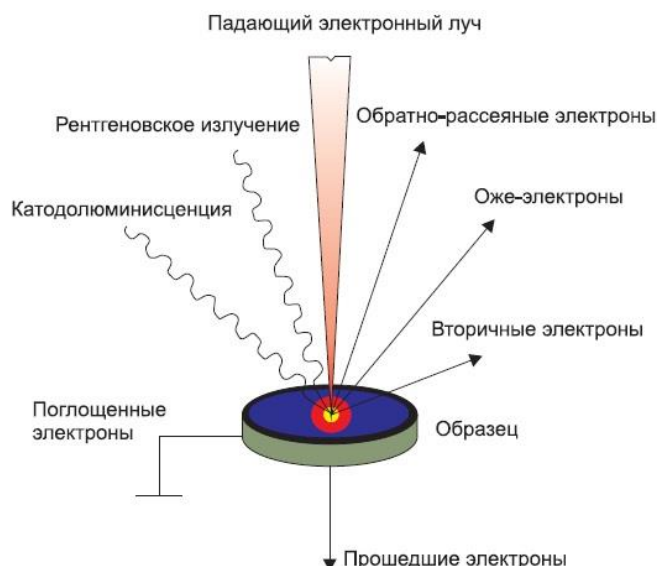


Рисунок 11 – Эмиссия электронов и электромагнитных волн из образца (упруго и неупруго рассеянные электроны не показаны)

На рисунке 11 показан результат взаимодействия электронов с образцом. Помимо прошедших электронов из образца вылетают электроны, подвергшиеся упругому и неупругому рассеянию. Упругое рассеяние происходит под большим углом, чем неупругое.

1.2.3 Подготовка образцов для криоэлектронной микроскопии

Крио-ЭМ включает в себя три методики подготовки образцов: заморозку под высоким давлением, резкую заморозку и заморозку погружением [22 - 24]. Образцы рибосом для криоэлектронной микроскопии готовятся с использованием заморозки погружением.

Метод заморозки погружением реализуется следующим образом: образец наносится на сетку держателя электронного микроскопа, в результате этого в перфорационных отверстиях сетки образуется слой жидкости, который из-за малых размеров исходного отверстия можно считать тонким и однородным. Далее лишняя жидкость удаляется с помощью фильтровальной бумаги, после чего сетка погружается в сосуд с

жидким этаном, который, в свою очередь, находится в сосуде с жидким азотом. После этого сразу же проводят измерения (рисунок 12) [24].

Приготовление образцов по методу погружения непосредственно сопряжено с сеткой держателя, что может привести к явлению криомерцания. Оно обусловлено различными коэффициентами термического сжатия материалов, из которых изготовлена сетка. Однако данная проблема решается созданием сетки из материалов с близкими коэффициентами термического сжатия [24]. Следует отметить, что методика заморозки погружением проводится в специализированной камере Vitrobot (производство FEI), который препятствует воздействию окружающей среды на образец.

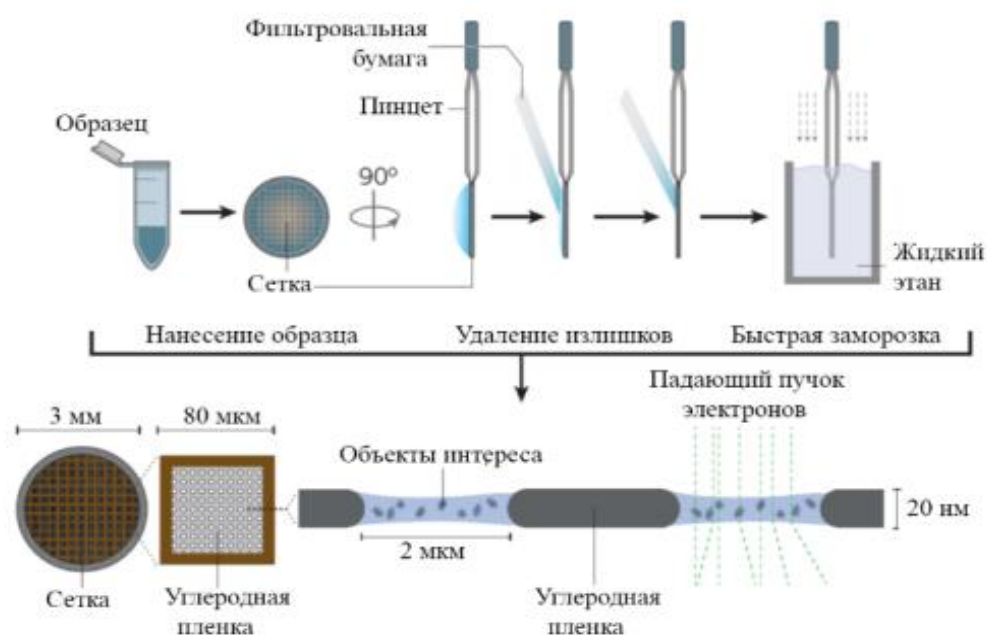


Рисунок 12 – Схема подготовки образца методом погружения [25]

Согласно [26], образцы, исследуемые при более низких температурах, менее подвергаются радиационному воздействию электронного излучения, что позволяет сохранять внутреннюю структуры изучаемых биологических объектов (рисунок 13).

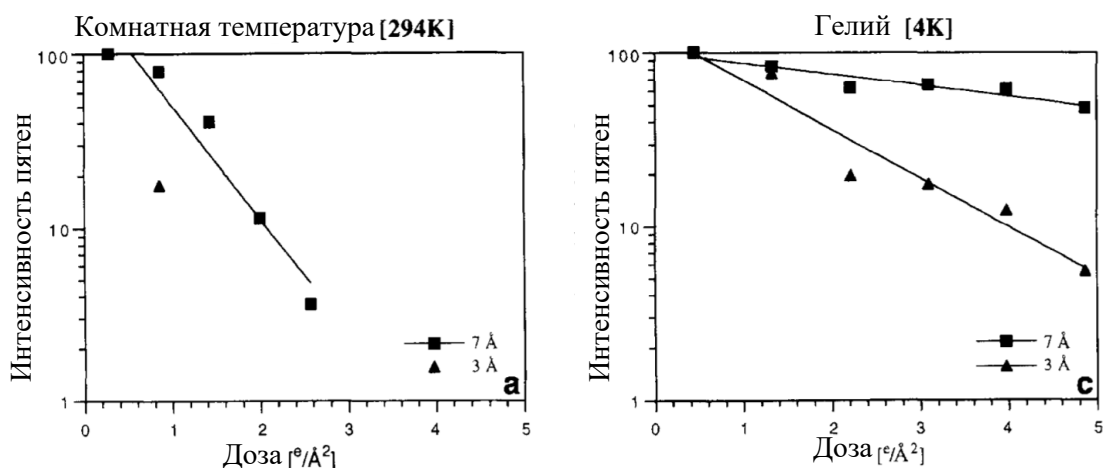


Рисунок 13 – Зависимость интенсивности двух пятен от дозы излучения, попавшей на образец, находящийся при комнатной температуре (слева) и при температуре жидкого гелия (справа) [26]

На рисунке 13 по оси Оу отложена интенсивность пятен (зависимая от отраженной энергии) в произвольном масштабе, по оси Ох отложена доза, измеряемая в количестве электронов на квадратный ангстрем. На нём показана зависимость отраженной энергии для двух структурных порядков при комнатной температуре, одно из которых соответствует порядку на 7 \AA (соответствует альфа-спиралям в упакованном белке), а другое на 3 \AA (боковые цепи белка). Из данного графика видно, что уже после дозы в $2,5 e/\text{Å}^2$ отраженная энергия уменьшается больше, чем в 10 раз. Это означает, что при комнатной температуре при $2,5 e/\text{Å}^2$ относительные положения альфа-спиралей в белке разрушаются. Для образца, находящегося при температуре жидкого гелия (рисунок 13 справа), наблюдается более медленный спад отраженной энергии с ростом общей дозы. Так, отраженная энергия, соответствующая структуре с разрешением 7 \AA , спадает, приблизительно, на 30% при дозе равной $5 e/\text{Å}^2$. Участки биологической структуры, соответствующие высокому разрешению, также демонстрируют более пологий спад отраженной энергии, что подчеркивает преимущество криоэлектронной микроскопии для исследования биологических объектов.

1.2.4 Принципы получения изображения в криоэлектронной микроскопии

Получение изображения в крио-ЭМ возможно за счёт существования амплитудного и фазового контрастов.

Амплитудный контраст основан на представлениях об электронах как о частицах и обусловлен различием между энергиями рассеянных электронов, падающих на детектор. Данный факт не противоречит необходимости высокой временной когерентности, ведь речь идёт о разных электронных пучках. Так, если в колонне микроскопа после образца и линзы поставить диафрагму и энергетический фильтр, то до детекторов дойдут лишь электроны с достаточно большой энергией (нерассеянные электроны, неупруго рассеянные электроны). То есть, амплитудный контраст, фактически, заключается в «удалении» части прошедших образец электронов.

Фазовый контраст, в свою очередь, связан с рассмотрением электрона как плоской волны. В этом случае, волна, падающая на исследуемый образец, одновременно во всех центрах его рассеяния создает когерентные источники вторичных волн (по аналогии с интерференцией на двух щелях), которые затем интерферируют между собой. Результатом такого взаимодействия является образование волн, распространяющихся под углом α к горизонту. Угол α определяется из формулы (4)

$$d \cdot \frac{\sin \alpha}{\lambda} = \pm 0, \pm 1, \pm 2, \dots, \quad (4)$$

где d – расстояние между центрами рассеяния, α – угол между горизонтом и направлением распространения волны, λ – длина волны.

Из данного соотношения видно, что чем меньше расстояние между центрами рассеяния, тем больше будет угол конструктивной интерференции. Схематично это показано на рисунке 14.

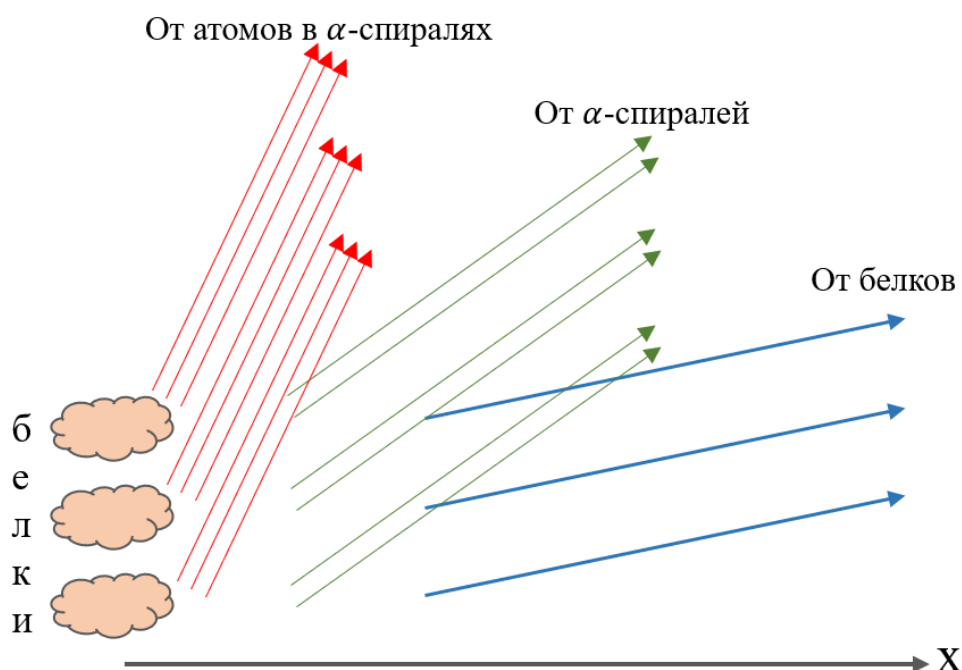


Рисунок 14 – Направления конструктивной интерференции от различных центров рассеяния. Оранжевыми пятнами - белки. Синие стрелками - интерференция для белков, зелёные стрелки - интерференция для альфа-спиралей, красные стрелки - интерференция для отдельных атомов в альфа-спиралях

Представленные на рисунке 14 волны, распространяющиеся после конструктивной интерференции под различными углами, имеют разные фазы, что и обеспечивает фазовый контраст. При этом волны, рассеянные под малым углом к горизонту, несут в себе информацию о количестве центров рассеяния, находящихся на расстоянии d друг от друга в образце.

Для объяснения формирования изображения электронный пучок рассматривают, как набор плоских электронных волн, характеризующихся волновыми функциями ψ_i , амплитудой A и фазой θ . При падении данных волн на образец, представляющий собой скопление большого количества центров рассеяния, они рассеиваются под различными углами, затем фокусируются магнитной линзой и попадают на экран с детекторами, на котором формируется изображение. Экран с детекторами фиксирует лишь те электроны, которые преодолевают энергетический фильтр, формируя амплитудный контраст. На выходе детекторов получается дискретный набор

значений, пропорциональных интенсивностям электронных волн, пришедших в каждый отдельный пиксел.

Поскольку электронные волны распространяются в пространстве, то их взаимодействие удобно представлять на комплексной плоскости. Таким образом, работая с векторами волновых функций в комплексной плоскости, можно легко вычислить вектор общей волновой функции, характеризующий взаимодействие i электронных волн. Квадрат модуля общей волновой функции есть вероятность обнаружения электрона в каком-либо конкретном пикселе. Таким образом, увеличивая число пикселей на детекторе, можно перейти к плотности вероятности обнаружения электрона в конкретном пикселе, что, в конечном итоге, приводит к получению электронной плотности исходного объекта. Естественно, достичь такого предела нельзя, поэтому в эксперименте получается лишь приближительная модель реальной электронной плотности исследуемого образца [27].

Трёхмерное изображение в крио-ЭМ исследованиях строится на основе проекций. Поскольку объект исследования находится на сетке в разных положениях, то получить проекции не составляет проблем. Ниже приведена схема 3D реконструкции.

Схема, представленная на рисунке 15, демонстрирует практический способ восстановления трехмерной структуры объекта через проекции с использованием теоремы о проекционном срезе [22]. Согласно ей, двумерное преобразование Фурье от проекции трехмерного объекта есть сечение трехмерного преобразования Фурье от исходного объекта [22].

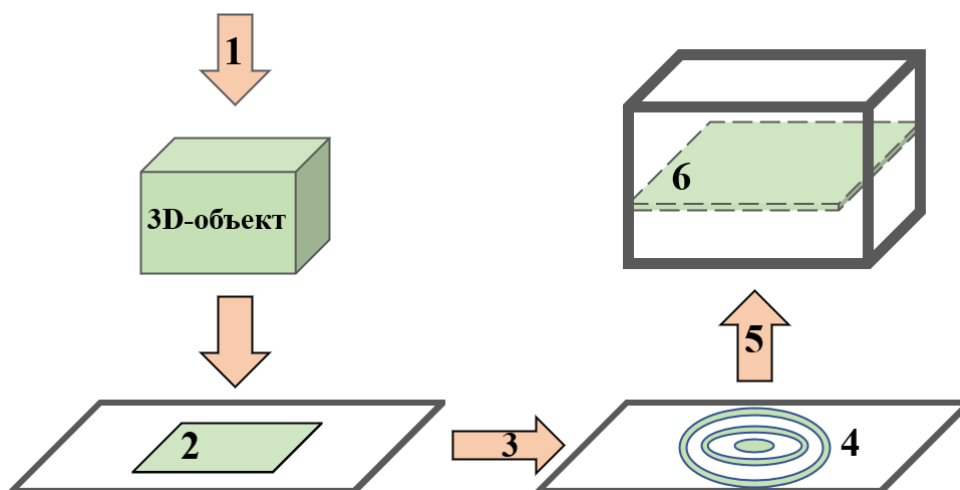


Рисунок 15 – Схематическое изображение трехмерной реконструкции объекта по двумерным проекциям. 1 – проектирование объекта в данном направлении, 2 – двумерное изображение трехмерного объекта, 3- двумерное Фурье преобразование, 4 – набор амплитуд и фаз, 5 – применение теоремы о проекционном срезе, 6 – сечение трехмерного преобразование Фурье

Получая проекции объекта с самых разных сторон, трёхмерное пространство заполняется срезами двумерного Фурье-преобразования от полученных проекций. После чего выполняется обратное трёхмерное преобразование Фурье, результатом которого будет реконструированная 3D модель исходного объекта.

1.3 Методы анализа и визуализации данных криоэлектронной микроскопии

1.3.1 Relion 3.1

Relion 3.1 – программа, построенная на эмпирическом Байесовском подходе, для уточнения трёхмерных моделей или двумерных классов. Она предназначена для обработки крио-ЭМ данных, полученных методом отдельных частиц (single particle analysis) [28]. Целью работы в Relion 3.1

является обработка и корректировка двумерных изображений исследуемого объекта и дальнейшее установление его трёхмерной структуры. На рисунке 16 приведена схема, демонстрирующая необходимые этапы работы с Relion 3.1 для получения конечной 3D модели.

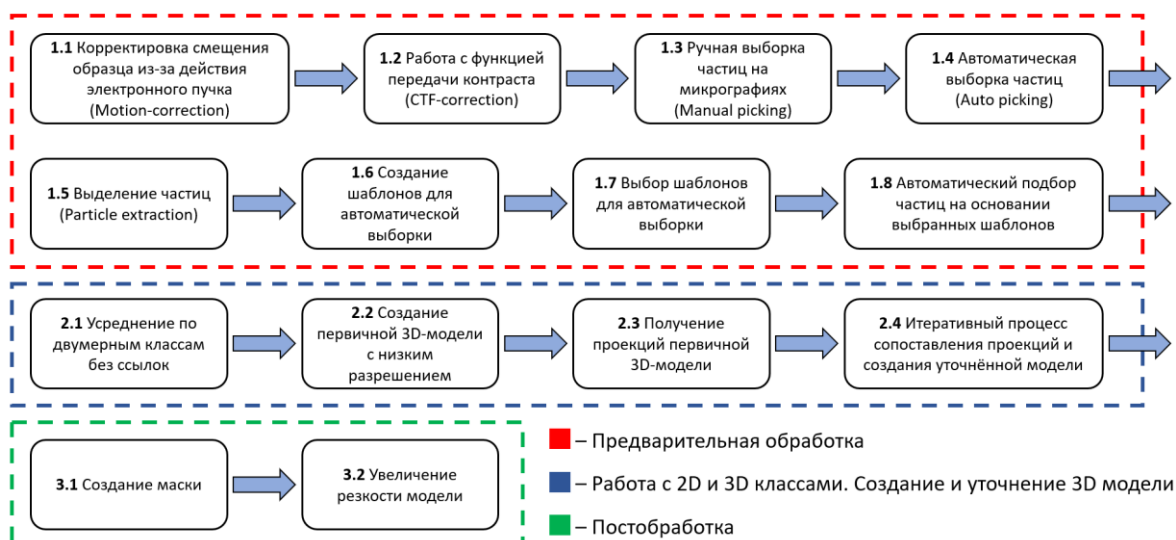


Рисунок 16 – Этапы работы с крио-ЭМ данными в программе Relion 3.1

Для того, чтобы понять важность этапа 1.1, необходимо представлять конструкцию сетки-держателя образца. Она представляет собой сетку, изготовленную из углерода, в нижней части которой находятся медные стержни. При заморозке образца для крио-ЭМ отверстия сетки, в которых находился образец, покрываются стеклообразным льдом. Воздействие электронным пучком приводит к деформации льда и сетки, схематичное изображение которых приведено на рисунке 17 [29].

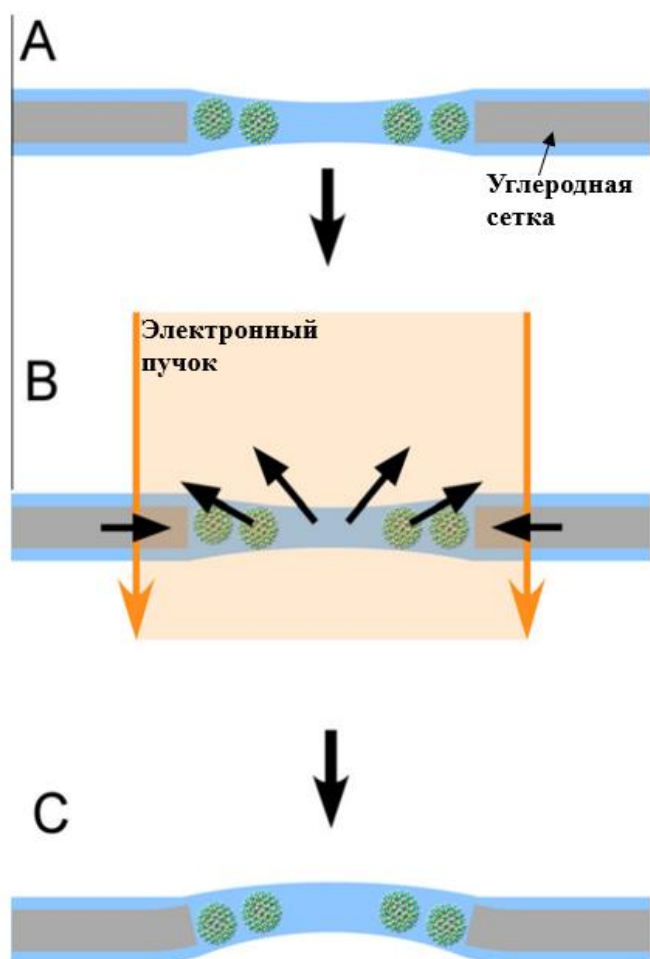


Рисунок 17 – Схематичное изображение движения, вызванного электронным пучком.

(А) Частицы взвешены в стеклообразном льду. (В) Облучение образца пучком электронов и деформация льда и углеродной плёнки. (С) Сохранение дефектов льда и плёнки (пластическая деформация) [29]

При освещении образца электронным пучком углеродная плёнка немного деформируется, что приводит к уменьшению отверстия. Помимо этого, электронный пучок вызывает радиолиз растворителя и макромолекул, что приводит к образованию радикалов внутри льда, повышающих его внутреннее давление (рисунок 17, В). Таким образом, лёд как бы выпячивается над поверхностью углеродной плёнки, двигая и вращая частицы внутри себя. (рисунок 17, С). После остановки потока электронов на образец, изменения в образце сохраняются (пластическая деформация). В

результате пластических деформаций льда и сетки частицы смещаются, что приводит к ухудшению качества изображения (рисунок 18) [29].

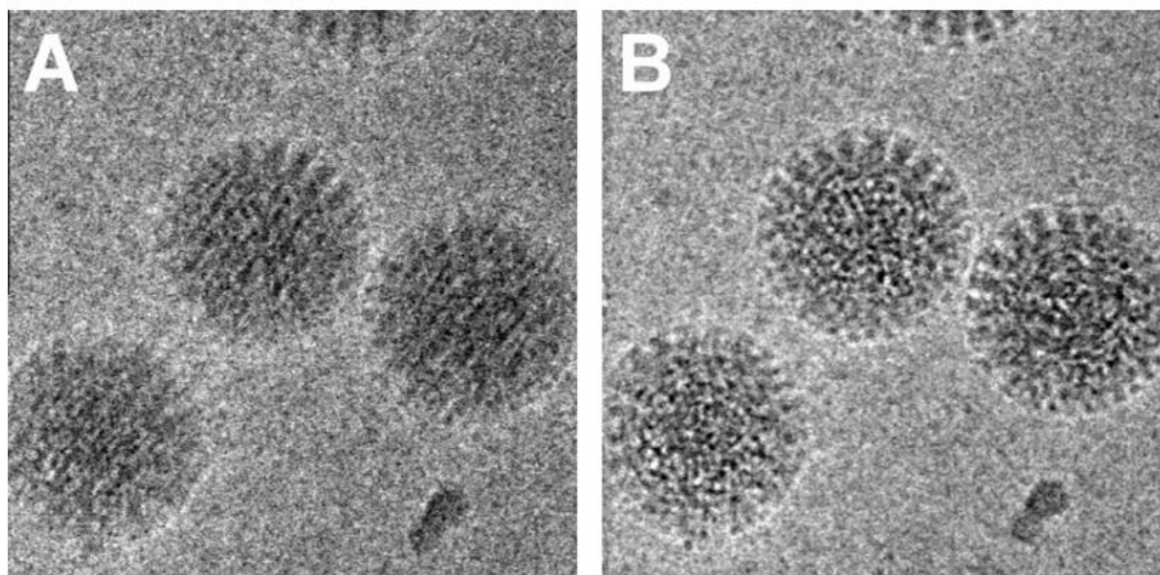


Рисунок 18 – Трансляционная коррекция изображений для уменьшения размытости. (А) Размытые изображения с потерянной информацией высокого разрешения. (В) То же изображение после трансляционного выравнивания [29]

По рисунку 18 видно, что трансляционная коррекция изображения поспособствовала улучшению контраста с деталями высокого разрешения [29]. Таким образом, корректировка смещения образца под действием электронного пучка (beam-induced motion correction) является важным этапом в процессе обработки крио-ЭМ данных.

Следующим этапом является работа с функцией передачи контраста (CTF). CTF показывает, сколько Фурье-компонент переносится в изображения, а также вносимый ими вклад. Для описания формирования функции передачи контраста следует рассмотреть рассеяние электронов на образце под разными углами. В этом случае, в зависимости от разности хода, будет наблюдаться различный сдвиг фаз, что можно отобразить на комплексной плоскости (рисунок 19).

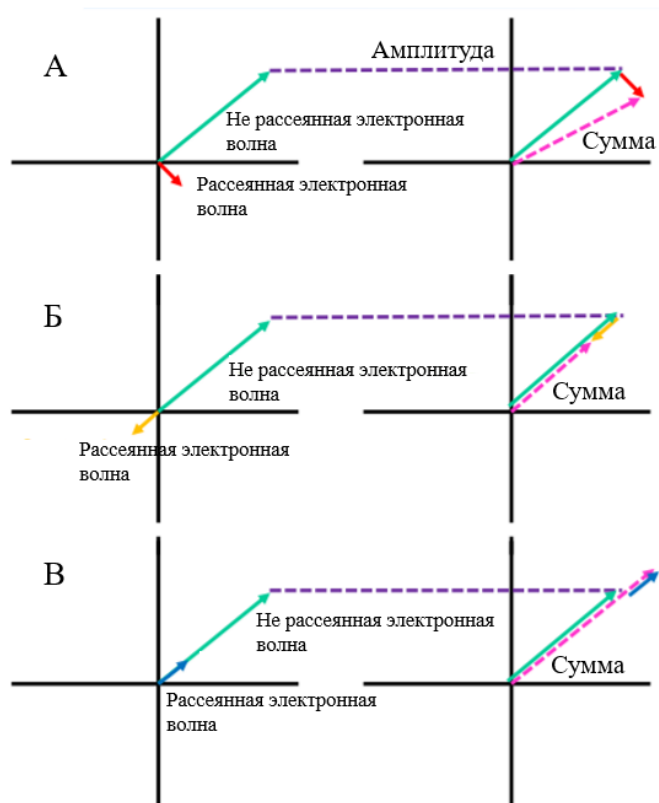


Рисунок 19 – Диаграммы Арганда для различных фазовых сдвигов. (А) Отсутствие контраста в силу отсутствия фазового сдвига (малый угол рассеяния). (Б) Отрицательный контраст за счёт дополнительного фазового 90 градусного сдвига от разности хода. (В) Положительный контраст за счёт дополнительного 270 градусного фазового сдвига от разности хода [30]

На основании таких диаграмм для каждого рассеянного электрона можно получить идеализированную функцию передачи контраста (рисунок 20).

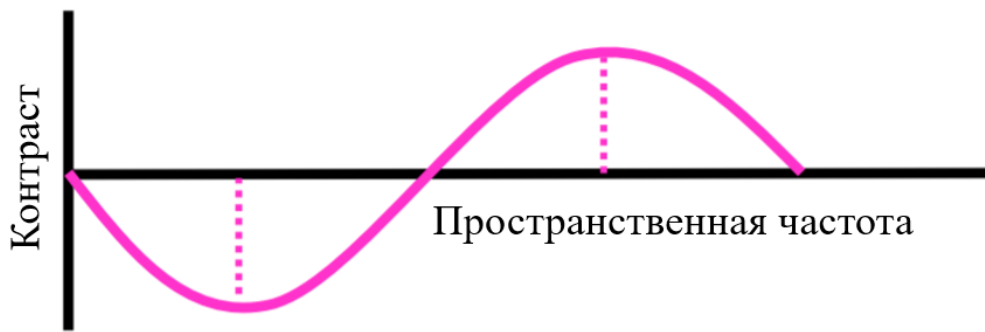


Рисунок 20 – Функция передачи контраста. Максимальное и минимальное значения этой функции равны соответственно 1 и -1

Так, если на определённой пространственной частоте к STF равняется 1, то соответствующая к Фурье-компонента вносит положительный вклад в итоговое изображение. Если же STF равняется -1, то такая Фурье-компонента вносит отрицательный вклад в изображение. Те пространственные частоты, на которых функция передачи контраста равна 0 не вносят никакого вклада в итоговое изображение.

Математически STF описывается формулой (5):

$$CTF = -2\sin \left[\pi \left(\Delta z \cdot \lambda \cdot k^2 - C_s \cdot \lambda^3 \cdot \frac{k^4}{2} \right) \right], \quad (5)$$

где Δz – расфокусировка, λ – длина волны электрона, k – пространственная частота, C_s – коэффициент сферической аберрации.

В процессе проведения эксперимента можно изменять параметр расфокусировки, который будет влиять на получаемое изображение. На рисунках 21 и 22 приведены влияния параметра расфокусировки на контраст изображений, а также его влияние на функцию передачи контраста.

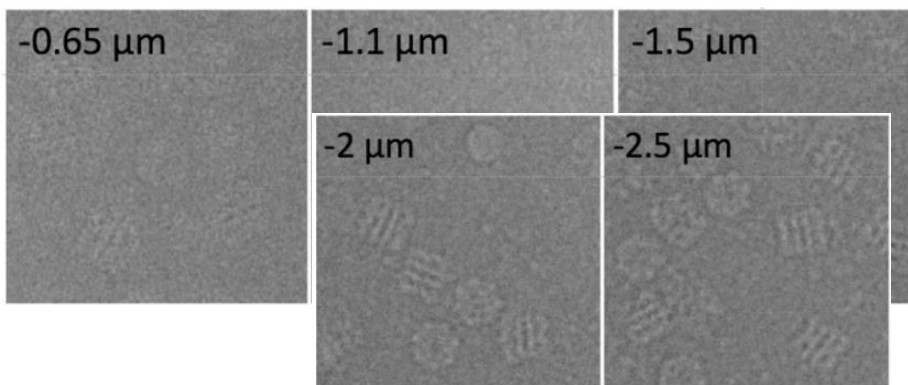


Рисунок 21 – Влияние расфокусировки на контрастность получаемого изображения [30]

По мере увеличения расфокусировки Δz , относительный сдвиг фаз между рассеянной и нерассеянной электронными волнами на низких пространственных частотах увеличивается, что позволяет легче увидеть объект [30].

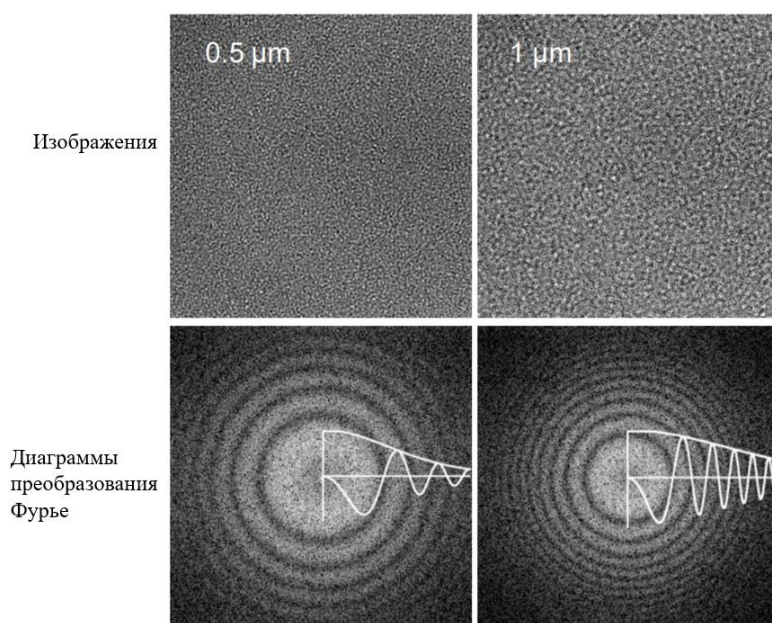


Рисунок 22 – Изменение STF, определяемое увеличением расфокусировки [30]

Функция передачи контраста оказывает влияние как на двумерные проекции, так и на трехмерные модели (карты). Таким образом, STF представляет собой весьма важную характеристику в криоэлектронной микроскопии. Если бы функция передачи контраста $STF = 1$, то качество изображения было бы неизменно хорошим. Однако такого не наблюдается и STF всегда отлична от 1. С целью исправить недостатки изображения, вызванные функцией передачи контраста, проводится так называемая коррекция функции передачи контраста (CTF correction).

Для того, чтобы понять, как она проводится, необходимо ввести функцию рассеяния точки (PSF), которая будет описывать картину,

получаемую методом электронной микроскопии, при наблюдении точечного объекта. Обычно, в криоэлектронной микроскопии PSF представляет собой пятно, накладывающееся на изображения объекта. Это приводит к ухудшению общей картины.

Функция рассеяния точки связана с функцией передачи контраста формулой (6):

$$PSF = F(CTF), \quad (6)$$

где PSF – функция рассеяния точки, F – Фурье преобразование, CTF – функция передачи контраста.

Определим далее связь между изображением, исходным объектом и PSF через формулу (7):

$$\begin{aligned}
 Img = Obj \otimes PSF &\rightarrow F(Img) = F(Obj) \cdot F(PSF) = F(Obj) \cdot CTF \rightarrow \\
 \rightarrow F(Obj) &= \frac{F(Img)}{CTF} \rightarrow Obj = F^{-1} \left(\frac{F(Img)}{CTF} \right), \quad (7)
 \end{aligned}$$

где Img – изображение, Obj – объект, PSF – функция рассеяния точки, F – Фурье преобразование, CTF – функция передачи контраста, F^{-1} – обратное преобразование Фурье.

Последнее равенство в формуле (7) и выражает идею исправления функции передачи контраста. Графическая интерпретация приведена на рисунке 23.

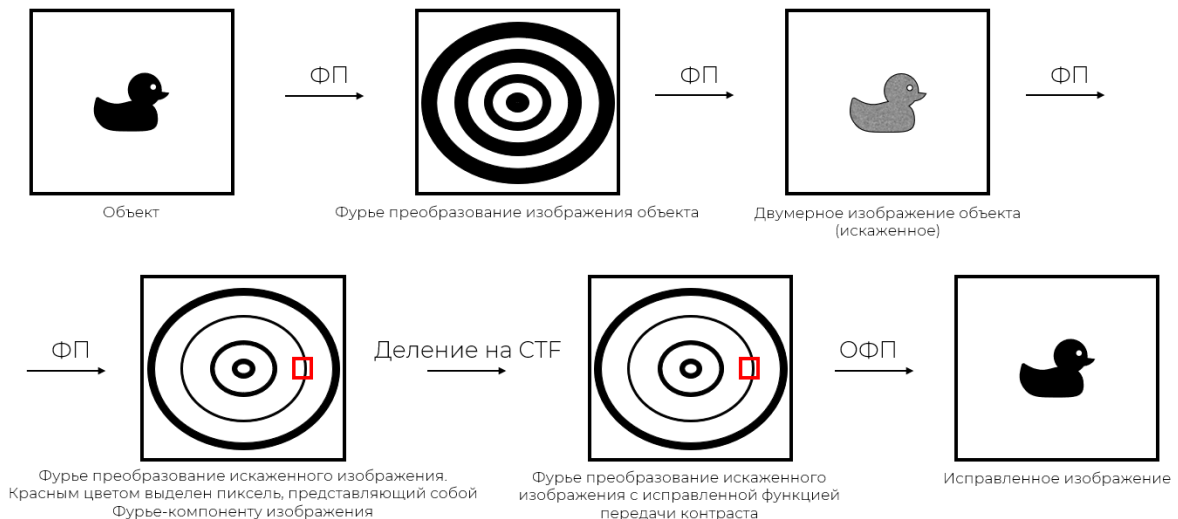


Рисунок 23 – Принцип исправления функции передачи контраста для получения лучшего изображения

Приведённая выше последовательность действий для исправления STF способствует получению исправленного изображения, что значительно упрощает последующую работу с микрографиями.

Дальнейшие этапы работы в Relion 3,1 (1.3-1.8, рисунок 16) сводятся к первоначальному ручному выбору частиц для последующей автоматической выборки, на основе которой формируются двумерные классы. На их основе, в дальнейшем, создаётся первичная трёхмерная модель, улучшение которой представляет собой итеративный процесс, схема которого приведена на рисунке 24.

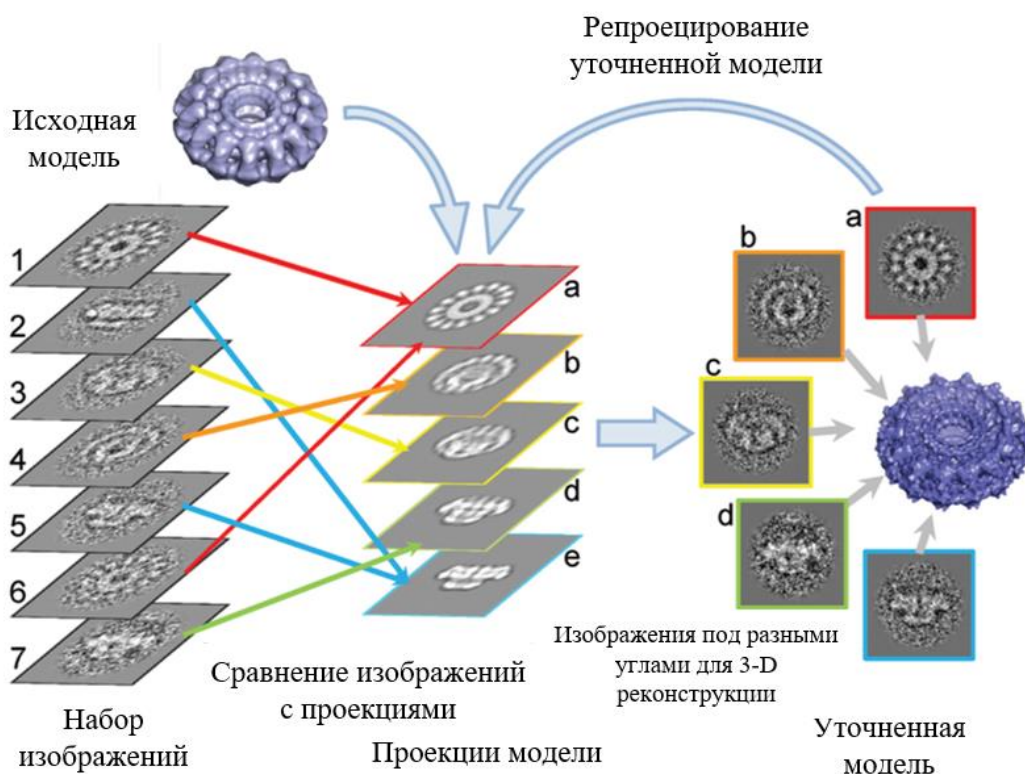


Рисунок 24 – Процедура сопоставления проекций. Цифрами 1-7 слева отмечены исходные изображения, в левом верхнем углу представлена исходная модель, построенная по исходным изображениям, буквами а-е по центру обозначены репроекции исходной модели, справа показаны средние классы и уточненная модель [22]

Схема, представленная на рисунке 24, объясняет итеративный процесс улучшения трёхмерной модели. На основе набора изображений строится первичная модель, которая затем репроецируется с различных направлений. Затем репроекции сравниваются с исходными изображениями для переклассификации. После того, как были обнаружены соответствия (показаны на рисунке 24 цветными стрелками), исходные изображения присваиваются классу (например, исходные изображения 1 и 6 соответствуют классу “а” в центре рисунка 24). Далее исходные изображения усредняются и формируют новый класс (класс “а” в правой части рисунка 24). Такая операция продлевается со всеми исходными изображениями и репроекциями исходной модели. На основе новых классов формируется уточненная модель (показана справа на рисунке 24), которая затем репроецируется с различных направлений. После этого, исходные изображения вновь сравниваются с репроекциями. Данный процесс происходит до тех пор, пока разрешение полученной модели не станет удовлетворительным [22].

В результате указанных выше действий получается трёхмерная карта плотности распределения потенциала, в которую в дальнейшем будет вписываться модель анализируемого объекта.

1.3.2 Coot

Coot – приложение для молекулярной графики (рисунок 25). В основном, Coot используется для построения кристаллографических молекулярных моделей, однако может использоваться и для работы с крио-ЭМ данными. В представленной работе это приложение использовалось для встраивания трёхмерной структуры комплекса 30S-RbfA, в плотность распределения потенциала, полученную в программе Relion 3.1 [31].

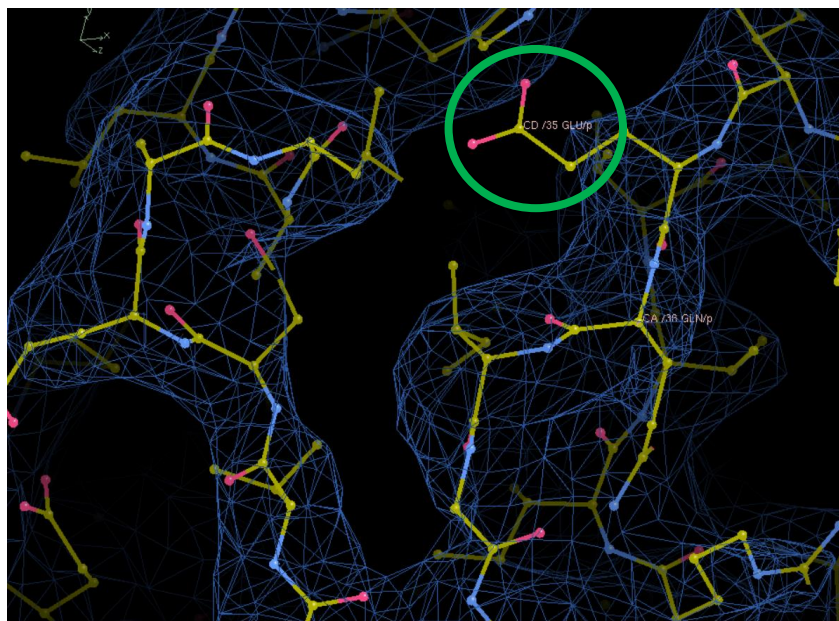


Рисунок 25 – Пример расположение структурных элементов 30S субъединицы рибосомы относительно электронной плотности (синяя область). Зеленым выделен остаток глутаминовой кислоты, не попадающий в электронную плотность при заданном разрешении последней

Основана работа приложения Coot на библиотеке по обработке молекулярных координат (mmdb) и на библиотеке для кристаллографических объектов и их вычислений (Clipper) [30]. Это позволяет использовать большой спектр инструментов для работы с молекулярной моделью: пространственное уточнение модели (real space refinement), геометрический анализ структуры, варьирование углов между химическими связями, вращение участка модели, отдельной цепи или молекулы, построение карты Рамачандрана и другие [30, 31].

1.3.3 Chimera X

ChimeraX – программное обеспечение для визуализации и анализа молекулярных структур (рисунок 26) [32].

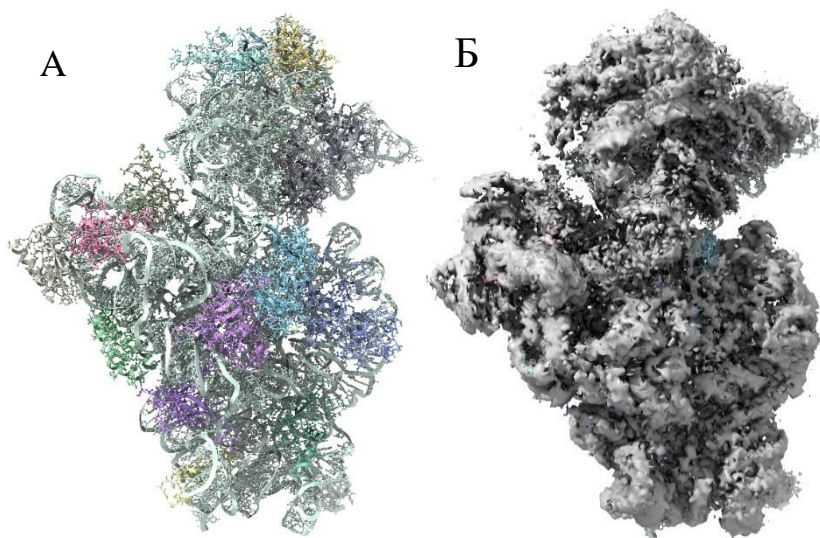


Рисунок 26 – (А) – Молекулярная структура 30S субъединицы рибосомы в комплексе с фактором сборки RbfA. (Б) - Молекулярная структура 30S субъединицы рибосомы в комплексе с фактором сборки RbfA с наложенной на неё плотностью распределения потенциала по данным крио-ЭМ

Эта программа позволяет работать с картами плотности распределения потенциала модели, что демонстрируется на рисунке 26.

1.3.4 PHENIX

PHENIX – многокомпонентное программное обеспечение, с помощью которого можно определять макромолекулярные структуры на основе данных, получаемых различными методами (крио-ЭМ, рентгеновская кристаллография и прочие).

Для каждого из методов подход к анализу данных различен, однако общий алгоритм получения моделей аналогичен (рисунок 27).



Рисунок 27 – Общий алгоритм определения макромолекулярной структуры в PHENIX [33]

Вначале карта оценивается на предмет аномалий или ошибок, которые впоследствии могут повлиять на качество полученной структуры. Затем формируется первичная модель структуры макромолекулы, которая в результате итеративного процесса претерпевает изменения и улучшается.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы и методы

2.1.1 Выделение и очистка RbfA

Ген RbfA *S. aureus* амплифицировали из геномной ДНК с помощью пары специфических праймеров (rbfA_Nhis_NdEI_fwd, rbfA_Nhis_HindIII_rev.). Затем данный ген клонировали в вектор pET28a с 6HIS-tag (метка с шестью гистидинами).

Экспрессия белка проводилась в штамме *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen) на богатой питательной среде LB, содержащей хлорамфеникол (Cm 25 мг/мл) и канамицин (Km 50 мг/мл). Клетки выращивали при 37 °C и перемешивали со скоростью 180 об/мин. По достижении оптической плотности $OD_{600} = 0,6$ AU/мл к клеткам добавлялся 1 mM IPTG (изопропил-бета-галактопиранозид – индуктор транскрипции генов под контролем *lac*-оперона) для индуцирования экспрессии *rbfA*. Экспрессия длилась 6 часов при 30°C и 180 об/мин.

Затем клетки осаждали центрифугированием при 5000 об/мин, 4°C и замораживали при –20°C.

Замороженные клетки были разморожены при 4°C и лизированы под воздействием ультразвука в буфере CRB (таблица 1) с добавлением ингибиторов протеаз PIC (Roche), фенолметилсульфонил фторида (PMSF) и эндогенного лизоцима T7 (pLysS). Полученный клеточный лизат очищался центрифугированием сначала при 25000g в течение 30 минут, а затем при 100000g в течение 45 минут.

Очистка RbfA из супернатанта проводилась в два этапа. Первым этапом являлась металл-хелатная аффинная хроматография на Ni-NTA смоле (QIAGEN), основанная на специфичном связывании ионов никеля с аминокислотными остатками гистидина в последовательности белка. Для увеличения ионной силы раствора белка и минимизации неспецифических ионных взаимодействий после нанесения супернатанта, колонка промывалась буфером А (таблица 1). Для очистки колонки от неспецифических взаимодействий, колонка промывалась буфером В (таблица 1) с небольшим содержанием имидазола. Элюция белка производилась буфером Е (таблица 1), в состав которого входит 300 mM имидазола. Элюированный белок был осажден сульфатом аммония (80%, w/v). Вторым этапом очистки была эксклюзионная хроматография (гель-фильтрация), основанная на разделении веществ по размеру за счёт их разной способности проникать в поры неподвижной фазы. Гель-фильтрация проводилась в

буфере R с использованием хроматографической системы NGC Discover и колонки Enrich SEC70 (BioRad).

Таблица 1 – буферы для выделения и очистки RbfA

Название буфера	Состав буфера
Буфер CRB	20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,5 M NH ₄ Cl, 1 mM DTT
Буфер A	20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1 M NH ₄ Cl, 1 mM DTT
Буфер B	20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,5 M NH ₄ Cl, 1 mM DTT, 20 mM имидазол
Буфер E	20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,5 M NH ₄ Cl, 1 mM DTT, 0.3 M имидазол
Буфер R	50 mM NaPH (pH 6,8), 0,25 M NH ₄ Cl

Чистота образца оценивалась с помощью 15% полиакриламидного гель-электрофореза в денатурирующих условиях (SDS-PAGE). Полученные образцы концентрировались с помощью концентраторов Amicon Ultra с отсечением по молекулярной массе в 10 кДа. Концентрация белка определялась на спектрофотометре при 280 нм с учётом коэффициента экстинкции RbfA ($4470 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2.1.2 Выделение 30S субъединицы рибосомы

Получение малой субъединицы рибосомы требовало предварительного выделения 70S рибосомы и её последующей диссоциации на 30S и 50S субъединицы.

Образец 70S рибосом выделялся из двух литров культуры *S. aureus* RN6390, выращенной на богатой среде LB при 37°C и 180 об/мин в шейкере-инкубаторе. По достижении оптической плотности $\text{OD}_{600} = 1 \text{ AU/мл}$,

инкубация прекращалась. Клетки дважды промывались буфером А (таблица 2) и осаждались центрифугированием при 4750g. Клеточный осадок был заморожен при -80°C .

Клетки были разморожены при 4°C и ресуспендированы в 30 мл буфера А, к которому были добавлены ингибиторы протеаз, ДНКазы I (Roche), 3,5 мг лизостафина, который разрушает клеточную стенку *S. aureus*. Клетки были лизированы при 37°C в течение 45 минут, а клеточный лизат очищался центрифугированием при 30000g в течение 90 минут. К полученному супернатанту добавлялся ПЭГ 20000 (Hampton Research) (2.8 % в соотношении веса к объему) для первой стадии фракционирования. Надосадочная жидкость извлекалась, а концентрация ПЭГ увеличивалась до 4.2 % (масса к объему). Полученный раствор центрифугировался при 20000g в течение 10 минут, рибосомный осадок ресуспендировался в 30 мл буфера А и наслаивался на 25 мл сахарной подушки (таблица 2). После наслаивания образец центрифугировался в ультрацентрифуге с использованием ротора Beckman Type 45 Ti при 158420g в течение 15 часов.

Осадок, образовавшийся после центрифугирования и содержащий рибосомы, ресуспендировался в буфере Е (таблица 2) до концентрации 7 мг/мл. Полученный раствор центрифугировался на градиентах плотности 7-30% сахарозы при 52214g в течение 15,5 часов с использованием ротора Beckman SW32Ti. После разделения в градиенте сахарозы фракции, соответствующие 70S рибосомам, объединялись, концентрация $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ повышалась до 25 мМ. Для избавления от сахарозы к раствору рибосом добавлялся ПЭГ 20000 до конечной концентрации 4.5% (масса к объему), затем образец центрифугировался при 20000g в течение 12 минут, после чего полученный осадок растворялся в буфере G (таблица 2) до конечной концентрации 25-30 мг/мл.

Малые субъединицы рибосомы получались путём диссоциации 70S рибосом в сахарозном (0-30%) градиенте в буфере D с пониженным содержанием магния (таблица 2). Разделение на градиенте производилось на

ультрацентрифуге Optima XPN-80 (Beckman Coulter) с использованием ротора SW32Ti при 119730g в течение 15 часов при 4°C.

Таблица 2 – буферы для выделения малых субъединиц рибосомы

Название буфера	Состав буфера
Буфер А	20 мМ HEPES-KOH (pH 7,5), 100 мМ NH ₄ Cl, 21 мМ Mg(OAc) ₂ , 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT
Сахарозная подушка	10 мМ HEPES-KOH (pH 7,5), 500 мМ KCl, 25 мМ Mg(OAc) ₂ , 1,1 М сахароза, 0,5 мМ EDTA, 1 мМ DTT
Буфер Е	10 мМ HEPES-KOH (pH 7,5), 100 мМ KCl, 10 мМ Mg(OAc) ₂ , 0,5 мМ EDTA, 1 мМ DTT
Буфер G	10 мМ HEPES-KOH (pH 7,5), 50 мМ KCl, 10 мМ NH ₄ Cl, 10 мМ Mg(OAc) ₂ , 1 мМ DTT
Буфер D	10 мМ HEPES-K (pH 7,5), 30 мМ NH ₄ Cl, 1 мМ Mg(OAc) ₂ , 1 мМ DTT

Полученные в результате разделения в градиенте плотности сахарозы фракции, содержащие 30S субъединицы, объединялись и концентрировались в концентраторах Amicon Ultra (отсечение по молекулярной массе 30 кДа) с заменой буфера D на буфер G (с большим содержанием магния) с добавлением 2,5 мМ спермидина. Полученный образец аликвотировался по 30 мкл, а затем замораживался в жидком азоте и хранился при –80°C.

2.1.3 Формирование комплекса 30S с RbfA

Комплекс 30S с RbfA собирался путём смешивания зрелых 30S субъединиц, выделенных при диссоциации очищенных 70S рибосом, и рекомбинантного RbfA в соотношении 1:30.

2.1.4 Криоэлектронная микроскопия

Из полученных ранее аликвот отбирались 2,7 мкл комплекса 30S-RbfA (концентрация ~1 мг/мл) и наносились на углеродные сетки (Quantifoil Cu R1.2/1.3, 200 ячеек). Избыточная жидкость удалялась промокиванием в течение 4-5 секунд с использованием прибора FEI Vitrobot Mark IV. Затем для заморозки образец погружался в жидкий этан при температуре ~100 К. Углеродные сетки переносились в просвечивающий электронный микроскоп Talos Arctica 200 кэВ (Thermo Fisher), оснащенный прямым детектором электронов K2 (Gatan). Энергетический фильтр настраивался на ширину 20 эВ.

Изображения регистрировались при увеличении 130000, что позволяет получить размер пикселя на изображении равным 1,022 Å, а также при диапазоне расфокусировки от -1,5 до -3 мкм. Всего было получено 876 микрографий исследуемого комплекса.

2.2 Обработка данных криоэлектронной микроскопии комплекса 30S с RbfA *S. aureus*

2.2.1 Обработка микрографий комплекса 30S с RbfA *S. aureus* в Relion 3.1

Обработка микрографий комплекса 30S-RbfA проводилась согласно схеме, проиллюстрированной на рисунке 16.

После загрузки микрографий в Relion 3.1, была проведена процедура корректировки смещения изображения, вызванного воздействием на образец электронного пучка (Beam-induced motion correction). Затем проводилась оценка параметров функции передачи контраста (CTF estimation). Среди

улучшенных изображений вручную выбирались изображения, содержащие 30S. Такие изображения использовались в качестве базиса для автоматической выборки частиц (Auto-picking), работающей на основе LoG-фильтра (Laplacian of Gaussian filter).

На основе автоматически отобранных частиц создавались усреднённые 2-D классы, среди которых вручную отбирались изображения с лучшим разрешением, которые использовались в качестве основы для построения первичной 3-D модели структуры комплекса 30S-RbfA.

Процедура сопоставления проекций, приведённая на рисунке 24, позволила на основе двумерных классов получить 3-D классы, среди которых отбирались лучшие по разрешению и форме. На их основе была построена итоговая крио-ЭМ карта со средним разрешением 2.9 Å.

2.2.2 Модель комплекса 30S с RbfA и её встраивание в крио-ЭМ карту с использованием PHENIX и Coot

Полученная после обработки микрографий в программе Relion 3.1 крио-ЭМ карта комплекса 30S с RbfA сравнивалась с индивидуальной картой малой субъединицы *S. aureus* (EMD-23052) (рисунок 27).

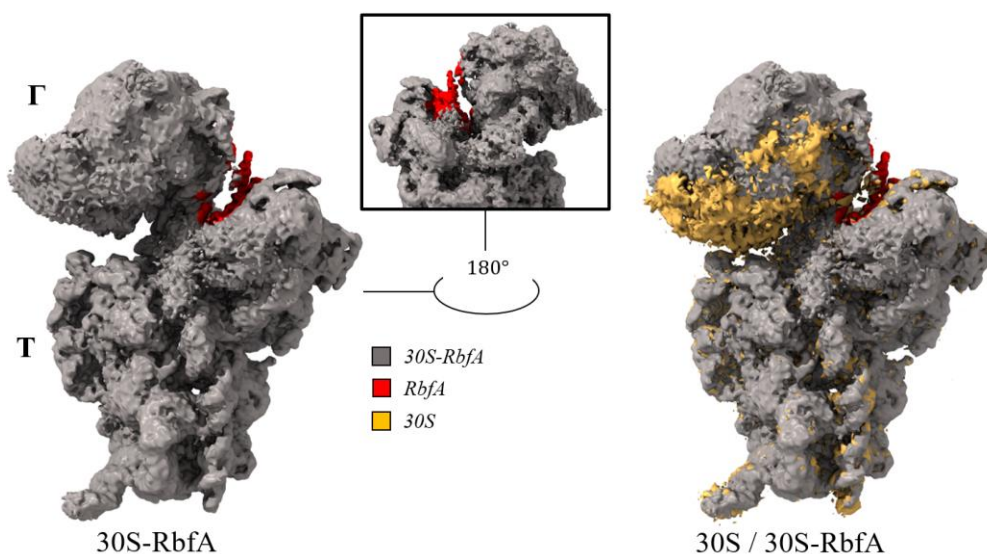


Рисунок 27 – Карта плотности крио-ЭМ комплекса *S. aureus* 30S-RbfA (серый) с разрешением 2.9 Å (слева) и её сравнение с картой *S. aureus* 30S (PDB: EMD-23052, золотой). Обнаруженная дополнительная плотность RbfA показана красным. Г – голова, Т – тело малой субъединицы

Такое соотнесение позволило выявить дополнительную плотность, которая и была отнесена к RbfA. Данная плотность располагается между областями платформы, шеи и головы, что согласуется с данными криоэлектронной микроскопии комплекса 30S с RbfA для *E. coli* (рисунок 7).

Таким образом, данную крио-ЭМ карту можно использовать для построения модели комплекса 30S-RbfA. Для создания последнего использовались кристаллическая структура RbfA (PDB: 8BXА, разрешение 2.2Å) и индивидуальная структура 30S *S. aureus* (PDB: 7KWG, разрешение 3.75 Å) (рисунок 28).

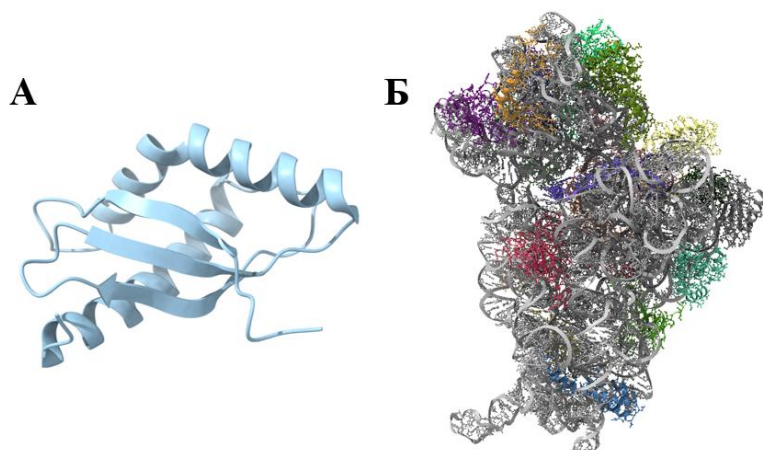


Рисунок 28 – (А) – Кристаллическая структура RbfA *S. aureus* (PDB: 8BXА) (Б) - Индивидуальная структура *S. aureus* 30S (PDB: 7KWG. 16S рРНК показана серым, другими цветами показаны рибосомные белки)

Структуры, представленные на рисунке 28, были объединены с использованием программного обеспечения ChimeraX, в котором проводилась грубая подгонка двух структур и их встраивание в крио-ЭМ карту (рисунок 29).

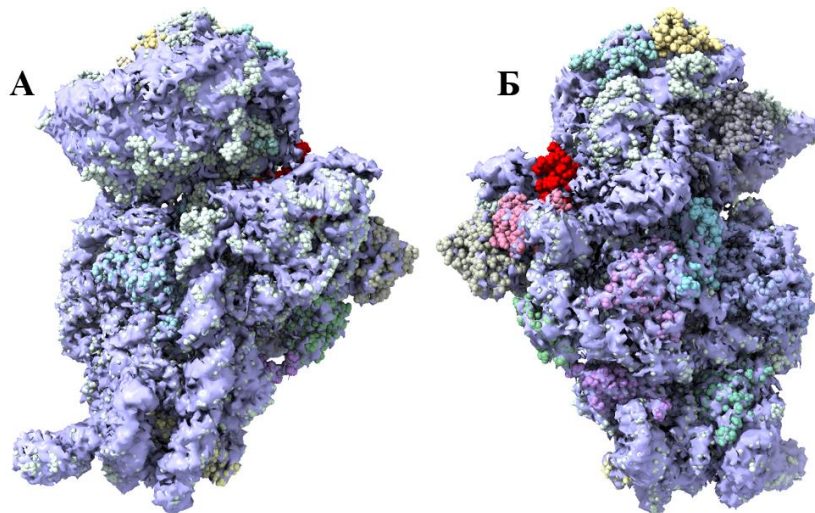


Рисунок 29 – Наложение крио-ЭМ карты на модель комплекса 30S-RbfA до обработки в PHENIX и Coot (RbfA выделен красным). (А) – передняя (спираль h44 в передней части структуры) часть комплекса 30S-RbfA, (Б) – задняя часть комплекса 30S-RbfA (спираль h44 с задней части структуры)

Как видно из изображения 29, далеко не все области структуры исследуемого комплекса вписаны в крио-ЭМ карту. Так, например, голова малой субъединицы рибосомы крайне подвижна, что не обеспечивает достаточно точного совпадения структуры 30S-RbfA с крио-ЭМ картой. Также видно, что область RbfA в построенной модели не полностью соотносится с крио-ЭМ картой. Построение точной модели исследуемого комплекса было выполнено в программном обеспечении PHENIX, инструменты которого позволили получить готовую точную модель комплекса 30S-RbfA.

Перед процедурой встраивания белка RbfA в индивидуальную модель малой субъединицы рибосомы, была проведена операция Autosharpen Map в PHENIX, которая позволила уточнить карту и повысить её разрешение.

Затем с использованием грубой модели, полученной в ChimeraX, данных аминокислотной последовательности 30S субъединицы, белка RbfA и крио-ЭМ карты комплекса 30S-RbfA, улучшенную после Autosharpen Map, был применён инструмент Map to model. Он разбивает крио-ЭМ карту на

несколько частей, а затем проводит уточнение модели по каждому такому участку карты. На выходе был получен PDB файл, содержащий итоговую структуру комплекса 30S-RbfA, изображенную на рисунке 30.

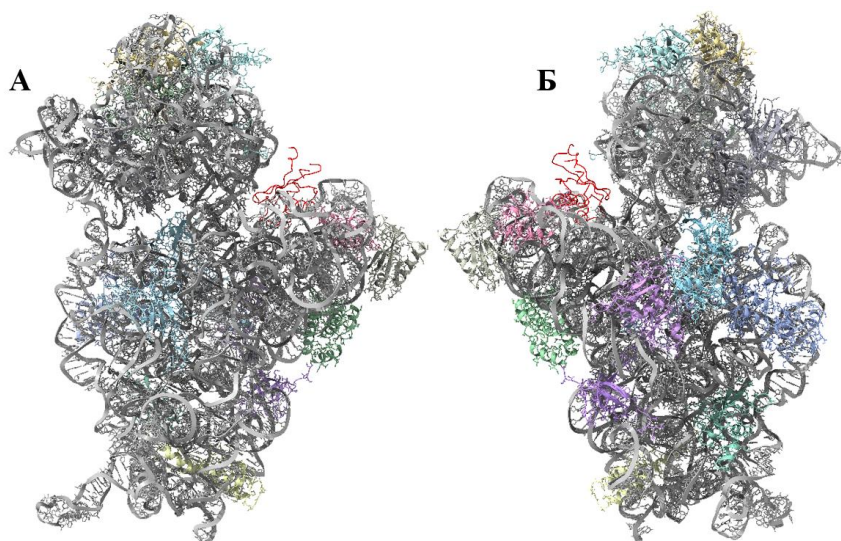


Рисунок 30 – Модель комплекса 30S-RbfA, составленная из кристаллической структуры RbfA (PDB: 8BXA, показана красным) и индивидуальной структуры *S. aureus* 30S (PDB: 7KWG). (А) – передняя (спираль h44 в передней части структуры) часть комплекса 30S-RbfA, (Б) – задняя часть комплекса 30S-RbfA (спираль h44 с задней части структуры)

Затем в Coot вручную вносились корректировки с целью уточнения структуры комплекса.

При работе с Coot использовались следующие инструменты:

- Анализ геометрической структуры: оценивает степень корректности геометрической структуры модели по следующим параметрам: длины связей между атомами в цепях, углы между связями, расположение атомов и плоскостей связей в пространстве. Данный инструмент позволяет увидеть нарушения геометрии структуры для каждой из цепей молекулы.

- Real Space Refine Zone: позволяет перемещать атомы, анализируя следующие параметры: соответствие положения атомов плотности крио-ЭМ карты, длины связей, углы между связями, хиральность, расположение плоскостей связей в пространстве. Таким образом, данный инструмент автоматически подбирает оптимальные значения данных параметров, что позволяет корректировать геометрическую структуру модели.
- Карта Рамачандрана: представляет собой карту распределения двугранных углов аминокислот полипептидов. Поскольку конформация полипептида может быть описана совокупностью двугранных углов φ (угол вокруг $N - C_\alpha$) и ψ (угол вокруг $C_\alpha - C'$), то карта Рамачандрана демонстрирует правильность укладки полипептида, что позволяет использовать её в работе с геометрией структуры в Coot.
- Rotamers: инструмент для ручной корректировки двугранных углов. С его помощью можно вращать участки цепи относительно её атомов.

Результат применения данных инструментов приведён на рисунках 31-33.



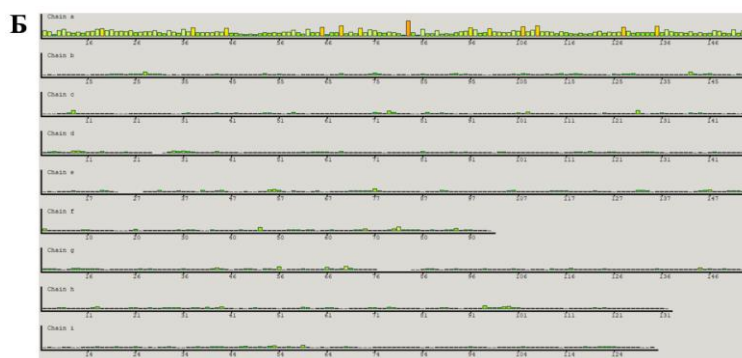


Рисунок 31 – Геометрический анализ модели 30S-RbfA. (А) – до её редактирования, (Б) – после её редактирования

Результат геометрического анализа структуры комплекса 30S-RbfA полученную в PHENIX после процедуры Map to model представлен на рисунке 31 (А). Для каждой полипептидной цепи приведены ошибки, степень которых характеризуется цветом и высотой столбика. Так, высокий красный столбец означает серьезную ошибку в геометрии той или иной связи в цепи, выходящую за пределы плотности крио-ЭМ карты. Напротив, небольшой зеленый столбец сигнализирует о незначительных проблемах в геометрической структуре цепи, из-за которых атомы цепи не попадают в плотность крио-ЭМ карты. Рисунок 31 (Б) демонстрирует значительное улучшение геометрии всей модели в целом.

Всего структура насчитывает в своём составе 21 полипептидную цепь. Нас, прежде всего, интересовала цепь, соответствующая RbfA. Итоги работы с геометрической структурой RbfA в модели комплекса 30S-RbfA приведены на рисунке 32.

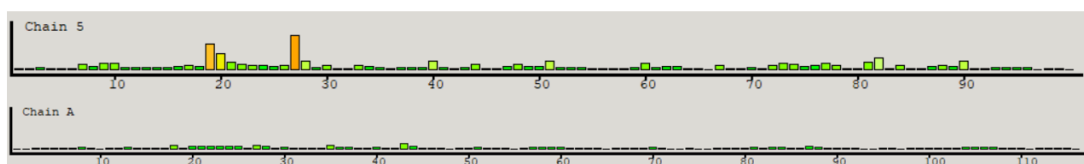


Рисунок 32 – Сравнение геометрического анализа цепи, соответствующей RbfA. Chain 5

– до корректировки геометрии, Chain A – после корректировки геометрии

Также для оценки качества ручных правок были построены карты Рамачандрана для моделей до и после обработки в Coot. Их сравнение приведено на рисунке 33.

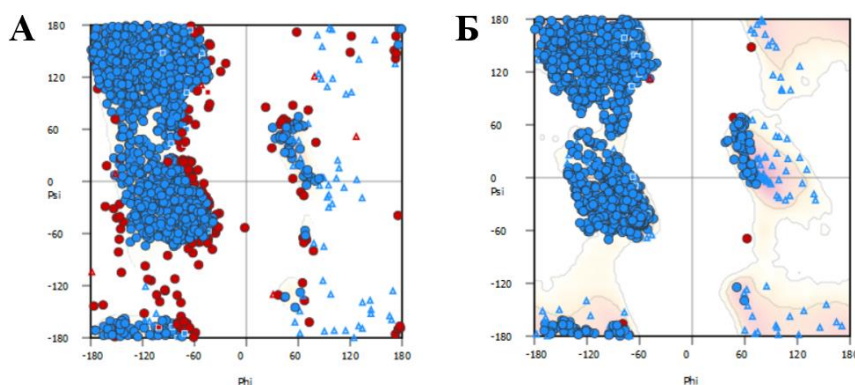


Рисунок 33 – Карты Рамачандрана модели 30S-RbfA. (А) – До редактирования, (Б) – После редактирования

Модель комплекса до редактирования содержит 8.37% двугранных углов, принадлежащих областям с некорректными значениями φ и ψ (рисунок 33, А). После редактирования число таких двугранных углов сократилось до 0,26% (рисунок 33, Б).

Таким образом, анализ рисунков 31-33 позволяет утверждать, что в результате ручного исправления структуры комплекса 30S-RbfA в Coot, геометрия структуры значительно улучшилась. Это, в свою очередь, привело к гораздо лучшему её соответствию крио-ЭМ карте, что отражено на рисунке 34. Полная статистика структуры комплекса 30S-RbfA представлена в таблице 3.

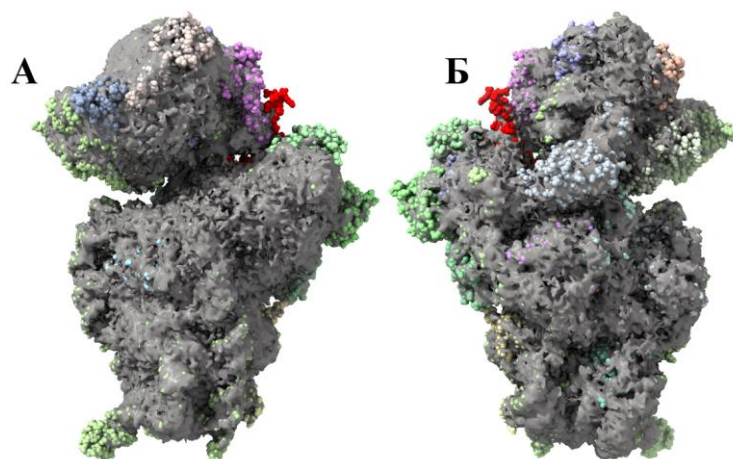


Рисунок 34 – Наложение крио-ЭМ карты на модель комплекса 30S-RbfA после обработки в Coot (RbfA выделен красным). (А) – передняя (спираль h44 в передней части структуры) часть 30S субъединицы, (Б) – задняя часть 30S субъединицы (спираль h44 с задней части структуры)

Построенная структура комплекса 30S-RbfA для *S. aureus* позволяет проанализировать структуру и функции RbfA, сравнивая полипептидные цепи моделей малой субъединицы и 30S-RbfA.

Таблица 3 – Статистика структуры комплекса 30S-RbfA из *S. aureus*, полученной методом крио-ЭМ

Сбор данных	
Микроскоп	FEI TALOS ARCTICA
Камера	Gatan K2 Quantum (4k x 4k)
Напряжение (кВ)	200
Диапазон расфокусировки (мкм)	(-1,5) – (-3,0)
Общая доза ($\bar{e}/\text{\AA}^2$)	53,3
Доза на кадр ($\bar{e}/\text{\AA}^2$)	0,89
Количество кадров	60

Обработка изображений	
Количество изображений	876

Продолжение таблицы 3

Обработка изображений	
Количество частиц, используемых для 3D реконструкции	81421
Разрешение (Å; at $FSC^1 = 0.143$)	2,89
CC^1 (маска)	0,70
CC (box)	0,71
Валидация ²	
Оценка нежелательных контактов ³	15,08
Белки	
Оценка MolProbity	1,97
Количество нежелательных ротамеров (%)	0,93
Наиболее выгодные ротамеры (%)	70,51
Количество остатков в разрешенных областях карты Рамачандрана (%)	4,18
Количество остатков в предпочтительных областях карты Рамачандрана (%)	95,82
Среднеквадратическое отклонение	
Связей (Å)	0,005
Углов (°)	0,712
Нежелательные связи (%)	0,00
Нежелательные углы (%)	0,00
Цис-пролины (%)	0,00
Отклонения CaBLAM (%)	3,8

РНК

Продолжение таблицы 3

РНК	
Некорректное положение колец сахара (%)	0,26
Некорректные конформации цепи (%)	17,35
Некорректные связи (%)	0,00
Некорректные углы (%)	0,00

¹FSC – Корреляция Фурье-оболочек; ² Составлено с использованием MolProbity; ³ – коэффициент корреляции

2.2.3 Анализ структуры RbfA из *S. aureus* и его влияния на 30S субъединицу

Кристаллическая структура *S. aureus* RbfA состоит из трёх α -спиралей и трёх β -складок в следующем порядке: $\alpha 1$ (4 – 25) – $\beta 1$ (34 – 40) – $\beta 2$ (46 – 52) – $\alpha 2$ (57 – 69) – $\alpha 3$ (71 – 81) – $\beta 3$ (89 – 94). Все альфа-спирали расположены напротив трёх β -складок (рисунок 35 А).

Среди 99 аминокислот, входящих в состав молекулы RbfA, 40 являются гидрофобными. Они формируют ядро RbfA между альфа-спиралями и бета-складками. В результате анализа электростатического поверхностного потенциала молекулы RbfA при pH = 7,5 было установлено наличие отрицательно заряженной области между $\alpha 2$ и $\beta 3$ в направлении $\beta 1$ через вершину $\beta 3$ и C-концевой участок (рисунок 35 Б).

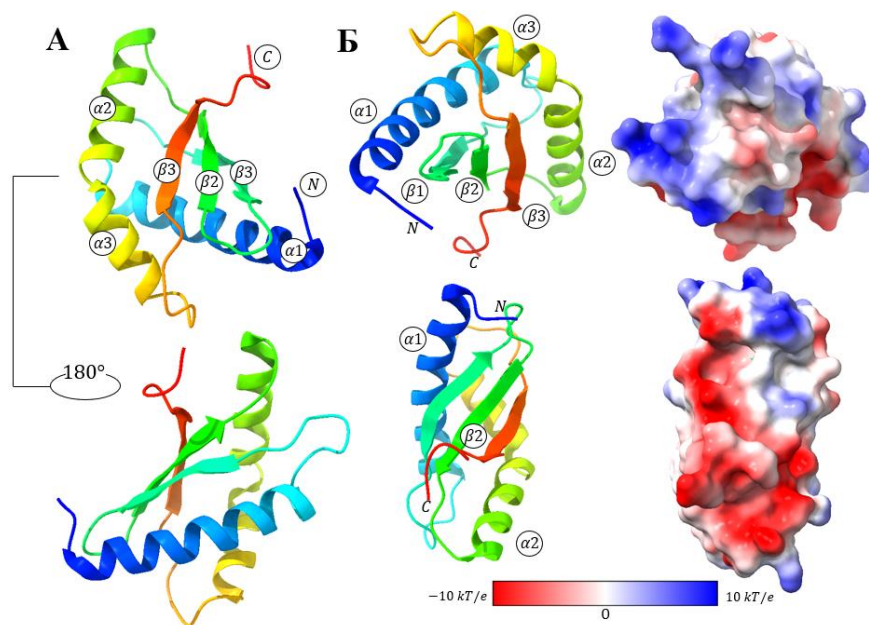


Рисунок 35 – Структура *S. aureus* RbfA. (А) – кристаллическая структура, (Б) – электростатический поверхностный потенциал молекулы RbfA (рН 7.5)

Отрицательно заряженная область находится между $\alpha 2$ и $\beta 3$ в направлении $\beta 1$. В белке RbfA имеется также положительно заряженная область. Она формируется между линкерами $\alpha 2/\beta 3$, $\beta 1/\beta 2$ и N -концом $\alpha 1$ спирали (рисунок 35 Б). Такие структурные особенности RbfA обеспечивают формирование обширного интерфейса для взаимодействия с отрицательно заряженной 16S рРНК малой субъединицы рибосомы.

Поскольку RbfA непосредственно связывается с 16S рРНК, то для определения влияния белка RbfA на 16S рРНК было проведено сравнение структуры 16S рРНК для индивидуальной модели малой субъединицы рибосомы и для комплекса 30S-RbfA (рисунок 36).

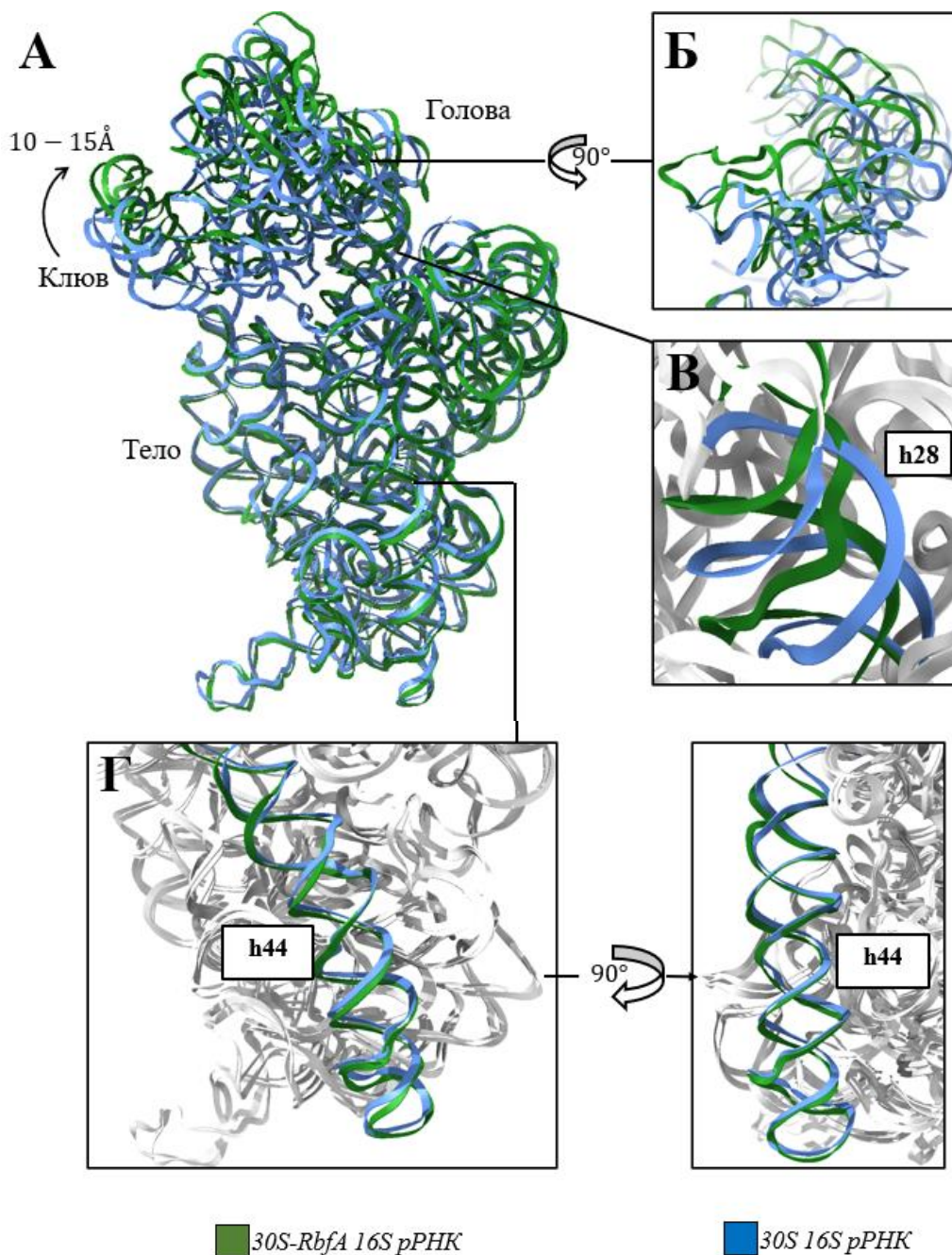


Рисунок 36 – Сравнение 16s рPHK в зрелой 30S (PDB: 7KWG, синий) и комплекса 30S-RbfA (синий) из *S. aureus*. (A) – общий вид, (Б) – смещение головы малой субъединицы рибосомы, (В) и (Г) – конформационные изменения спиралей h28 и h44. Остальная часть 16S рPHK окрашена в белый цвет

Верхняя часть h44 смещена ко внешней стороне 30S субъединицы по сравнению со зрелой 30S (рисунок 36, Г). Спираль h28, в свою очередь, имеет зрелую конформацию, однако, верхняя часть шеи смещена вверх, по сравнению со зрелой субъединицей (рисунок 36, В). Положение головы

созревшей 30S субъединицы рибосомы смещено на 10 – 15 Å относительно комплекса 30S-RbfA (рисунок 36, А и Б). Таким образом, можно заключить, что RbfA вызывает смещение шеи 30S, что затем приводит к смещению головы малой рибосомной субъединицы.

3'-конец 16S рРНК, расположенный в канале выхода мРНК, взаимодействует с мотивом hkh и $\alpha 1/\beta 1$ участком RbfA (выделены красным цветом на рисунке 37). $\beta 1/\beta 2$ участок белка RbfA направлен в пространство между спиралью h28 и линкером h44-h45. $\alpha 3/\beta 3$ располагается в пространстве между двумя изгибами рРНК (G1517 и G1541) (рисунки 2, 37). Внешняя сторона $\alpha 1$ примыкает к центральной площадке (h23, h24) и р-белку uS11. РНК-связывающая сторона RbfA (hkh и $\alpha 1/\beta 1$) удерживает 3'-конец 16S рРНК (G1542 – A1548) за счёт взаимодействия A1543 – C1545 с мотивом последовательности GXXG (Ala70-Lys71-Gly-72 в *S. aureus* RbfA). Аминокислоты Asp27-Arg29 из $\alpha 1/\beta 1$ специфически взаимодействуют с A1546 – C1548 3'-конца, который простирается в сторону Arg48 из р-белка uS18 (рисунок 37).

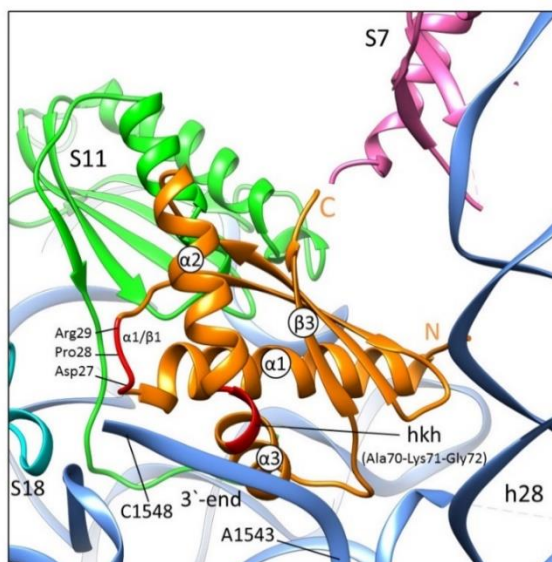


Рисунок 37 – Сайт связывания RbfA (оранжевый) на 30S субъединице. Область связывания RbfA с 16S рРНК (мотив hkh и $\alpha 1/\beta 1$) окрашена в красный цвет [33]

Таким образом, связывание белка RbfA с 30S субъединицей приводит к смещению шеи, что стабилизирует положение головы малой субъединицы. Помимо этого, связываясь с 16S рРНК RbfA стабилизирует 3'-конец 16S рРНК.

Дальнейший анализ белка RbfA касался его структуры, поскольку на крио-ЭМ карте 30S-RbfA *S. aureus* в области RbfA наблюдалась спиралевидная плотность (рисунок 38), которая была отнесена к С-концевой спирали RbfA (Asp95-Arg106). Данная плотность достигает белка uS7, находящегося на голове 30S субъединицы.

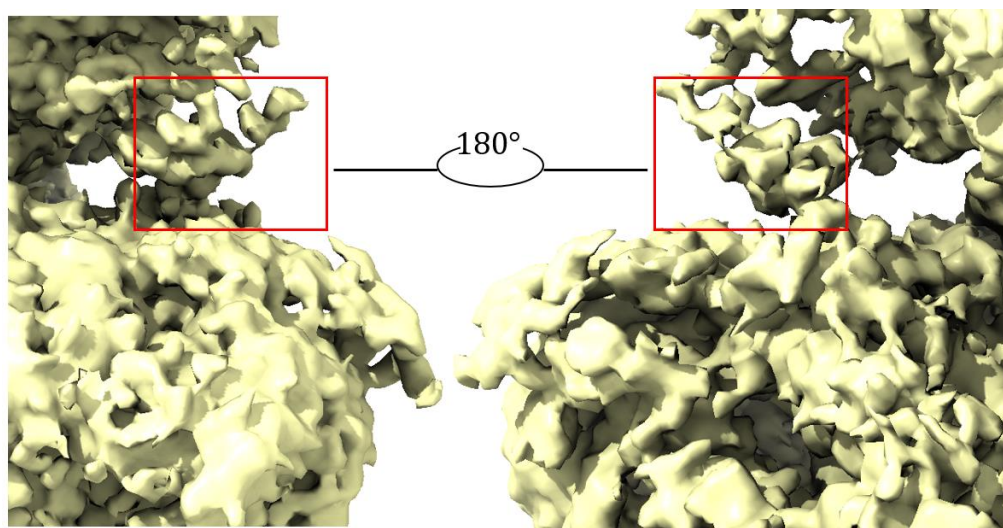


Рисунок 38 – Выявленная спиралевидная плотность крио-ЭМ карты комплекса 30S-RbfA

Было проведено сравнение кристаллической, ЯМР структуры с предсказанной структурой *S. aureus* RbfA из AlphaFold Protein Structure Database (рисунок 39).

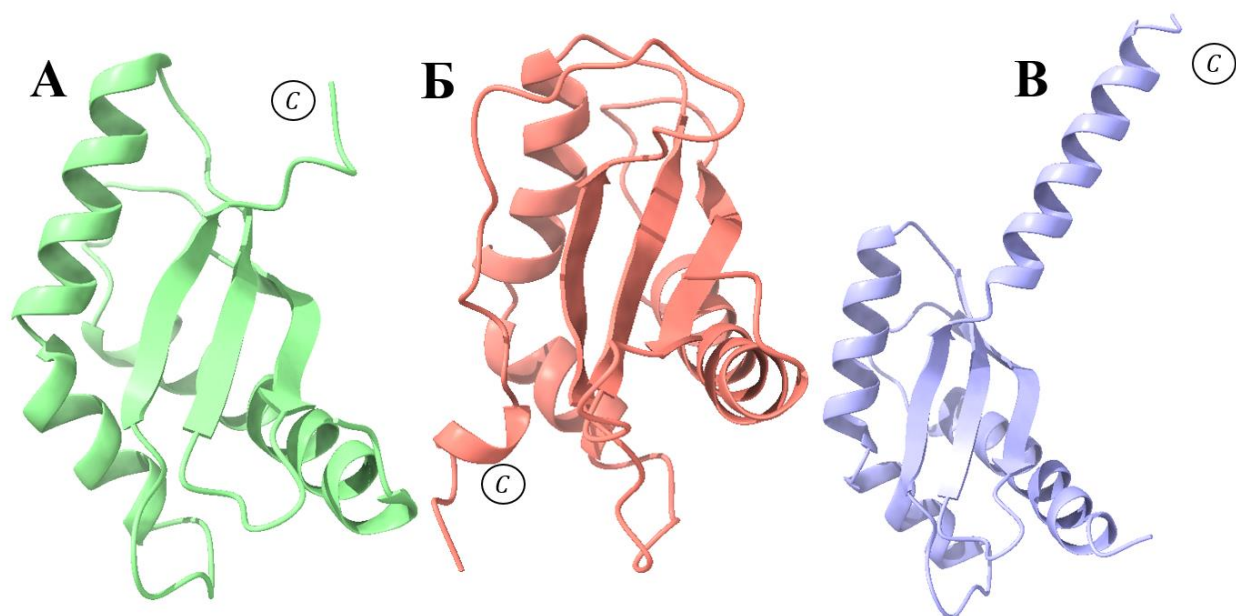


Рисунок 39 – Сравнение структур RbfA *S. aureus*. (А) – кристаллическая структура, (Б) – ЯМР структура, (В) – структура предсказанная AlphaFold

В ЯМР структуре белка RbfA (рисунок 39, Б) С-концевой участок имеет вид спирали, что позволяет с большей вероятностью сопоставлять этот участок с α -спиралью. Затем, С-конец RbfA был оптимизирован под крио-ЭМ плотность и его модель была перестроена с учётом дополнительной спирали. Остатки аминокислот Ser97-Asp115 RbfA, связанные с 30S, образуют спиралевидную структуру, взаимодействующую с белком uS7 (рисунок 40). Данная модель RbfA затем использовалась при построении конечной модели комплекса 30S-RbfA (рисунок 34).

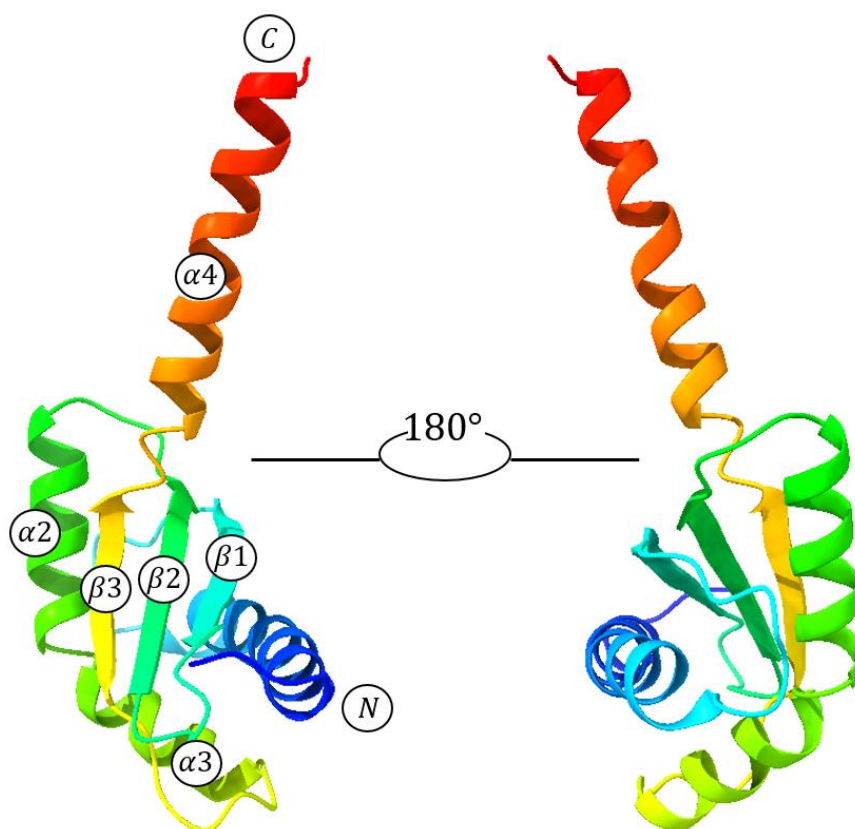


Рисунок 40 – Крио-ЭМ структура RbfA *S. aureus*, построенная на основании структуры AlphaFold

Тот факт, что С-конец RbfA в растворе, кристалле и комплексе имеет различные конформации, свидетельствует о его динамической природе и способности формировать α -спираль при взаимодействии с рибосомным белком uS7 30S субъединицы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проделанной работы получены следующие результаты:

- Оптимизированы условия экспрессии и очистки белка RbfA и 30S субъединицы рибосомы из *S. aureus* для дальнейших структурных исследований.
- Методом реконструкции *in vitro* получен комплекс RbfA с 30S субъединицей рибосомы *S. aureus*.
- Выполнена обработка крио-ЭМ микрографий, на основе которых получена крио-ЭМ карта комплекса 30S с RbfA с разрешением 2.9 Å.
- Получена структура комплекса 30S-RbfA и установлено место локализации белка RbfA на малой субъединице рибосомы *S. aureus*.

На основе полученных данных сделаны следующие выводы:

- Связывание белка RbfA путём взаимодействия остатков Ala70-Lys71-Gly-72 с участками A1543-C1545 рРНК стабилизирует «голову» 30S субъединицы рибосомы *S. aureus*, что обеспечивает корректное положение спирали h44 и переход к зрелой конформации малой субъединицы рибосомы.
- Связываясь с 30S субъединицей, С-концевой домен RbfA меняет третичную структуру, образуя α -спираль, которая ранее не была обнаружена в кристаллографической и ЯМР структурах.
- Полученные данные позволяют разработать новые ингибиторы RbfA, препятствующие его связыванию с 30S субъединицей рибосомы *S. aureus*. Это, вероятно, помешает стабилизации «головы» 30S субъединицы рибосомы *S. aureus* и приведёт к ошибкам в трансляции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Subramaniam, G. Antibiotic Resistance — A Cause for Reemergence of Infections / G. Subramaniam, M. Girish. – Текст: непосредственный // The Indian Journal of Pediatrics. – 2020. – V. 87. – P. 937-944.
2. Hurley, J. Could simulation methods solve the curse of sparse data within clinical studies of antibiotic resistance? / J. Hurley, D. Brownridge. – Текст: непосредственный // JAC-Antimicrobial Resistance. – 2021. – V. 3. – P. 1-10.
3. Center for Disease Dynamics, Economics & Policy 2015. State of the World's Antibiotics. Washington, DC: Center for Disease Dynamics, Economics & Policy: сайт – 2015. – URL: https://www.cddep.org/wp-content/uploads/2017/06/swa_edits_9.16.pdf (дата обращения 01.05.23). – Текст: электронный.
4. Talebi B. A. World Health Organization Report: Current Crisis of Antibiotic Resistance / B. A. Talebi, A. Rizvanov, A.A. Haertlé, N. L. Blatt. – Текст: непосредственный // BioNanoScience – 2019. – V. 9. – P. 778–788.
5. Asbell P. Trends in Antibiotic Resistance Among Ocular Microorganisms in the United States From 2009 to 2018 / P. Asbell, C. Sanfilippo, H. DeCory, [et al.]. – Текст: непосредственный // JAMA Ophthalmology – 2020. – V. 5. – P. 439–450.
6. Xiao-Yang Hu Antimicrobial resistance is a global problem – a UK perspective / Hu Xiao-Yang, M. Logue, N. Robinson. – Текст: непосредственный // European Journal of Integrative Medicine – 2020. – V. 36. – P. 1 – 4.
7. Dhungel S. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Prevalence, Antimicrobial Susceptibility Pattern, and Detection of *mecA* Gene among Cardiac Patients from a Tertiary Care Health Center in Kathman-

- du, Nepal / S. Dhungel, B. Yadav, B. Dhungel, N. Adhikari, [et al.]. – Текст: непосредственный // *Infection Diseases and Treatment* – 2021. – V. 14. – P. 10-14.
8. Нэльсон Д. Основы биохимии Ленинджера / Д. Нэльсон, М. Кокс. – Изд. 3-е. – Москва: Лаборатория знаний, 2006. – Т. 1. – 694 с. – ISBN 978-5-00101-014. – Текст: непосредственный.
9. Nandhini P. Recent Developments in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Treatment: A Review / P. Nandhini, P. Kumar, S. Mickyumaray, A. Alothaim, [et al.]. – Текст: непосредственный // *Antibiotics* – 2022. – V. 11. – 21 pages.
10. Спири́н А. С. Принцип структуры рибосомы / А. С. Спири́н. – Текст: непосредственный // *Соросовский образовательный журнал*. – 1998. – №11. – С. 65-70.
11. Бикмуллин А.Г. Сборка комплекса 30S субъединицы рибосомы и фактора RbfA *S. aureus in vitro* для структурных исследований / А.Г. Бикмуллин, Л.И. Нуруллина, Н.С. Гараева [и др.]. – Текст: непосредственный // *Биохимия*. – 2020. – т.85. – №. 5. – С. 637-646.
12. Clemons W. Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution / W. Clemons, J. May, B. Wimberly, J. McCutcheon, [et al.]. – Текст: непосредственный // *Nature* – 1999. – V. 400. – P. 833-840.
13. Wimberly. B Structure of the 30S ribosomal subunit / B. Wimberly, D. Brodersen, A. Carter, C. Vornrhein, [et al.]. – Текст: непосредственный // *Nature* – 2000. – V. 407. – P. 327-339.
14. Сергеева, О.В. Рибосома: уроки строительства молекулярной фабрики / О. В. Сергеева, П. В. Сергиев, А. А. Богданов, О. А. Донцова. – Текст: непосредственный // *Молекулярная биология*. – 2014. – т. 48. – №4. – С. 543-560.
15. Schedlbauer A. A conserved rRNA switch is central to decoding site maturation on the small ribosomal subunit / A. Schedlbauer, I. Iturrioz, S.

- Connell, T. Diercks, [et al.]. – Текст: непосредственный // Science Advances – 2021. – V. 7. – 16 pages.
16. Datta P. Structural Aspects of RbfA Action during Small Ribosomal Subunit Assembly / P. Datta, D. Wilson, M. Kawazoe, N. Swami, [et al.]. – Текст: непосредственный // Molecular Cell – 2007. – V. 28. – P. 434-445.
17. G. Jensen (5 февраля 2015) Part 1: Electron Guns – G. Jensen [видео-запись лекций по крио-ЭМ]: сайт. – 2015. – URL: https://www.youtube.com/watch?v=C6DSFK7zJo0&list=PL8_xPU5epJdctoHdQjpfHmd_z9WvGxK8-&index=6&ab_channel=caltech (Дата обращения: 18.04.23). – Текст: электронный.
18. G. Jensen (5 февраля 2015) Part 1: EM lenses – G. Jensen [видео-запись лекций по крио-ЭМ]: сайт. – 2015. – URL: https://www.youtube.com/watch?v=SKjxp-al_UI&list=PL8_xPU5epJdctoHdQjpfHmd_z9WvGxK8-&index=7&ab_channel=caltech (Дата обращения: 18.04.23). – Текст: электронный.
19. G. Jensen (5 февраля 2015) Part 1: The column – G. Jensen [видео-запись лекций по крио-ЭМ]: сайт. – 2015. – URL: https://www.youtube.com/watch?v=hc2s4uSbpyI&list=PL8_xPU5epJdctoHdQjpfHmd_z9WvGxK8-&index=8&ab_channel=caltech (Дата обращения: 18.04.23). – Текст: электронный.
20. G. Jensen (5 февраля 2015) Part 1: Vacuum Systems – G. Jensen [видео-запись лекций по крио-ЭМ]: сайт. – 2015. – URL: https://www.youtube.com/watch?v=LUIM0kl6Lp0&list=PL8_xPU5epJdctoHdQjpfHmd_z9WvGxK8-&index=12&ab_channel=caltech (Дата обращения: 18.04.23). – Текст: электронный.
21. G. Jensen (5 февраля 2015) Part 1: Energy Filters – G. Jensen [видео-запись лекций по крио-ЭМ]: сайт. – 2015. – URL: https://www.youtube.com/watch?v=UzKNE8ZZBxw&list=PL8_xPU5ep

- JdctoHdQjpfHmd_z9WvGxK8-&index=10&ab_channel=caltech (Дата обращения: 18.04.23). – Текст: электронный.
22. Orlova E.V. Structural Analysis of Macromolecular Assemblies by Electron Microscopy / E.V. Orlova, H.R. Saibil. – Текст: непосредственный // *Chemical Reviews* – 2011. – V. 111. – P. 7710-7748.
23. Pilhofer M. Bacterial TEM: New Insights from Cryo-Microscopy / M. Pilhofer, M.S. Ladinsky, A. W. McDowell, G. J. Jensen. – Текст: непосредственный // *Methods in Cell Biology*. – Elseiver, 2010. – V. 96. – P. 21-45.
24. G. Jensen (5 февраля 2015) Part 4: Sample Prep: Methods Involving Freezing – G. Jensen [видеозапись лекций по крио-ЭМ]: сайт. – 2015. – URL: https://www.youtube.com/watch?v=7NHdFBA-fDs&list=PL8_xPU5epJdctoHdQjpfHmd_z9WvGxK8-&index=30&ab_channel=caltech (Дата обращения: 18.04.23). – Текст: электронный.
25. Fernandez-Leiro R. Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy / R. Fernandez-Leiro, H.W. Scheres. – Текст: непосредственный // *Nature* – 2016. – V. 537 – P.339–346.
26. Stark H. Electron radiation damage to protein crystals of bacteriorhodopsin at different temperatures / H. Stark, F. Zemlin, C. – Текст: непосредственный // *Ultramicroscopy*. – Elseiver, 1996. – V. 63. – P. 75-79.
27. G. Jensen (5 февраля 2015) Part 3: Wave Propagation and Phase Shifts – G. Jensen [видеозапись лекций по крио-ЭМ]: сайт. – 2015. – URL: https://www.youtube.com/watch?v=YXIVCoHbp4&list=PL8_xPU5epJdctoHdQjpfHmd_z9WvGxK8-&index=23&ab_channel=caltech (Дата обращения: 18.04.23). – Текст: электронный.
28. RELION Wiki: сайт. – 2019. – URL: https://www3.mrc-lmb.cam.ac.uk/relion/index.php/Main_Page (дата обращения: 18.05.23). – Текст: электронный.

29. Briot A. Beam-induced motion of vitrified specimen on holey carbon film / A. Briot, J. Chen, A. Cheng, J. Pan, [et al.]. – Текст: непосредственный // *Journal of Structural Biology*. – Elsevier, 2012. – V. 177. – P. 630-637.
30. Contrast Transfer and CTF Correction: сайт. – 2019. – URL: http://www.cryst.bbk.ac.uk/embo2019/ppts/Lec_05_EMBO_19-DKC-5.pdf (дата обращения: 18.05.23). – Текст: электронный.
31. The Coot User Manual: сайт. – 2019. – URL: <https://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/personal/pemsley/coot/web/docs/coot.html#Introduction> (дата обращения: 18.05.23). – Текст: электронный.
32. UCSF ChimeraX User Guide: сайт. – <https://www.cgl.ucsf.edu/chimerax/docs/user/index.html> (дата обращения: 18.05.23). – Текст: электронный.
33. Bikmullin A. G. Yet Another Similarity between Mitochondrial and Bacterial Ribosomal Small Subunit Biogenesis Obtained by Structural Characterization of RbfA from *S. aureus*. / A. G. Bikmullin, B. Fatkhullin, A. Stetsenko, [et al.]. – Текст: непосредственный // *International Journal of Molecular Sciences* – 2023. – V. 24. – P. 15 pages.