

La Revolución de la Resolución: la Criomicroscopía Electrónica de partículas aisladas resuelve la estructura atómica de biomoléculas en solución

Fernando Mendoza¹ y Raúl Padrón²

¹) Thermo Fisher Scientific, Avenida de los Insurgentes Sur 863, Nápoles, 03810 Benito Juárez, CDMX, México,

²) Centro de Biología Estructural Humberto Fernández-Morán, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C.), APDO 20632, Caracas 1020A, Venezuela

fernando.mendoza@thermofisher.com, raul.padron@gmail.com

Invitado: 01/03/2018

Recibido: 23/04/2018

Aceptado: 30/04/2018

Resumen

Luego de la invención del microscopio electrónico (ME) de transmisión en 1934 se iniciaron esfuerzos para corregir los problemas asociados a la observación de biomoléculas en medio acuoso debidos al alto vacío y daño por radiación electrónica. Una solución fue usar temperaturas criogénicas lo cual condujo a la ME de baja temperatura para observar biomoléculas congelado-hidratadas y a la invención del crio-ME en 1966. El desarrollo de la incipiente crio-ME fue lento hasta el 2014 cuando el desarrollo de las técnicas de reconstrucción 3D de partículas aisladas y de los detectores de electrones directos revolucionaron el campo convirtiendo la crio-ME de partículas aisladas en la técnica que permite la determinación directa –sin requerir cristalización– de la estructura atómica de biomoléculas en solución. La resolución atómica alcanzada junto al desarrollo de poderosos crio-MEs produjo un incremento explosivo en la determinación de estructuras de biomoléculas cuyas consecuencias médicas y farmacológicas estamos presenciando.

Palabras claves: criomicroscopía electrónica; criomicroscopía electrónica de partículas aisladas

Abstract

The Revolution of the Resolution: the Cryo-electronic Microscopy of isolated particles solves the atomic structure of biomolecules in solution. After the invention of the transmission electron microscope (EM) in 1934 efforts started to address the problems associated with the observation of biomolecules in water solution due to the high vacuum and associated electron radiation damage. One solution was to use cryogenic temperatures leading to the low temperature EM to observe frozen-hydrated biomolecules and to the invention of the cryo-EM in 1966. The development of cryo-EM since then was slow till 2014 when single-particle 3D reconstruction techniques and the direct electron detectors revolutionized the field converting single-particle cryo-EM in the technique that allows the direct determination –without crystallization– of the atomic structure of biomolecules in solution. The atomic resolution achieved together with the development of powerful cryo-EM lead to an explosive increase on the determination of biomolecule structures whose important medical and pharmaceutical consequences we are attending.

Keywords: Cryo-electron microscopy, Single-particle cryo-electron microscopy

Introducción

Luego de la invención del microscopio electrónico (ME) de transmisión en 1934 por Ruska¹ que le valió el Premio Nobel de Física en 1986; Marton, quién construyó un ME horizontal², arguyó que dichos microscopios no podrían ser usado para el estudio de especímenes biológicos ya que el intenso haz electrónico los destruiría³, proponiendo soluciones a dicho problema como enfriar el espécimen o usar técnicas alternativas para preparar estos especímenes. El nuevo instrumento presentaba serios problemas para observar especímenes biológicos, que contienen agua, y que reducen la resolución a solo decenas de Å debido a: (1) bajo contraste de las imágenes, (2) destrucción del espécimen por la radiación del haz electrónico, (3) evaporación del agua del espécimen por

el alto vacío, (4) el espécimen debe ser muy delgado y (5) el espécimen se mueve al interactuar con los electrones del haz electrónico y por variaciones térmicas.

La ingeniosidad de los microscopistas e inventiva de los ingenieros permitió resolver estos cinco problemas en los siguientes 80 años con el desarrollo sistemático de nuevas técnicas para la preparación de especímenes biológicos y de nuevos microscopios electrónicos, lográndose en el 2014 la determinación de la estructura atómica de biomoléculas (“partículas”) aisladas sin necesidad de cristalizarlas como requiere la cristalografía de rayos-X. Esta gesta científico-tecnológica, se resume en la figura 1, basada - en parte - en la argumentación del Premio Nobel de Química 2017⁴, y que fue bautizada como la “Revolución de la Resolución”⁵.

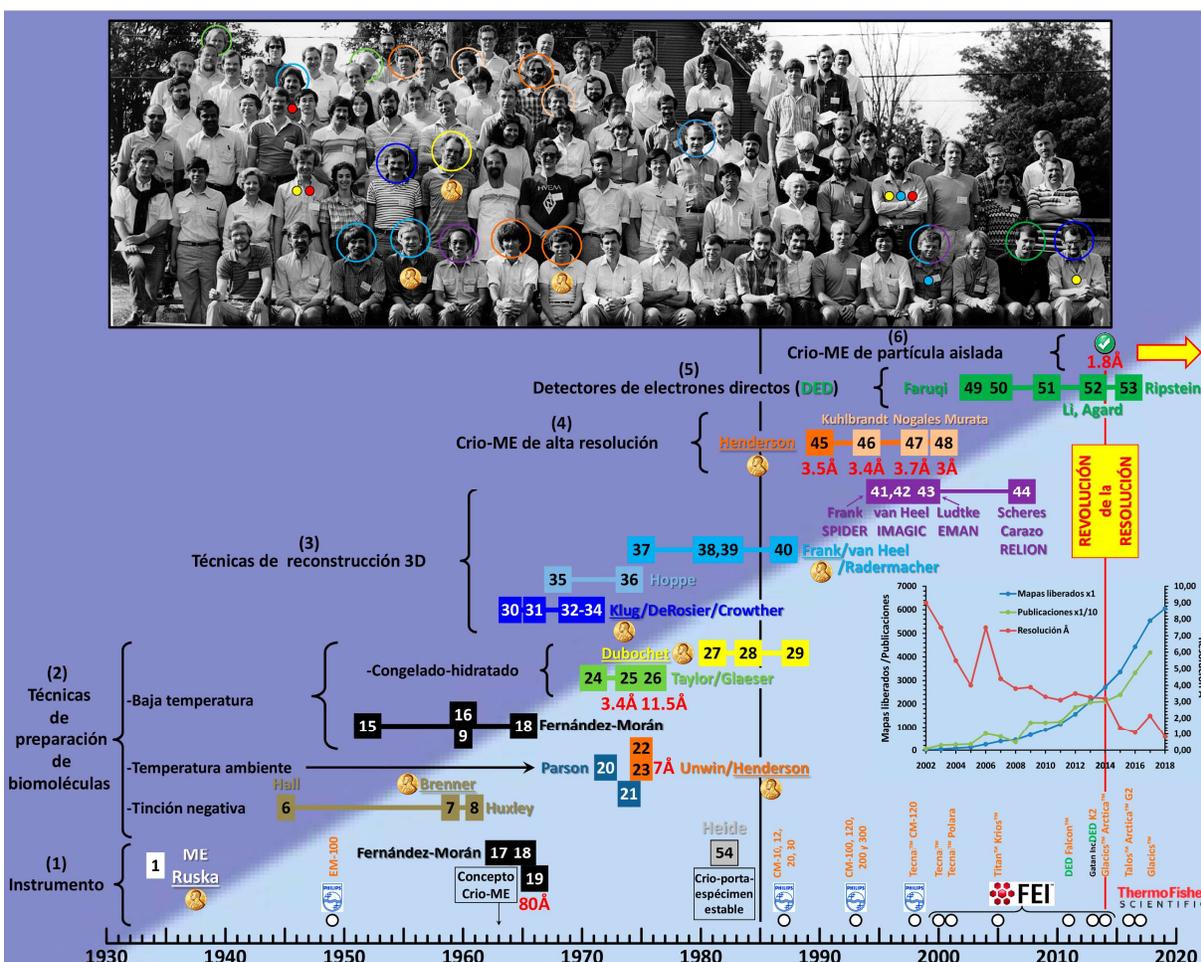


Fig. 1: Desarrolló de la Criomicroscopía Electrónica de partículas aisladas. Los rectángulos coloreados resaltan los hitos alcanzados con su referencia bibliográfica y resolución alcanzada (en rojo). Arriba se muestran los microscopistas participantes en la primera GRC 3DEM en 1985. Tres participantes, Henderson, Frank y Dubochet (Medalla Nobel), fueron galardonados con el Premio Nobel de Química 2017 por su contribución al desarrollo de la crio-ME de partícula aislada. Otros participantes contribuyeron a diferentes hitos y se muestran en círculos con el color correspondiente en la fotografía. A la derecha se grafica - antes y después de la “Revolución de la Resolución”⁵ del 2014 - el número acumulado de mapas 3D liberados (curva azul) depositados en el *Protein Data Bank in Europe (PDB) EM Resources (EMDB)*, de publicaciones asociadas a estos mapas (curva verde), y mayor resolución alcanzada cada año (curva roja). En las abscisas se indican los criomicroscopios desarrollados sinérgicamente por *Thermo Fisher Scientific*, señalándose los equipados con detectores directos de electrones (DED) para observar y analizar partículas aisladas (ver figura 2b-d). Hasta el 2017 se instalaron en el mundo 160 Titan™ Krios™ (figura 2c) y 70 Talos™ Arctic™ (Figura 2d), aunque solo dos en Latinoamérica (Brasil). Puntos amarillos, azules y rojos: ver texto. Imágenes reproducidas con permiso de *The Nobel Foundation* (© ® Medalla Nobel) y *Thermo Fisher Scientific* (logos).

Para la concreción de dicha gesta fue crucial la realización de las *Gordon Research Conferences (GRC) on Three Dimensional Electron Microscopy of Macromolecules (GRC 3DEM)* iniciadas en 1985 (Fig. 1) y que se siguen realizando actualmente reuniendo microscopistas electrónicos de muchos países. Estos participantes tenían intereses muy diferentes: unos querían resolver problemas biológicos con microscopía electrónica mientras otros querían desarrollar las técnicas de vitrificación, de registro de imágenes a baja dosis electrónica y reconstrucción tridimensional de biomoléculas, así como desarrollar nuevos criomicroscopios electrónicos, crio-porta-especímenes, detectores directos de electrones y programas computacionales asociados. La figura 1 muestra que esta gesta incluyó cinco etapas previas que permitieron el desarrollo de: (1) microscopios electrónicos y accesorios para baja

temperatura, (2) técnicas para la preparación de especímenes biológicos, (3) técnicas de reconstrucción tridimensional y programas computacionales asociados, (4) la criomicroscopía electrónica (crio-ME) de alta resolución *per se*, y (5) detectores de electrones directos que condujeron finalmente a la (6) crio-ME de partículas aisladas actual.

La tinción negativa, introducida en 1945 y desarrollada en los 16 años siguientes⁶⁻⁸, resolvió el problema del daño por radiación y el bajo contraste de los especímenes biológicos mediante el uso de sales de metales pesados como el acetato de uranio.

El uso de bajas temperaturas para la observación directa de especímenes biológicos congelados-hidratados con moléculas

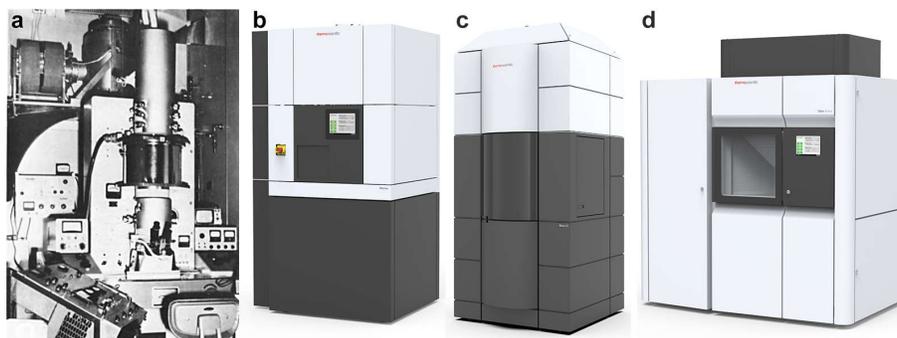


Fig. 2: Criomicroscopios electrónicos precusores y de última generación: (a) primer crio-ME experimental con un conjunto de lente objetiva superconductor en un criostato plano¹⁹ (*Cryo-Electron Microscope Laboratories, University of Chicago, EE.UU.*); (b) Crio-MEs *Thermo Fisher Scientific* Glacios™; (c) *Krios™ G3i* y (d) *Talos™ Artica™*. Imágenes reproducidas de: (a) Fernández-Morán¹⁰ con permiso de Elsevier y (b-d) *Thermo Fisher Scientific*.

de agua “vitrificadas” fue propugnado ávidamente desde 1960 por Fernández-Morán⁹ (ver¹⁰⁻¹⁴), quien introdujo en 1952 la crio-ultramicrotomía¹⁵, en 1960 la crio-substitución¹⁶, avanzando en 1963 el concepto de la criomicroscopía electrónica^{17,18}. En 1966 construyó el primer criomicroscopio electrónico con lentes superconductoras a temperatura de helio líquido¹⁹ en la Universidad de Chicago (EE.UU.).

Este prototipo de crio-ME experimental le permitió registrar las primeras criomicrografías electrónicas de cristales de catalasa congelado-hidratados a 80 Å de resolución, espécimen que se convirtió en la referencia usada en los años subsiguientes para evaluar la resolución alcanzada por los nuevos crio-ME.

La observación de biomoléculas a temperatura ambiente en el microscopio electrónico intentando preservar intacta su hidratación condujo a Parson en 1972 al desarrollo de cámaras ambientales con atmosfera húmeda mantenidas a temperatura ambiente en el microscopio electrónico^{20,21}, y a Unwin y Henderson en 1975 a reemplazar el agua de hidratación por una solución de glucosa^{22,23} alcanzando una sorprendente resolución de 7Å.

La observación de biomoléculas congelado-hidratadas permitió a Glaeser en 1971 estimar y minimizar el daño por radiación²⁴, sugiriendo que se podía incrementar la relación señal/ruido promediando conjuntos de partículas aisladas irradiadas a dosis electrónicas bajas. Taylor y Glaeser en 1974 registraron patrones de difracción de electrones de cristales de catalasa a una resolución de 3,4 Å²⁵ obteniendo en 1976 criomicrografías electrónicas a 11,5 Å de resolución de cristales de catalasa efectivamente congelados-hidratados²⁶. A partir de 1981 Dubochet y colaboradores desarrollaron el método actualmente en uso para congelar rejillas de cobre conteniendo biomoléculas en solución acuosa sumergiéndolas rápidamente en etano líquido, logrando alcanzar rutinariamente el estado congelado-hidratado²⁷⁻²⁹.

Klug (Premio Nobel de Química 1982) y sus colaboradores diseñaron métodos para analizar ópticamente micrografías

electrónicas de estructuras periódicas teñidas negativamente^{30,31} o directamente por difracción de electrones³², para calcular modelos 3D de partículas no-helicoidales^{33,34}. Hoppe estableció nuevos métodos en cristalografía de electrones para analizar la estructura de proteínas³⁵ incluyendo biomoléculas no cristalinas³⁶. Frank, en 1975, encaró el problema de alinear y promediar partículas asimétricas en solución no cristalinas y sin teñir orientadas al azar³⁷. Van Heel y Frank desarrollaron en 1981 un método para clasificar imágenes en clases en base a su orientación^{38,39}. En 1987 Radermacher y colaboradores desarrollaron un método general para determinar la orientación relativa 3D de clases de proyecciones 2D de partículas asimétricas⁴⁰. A partir de 1996 se desarrollaron programas computacionales para el análisis de partículas aisladas como por ejemplo SPIDER⁴¹, IMAGIC⁴², EMAN⁴³ y RELION⁴⁴.

Un hito muy importante ocurrió en 1990 cuando Henderson y colaboradores demostraron que podían determinar la estructura a 3,5 Å de resolución de bacteriorodopsina mediante el uso de crio-ME promediando muchas imágenes del mismo objeto⁴⁵, avance que disparó una secuela de varios estudios de similar alta resolución⁴⁶⁻⁴⁸.

Faruqi introdujo en 2003 los detectores de electrones directos basados en tecnología CMOS para registrar directamente las micrografías electrónicas^{49,50}, pero tan solo estuvieron disponibles para los crio-MEs en 2012-2013. Su velocidad permitió un aumento importante en la relación señal/ruido, resolución espacial y el conteo de electrones solucionando el quinto problema de la ME al compensar el movimiento del espécimen causado por la irradiación de electrones y las variaciones de temperatura concomitantes⁵¹⁻⁵³. Estos detectores han sido producidos mayormente por *Thermo Fisher Scientific* y *Gatan, Inc.*

Los avances en el diseño de los microscopios electrónicos, incluyendo crio-porta-especímenes estables por Heide⁵⁴ (ver⁵⁵), permitieron construir los nuevos criomicroscopios electrónicos requeridos para la “Revolución de la Resolución”. La tecnología actual incluye además óptica electrónica con lentes de poder constante para garantizar la máxima resolución de

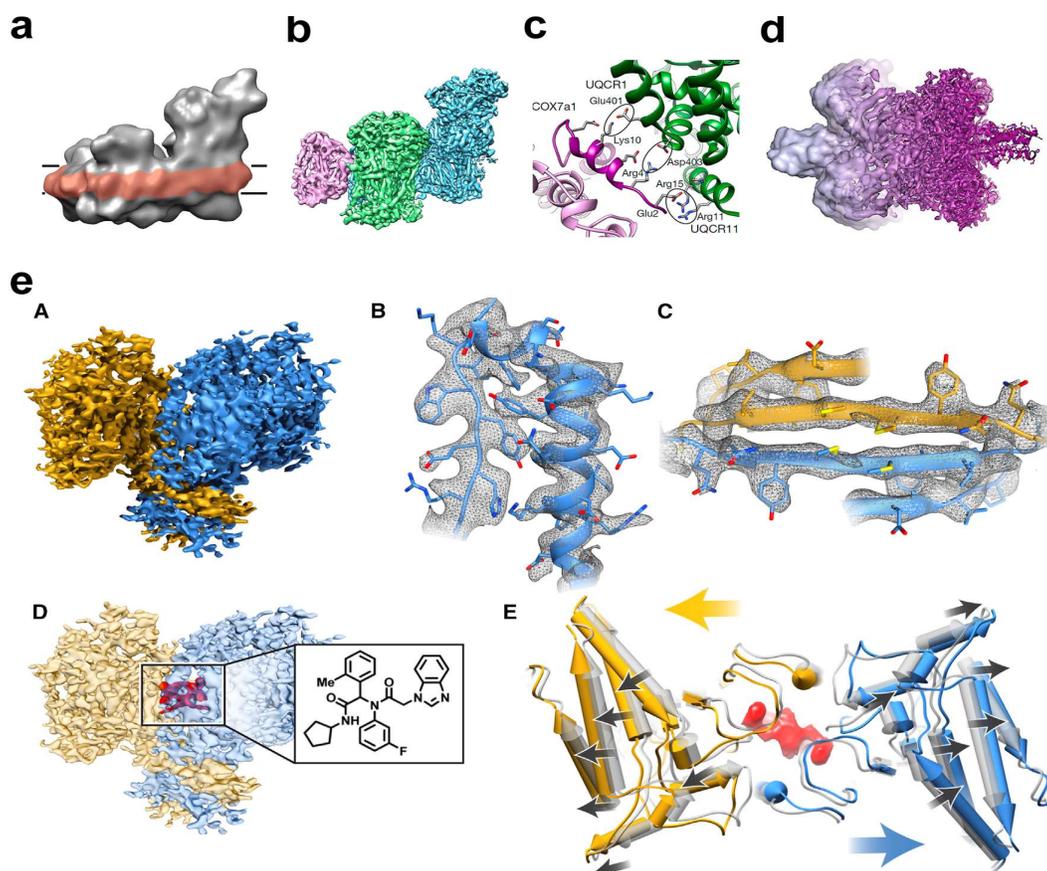


Fig. 3: Estructura del supercomplejo mitocondrial I₁III₂IV₁ determinada por crio-ME⁵⁸ (a) o crio-ME de partícula aislada⁵⁹ (b), mostrando sus complejos I (azul), III (verde) y IV (morado) y la interface III-IV (c); estructura de glutamato deshidrogenasa⁶⁰ a una resolución progresiva desde ~20 Å (izquierda) hasta ~1,8 Å (derecha) (d). Mapa 3D del dímero (amarillo/azul) isocitrato deshidrogenasa apo-IDH1 (eA) mostrando las densidades de las cadenas laterales en una región α -helical (eB) y otra β -laminar (eC). El mapa de IDH1 acomplejado con el inhibidor ML309 (inserto) se muestra con densidades rojas en (eD) cercano a la interface del dímero. En (eE) se muestra la superposición de apo-IDH1 (gris) y las estructuras del IDH1 (amarillo/azul) con el inhibidor enlazado mostrando los cambios que produce en la estructura terciaria (flechas negras) y los movimientos globales de la estructura cuaternaria (flechas amarillas/azules). Imágenes reproducidas de: (a) Althoff *et al.*⁵⁸ con permiso de EMBO y Wiley; (b,c) Letts *et al.*⁵⁹ con permiso de Springer Nature; (d) Merk *et al.*⁶⁰, con permiso de ©Martin Höghbom (Universidad de Estocolmo), Dr. P. Brzezinski (Royal Swedish Academy of Science), Cell y Elsevier; (e) Merk *et al.*⁶⁰ con permiso de Cell y Elsevier.

imagen, la optimización del sistema de transferencia libre de contaminación al robot que transfiere hasta 12 muestras de forma automatizada hacia la columna, el Autoloader™.

La compleja saga que condujo a la “Revolución de la Resolución” y la crio-ME de partículas aisladas (figura 1), fue posible gracias a la importante contribución de tres participantes y sus colaboradores al 3DEM GRC en 1985: Dubochet por desarrollar métodos para preparar especímenes congelados-hidratados²⁷⁻²⁹, Frank por desarrollar métodos de partículas aisladas para determinar la estructura de biomoléculas en solución^{37-41,56}, y Henderson por lograr alcanzar resolución atómica en estructuras de biomoléculas por crio-ME^{22,23,45,50,57}. La Academia Real Sueca de Ciencias decidió otorgarles a los tres el Premio Nobel de Química 2017 por “desarrollar la crio-ME para la determinación de la estructura a alta resolución de biomoléculas en solución”⁴.

Los límites alcanzables actualmente con la crio-ME de partículas aisladas se muestran en la figura 3. Al observar la misma biomolécula congelada-hidratada por crio-ME convencional⁵⁸ (resolución ~20 Å, figura 3a) y por crio-ME de partículas aisladas⁵⁹ (~6 Å, figura 3b) se observa que en el último caso se disciernen sus tres complejos componentes y las cadenas laterales aminoacídicas de sus contactos interfaciales (figura 3c). La importancia relativa de la resolución alcanzable en una misma biomolécula⁶⁰ se muestra en la figura 4d. Esta biomolécula es una pequeña enzima soluble implicada en el metabolismo del cáncer⁶⁰ (figura 3eA) cuyo estudio por crio-ME de partículas aisladas reveló que es posible cruzar la barrera de 2 Å de resolución (figura 3eB,C) y obtener estructuras de proteínas de <100 kDa para el estudio de interacción fármaco-blanco (figura 3eD) así como sus estados conformacionales dinámicos (vg. registro de películas a resolución atómica, figura 3eE) facilitando el descubrimiento y optimización de nuevos fármacos.

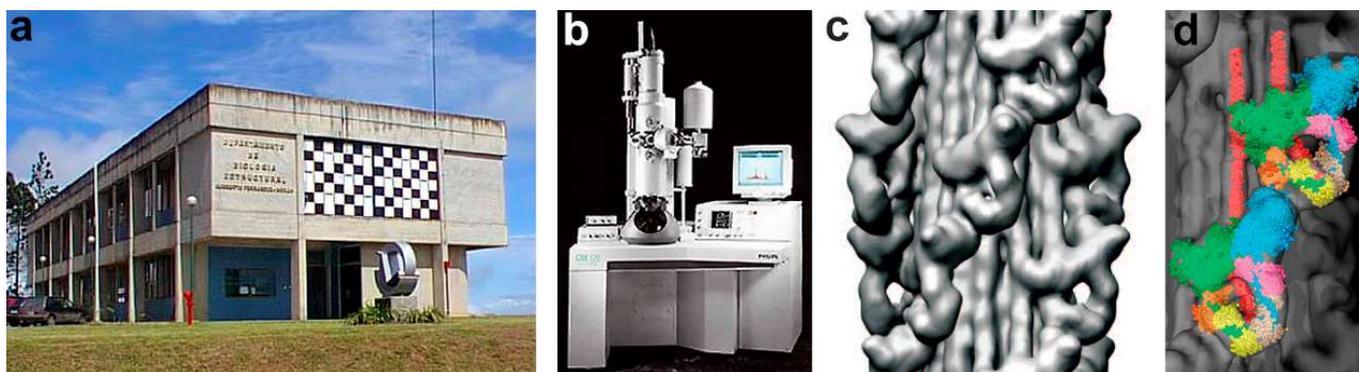


Fig. 4: (a) Centro de Biología Estructural “Humberto Fernández-Morán” del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C.) fundado en 1997, sede del Centro Latino-Americano FEI de Criomicroscopía (CLAF-CME) desde 1999 y uno de los nodos del Centro de Biología Estructural del Mercosur (CeBEM). (b) Primer criomicroscopio electrónico (Philips CM-120) instalado en Latinoamérica en 1997. (c) Mapa 3D de filamentos gruesos de músculo de tarántula (resolución 25 Å, ver 20 Å EMD-1950). (d) Modelo cuasi-atómico de dos motivos de cabezas interactuantes de miosina (IHM) (PDB [3DTP](#), [3JBH](#), [3JAX](#) y [5TBY](#)). Imágenes reproducidas con permiso de: (a) Departamento de Fotografía Científica, I.V.I.C.; (b) Thermo Fisher Scientific; (c,d) Reimpreso de Woodhead *et al.*⁶³ con permiso de Springer Nature.

Para resolver la estructura atómica de una biomolécula por crio-ME de partículas aisladas en la actualidad primero es necesario caracterizar el espécimen por tinción negativa a fin de obtener un mapa 3D de baja resolución. Solamente cuando las imágenes teñidas negativamente muestran partículas monodispersas con poca agregación y un grado controlable de heterogeneidad, se puede pasar efectivamente a su análisis por crio-EM de partículas aisladas. Este análisis comienza con la vitrificación de la biomolécula para la obtención de imágenes 2D para seleccionar las partículas congeladas-hidratadas y calcular los promedios 2D que conducen a un mapa 3D inicial, el cual se refina para obtener el mapa 3D final de cuya evaluación se decide si la preparación requiere mejoras adicionales para poder alcanzar resolución casi-atómica. Una vez logrado un mapa 3D de resolución casi-atómica se procede a su interpretación que conduce al modelo atómico⁶¹.

En Latinoamérica el primer crio-ME (Philips CM-120) se instaló en 1997 en el Centro de Biología Estructural “Humberto Fernández-Morán” del I.V.I.C. de Venezuela (figura 4a,b), sede del Centro Latino-Americano FEI de Criomicroscopía (CLAF-CME) desde 1999 y uno de los nodos del Centro de Biología Estructural del Mercosur (CeBEM). El primer mapa 3D de filamentos gruesos de músculo de tarántula teñidos negativamente⁶² (resolución 50 Å) fue presentado en la 3DEM GRC de 1985 (figura 1) por Crowther, Craig y Padrón (figura 1, puntos amarillos). La estructura cuasi-atómica ajustada rígidamente a un mapa 3D de filamento gruesos de músculo de tarántula congelados-hidratados⁶³ (resolución 25 Å) (figura 4c) condujo al hallazgo del motivo de cabezas interactuantes de miosina (IHM)^{64,65} (PDB [3DTP](#)⁶⁶ y [3JBH](#)⁶⁷ basadas en el mapa 3D de 20 Å de resolución [EMD-1950](#)). La figura 4d muestra dos motivos IHM en hélice. Tres autores de este trabajo asistieron a la 3DEM GRC de 1985 (figura 1, Craig, Egelman y Padrón, puntos rojos). Solo dos microscopistas ligados a Latinoamérica estuvieron presentes, van

Heel^{38,39,42} de de los Países Bajos y Padrón de Venezuela (figura 1, puntos azules). Van Heel, con raíces en Brasil desde su niñez, fue galardonado con el Premio Wiley en Ciencias Biomédicas 2017 junto con Frank y Henderson, otorgado por sus “desarrollos pioneros en microscopía electrónica que están transformando los estudios estructurales de biomoléculas y sus complejos”. Van Heel actualmente está colaborando con el Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LNNano) del Centro Nacional de Investigaciones en Energía y Materiales (CNPEM) de Brasil en el cual se están instalando dos crio-MEs *Thermo Fisher Scientific* (Talos™ Arctica™ G2 y Krios™ G3i) que entrarán en operación junto al nuevo sincrotrón SIRIUS, convirtiendo al CNPEM en el laboratorio más avanzado de Biología Estructural en Latinoamérica y permitiendo la realización expedita de estudios por crio-ME de partículas aisladas en Latinoamérica.

Agradecimientos

Las investigaciones de Raúl Padrón han sido financiadas por el *Howard Hughes Medical Institute* (EE.UU.) y CONICIT (Venezuela) que aportaron el crio-porta-espécimen Gatan 626-DH y el crio-EM Philips CM-120 (figura 4b), y el Centro de Biología Estructural del Mercosur (CeBEM). Agradecemos al Lic. Lorenzo Álamo por su ayuda con las figuras, al Dr. Julio Ortiz por precisar el origen del concepto de crio-ME^{17,18} y al Lic. Saúl Castro Gómez por sus comentarios sobre Fernández-Morán, la crio-ME y la adjudicación del Premio Nobel de Química 2017.

Referencias

1. E Ruska. Über Fortschritte im Bau und in der Leistung des magnetischen Elektronenmikroskops. *Z. Physik*, **87**, 580-602 (1934).
2. L Marton. La microscope électronique des objets biologiques. *Acad. roy. de Belg. Bull. de la Cl. des Sci., Ser. 5*, **20**, 439-446 (1934).
3. L. Marton. Electron microscopy of biological objects. *Nature*, **133**, 911 (1934).

4. P Brzezinski. Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2017: The development of cryo-electron microscopy. The Royal Swedish Academy of Sciences (2017).
Disponible en: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2017/advanced-chemistryprize2017.pdf
5. W Kühlbrandt. The resolution revolution. **Science**, **343**, 1443-1444 (2014).
6. CE Hall, MA Jakus, FO Schmitt. The structure of certain muscle fibrils as revealed by the use of electron stains. **J. Applied Physics**, **16**, 459-465 (1945).
7. S Brenner, RW Horne. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. **Biochim. Biophys. Acta**, **34**, 103-110 (1959).
8. HE Huxley, G Zubay. Preferential staining of nucleic acid-containing structures for electron microscopy. **J. Biophys. Biochem. Cytology**, **11**, 273-296 (1961).
9. H Fernandez-Moran. Low-temperature preparation techniques for electron microscopy of biological specimens based on rapid freezing with liquid helium II. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **85**, 689-713 (1960).
10. H Fernández-Morán. Cryo-Electron Microscopy and Ultramicrotomy: Reminiscences and Reflections. **Adv. Electronics and Electron Physics, Supplement 16**, 167-223 (1985).
11. E Ruska. The development of the electron microscope and of electron microscopy. Nobel Lecture, December 8 (1986).
Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/072f/8c9dc4f6507779d26e7123e20f8669ec79b8.pdf>
12. P Echlin. Low-Temperature Microscopy and Analysis. Plenum Press, New York and London (1992).
13. R Padrón. Contribución de Humberto Fernández-Morán a la Microscopía Electrónica. **Rev. Lat. Met. Mat.**, **19**, 5-6 (1999).
14. H Padrón. The contribution of Humberto Fernández-Morán to the electron microscopy. **Acta Microsc.**, **10**, 54-56 (2001).
15. H Fernández-Morán. Application of the ultrathin freezing sectioning technique to the study of cell structures with the electron microscope. **Arkiv. Fysik.**, **4**, 471-483 (1952).
16. H Fernández-Morán. The staining of thin sections of mouse pancreas prepared by the Fernández-Morán Helium II freeze substitution method. **J. Biophys. Biochem. Cytology**, **8**, 644-670 (1960).
17. H Fernández-Morán. New approaches in correlative studies of biological ultrastructure by high resolution electron microscopy. Royal Microscopical Society's Celebration of the "Tercentenary of the Microscope in Living Biology" (1963).
18. H Fernández-Morán. Electron microscopy with high-field superconducting solenoid lenses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **53**, 445-451 (1965).
19. H Fernandez-Moran. High-resolution electron microscopy with superconducting lenses at liquid helium temperatures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **56**, 801-808 (1966).
20. VR Matricardi, RC Moretz, DF Parsons. Electron diffraction of wet proteins: catalase. **Science**, **177**, 268-270 (1972).
21. DF Parsons. Structure of wet specimens in electron microscopy. Improved environmental chambers make it possible to examine wet specimens easily. **Science**, **186**, 407-414 (1974).
22. PNT Unwin, R Henderson. Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens. **J. Mol. Biol.**, **94**, 425-432 (1975).
23. R Henderson, PNT Unwin. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. **Nature**, **257**, 28-32 (1975).
24. RM Glaeser. Limitations to significant information in biological electron microscopy as a result of radiation damage. **J. Ultrastruct. Res.**, **36**, 466-482 (1971).
25. KA Taylor, RM Glaeser. Electron diffraction of frozen, hydrated protein crystals. **Science**, **186**, 1036-1037 (1974).
26. KA Taylor, RM Glaeser. Electron microscopy of frozen hydrated biological specimens. **J. Ultrastr. Res.**, **55**, 448-456 (1976).
27. J Dubochet, AW McDowell. Vitrification of pure water for electron microscopy. **J. Microsc.**, **124**, 3-4 (1981).
28. M Adrian, J Dubochet, J Lepault, AW McDowell. Cryo-electron microscopy of viruses. **Nature**, **308**, 32-36 (1984).
29. J Dubochet, M Adrian, JJ Chang, JC Homo, J Lepault, AW McDowell, P Schultz. Cryo-electron microscopy of vitri-fied specimens. **Q. Rev. Biophys.**, **21**, 129-228 (1988).
30. A Klug, JE Berger. An optical method for the analysis of periodicities in electron. **J. Mol. Biol.**, **10**, 565-569 (1964).
31. A Klug, DJ DeRosier. Optical filtering of electron micrographs: reconstruction of one-sided images. **Nature**, **212**, 29-32 (1966).
32. HP Erickson, A Klug. The Fourier transform of an electron micrograph: effects of defocussing and aberrations, and implications for the use of underfocus contrast enhancement. **Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie**, **74**, 1129-1137 (1970).
33. RA Crowther, LA Amos, JT Finch, DJ DeRosier, A Klug. Three dimensional reconstructions of spherical viruses by Fourier synthesis from electron micrographs. **Nature**, **226**, 421-425 (1970).
34. RA Crowther, DJ DeRosier, A Klug. The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its application to electron microscopy. **Proc. R. Soc. London, A** **317**, 319-340 (1970).
35. W Hoppe, R Langer, G Knesch, C Poppe. Protein-kristallstrukturanalyse mit elektronenstrahlen. **Naturwissenschaften**, **55**, 333-336 (1968).
36. W Hoppe, J Gassmann, N Hunsmann, HJ Schramm, M Sturm. Three dimensional reconstruction of individual negatively stained yeast fatty acid synthetase molecules from tilt series in the electron microscope. **Z. Physiol. Chem.**, **355**, 1483-1487 (1974).
37. J Frank. Averaging of low exposure electron micrographs of non-periodic objects. **Ultramicroscopy**, **1**, 159-162 (1975).

38. M van Heel, J Frank. Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules. **Ultramicroscopy**, **6**, 187-194 (1981).
39. J Frank, M van Heel. Correspondence analysis of aligned images of biological particles. **J. Mol. Biol.**, **161**, 134-137 (1982).
40. M Radermacher, T Wagenknecht, A Verschoor, J Frank. Three-dimensional reconstruction from a single-exposure, random conical tilt series applied to the 50S ribosomal subunit of *Escherichia coli*. **J. Microsc.**, **146**, 113-136 (1987).
41. J Frank, M Radermacher, P Penczek, J Zhu, Y Li, M Ladjadj, A Leith. SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. **J. Struct. Biol.**, **116**, 190-199 (1996).
42. M van Heel, G Harauz, EV Orlova, R Schmidt, M Schatz. A new generation of the IMAGIC image processing system. **J. Struct. Biol.**, **116**, 17-24 (1996).
43. SJ Ludtke, PR Baldwin, W Chiu. EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. **J. Struct. Biol.**, **128**, 82-97 (1999).
44. SHW Scheres, H Gao, M Valle, GT Herman, PPB Eggermont, J Frank, JM Carazo. Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization. **Nature Methods**, **4**, 27-29 (2007).
45. R Henderson, JM Baldwin, TA Ceska, F Zemlin, E Beckmann, KH Downing. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. **J. Mol. Biol.**, **213**, 899-929 (1990).
46. W Kühlbrandt, DN Wang, Y Fujiyoshi. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. **Nature**, **367**, 614-621 (1994).
47. E Nogales, SG Wolf, KH Downing. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. **Nature**, **391**, 199-203 (1998).
48. K Murata, K Mitsuoka, T Hirai, T Walz, P Agre, JB Heymann, A Engel, Y Fujiyoshi. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. **Nature**, **407**, 599-605 (2000).
49. AR Faruqi, DM Cattermole, C Raeburn. Direct electron detection methods in electron microscopy. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, A** **513**, 317-321 (2003).
50. AR Faruqi, R Henderson, M Pryddetch, P Allport, A Evans. Direct single electron detection with a CMOS detector for electron microscopy. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, A** **546**, 170-175 (2005).
51. G McMullan, AT Clark, R Turchetta, AR Faruqi. Enhanced imaging in low dose electron microscopy using electron counting. **Ultramicroscopy**, **109**, 1411-1416 (2009).
52. X Li, P Mooney, S Zheng, CR Booth, MB Braunfeld, S Gubbens, DA Agard, Y Cheng. Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM. **Nature Methods**, **10**, 584-590 (2013).
53. ZA Ripstein, JL Rubinstein. Processing of cryo-EM movie data. **Methods in Enzymology**, **579**, 103-124 (2016).
54. H Heide. Design and operation of cold stages. **Ultramicroscopy**, **10**, 125-154 (1982).
55. P Hawkes. Cold Field Emission and the Scanning Transmission Electron Microscope. **Advances in Imaging and Electron Physics**, **159**, 1-418 (2009).
56. J Frank, L Al-Ali. Signal-to-noise ratio of electron micrographs obtained by cross correlation. **Nature**, **256**, 376-379 (1975).
57. S Chen, G McMullan, AR Faruqi, GN Murshudov, JM Short, SH Scheres, R Henderson. High-resolution noise substitution to measure overfitting and validate resolution in 3D structure determination by single particle electron cryomicroscopy. **Ultramicroscopy**, **135**, 24-35 (2013).
58. T Althoff, DJ Mills, JL Popot, W Kühlbrandt. Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I₁III₂IV₁. **EMBO J.**, **30**, 4652-4664 (2011).
59. JA Letts, K Fiedorczuk, L Sazanov. The architecture of respiratory supercomplexes. **Nature**, **537**, 644-648 (2016).
60. A Merk, A Bartesaghi, S Banerjee, V Falconieri, P Rao, MI Davis, R Pragani, MB Boxer, LA Earl, JLS Milne, S Subramanian. Breaking cryo-EM resolution barriers to facilitate drug discovery. **Cell**, **165**, 1698-1707 (2016).
61. Cheng, Y., Grigorieff, N., Penczek, P. A. & Walz, T. (2015). A Primer to Single-Particle Cryo-Electron Microscopy., pp. 438-449.
62. RA Crowther, R Padrón, R Craig. Arrangement of the heads of myosin in relaxed thick filaments from tarantula muscle. **J. Mol. Biol.**, **184**, 429-439 (1985).
63. JL Woodhead, FQ Zhao, R Craig, EH Egelman, L Alamo, R Padrón. Atomic model of a myosin filament in the relaxed state. **Nature**, **436**, 1195-1199 (2005).
64. L Alamo, N Koubassova, A Pinto, R Gillilan, A Tsaturyan, R Padrón. Lessons from a tarantula: New insights into thick filament and myosin interacting-heads motif structure and function. **Biophys. Rev.**, **9**, 461-480 (2017).
65. L Alamo, A Pinto, G Sulbarán, J Mavárez, R Padrón. Lessons from a tarantula: New insights into myosin interacting-heads motif evolution and its implications on disease. **Biophys. Rev.**, (2017). <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0292-4>
66. L Alamo, W Wriggers, A Pinto, F Bartoli, L Salazar, FQ Zhao, R Craig, R Padrón. Three-dimensional reconstruction of tarantula myosin filaments suggests how phosphorylation may regulate myosin activity. **J. Mol. Biol.**, **384**, 780-797 (2008).
67. L Alamo, D Qi, W Wriggers, A Pinto, J Zhu, A Bilbao, R Gillilan, S Hu, R Padron R. Conserved Intramolecular Interactions Maintain Myosin Interacting-Heads Motifs Explaining Tarantula Muscle Super-Relaxed State Structural Basis. **J. Mol. Biol.**, **428**, 1142-1164 (2016).