

Оценка локальной неоднородности крио-ЭМ карт в прямом пространстве для пилей типа I из *E. coli*

Лунин В.Ю., Лунина Н.Л., Петрова Т.Е.

Институт математических проблем биологии РАН – филиал Института прикладной математики им. М.В. Келдыша Российской академии наук, Пушкино, Россия

Аннотация. Точность оценки разрешения экспериментальной крио-ЭМ карты рассеивающей плотности имеет решающее влияние на точность определения параметров неопределенности положений атомов (ADP параметров) при уточнении в прямом пространстве. Разработанная ранее методика оценки локального разрешения крио-ЭМ карт распределения методами прямого пространства была применена к исследованию карт для пилей типа I из *E. coli*. Исследование 4 карт, полученных тремя группами исследователей, показало, что для каждой из трех стандартных карт разрешение может считаться постоянным и составляет порядка 2.6–2.7 Å. В то же время, для обостренной карты разрешение выше и составляет 2.3 Å.

Ключевые слова: структурная биология, крио-ЭМ карты, уточнение в прямом пространстве, локальное разрешение, оболочечные функции

ВВЕДЕНИЕ

При исследовании атомной структуры биологических объектов методами рентгеновского рассеяния или криоэлектронной микроскопии первоначально координаты атомов определяются в результате интерпретации карты рассеивающей плотности. В качестве рассеивающей плотности выступают плотность распределения электронов при использовании рассеяния рентгеновских лучей или рассеивающего электростатического потенциала в криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ). Под картой плотности (крио-ЭМ картой) мы далее понимаем набор значений величины рассеивающей плотности, заданный в узлах регулярной сетки в трехмерном пространстве или, как визуальный образ, трехмерную топографическую карту рассеивающей плотности, представленную ее изоповерхностями. С каждой картой связан трехмерный набор ее комплексных коэффициентов Фурье, называемых структурными факторами.

Для всех химических типов атомов и ионов распределения плотности для атомов, покоящихся в начале координат, известны и собраны в таблицы [1]. Преобразования Фурье этих функций называются факторами атомного рассеяния (или формфакторами) этих атомов. В практической работе они обычно аппроксимируются суммами нескольких (от одной до пяти) изотропных Гауссовых функций [1–3]. При известных координатах атомов и их формфакторах может быть рассчитана теоретическая карта рассеивающей плотности. Сравнение этой карты с экспериментальной и попытка достижения максимального соответствия этих карт посредством варьирования координат атомов составляет основу процедуры уточнения атомной структуры в прямом пространстве [4–6].

При уточнении атомной модели в прямом пространстве существенной сложностью является то, что и реальное распределение рассеивающей плотности, и экспериментальная карта содержат искажения, которые должны быть приняты во внимание (смоделированы). Одной из основных причин искажения теоретической

плотности является динамическая и статическая неопределенность положений атомов в исследуемом объекте. И при рентгеновском, и при ЭМ исследовании структуры экспериментально получаемое распределение является результатом усреднения по огромному числу экземпляров исследуемого объекта (молекул в кристалле или ЭМ-изображений), имеющих небольшие расхождения в координатах атомов объекта. Динамическая неопределенность связана с тепловой подвижностью атомов. Статическая неопределенность связана с тем, что в различных копиях объекта некоторые участки цепи могут находиться в различных конформациях при сохраняющейся общей структуре объекта. Неопределенность положений атомов проявляется как увеличение ширины пиков, отвечающих атомам в теоретическом распределении и слиянии пиков близких атомов. Неопределенность положения атома обычно описывается трехмерным изотропным Гауссовым распределением вероятностей и задается параметром неопределенности положения B_j (Atomic Displacement Parameter, ADP), где j – порядковый номер атома в списке атомов. Параметры $\{B_j\}$, несущие важную информацию о внутренней подвижности объекта исследования, определяются в процессе уточнения структуры наравне с координатами атомов.

Из параметров, определяющих искажения экспериментальной карты, мы в данной работе остановимся на трех: фоне T , проявляющемся на карте, масштабирующем коэффициенте Z , приводящем теоретическую шкалу значений к шкале экспериментальной карты, и величине разрешения D . Разрешение характеризует детальность полученной карты и определяется условиями эксперимента, например, чувствительностью и разрешающей способностью детектора. Эта величина не является атрибутом исследуемого объекта, а характеризует эксперимент. Понижение разрешения карты, помимо увеличения ширины пиков на карте, может приводить к появлению волн обрыва – чередующихся в пространстве сферических оболочек относительно высокой амплитуды значений плотности с чередующимся знаком.

Схожесть картины проявления неопределенности положений атомов и ограниченного разрешения экспериментальной карты приводит к тому, что при уточнении в прямом пространстве найденные значения параметров B являются суммой $B = B^{\text{ADP}} + B^{\text{res}}$, где B^{ADP} описывает истинную подвижности атомов объекта, а B^{res} является «паразитной» добавкой, выражающейся через значение разрешения карты D [7]. В связи с этим аккуратное определение значения параметра D является необходимым условием для точного определения значений B^{ADP} . В то время как значения B_j , как правило, рассматриваются как локальные характеристики (разные для разных атомов), величины D , Z и T обычно считаются глобальными характеристиками, одинаковыми для всех атомов. Тем не менее, в последнее время ряд авторов обратил внимание на то, что крио-ЭМ карты часто имеют разрешение, визуально различающееся для разных участков карты, что привело к развитию концепции локального разрешения [8–11]. В наших расчетах мы изначально считаем величину разрешения локальной, разной для окрестностей разных атомов, и находим набор значений $\{B_j\}$ и $\{D_j\}$. Далее, базируясь на полученных результатах, может приниматься решение о приемлемости единого глобального значения D^* для всех атомов.

В данной работе приводятся результаты применения разработанной методики для оценки параметров гетерогенности экспериментальных крио-ЭМ карт, полученных недавно [12–14] при исследовании структуры пилей типа I бактерий *E. coli*. Пилиями называются белковые нитеобразные трубчатые структуры, с помощью которых бактерии прикрепляются к другим клеткам. Пили могут иметь диаметр от десятков до сотен ангстрем и достигать в длину сотен тысяч ангстрем. В указанных выше работах атомные модели были получены для фрагментов пилей длиной около 130 Å, имеющих внешний диаметр около 70 Å и внутренний около 12 Å (рис. 1). Основная часть пилей образована расположенными по спирали субъединицами (цепями) белка пилина FimA.

Отдельная субъединица состоит из 159 аминокислотных остатков и имеет явно выраженный желоб на поверхности и длинный (19 остатков) «крюк», посредством которого предыдущая субъединица «цепляется» за последующую (рис. 1).

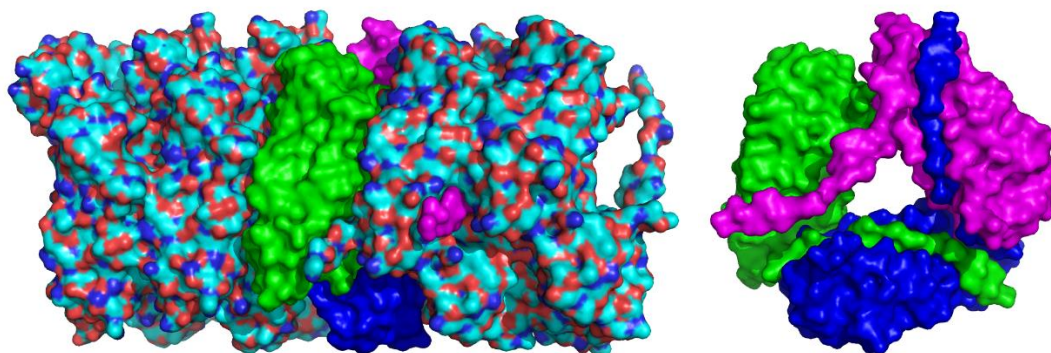


Рис. 1. Общий вид фрагмента пилей из 15 субъединиц пилина [14], (код PDB 9VKV) и способ сцепления отдельных субъединиц в спиральной структуре. Сплошным цветом выделены субъединицы Н (зеленый), I (синий) и J (фиолетовый).

ОЦЕНКА РАЗРЕШЕНИЯ КАРТЫ

Существуют разные подходы к определению понятия разрешения и оценки его величины [15, 16]. В настоящее время основным подходом к определению разрешения карты в крио-ЭМ исследованиях являются методы обратного пространства, основанные на сравнении структурных факторов для двух карт, полученных для исследуемого объекта по независимым наборам экспериментальных данных. Сравнение двух наборов структурных факторов осуществляется посредством расчета коэффициента корреляции структурных факторов для разных зон разрешения (Fourier Shell Correlation, FSC) [17–20]. В качестве оценки разрешения карты выбирается величина, соответствующая зоне, для которой график FSC падает до определенного критического значения (как правило, 0.143). Такой подход имеет некоторые недостатки. Во-первых, выбор критического значения достаточно условен и не всеми признается корректным. Предлагаются и другие пороговые значения, например, 0.5. Кроме того, предложены схемы, в которых структурные факторы (и, соответственно, FSC кривая) рассчитываются по модифицированным картам. Это приводит к тому, что для величины разрешения существует множество несовпадающих оценок [14]. Во-вторых, данный критерий оценивает уровень воспроизводимости деталей на двух картах, а не качество самой карты. Найденный порог разрешения D , при котором значение FSC становится ниже критического значения, показывает, что детали карты, отвечающие более высокому, чем значение D , разрешению, ненадежны. Но это не означает, что карта достигает значения D , а не имеет еще более низкое разрешение. В-третьих, получение оценки сильно усложняется, если карта имеет переменное локальное разрешение.

Недавно нами был предложен альтернативный подход, основанный на работе в прямом пространстве [21]. Подход нацелен на определение локальных параметров B , D , Z , T . Он базируется на разработанной недавно методике быстрого расчета, при заданных значениях параметров B и D , изображения $\rho^{\text{img}}(\mathbf{r}; B, D)$ атома, помещенного в начало координат. Расчет осуществляется с использованием аналитически заданных аппроксимаций [11, 22]. Для окрестности j -го атома оптимальные значения параметров B^{opt} , D^{opt} , Z^{opt} , T^{opt} определяются посредством минимизации локального критерия совпадения экспериментальной и рассчитанной карт:

$$Q_j(B, D, Z, T) = \frac{\sum_{\mathbf{u}: |\mathbf{u}-\mathbf{r}_j| \leq R_{\text{vic}}} \left(\rho^{\text{obs}}(\mathbf{u}) - Z \left(T + \sum_{\substack{k: \\ |\mathbf{u}-\mathbf{r}_k| \leq R_{\text{atom}}}} \rho^{\text{img}}(\mathbf{u}-\mathbf{r}_k; B, D) \right) \right)^2}{\sum_{\mathbf{u}: |\mathbf{u}-\mathbf{r}_j| \leq R_{\text{vic}}} (\rho^{\text{obs}}(\mathbf{u}))^2}.$$

Здесь R_{vic} – заданный радиус окрестности, R_{atom} – заданный радиус атома, суммирование по $\mathbf{u}$ идет по узлам сетки, попавшим в окрестность j -ого атома, суммирование по k идет по атомам, находящимся поблизости к точке сетки $\mathbf{u}$, $\mathbf{r}_k$ – координаты k -ого атома, $\rho^{\text{obs}}(\mathbf{u})$ – экспериментальная карта.

Минимизация критерия Q осуществляется перебором значений B и D с заданным шагом на заданных интервалах параметров. При этом предполагается, что внутри рассматриваемой окрестности все значения параметров B и D одинаковы. В силу того, что критерий является квадратичной функцией по Z и ZT , то сопутствующие текущим пробным значениям B и D оптимальные значения $Z^{\text{opt}}(B, D)$ и $T^{\text{opt}}(B, D)$ вычисляются по формулам для решения системы двух линейных уравнений [21].

ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ ЛОКАЛЬНОЙ НЕОДНОРОДНОСТИ КРИО-ЭМ КАРТ ДЛЯ ПИЛЕЙ ТИПА I ИЗ *E. coli*

Анализ карты J171

Карта J171 рассеивающей плотности для уро-патогенной бактерии *E. coli* была получена на сетке $256 \times 256 \times 256$ в кубической виртуальной ячейке с длиной ребра $214.016 \text{ \AA}$ [14]. Построенная по карте модель была уточнена в прямом пространстве программой *Phenix* [23, 24]. PDB и EMDB коды депонированных модели и карты – 9VKV и EMD-65144 соответственно. Анализ локальной гетерогенности был проведен для субъединицы Н. При расчете изображений атомов использовались 4-Гауссовы аппроксимации формфакторов [2]. Радиус окрестности R_{vic} для вычисления критерия Q был выбран равным $4.0 \text{ \AA}$, радиус атома R_{atom} зависел от величины D тестируемого разрешения и определялся как $R_{\text{atom}} = 3D$. Сканирование значений параметров B и D производилось с шагом $1.0 \text{ \AA}^2$ и $0.025 \text{ \AA}$ соответственно.

Первый этап работы был посвящен определению величин глобальных (для всей молекулы) масштабирующих параметров Z^* , T^* . Для этого на первом этапе работы эти параметры временно рассматривались как варьируемые локальные параметры, и для каждого атома были найдены индивидуальные оптимальные значения $\{B_j^{\text{opt}}, D_j^{\text{opt}}, Z_j^{\text{opt}}, T_j^{\text{opt}}\}$. На рисунке 2 показаны найденные значения локальных параметров $\{Z_j^{\text{opt}}\}$ и $\{T_j^{\text{opt}}\}$ для атомов главной цепи (-N-C α -C-). Глобальные значения $Z^* = 1.1$ и $T^* = 0.053$ были определены как медианные значения величин $\{Z_j^{\text{opt}}\}$ и $\{T_j^{\text{opt}}\}$ соответственно.

На втором этапе работа велась с фиксированными для всех атомов значениями масштабирующих параметров $Z^* = 1.1$ и $T^* = 0.053$. На рисунке 3 показано распределение значений локального разрешения D для всех атомов и атомов главной цепи. Из графиков следует, что, в основном, эти значения близки и группируются вокруг медианного значения $D = 2.7 \text{ \AA}$. Области пониженного разрешения карты связаны, преимущественно, с цепями боковых групп на внешней поверхности пили, обращенными в растворитель, для которых на карте отсутствует видимая плотность. В то же время, для групп, лежащих в глубине желоба, разрешение может быть несколько выше медианного. В целом, для карты J171 разрешение можно считать постоянным, равным $2.7 \text{ \AA}$.

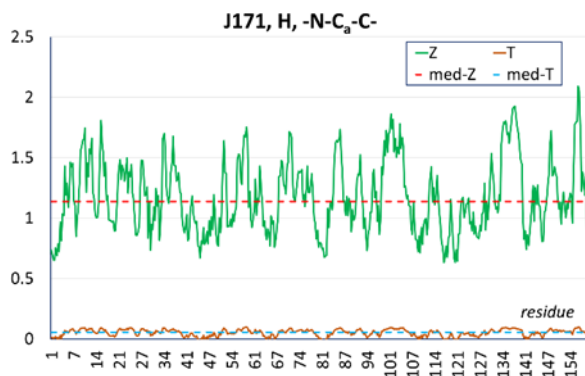


Рис. 2. Распределение локальных значений масштабирующих коэффициентов Z и T по главной цепи субъединицы H и их медианные значения.

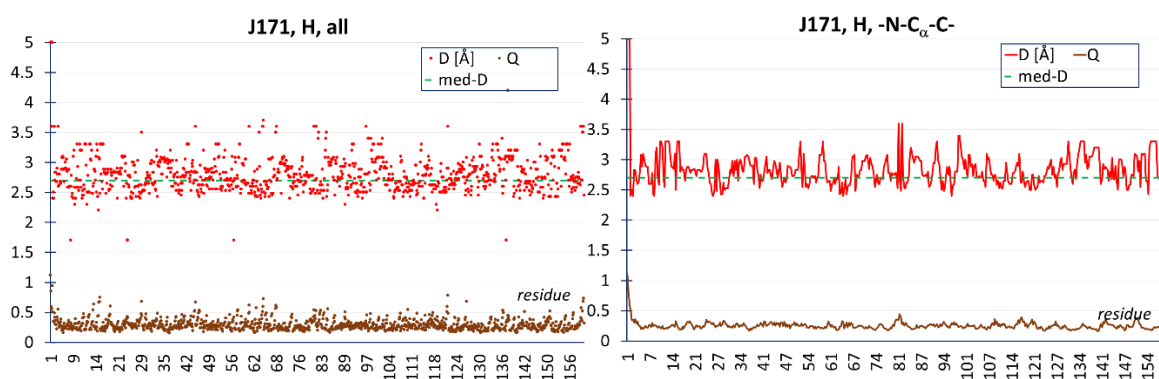


Рис. 3. Величина локального разрешения и значения критерия Q для всех атомов субъединицы H и для атомов главной цепи. Показано медианное значение разрешения $D^* = 2.7 \text{ \AA}$.

Анализ “обостренной” карты J167

Следующим объектом анализа являлась карта J167, полученная из карты J171 процедурой обострения [25]. Эта процедура заключается в расчете по исходной карте соответствующих ей значений структурных факторов, умножении этих значений на растущую на бесконечности функцию и расчете обратного преобразования Фурье. Цель этой процедуры – приблизить изображения отдельных атомов на карте к изображению дельта-функции, т.е. уменьшить ширину пиков на карте. Побочным эффектом такой процедуры является возрастание уровня шума на карте, который, в ряде случаев, может превышать уровень сигнала. Использование обостренной карты позволило повысить визуальное разрешение карты и, в частности, внести в модель молекулы связанной с пилы воды [14].

Оценка локального разрешения для данной карты проводилась аналогично тому, как это было сделано для карты J171. Вначале поиск оптимальных параметров проводился с варьированием всех параметров модели и карты, а затем масштабирующие параметры были зафиксированы на медианных значениях $Z^* = 1.76$ и $T^* = 0.09$ и был проведен поиск значений $\{B_j^{\text{opt}}, D_j^{\text{opt}}\}$ при фиксированных для всех атомов значениях масштабирующих параметров.

На рисунке 4 показаны найденные значения локального разрешения для карты J167. Здесь разброс найденных значений D_j^{opt} относительно медианного значения существенно меньше, чем для карты J171, и медианное значение $D^* = 2.32 \text{ \AA}$ меньше, чем рассчитанное для карты J171 значение $2.7 \text{ \AA}$. Это подтверждает ранее сделанный вывод о том, что карта J167 обладает более высоким разрешением [14], основанный на визуальном анализе и использовании процедуры *phenix.mtriage* [24]. С другой стороны,

для обостренной карты совпадение с ней, рассчитанной по атомной модели карты, несколько хуже, чем это было для исходной карты J171: медианное значение 0.35 величины критерия Q по сравнению с 0.27. Это связано с упомянутым выше свойством обостренных карт иметь более высокий уровень шума.

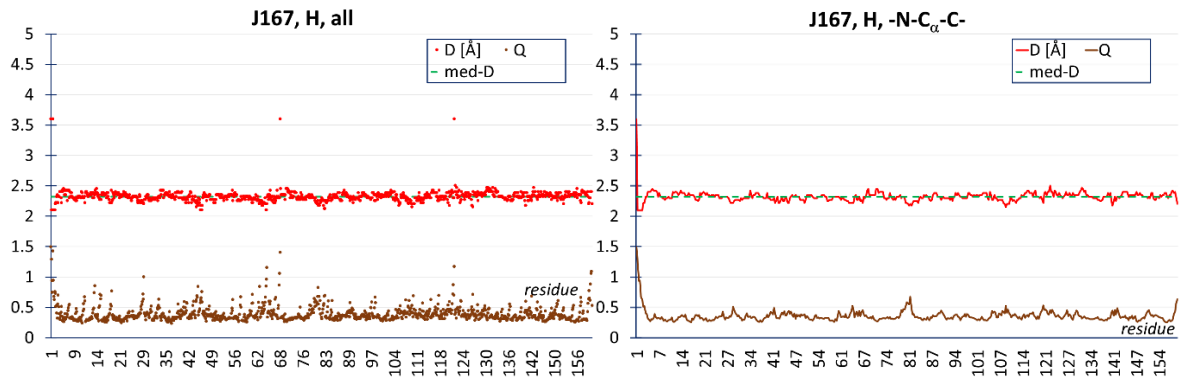


Рис. 4. Величина локального разрешения D и значения критерия Q для всех атомов субъединицы Н (слева) и для атомов главной цепи (справа) для карты J167. Показано медианное значение разрешения $D^*=2.3$ Å.

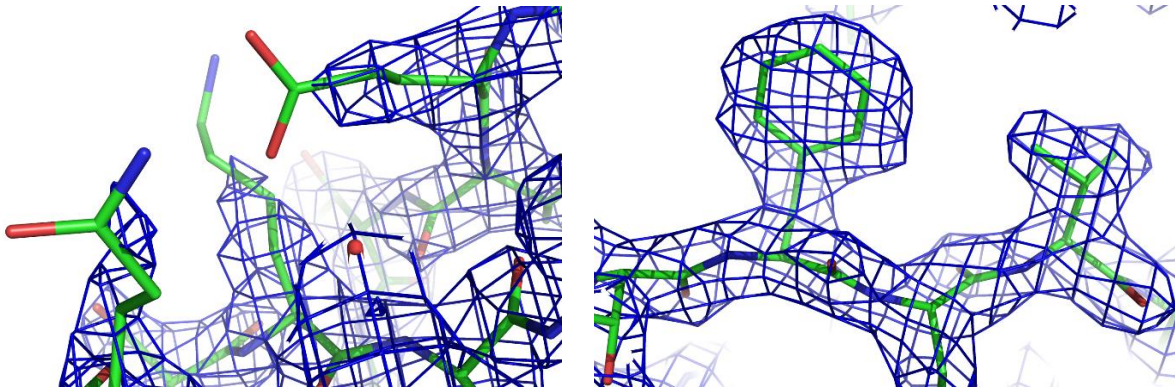


Рис. 5. Фрагменты карты J167 рассеивающей плотности для плохо видимых остатков (слева) и участок карты с хорошо определенной плотностью (справа).

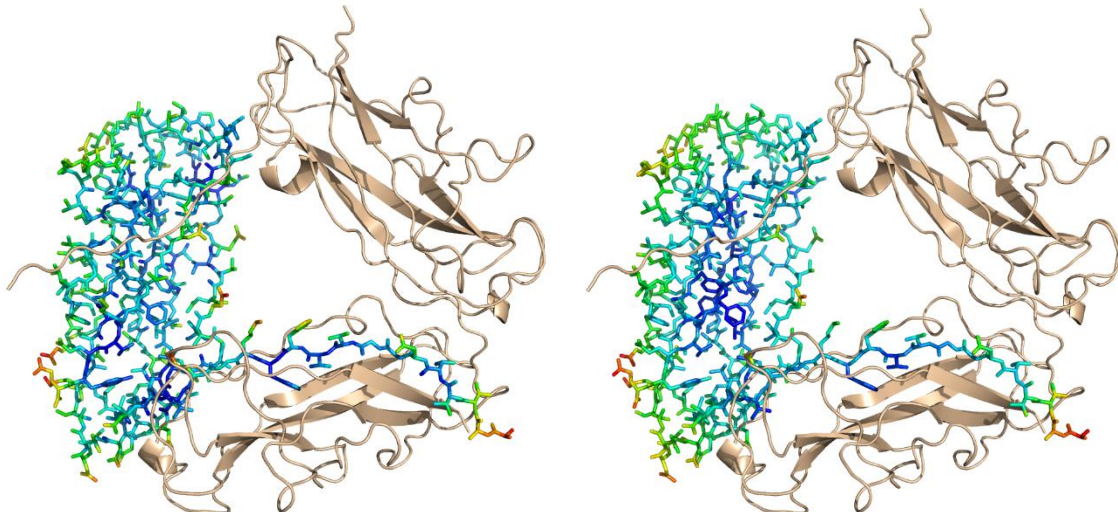


Рис. 6. Левый рисунок. Величина критерия качества Q для атомов субъединицы Н показана цветом: от темно синего для малых величин Q до красного для высоких значений. Правый рисунок: значения параметра неопределенности положения атома B . Цепи Н, I, J показаны в направлении оси пилей.

Присутствующие на диаграмме выбросы, относящиеся к остаткам Lis 68, Glu 121, Ala 1, соответствуют плохо определенным участкам карты (рис. 5).

На рисунке 6 показано распределение значений критерия Q для субъединицы H (в пространстве). Наилучшее совпадение рассчитанной и экспериментальной карт имеет место для более стабильных частей молекулы, находящихся внутри субъединицы пилина или в областях контактов между субъединицами. Для частей молекулы, экспонированных во внешнюю сторону или во внутреннюю полость пили, значения критерия несколько выше. Аналогичное распределение значений в пространстве имеет место и для других параметров модели (B) и карты (Z , T).

Анализ карт EMD_17878 и EMD_60903

Аналогичный анализ был проведен для карт для пилей типа I из *E. coli*, полученных другими группами исследователей.

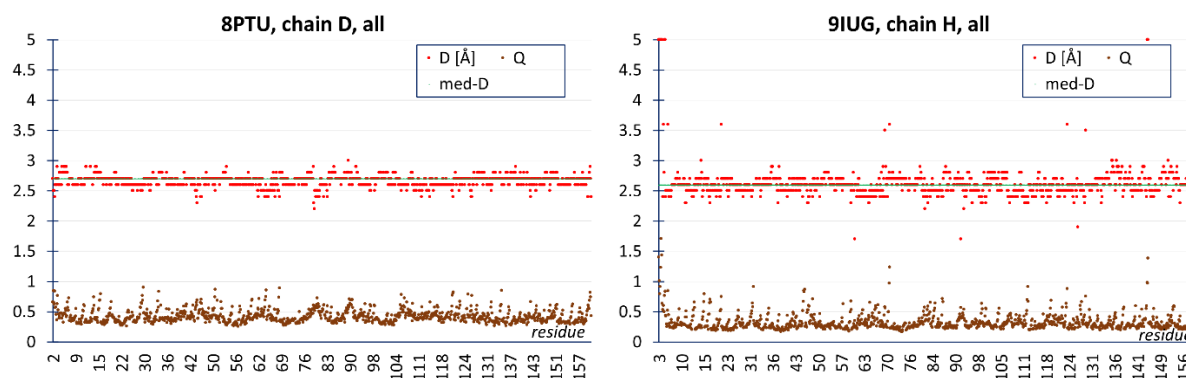


Рис. 7. Величина локального разрешения для атомов исследуемой цепи и значение критерия Q для карт EMD_17878 (слева) и EMD_60903 (справа).

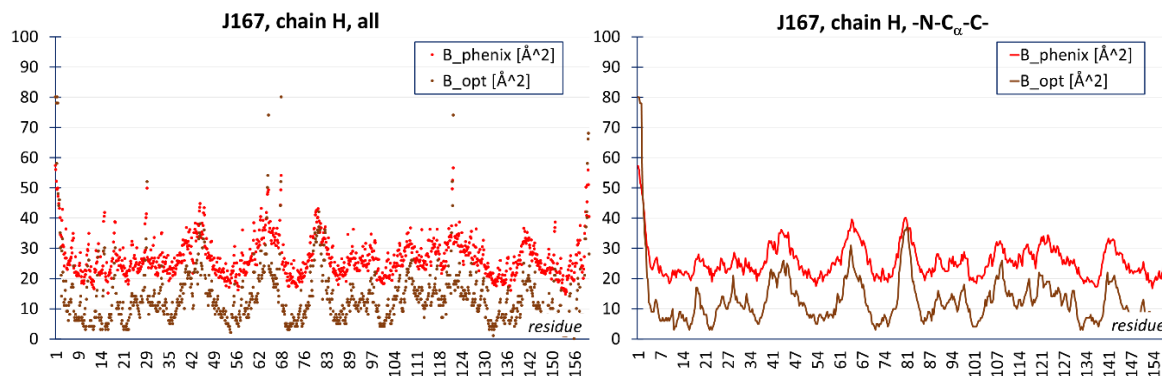


Рис. 8. Значения параметров B_{opt} , найденные в процессе минимизации невязки Q , и значения B_{phenix} , определенные в процессе уточнения модели 9VKV программой *Phenix*.

Карта EMD_17878 рассеивающей плотности для пили бактерии *E. coli* была получена на сетке $256 \times 256 \times 256$ в кубической виртуальной ячейке с длиной ребра $270.08 \text{ \AA}$ [12]. Построенная по карте модель была уточнена программой *Phenix*. PDB и EMDV коды депонированных модели и карты: 8PTU и EMD-17878 соответственно. Анализ локальной гетерогенности был проведен для цепи D. Радиус окрестности при вычислении критерия соответствия карт Q был выбран равным $4.0 \text{ \AA}$. Сканирование значений параметров B и D производилось с шагом $2.0 \text{ \AA}^2$ и $0.1 \text{ \AA}$ соответственно.

Карта EMD_60903 рассеивающей плотности для пилей бактерии энтеротоксигенной *E. coli* была получена на сетке $400 \times 400 \times 400$ в кубической виртуальной ячейке с длиной ребра $300.8 \text{ \AA}$ [13]. Построенная по карте модель была уточнена программой *Phenix*. PDB и EMDV коды депонированных модели и карты: 9IUG и EMD-60903

соответственно. Анализ локальной гетерогенности был проведен для цепи Н. Радиус окрестности при вычислении критерия соответствия карт Q был выбран равным $4.0 \text{ \AA}$. Сканирование значений параметров B и D производилось с шагом $2.0 \text{ \AA}^2$ и $0.1 \text{ \AA}$ соответственно.

Как и ранее, вначале поиск оптимальных параметров проводился с варьированием всех параметров модели и карты, а затем масштабирующие параметры были зафиксированы на медианных значениях $Z^* = 0.423$, $T^* = 0.08$, для 9PTU и $Z^* = 0.181$, $T^* = 0.063$ для 9IUG, и был проведен поиск значений $\{B_j^{\text{opt}}, D_j^{\text{opt}}\}$ при фиксированных для всех атомов значениях масштабирующих параметров. На рисунке 7 показаны результаты определения локального разрешения для этих двух карт. Как и ранее, разрешение может рассматриваться как постоянное для всей карты и оценено медианным значением $D = 2.7 \text{ \AA}$ для карты EMD_17878 и $D = 2.6 \text{ \AA}$ для карты EMD_60903.

Определение значений параметров неопределенности положения атомов

Помимо значений локального разрешения в процессе сканирования параметров гетерогенности определялись и локальные значения параметров B , характеризующих неопределенность положений атомов (ADP). На рисунке 8 показаны значения B_j^{opt} , полученные для карты J167 и атомной модели 9VKV. Распределение параметра B в пространстве показано на рисунке 6. Видимые на рисунке 8 колебания соответствуют выходу полипептидной цепи на экспонированную в растворитель поверхность пилей. Для сравнения на рисунке 8 показаны также значения ADP параметра, полученные в процессе уточнения модели 9VKV программой *Phenix*. Из графиков видно, что эти значения сильно коррелированы и отличаются общим сдвигом графика. Основной причиной этого различия является то, что в вычислениях с помощью программы *Phenix* были использованы постоянные значения формфакторов атомов, отвечающие точечным атомам (дельта-функциям). Для атомов, имеющих Гауссово распределение плотности с параметром B^{atom} , такой прием приводит к увеличению получаемого значения B_{phenix} на величину B^{atom} [7]. Этот эффект показан на рисунке 9. Замена 4-Гауссовых формфакторов на постоянные формфакторы в процессе минимизации критерия Q приводит к значениям B_{delta} , достаточно точно воспроизводящим значения, полученные программой *Phenix*. Остающаяся разница может быть вызвана как фактической заменой 4-Гауссовой аппроксимации формфактора на одно-Гауссову, так и тем, что при работе с программой *Phenix* использовалось постоянное для всех атомов значение локального разрешения $D = 2.09 \text{ \AA}$.

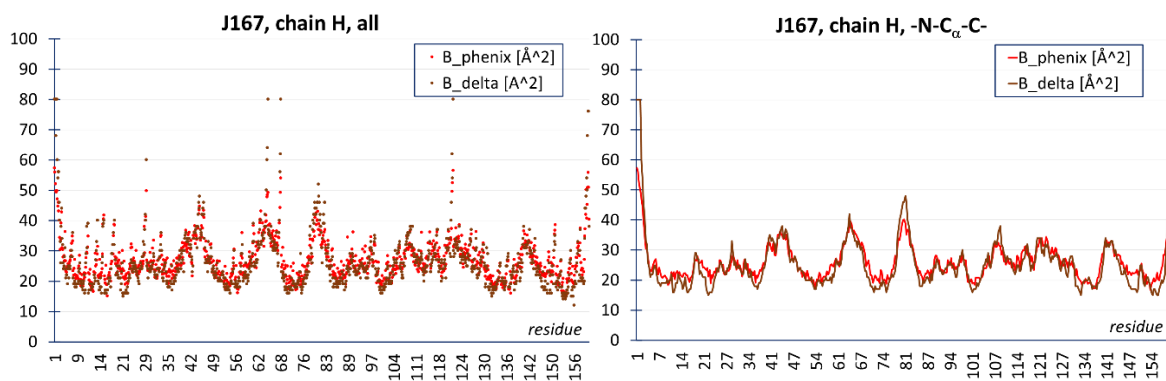


Рис. 9. Значения B_{phenix} , определенные для атомов в процессе уточнения модели 9VKV программой *Phenix* и значения параметров B_{delta} , полученные в процессе минимизации невязки Q с использованием постоянных формфакторов.

Следует отметить, что описанная подмена формфакторов не приводит к существенному изменению определяемых значений локального разрешения (рис. 10), но, как было продемонстрировано выше, приводит к искаженным сдвигом значениям параметров B .

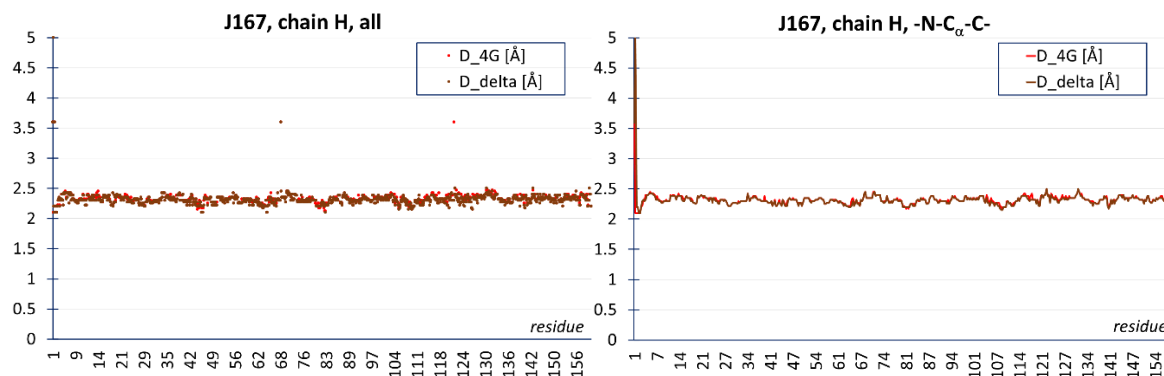


Рис. 10. Значения локального разрешения D_{4G} , полученные с использованием 4-Гауссовой аппроксимации формфакторов, и значения локального разрешения D_{δ} , полученные с использованием постоянных формфакторов для всех атомов субъединицы H (слева) и для атомов главной цепи (справа).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе описано исследование локальной неоднородности четырех крио-ЭМ карт для пилей бактерии *E. coli* методами прямого пространства. Анализ показал, что все карты могут рассматриваться как карты с постоянным локальным разрешением. При этом три исходных карты (полученные разными авторами) имеют примерно одинаковое разрешение 2.6–2.7 Å, в то время как обостренная карта имеет более высокое разрешение 2.3 Å. Эти результаты согласуются с результатами визуального анализа ЭМ карт. Полученные оценки разрешения можно использовать, чтобы повысить надежность определения значений параметров неопределенности положения атомов (Atomic Displacement Parameters, ADP) в исследованных объектах и выбрать карту, наиболее перспективную для построения наиболее детальной модели объекта, включающую сеть молекул воды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brown P.J., Fox A.G., Maslen E.N., O’Keefe M.A., Willis B.T.M. Intensity of diffracted intensities. In: *International Tables for Crystallography*. Ed. E. Prince. 2006. V. C. P. 554–595. doi: [10.1107/97809553602060000600](https://doi.org/10.1107/97809553602060000600)
2. Peng L.-M. Electron atomic scattering factors and scattering potentials of crystals. *Micron*. 1999. V. 30. P. 625–648. doi: [10.1016/S0968-4328\(99\)00033-5](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(99)00033-5)
3. Doyle P.A., Turner P.S. Relativistic Hartree–Fock X-ray and electron scattering factors. *Acta Cryst.* 1968. V. A24. P. 390–397. doi: [10.1107/S0567739468000756](https://doi.org/10.1107/S0567739468000756)
4. Diamond R. A real-space refinement procedure for proteins. *Acta Cryst.* 1971. V. A27. P. 436–452. doi: [10.1107/S0567739471000986](https://doi.org/10.1107/S0567739471000986)
5. Rupp B. *Biomolecular Crystallography. Principles, Practice, and Applications to Structural Biology*. New York (USA): Garland Science, Taylor & Francis Group. 2009.
6. Urzhumtsev A.G., Lunin V.Y. Introduction to crystallographic refinement of macromolecular atomic models. *Crystallography Reviews*. 2019. V. 25. No. 3. P. 164–262. doi: [10.1080/0889311X.2019.1631817](https://doi.org/10.1080/0889311X.2019.1631817)

7. Lunin V.Y., Lunina N.L. The separation of the effects of atomic displacement and local resolution in crystallographic and cryo-electron microscopy maps. *Acta Cryst.* 2025. V. A81. No. 6. doi: [10.1107/S2053273325008034](https://doi.org/10.1107/S2053273325008034)
8. Cardone G., Heymann J.B., Steven A.C. One number does not fit all: Mapping local variations in resolution in cryo-EM reconstructions. *J. Struct. Biol.* 2013. V. 184. P. 226–236. doi: [10.1016/j.jsb.2013.08.002](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.08.002)
9. Kucukelbir A., Sigworth F.J., Tagare H.D. Quantifying the local resolution of cryo-EM density maps. *Nat. Methods.* 2014. V. 11. P. 63–65. doi: [10.1038/nmeth.2727](https://doi.org/10.1038/nmeth.2727)
10. Vilas J.L., Gómez-Blanco J., Conesa P., Melero R., de la Rosa-Trevín J.M., Otón J., Cuenca J., Marabini R., Carazo J.M., Vargas J., Sorzano C.O.S. MonoRes: Automatic and Accurate Estimation of Local Resolution for Electron Microscopy Maps. *Structure.* 2018. V. 26. P. 337–344. doi: [10.1016/j.str.2017.12.018](https://doi.org/10.1016/j.str.2017.12.018)
11. Urzhumtsev A., Lunin V.Y. Analytic modeling of inhomogeneous-resolution maps in cryo electron microscopy and crystallography. *IUCrJ.* 2022. V. 9. P. 728–734. doi: [10.1107/S2052252522008260](https://doi.org/10.1107/S2052252522008260)
12. Żyła D.S., Wiegand T., Bachmann P., Zdanowicz R., Giese C., Meier B.H., Waksman G., Hospenthal M.K., Glockshuber R. The assembly platform FimD is required to obtain the most stable quaternary structure of type 1 pili. *Nat. Commun.* 2024. V. 15. P. 3032. doi: [10.1038/s41467-024-47212-9](https://doi.org/10.1038/s41467-024-47212-9)
13. Kawahara K., Oki H., Iimori M., Muramoto R., Imai T., Gerle C., Shigematsu H., Matsuda S., Iida T., Nakamura S. High-resolution cryo-EM analysis visualizes hydrated type I and IV pilus structures from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Structure.* 2025. V. 33. No. 6. P. 1040–1050. doi: [10.1016/j.str.2025.03.010](https://doi.org/10.1016/j.str.2025.03.010)
14. Petrova T.E., Glukhov A.S., Stetsenko A., Guskov A., Gabdulkhakov A.G. Determination of the water network surrounding the type I pilus from *E. coli* by cryo-electron microscopy. *bioRxiv.* 2025. doi: [10.1101/2025.09.07.674696](https://doi.org/10.1101/2025.09.07.674696)
15. Penczek P.A. Chapter Three - Resolution Measures in Molecular Electron Microscopy. *Methods Enzymol.* 2010. V. 482. P. 73–100. doi: [10.1016/S0076-6879\(10\)82003-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)82003-8)
16. Urzhumtseva L., Klaholz B., Urzhumtsev A. On effective and optical resolutions of diffraction data sets. *Acta Cryst.* 2013. V. D69. P. 1921–1934. doi: [10.1107/S0907444913016673](https://doi.org/10.1107/S0907444913016673)
17. Saxton W.O., Baumeister W. The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein. *J. Microsc.* 1982. V. 127. P. 127–138. doi: [10.1111/j.1365-2818.1982.tb00405.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1982.tb00405.x)
18. Harauz G., van Heel M. Exact filters for general geometry three dimensional reconstruction. *Optik.* 1986. V. 73. P. 146–156.
19. Van Heel M. Similarity measures between images. *Ultramicroscopy.* 1978. V. 21. P. 95–100. doi: [10.1016/0304-3991\(87\)90010-6](https://doi.org/10.1016/0304-3991(87)90010-6)
20. Urzhumtsev A. Straightening FSC curves. *bioRxiv.* 2025. doi: [10.1101/2025.06.22.660909](https://doi.org/10.1101/2025.06.22.660909)
21. Lunin V.Y., Lunina N.L., Urzhumtsev A.G. Local heterogeneity analysis of crystallographic and cryo-EM maps using shell-approximation. *Current Research in Structural Biology.* 2023. V. 6. P. 100102. doi: [10.1016/j.crstbi.2023.100102](https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2023.100102)
22. Urzhumtsev A.G., Lunin V.Y. Gaussian-convolution-invariant shell approximation to spherically-symmetric functions. *arXiv:* 2412.14350. 2024. doi: [10.48550/arXiv.2412.14350](https://doi.org/10.48550/arXiv.2412.14350)
23. Adams P.D., Afonine P.V., Bunkóczi G., Chen V.B., Davis I.W., Echols N., Headd J.J., Hung L.W., Kapral G.J., Grosse-Kunstleve R.W., et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst.* 2010. V. D66. P. 213–221. doi: [10.1107/S0907444909052925](https://doi.org/10.1107/S0907444909052925)

24. Afonine P.V., Poon B.K., Read R.J., Sobolev O.V., Terwilliger T.C., Urzhumtsev A., Adams P.D. Real-space refinement in PHENIX for cryo-EM and crystallography. *Acta Cryst.* 2018. V. D74. P. 531–544. doi: [10.1107/S2059798318006551](https://doi.org/10.1107/S2059798318006551)
25. Terwilliger T.C., Sobolev O.V., Afonine P.V., Adams P.D. Automated map sharpening by maximization of detail and connectivity. *Acta Cryst.* 2018. V. D74. P. 545–559. doi: [10.1107/S2059798318004655](https://doi.org/10.1107/S2059798318004655)

Рукопись поступила в редакцию 18.08.2025, переработанный вариант поступил 03.09.2025.

Дата опубликования 13.10.2025.

===== MATHEMATICAL MODELING =====

Estimation of Local Heterogeneity of Cryo-EM Maps in Direct Space for Type I Pilus from *E. coli*

Lunin V.Y., Lunina N.L., Petrova T.E.

Institute of Mathematical Problems of Biology RAS, Keldysh Institute of Applied Mathematics of Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

Abstract. The accuracy of resolution estimation of an experimental cryo-EM scattering density map has a decisive effect on the accuracy of determining the uncertainty parameters of atomic positions (ADP parameters), when refined in direct space. The previously developed methodology for local resolution estimation of cryo-EM maps using direct space methods was applied to the study of maps for type I pilus from *E. coli*. A study of four maps obtained by three groups of researchers showed that, for each of the three standard maps, the resolution can be considered constant and is about 2.6–2.7 Å, while for the sharpened map, the resolution is higher and is equal to 2.3 Å.

Key words: structural biology, cryo-EM maps, real-space refinement, local resolution, shell functions