



Российская Академия Наук

О.С. Соколова

**Структурная биология:
из XX в XXI век**

Москва 2017

УДК 573.22
ББК 28.07
Г34

ISBN 978-5-906906-09-0

© Российская академия наук, 2017
© О.С. Соколова, 2017

Структурная биология: из XX в XXI век

О.С. Соколова

профессор РАН

биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

***Аннотация.** В статье в историческом ключе обсуждаются принципы современных методов структурной биологии: рентгеноструктурного анализа, спектроскопии ядерно-магнитного резонанса и просвечивающей электронной микроскопии, – использующихся для расчета атомных структур молекул и макромолекулярных комплексов. В последние десятилетия структурные методы претерпели бурное развитие, что выразилось в определении новых атомных структур различных белков и их комплексов.*

Вступление

Структурная биология является разделом молекулярной биологии, биохимии и биофизики и изучает структуры биологических макромолекул, в том числе белков и нуклеиновых кислот. Структура белка изучается на разных уровнях: первичная, вторичная, третичная, четвертичная. Протеомика изучает первичную структуру белка, последовательность аминокислот в полипептидной цепи. Мы можем считать, что в идеальном случае эта структура является одномерной. Однако в цитоплазме клетки при элонгации полипептидная цепь мгновенно приобретает многомерное представление: альфа-спирали или бета-листы, субдомены, домены располагаются в пространстве и удерживаются водородными, электростатическими, ван-дер-ваальсовыми связями.

В течение XX в. структурная биология преуспела в получении огромных количеств информации и теперь имеет очень реальный потенциал для впечатляющего прорыва, основанный на существующих структурных знаниях. Ключевой элемент этих знаний, ведущих к медицинскому и биотехнологическому применению – структурное понимание биологических механизмов при атомном разрешении. К 2017 г. уже расшифровано более 130 000 третичных и четвертичных структур белков, в их числе крупные молекулярные машины, рибосома [1], мембранные белки [2, 3], белки цитоскелета [4], ферменты и др. Вслед за геномикой, протеомикой, транскриптомикой и метаболомикой появилась отрасль науки «структурная протеомика».

Интересно отметить, что начиная с 1901 г. по 2016 г., 67 Нобелевских премий получили структурные биологи (28 премий по химии и 39 по физиологии и медицине). Рискну предположить, что в 2017 г. одну из премий дадут за впечатляющие исследования с применением криоэлектронной микроскопии (криоПЭМ).

Оптимисты считают реальной возможность получить более или менее полную реконструкцию всех процессов в живых организмах, расшифровать архитектуру белков и их функций к середине XXI в. Это означает не только понимание структуры индивидуальных макромолекул и их взаимодействий с лигандами, но также межмакромолекулярных взаимодействий в сложных многомолекулярных образованиях. Изменение конформационного состояния белка отражается на его функциональной активности [5]. Знание структуры макромолекулярных комплексов дает возможность интерпретировать конформационные изменения в молекулярных машинах при активации и ингибировании.

Рассмотрим подробнее методы, использующиеся для получения структурной информации. Рентгеноструктурный анализ не является единственным структурным методом, но он был первым, открытым в XX в. и, как ожидается, будет оставаться одним из центральных игроков и в XXI в. В XX в. также были разработаны такие структурные методы, как криоПЭМ (80-е годы), ядерно-магнитный резонанс (ЯМР) (90-е годы), в начале XXI в. построены лазеры на свободных электронах (XFEL). С появлением в 90-х годах XX в. мощных компьютеров появилась возможность моделировать структуры и функциональные изменения полноразмерных белковых молекул. Все эти подходы имеют ограничения (табл. 1), поэтому для успешного решения одной структуры часто необходимо применение нескольких методов.

Табл. 1. Сравнение современных методов в структурной биологии

Метод	Образцы	Достоинства	Ограничения
Рентгеноструктурный анализ	Белковые молекулы, комплексы белка с нуклеиновыми кислотами	Высокое разрешение. Возможность применения роботов для кристаллизации	Требуется большая концентрация белка (5–15 мг/мл); мембранные белки и гибкие петли плохо кристаллизуются. Конформация молекул может быть нарушена из-за межмолекулярных взаимодействий при формировании кристалла

Окончание таблицы

Ядерно-магнитный резонанс		Маленькие белковые молекулы	Высокое разрешение. Конформация молекулы в растворе; динамика молекул	Молекулярная масса < 150 кДа. Требуется большая концентрация белка. Изотопное мечение
ПЭМ белковых молекул	Двумерные кристаллы	Мембранные белки	Мембранные белки. Применение роботов для кристаллизации. Высокое разрешение проекционной структуры	Требуется выращивание кристаллов. Поворот гониометра микроскопа на заданные углы. Медленно и очень сложно. Разрешение падает при переходе к трехмерной модели
	Симметричные молекулы	Вирусы, бактериофаги, спиральные молекулы (актин, тубулин). Молекулы с радиальной симметрией (ионные каналы, некоторые ферменты, шаперонины)	Нативная структура белка в растворе. Возможность изучать большие белки и комплексы. Высокое разрешение	Необходимость разделять конформации для получения высокого разрешения
	Ассимметричные молекулы	Большие белковые комплексы, комплексы белка с НК		Частицы должны располагаться в максимально отличающихся ориентациях. Необходимость разделять конформации для получения высокого разрешения
	Электронная томография	Целые клетки, большие белковые комплексы, органеллы	Взаимодействия в комплексах, строение отдельных молекул	Низкое разрешение; сильное радиационное поражение образца
Рентгеновские лазеры на свободных электронах		Вирусы. Нанокристаллы белка	Возможность изучения динамических процессов. нанокристаллы	Полное радиационное поражение образца

Рентгеноструктурный анализ (РСА): XX век

Рентгеновские лучи – это электромагнитные волны, которые занимают область спектра между гамма-излучением и коротким ультрафиолетом. В 1901 г. первой Нобелевской премии по физике удостоился Вильгельм Конрад Рентген за открытие «замечательных лучей, впоследствии названных в его честь». В структурных

исследованиях используются лучи с длинами волн от 0,5 до 2 Å. Когда на образец попадает рентгеновский луч, под действием электромагнитной волны этого луча все атомы исследуемого вещества становятся источниками вторичных рассеянных волн. Эти волны могут интерферировать, так как рассеяние таких рентгеновских лучей на атомах происходит главным образом без изменения длины волны. В то же время межатомные расстояния по своей величине сравнимы с длиной волны используемого излучения. Интерференционная картина определяется особенностями взаимного расположения атомов в исследуемом веществе.

В 1914 г. Нобелевская премия по физике была присуждена Макс фон Лауе за открытие дифракции на кристаллах. До открытия, что белковые молекулы тоже можно кристаллизовать, оставалось еще около 20 лет (табл. 2). В 1930-х годах Дороти Ходжкин и Макс Перутц провели самые ранние кристаллографические исследования белков в Кавендишской лаборатории в Кембридже; однако тонкости трехмерной структуры белков были слишком сложны для анализа с помощью рентгеновской кристаллографии того времени, а процесс вычисления структур с применением электрических калькуляторов слишком медленным. Только в конце 1940-х годов появились новые инструменты, которые можно было использовать для решения структуры белковой молекулы.

Табл. 2. Открытия, приведшие к развитию РСА белков

Год	Автор	Открытие
1895	В.К. Рентген	Рентгеновские лучи
1912	М. фон Лауэ	Дифракция рентгеновских лучей на кристаллах
1913	У.Г. Брэгг	Рентгеновский спектрометр. Изучил структуру кристаллов NaCl.
1949	Д.С. Ходжкин	Структура пенициллина
1957	Д.С. Ходжкин	Структура витамина B12
1958	Д. Кендри	Структура миоглобина (первый глобулярный белок)
1960	М. Перутц	Структура гемоглобина
1985	Й. Дейзенхофер, Р. Хубер, Х. Мичел	Структура фотореакционного центра (первый мембранный белок)
1998	Р. МакКиннон	Структура прокариотического ионного канала
2011	М. Юсупов	Структура эукариотической рибосомы

Одним из них был метод изоморфной замены, разработанный М. Перутцем, при котором некоторые легкие атомы в молекуле белка заменяют тяжелыми атомами. Когда эти модифицированные молекулы подвергаются рентгеновскому анализу, тяжелые атомы обеспечивают систему отсчета для сравнения дифракционных картин. Вторым инструментом была электронная вычислительная машина. Первый компьютер, ENIAC, начал функционировать в Филадельфии в 1945 г.; он мог выполнить расчет в десятки тысяч раз быстрее, чем человек с калькулятором. В 1951 г. Кембриджский университет был одним из нескольких мест в мире, обладающих высокоскоростным (на то время) программируемым компьютером EDSAC, и Д. Кендри первым применил компьютер к решению проблемы в структурной биологии. Он в полной мере воспользовался вычислительными мощностями для выполнения сложных математических расчетов, необходимых для решения структуры миоглобина.

В 1958 г. Джон Кендри опубликовал структуру глобулярного белка миоглобина [6], а Макс Перутц – структуру более сложного белка гемоглобина [7], за что ученые получили Нобелевскую премию в 1962 г. по химии за исследование структур глобулярных белков. Первая структура мембранного белка – фотореакционного центра – была опубликована на 27 лет позже [8], что свидетельствует о большей сложности кристаллизации мембранных белков.

Кристаллизация белка

В общем случае для кристаллизации белка необходимо пересыщение раствора, означающее, что концентрация белка в капле временно выше, чем позволяет его растворимость [9]. Для зарождения ядер кристаллизации необходима высокая степень пересыщения, в то время как последующий рост кристаллов происходит при небольшой степени пересыщения. Пересыщение может быть достигнуто уменьшением растворимости белка под влиянием различных физико-химических параметров: значения рН, ионной силы или диэлектрической проницаемости среды. Такое изменение, в свою очередь, достигается постепенным изменением состава буфера и/или концентрации солей (например, сульфата аммония или хлорида натрия), высокомолекулярных органических соединений (например, полиэтиленгликоля) или небольших молекул (например, этанола или других спиртов) [9].

Конкретный состав раствора в каждом случае определяется эмпирически. Накопленный таким путем опыт кристаллизации воплотился в создании ряд коммерчески доступных кристаллизационных панелей, предназначенных для предварительного подбора параметров раствора.

Основным методом создания пересыщенного раствора является метод диффузии паров [9]. Для этого в герметичном сосуде небольшой объем белкового раствора, имеющего низкую концентрацию осадителя (например, соли), приводят в равновесие через газовую фазу с большим объемом противораствора, имеющего высокую концентрацию осадителя. Испарение растворителя из капли белкового раствора приводит не только к уменьшению растворимости белка вследствие повышения концентрации соли в капле, но и к повышению концентрации самого белка, что ускоряет наступление пересыщения. При этом капля с белковым раствором может висеть на крышке сосуда (метод «висящей капли») либо находиться в углублении над противораствором (метод «лежащей капли») (рис. 1). Кристаллизация мембранных белков [10] представляет собой более сложную процедуру, поскольку работа с мембранным доменом вводит дополнительные параметры в задачу подбора условий и, как правило, требует использования детергентов и/или липидной фазы [11].

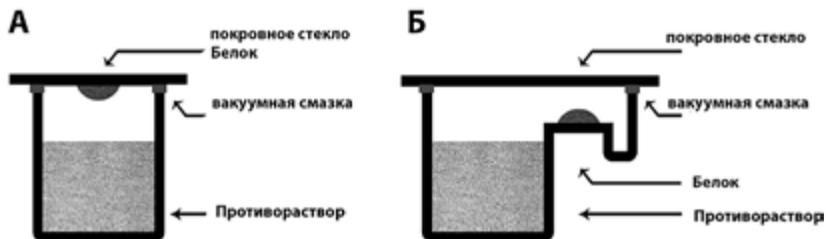


Рис. 1. Два варианта взаиморасположения капли с раствором белка и противораствора при кристаллизации методом диффузии паров: *A* – метод «висящей капли»; *B* – метод «лежащей капли».

Микроренталлография на синхротронном излучении

Синхротрон – это электровакуумная установка с кольцевой камерой, в которой частицы ускоряются до околосветовых скоро-

стей. Синхротрон основан на резонансном принципе ускорения частиц. Изменение направления движения элементарных частиц происходит за счет системы магнитов. Во избежание быстрого поглощения ускоренных частиц в камере постоянно поддерживается вакуум порядка 10–9 мм рт. ст. Вакуумную камеру синхротрона строят в виде многоугольника с поворачивающимися магнитами в углах.

Преимуществами использования синхротронного излучения в рентгеноструктурном анализе является спектральная характеристика излучения, позволяющая применять широкий набор методов, основанных на монохроматическом излучении, метод Лауэ и методы, основанные на аномальном рассеянии рентгеновского излучения на атомах серы серосодержащих аминокислотных остатков (цистеин, метионин) [12] или селена, замещающего серу в метионинах.

Большая часть имеющихся кристаллических структур белков получена с использованием следующих источников рентгеновского излучения: Европейской установки синхротронного излучения (ESRF), Национального источника синхротронного излучения (NSLS) в Брукхейвенской национальной лаборатории и источника синхротронного излучения высоких энергий в Корнелльском университете (CHESS).

Европейская установка синхротронного излучения (ESRF) является международным проектом и располагается в Гренобле (Франция). Установка представляет собой электронный синхротрон на 6 ГэВ с многочисленными каналами вывода излучения из поворотных магнитов и дополнительных вставок (вигглеры, ондуляторы) общим числом около 40 и является самым высокоэнергетичным в Европе синхротроном среди источников синхротронного излучения. Периметр синхротрона составляет около 850 м (рис. 2).

Национальный источник синхротронного излучения (NSLS) в Брукхейвенской национальной лаборатории относится к ведению Министерства энергетики США и располагается в г. Аптон, штат Нью-Йорк, США. Установка представляет собой электронный синхротрон на энергию около 2,5 ГэВ с многочисленными каналами вывода излучения общим числом более 60. Ежегодно установкой пользуется более 2 тысяч ученых из 30 стран мира. Источник синхротронного излучения высоких энергий в Корнелльском университете (CHESS) работает в интересах Национального института здоровья США (NIH) и располагается в г. Итака,

штат Нью-Йорк, США. Установка представляет собой электронный синхротрон на энергию около 5,5 ГэВ с несколькими каналами вывода излучения.

До появления синхротронных источников излучения третьего поколения большая часть дифракционных данных была получена при комнатной температуре. Однако довольно быстро стало понятно, что рентгеновское излучение приводит к радиационным повреждениям структуры [13]. Преимущества охлаждения белковых кристаллов в процессе накопления данных были впервые отмечены в середине 70-х годов [14]. Было показано, что охлаждение до низких температур значительно уменьшает скорость диффузии свободных радикалов, ответственных за вторичное повреждение, и, таким образом, уменьшает восприимчивость кристалла к радиации, что позволяет получить лучшее разрешение. Широкое внедрение криокристаллографии позволило эффективнее использовать синхротронные источники третьего поколения, генерирующие рентгеновские пучки высокой мощности.

Одновременно такие источники подстегнули развитие микрокристаллографии [15]. Высокая стабильность пучка, гониометры,

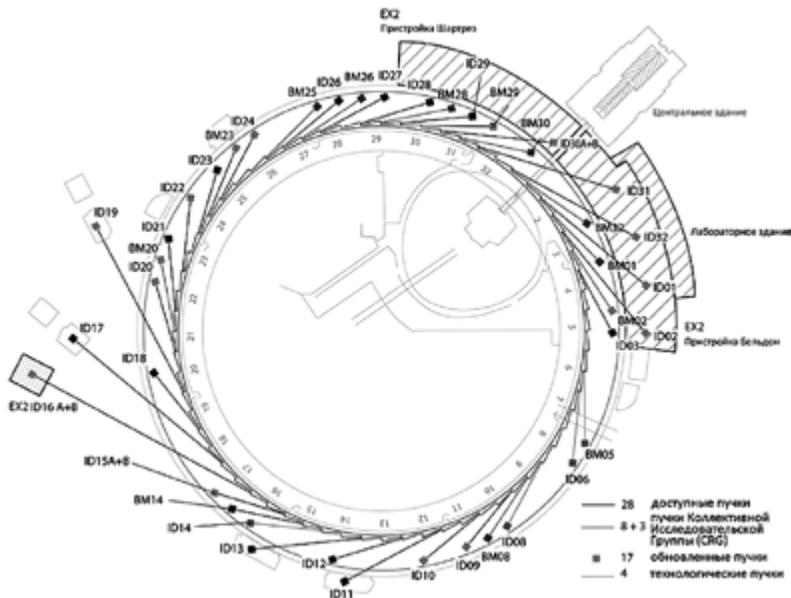


Рис. 2. Схема Европейской установки синхротронного излучения

детекторы и рентгеновская оптика позволили проводить исследования белков и комплексов, которые образуют лишь очень малые кристаллы. В настоящее время на большинстве синхротронных источников достижимый размер пучка варьируется от 1 до 20 мкм, что соответствует размеру кристаллов и позволяет резко улучшить соотношение сигнал–шум, особенно для рефлексов высокого разрешения [16].

Несмотря на многочисленные успехи микрофокусной кристаллографии, радиационное повреждение остается фундаментальным ограничением для накопления данных высокого разрешения в хорошо упорядоченных, но маленьких кристаллах. Недавнее появление рентгеновских лазеров на свободных электронах дает возможность преодолеть этот барьер и придать новый импульс структурным исследованиям тех белков, которые плохо поддаются кристаллизации (мембранные белки, вирусы) или образуют нанокристаллы, размер которых недостаточен для получения качественной дифракционной картины.

XXI век: рентгеновские лазеры на свободных электронах и фемтосекундная кристаллография

Рентгеновские лазеры на свободных электронах генерируют чрезвычайно яркие и чрезвычайно короткие импульсы когерентного рентгеновского излучения регулируемой мощности [17]. Пиковая яркость пучка такого лазера фемтосекундной длительностью превосходит яркость наиболее мощных синхротронных источников в миллиарды раз. Столь уникальные свойства рентгеновского пучка открывают новые возможности в различных областях науки [18].

В структурной биологии рентгеновские лазеры позволяют проводить накопление данных с гораздо меньших кристаллов, чем это было возможно прежде, а возможно, и с одиночных молекул. И хотя энергия импульса такого лазера столь высока, что может испарить любой материал, с которым будет взаимодействовать, длительность этого импульса столь мала, что рассеянные фотоны успеют покинуть образец до начала его разрушения, вызванного фотоионизацией [19]. Таким образом, дифракционные данные могут быть получены с неповрежденных молекул без использования низких температур (рис. 3).

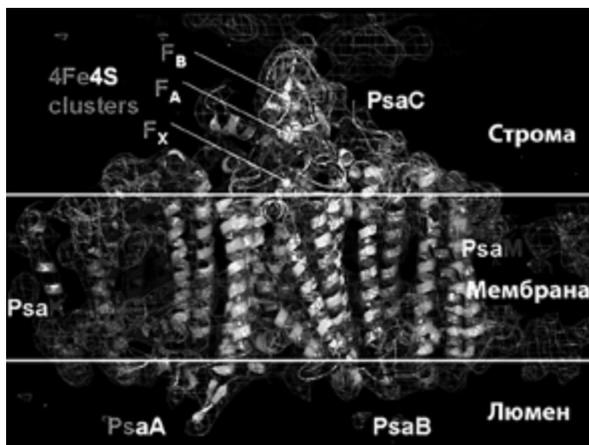


Рис. 3.
Структура фотосистемы I по данным фемтосекундной кристаллографии (из работы [51], с изменениями). Показаны трансмембранные спирали больших субъединиц PsaA, PsaB, PsaK и PsaF

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) – метод изучения магнитных свойств определенных атомных ядер, который основывается на явлении ядерного магнитного резонанса. Внутримолекулярное магнитное поле возле атома изменяет его резонансную частоту, измерение которой, таким образом, позволяет получить данные об электронном строении молекулы. Открытие этого метода также ознаменовалось присуждением Нобелевских премий по химии: в 1991 г. Ричарду Р. Эрнсту за открытие метода ЯМР и в 2002 г. Курту Вюртлиху за структурно-биологические исследования с помощью ЯМР.

Фундаментальным ограничением структурных исследований, выполняемых с помощью спектроскопии ЯМР, является необходимость иметь миллиграммы изотопно-меченого белка; критическим параметром также является молекулярная масса (см. табл. 1). Верхняя граница длины белка, для которого структура может быть определена, – 300–400 остатков (в зависимости от растворителя). Эта верхняя граница определяется двумя обстоятельствами: постепенным уширением сигналов ЯМР вследствие увеличения размера солюбилизованного в детергенте белка и негативным влиянием экстенсивного изотопного мечения, необходимого для получения достаточного количества структурной

информации. С другой стороны, использование селективного мечення может помочь в исследовании динамики белков и их взаимодействий.

Современный ЯМР-спектрометр состоит из сверхпроводящего магнита, внутрь которого помещают образец, импульсной катушки (возбуждающей магнитные ядра для прецессии в заданной последовательности), датчика, регистрирующего магнитные «отклики» атомов, усилителя, компьютеров и обслуживающего оборудования (рис. 4). Характерным значением магнитного поля является 20 тесла, что соответствует резонансной частоте протона около 900 МГц.

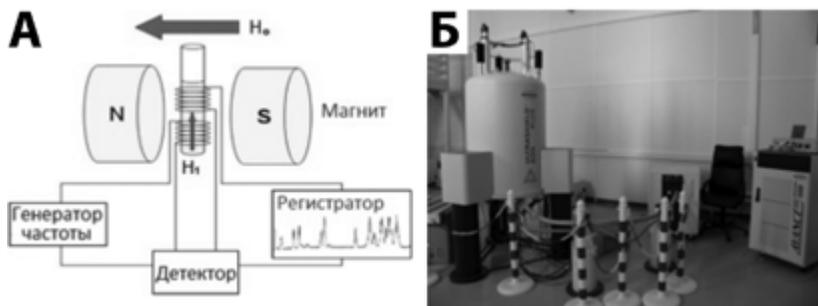


Рис. 4. А – Схема ЯМР-спектрометра А. Постоянный магнит, создающий поле H_0 . Генератор, создающий зондирующее поле H_1 . Датчик, регистрирующий возникновение ЯМР в образце под действием H_0 и H_1 . Усилитель сигнала. Система регистрации сигнала и обработки информации. Система термостатирования образца; Б – ЯМР-спектрометр Bruker AVANCE III 600 Б.

Ряд широко используемых методов в ЯМР-спектроскопии относится к так называемой 2D ЯМР-спектроскопии. Такими методами являются корреляционная спектроскопия (COSY, HSQC, HMQC), J-спектроскопия, обменная спектроскопия (EXSY), а также спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY).

Гомоядерная корреляционная спектроскопия (COSY) используется для идентификации ядер, соединенных друг с другом. Двухмерный спектр, получаемый в эксперименте COSY, показывает частоты единичного изотопа, чаще всего водорода (^1H) по обеим осям. Спектры COSY показывают два вида пиков: диагональные (имеют одинаковую частотную координату на каждой оси и выстраиваются по диагонали спектра) и кросс-пики (имеют разное значение для каждой частотной координаты и на-

ходятся вне диагональной линии). Диагональные пики соответствуют пикам в экспериментах одномерной ЯМР, в то время как кросс-пики показывают связывание между парой атомных ядер. Кросс-пики возникают в результате переноса намагниченности, и их присутствие обозначает, что два атомных ядра связаны и имеют два разных значения химического сдвига, которые и дают координаты кросс-пика. Каждое связывание дает два симметричных кросс-пика над и под диагональю. Таким образом, кросс-пик возникает, когда существует корреляция между сигналами спектра для каждой из двух осей в данных значениях. Поэтому можно определить, какие атомы соединены друг с другом (в диапазоне небольшого количества химических связей), сравнив кросс-пики между разными сигналами.

Гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия (HMBC, Heteronuclear Multiple-Bond Correlation) позволяет оценить дальние взаимодействия между углеродными атомами и протонами (как правило, через 2 или 3 связи); взаимодействия через 1 связь в ходе такого эксперимента подавляются. Гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия (HSQC, Heteronuclear Single Quantum Correlation) позволяет оценить магнитные взаимодействия между углеродными атомами и непосредственно связанными с ними протонами, т.е. для связей C–H. Ядерный эффект Оверхаузера (ЯЭО) состоит в изменении интенсивности сигнала ЯМР при взаимодействии спинов разных ядер, например X и Y. Увеличение интенсивности сигнала ядер X при резонансном облучении ядер Y тем сильнее, чем больше вклад магнитного диполь-дипольного взаимодействия ядер X и Y в релаксацию ядер X. Это позволяет выявить ядра, находящиеся в непосредственной близости друг от друга, но, в отличие от корреляционных методов, не связанные химическими связями. Спектроскопия ЯЭО (NOESY) позволяет определить расстояния между всеми такими ядрами и на основе этих пространственных ограничений воссоздать структуру белка.

В целом сейчас имеется большое количество методик проведения ЯМР-эксперимента, которые в совокупности позволяют получить информацию о структуре, динамике, реакционном состоянии и химическом окружении молекул. Расчет структуры, основанный на информации о величине химических сдвигов, оказался очень успешен для глобулярных белков [20–22], но его применимость для мембранных белков до сих пор не показана.

За последние годы комплексное изучение больших белков стало более доступным благодаря развитию методов как ЯМР-спектроскопии в растворах, так и твердотельной ЯМР-спектроскопии. Все чаще с помощью ЯМР-спектроскопии в растворах проводится определение структур мембранных белков, что свидетельствует о зрелости метода и возможности практически рутинного выполнения таких исследований [23]. Хотя спектры ЯМР симметричных олигомеров имеют преимущество в виде вырожденности пиков, большой размер этих олигомеров делает их очень сложной системой для изучения из-за большой ширины сигналов. Вероятнее всего, для расчета подобных структур потребуется улучшение нынешних алгоритмов, которые могли бы оперировать с большими наборами данных о величине химических сдвигов основной цепи, а также повышение мощности суперкомпьютеров.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) макромолекул

Идея создания микроскопа, в котором вместо света использовался бы пучок электронов, возникла в 20-е годы прошлого века вместе с открытием волновых свойств электрона и развитием теории корпускулярно-волнового дуализма. К середине 20-х годов XX в. было хорошо известно, что электромагнитное излучение (например, свет) обладает корпускулярными свойствами, т.е. ведет себя как поток частиц. В 1924 г. французский физик, нобелевский лауреат 1929 г. Луи де Бройль высказал гипотезу, что частицы обладают волновыми свойствами [24]. Де Бройль вычислил, что чем больше энергия электрона, тем короче должна быть длина его волны. Например, электрон с энергией 100 КэВ будет иметь длину волны около $0,1 \text{ \AA}$, что равно одной десятой диаметра атома.

Поскольку длина волны электрона в 10 раз меньше, чем диаметр отдельного атома, экспериментаторы стали подумывать о постройке микроскопа, в котором вместо света использовались бы электроны. Первым физиком, которому это удалось, был немец Эрнст Руска. В конце 20-х годов Э. Руска открыл, что магнитная катушка может действовать как линза для электронов. Кроме того, ему удалось построить магнитные линзы с таким коротким фокусным расстоянием, что их можно было использовать для получения изображения объекта, облучаемого электронами. Самый первый

электронный микроскоп, разработанный Э. Руской и М. Кноллем в 1931 г. (рис. 5), состоял из двух последовательно расположенных магнитных линз. При 15-кратном увеличении этот прибор был значительно менее мощным, чем современные оптические микроскопы, но именно он позволил установить основной принцип электронной микроскопии.

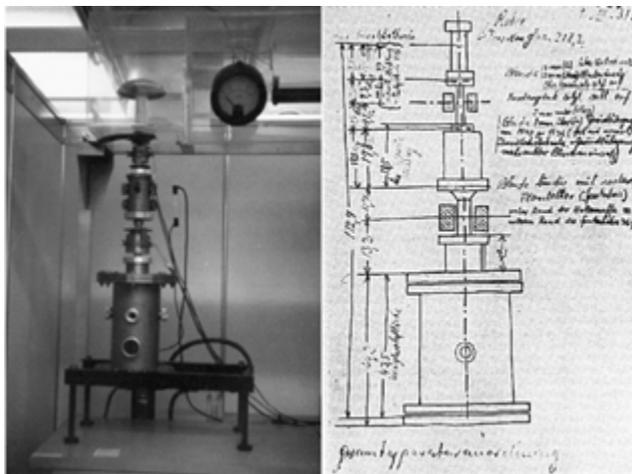


Рис. 5. Первый электронный микроскоп, сконструированный Э. Руской и М. Кноллем в 1931 г. (слева), и схема его устройства (справа)

В 1986 г. Э. Руска за изобретение электронного микроскопа получил Нобелевскую премию. Но уже к середине 50-х годов трансмиссионные электронные микроскопы активно использовались в материаловедении, а в 60-е годы начали применяться для исследования структуры белков (табл. 3) в Европе, Америке и СССР [25]. Вначале ученые изучали лишь проекционные структуры молекул крупных белков, окрашенных негативно солями тяжелых металлов (рибосомальные субъединицы, актиновые фибриллы, вирусы, бактериофаги). Эти изображения идентифицировали, измеряли и интерпретировали непосредственно на микрофотографии.

После того как исследователи догадались, что наблюдаемые проекции представляют собой суммарную плотность трехмерного объекта, перпендикулярно направлению потока электронов, стало возможным реконструировать трехмерные объекты по набору проекций с различными координатами. В 1968 г. при

обработке изображений отдельных частиц была получена первая трехмерная реконструкция биологического объекта – хвоста бактериофага T4 [26]. В 1974 г. была опубликована структура вируса табачной мозаики [27]. Как мы можем видеть на рис. 6, первые трехмерные реконструкции представляли собой вырезанные из пенопласта или оргстекла стопки, каждый слой которых соответствовал одной проекции. Эти реконструкции фотографировались, и фотографии публиковались в научных журналах.

Табл. 3. Открытия, приведшие к прогрессу ПЭМ макромолекул

Год	Автор	Открытие
1872	Э. Аббе	Дифракционная теория формирования изображений несамосветящихся объектов в микроскопе
1924	Л. де Бройль	Волновые свойства частиц
1930	Э. Руска, М. Кнолль	Создание электронного микроскопа
1968	Д. ДеРозиер, А. Клуг	Структура хвоста бактериофага T4
1988	Ж. Дубочет	КриоПЭМ
1990	Р. Хендерсон	Двумерная кристаллизация мембранных белков
1987	Й. Франк	Структура большой рибосомальной субъединицы E.coli с разрешением 26 Å
2013	И. Ченг	Первая структура ионного канала с разрешением 3,4 Å
2016	Й. Франк	Структура рибосомы с разрешением 2.5 Å
2014	В. Кюльбрандт	Структура γ -синтетазы с разрешением 2.2 Å
2016	С. Субраманиам	Структура глутамат-дегидрогеназы с разрешением 1,8 Å

Некоторые мембранные белки (например, родопсин, ацетилхолин) обладают свойством образовывать кристаллические структуры в мембранах *in vivo*. Эти мембраны выделяли и изучали в электронном микроскопе. Таким образом, были установлены структуры ацетилхолина из электрического органа ската Торпедо *Mormonota* [28] и родопсина из пурпурной мембраны [29].

Мембранные белки, не образующие кристаллов *in vivo*, научились подвергать двумерной кристаллизации *in vitro*. Единственной до сего времени Нобелевская премия в области структурной электронной микроскопии была присуждена в 1982 г. Аарону Клогу за разработку метода электронной кристаллографии. Однако сразу же встал вопрос об отрицательном воздействии контрастера на порядок кристаллической структуры и разрешение

реконструкции. Электронные микроскопы того времени были технически способны достичь разрешения, достаточного для наблюдения полипептидных цепей, но из-за трудностей с пробоподготовкой их не удавалось различить [30]. Поэтому в 80-е

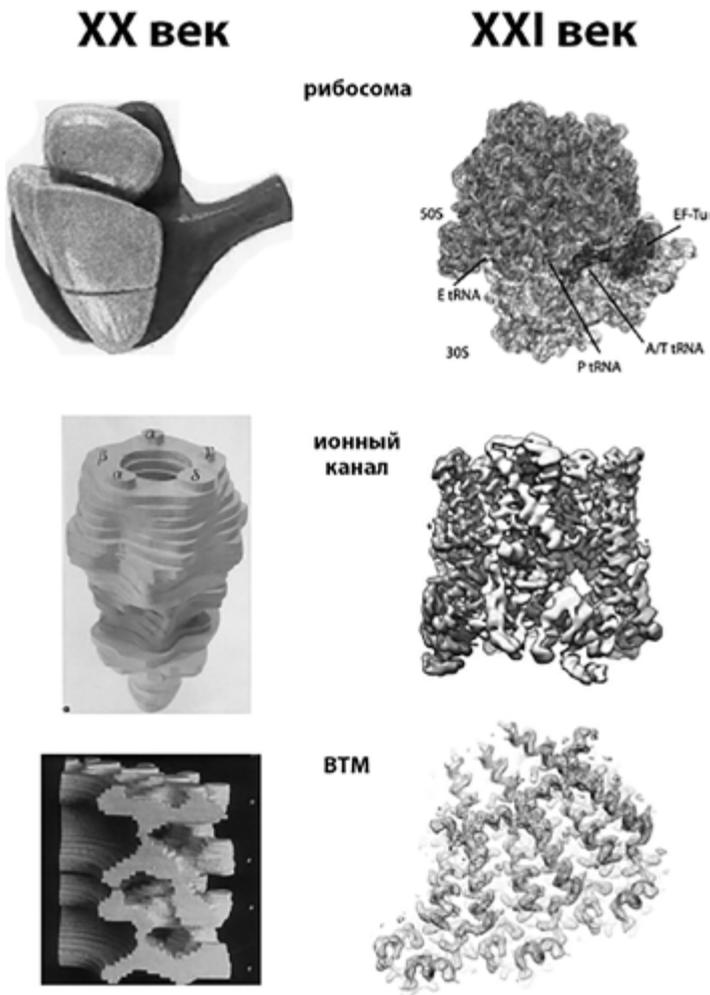


Рис. 6. Трехмерные структуры макромолекул, рассчитанные по данным ПЭМ. Слева – реконструкции 70-х годов XX в.; справа – реконструкции 10-х годов XXI в., полученные на криоэлектронных микроскопах, оснащенных FEG-катодом и ПДЭ-детектором

годы была впервые применена криоэлектронная микроскопия (см. табл. 3), позволяющая изучать объекты без окрашивания, путем помещения их в моментально замороженный тонкий (0,1–0,5 нм) слой воды или буфера [31]. Этот метод позволил определять внутреннюю структуру молекул и защитил молекулы от радиационного повреждения. В качестве альтернативной среды для заключения двумерных кристаллов был предложен раствор глюкозы [32], на которую замещалась вода, окружающая образец; при этом химически связанная с молекулой вода оставалась. Одним из преимуществ этого метода была возможность получать атомное разрешение при наблюдении образца при комнатной температуре. Таким образом, была получена первая атомная структура родопсина, определенная исключительно с помощью ПЭМ [29] (см. табл. 3).

Изучение белковых молекул в ПЭМ

Электроны взаимодействуют с веществом, поэтому внутри колонны микроскопа поддерживают высокий вакуум, чтобы избежать нежелательного рассеяния электронов на молекулах газа. Следовательно, образцы для ПЭМ должны быть в твердом состоянии, т.е. необходима их специальная подготовка путем либо обезвоживания, либо стабилизации гидратированных биологических образцов в условиях вакуума [33].

Простейший способ для изучения раствора или суспензии изолированных макромолекул – негативное контрастирование, при котором к образцу, нанесенному на сетку, добавляется водный раствор соли тяжелого металла, избыток жидкости промакивается, а образец высушивается на воздухе [33]. Уранилацетат – наиболее широко используемый контрастер, дающий высокий контраст, хотя некоторые белковые структуры лучше сохраняются при использовании солей вольфрама или молибдена [34]. Контрастер формирует электронно-плотную оболочку на поверхности изучаемого объекта, что дает информацию о размере, форме и симметрии частиц белка, а также дает представление об однородности образца. Метод называется негативным контрастированием, потому что молекулы на фоне подложки видны как светлые, не связавшие краситель области. Этот метод является быстрым и простым, однако не лишен некоторых недостатков. Некоторые молекулы хорошо сохраняются при негативном окрашивании

(вирусы, бактериофаги), но макромолекулярные комплексы могут сплюснуться или распасться под воздействием контрастера, часть структуры может быть искажена или отсутствовать на изображениях. Поэтому предпочтительнее использовать для определения структуры криометоды. Исключением до недавнего времени были небольшие молекулы (менее ~100–150 кДа).

КриопЭМ позволяет стабилизировать образцы в нативном, гидратированном состоянии при высоком вакууме. Быстрая заморозка используется для приведения образца в твердое состояние без обезвоживания и/или образования кристаллов льда, образец поддерживают при низкой температуре во все время переноса в колонну и в процессе наблюдения в электронном микроскопе.

Приготовление образца для криопЭМ состоит из трех этапов: 1) водную суспензию белка наносят на специальную сетку с отверстиями в подложке (1–2 мкм в диаметре); 2) все излишки жидкости на подложке удаляют фильтровальной бумагой; 3) оставшуюся в отверстиях тонкую водную пленку с молекулами мгновенно погружают в жидкий этан или пропан (-182 °С), охлажденный жидким азотом для быстрого оттока тепла от образца. Охлаждение путем погружения в жидкий этан происходит гораздо быстрее, чем при погружении непосредственно в жидкий азот, так как этан, охлажденный жидким азотом, находится ближе к точке замерзания, а не кипения, так что он не испаряется и не производит изолирующего слоя газа. Низкая температура значительно замедляет эффекты повреждения образца электронным пучком [35].

Взаимодействие электронного пучка с образцом

Формирование изображений с помощью электронов обеспечивает получение высокого разрешения из-за их короткой длины волны. Характер взаимодействия электронов с образцом зависит от энергии электронов и состава образца. Некоторые электроны проходят через образец без каких-либо взаимодействий, другие отклоняются электростатическим полем ядра, экранированным внешними орбитальными электронами атомов образца, а некоторые электроны могут отклоняться под большим углом или даже претерпевать обратное рассеяние. Из взаимодействующих электронов некоторые рассеиваются без потери энергии (упругое рассеяние), а другие передают часть своей энергии образцу (неупругое рассеяние) (рис. 7).

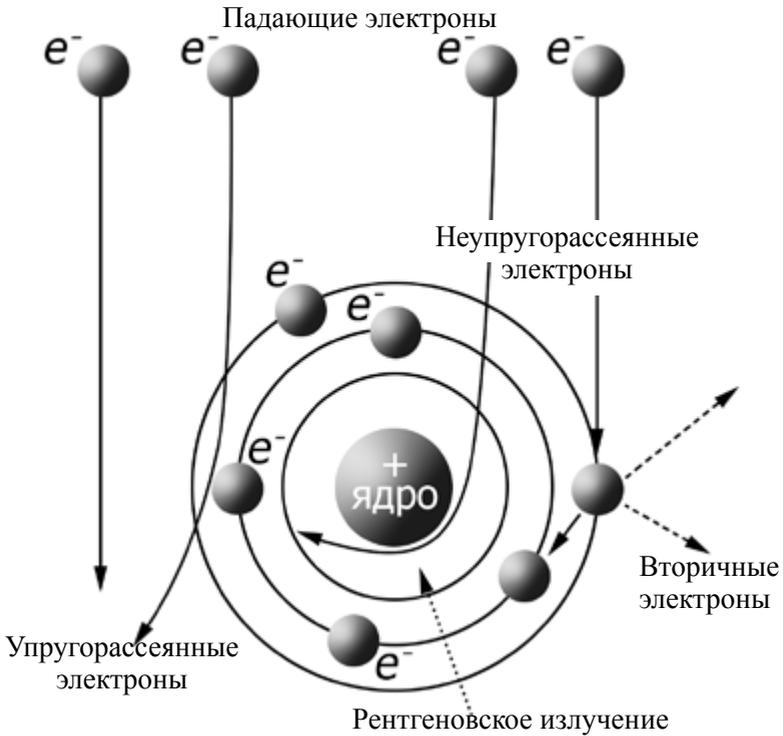


Рис. 7. Взаимодействие пучка электронов с образцом в электронном микроскопе (из [35])

Переданная энергия может ионизировать атомы в образце, вызывать рентгеновское излучение, перегруппировки химических связей и образование свободных радикалов. Все это изменяет структуру образца. Более 40 лет назад при наблюдении замороженных кристаллов каталазы было впервые замечено, что радиационное повреждение приводит к образованию в белковом образце газовых пузырей. Это происходит из-за появления в замороженном образце газообразного водорода [36].

Повреждение образцов является существенным препятствием для получения изображений с высоким разрешением. Типичные значения электронной экспозиции, используемые для биологических образцов, – от 1 до 20 $e/\text{Å}^2$ [37]. Хотя биологические

образцы могут выдерживать воздействие $100\text{--}500 \text{ e}/\text{\AA}^2$, требующие высокого разрешения детали образца терпят изменения уже при экспозициях от $10 \text{ e}/\text{\AA}^2$ [38]. Таким образом, радиационное повреждение определяет условия эксперимента и ограничивает разрешение структур. Для снижения радиационного повреждения во время выбора зоны съемки, выравнивания и фокусировки пучка электронов применяются специальные системы «низкой дозы», чтобы блокировать луч до последнего шага – получения изображения [36, 39]. Однако малые выдержки приводят к потере разрешения, шумным изображениям и как следствие недостатку данных с высоким разрешением. Это, в свою очередь, усложняет последующий процесс обработки изображений для определения трехмерной структуры объекта. Для таких коротких выдержек становится критически важной способность детектора воспринимать каждый попавший на него электрон. Такие устройства были сконструированы в XXI в., они позволяют напрямую детектировать электроны (ПДЭ) и получить за секундную выдержку от 16 до 400 кадров. Благодаря специальной процедуре обработки изображения одной и той же белковой частицы со всех полученных кадров можно выровнять относительно друг друга и сложить для усиления отношения сигнал-шум. Таким образом, компенсируется движение частиц во льду, происходящее за время секундной выдержки [40]. Так можно корректировать и эффекты радиационного повреждения. Для этого из всего набора для дальнейших расчетов берут несколько первых изображений, суммарное время экспозиции которых мало.

Интерпретация структур

В ПЭМ сигнал и шум распределены по всему спектру, и не существует простого способа оценить разрешение. Наиболее широко используемый метод определения разрешения реконструкций из отдельных частиц – объемная корреляция Фурье [41, 42]. Набор данных разбивают на два эквивалентных поднабора. Для двух поднаборов рассчитывают отдельные реконструкции. Их трехмерные Фурье-трансформанты сравнивают по кросс-корреляции. Средние корреляции для каждого радиуса строятся в виде графика, который изменяется от 1 при низком разрешении до 0 при высоком разрешении. Пространственную частоту на уровне корреляции 0,5 обычно принимают за оценку разрешения, но

есть и другие критерии, например, критерий 0,143, который был предложен на основе расчета отношения сигнал-шум [43].

Одним из преимуществ метода ПЭМ является возможность построения реконструкций молекул в разных конформациях. Для компьютерного разделения таких структур были разработаны три основных категории [33]: в первой – распознавание неоднородностей и начальная сортировка делается только в ходе двумерного анализа. Это «априорная» группа методов, основанная в первую очередь на многомерном статистическом анализе деталей в двумерных изображениях для выявления структурных вариаций. Изображения сортируются в соответствии с их основными изменениями, которые отражены в собственных векторах низкого порядка. Было показано, что такая техника позволяет разделить вариации в размере до 5% от общего размера [44]. Для второй категории методов сортировки необходима начальная трехмерная карта для разделения изображений на подмножества, содержащих изображения молекулярного комплекса в аналогичной ориентации. Затем делается анализ гетерогенности в двумерном пространстве для каждого подмножества. Это сводит к минимуму ориентационные различия внутри классов и способствует более точному распознаванию конформационных изменений [45]. Третья категория основана на апостериорном анализе трехмерных реконструкций. Создается множество трехмерных карт для анализа отклонений. Самые представленные из них затем используются в качестве исходных моделей для уточнения. В так называемой *bootstrap* технике трехмерные карты рассчитывают из случайно выбранных подмножеств изображений; пространственная ориентация изображений определяется методом сопоставления проекций с начальной картой. Оценка различий в полученных картах и локализация высококовариативных регионов позволяет оценить ковариантность в популяции и классифицировать трехмерные карты. Третья категория заключается в классификации карт на основе максимального правдоподобия, которая идентифицирует конформационную изменчивость в картах, а затем отделяет различные молекулярные состояния [46].

Встраивание известных атомных структур в ПЭМ карту комплекса является основным инструментом для их интерпретации [33]. Большинство карт, полученных до последнего времени, имели разрешение в диапазоне 7–25 Å. В этом диапазоне разрешений невозможно построить атомную структуру

и не всегда возможно однозначно определить позиции отдельных доменов. В диапазоне низких разрешений (18–25 Å) большие домены могут быть узнаваемы по форме. В диапазоне разрешений 6–9 Å можно различить α -спирали вторичной структуры. Отдельные β -слои видны при разрешении 4,5 Å и выше. Боковые цепи аминокислот видны только у исключительно высоко разрешенных структур (2–4 Å). Однако вписывание атомных структур в низкоразрешенные карты электронной плотности часто дает хорошие результаты. Основной принцип вписывания – корреляция двух плотностей. Плотностная карта рассчитывается по атомной структуре при том же разрешении, что и ПЭМ-карта, и производится поиск кросс-корреляций, который используется для выравнивания двух плотностей. Поиск может быть сделан в реальном или обратном пространстве. Для маленьких объектов, вписываемых в большую карту, был разработан метод локальной корреляции [46], что упрощает вписывание. Даже при невысоком разрешении реконструкции можно вписать в асимметричный домен атомную структуру с точностью до ангстрема.

Следует обратить внимание, что разрешение, как правило анизотропно, т.е. варьируется между различными частями структуры. Жесткие части более точно представлены, чем гибкие, и периферийные регионы будут сильнее подвержены влиянию ошибок, чем центральные. В случаях, когда электронная плотность позволяет различить особенности вторичной структуры, ее корректность может быть проверена вписыванием известных атомных моделей.

ПЭМ макромолекул из XX в XXI век

В 10-х годах XXI в., мы стали свидетелями беспрецедентно бурного развития криоэлектронной микроскопии, выражающейся в получении и публикации трехмерных структур молекул все более быстрыми темпами и со все более высокими разрешениями. Это связано с тем, что электронные микроскопы продолжают улучшаться, ускоряющие напряжения увеличиваются, появились полевые эмиссионные катоды и современные электронно-оптические системы, улучшающие характеристики электронного пучка.

Нужно заметить, что всплеск публикаций атомных структур по данным ПЭМ явился не только результатом методологических достижений, но и непосредственно связан с созданием камер пря-

мого детектирования электронов (ПДЭ). Отличие камер ПДЭ от ПЗС-камер состоит в том, что ПЗС-камеры используют не прямые данные для регистрации сигнала. Первичные электроны должны быть преобразованы в фотоны при помощи сцинтиллятора, соединенного с датчиком через объектив или волоконно-оптическую связь. В ПДЭ-камерах сигнал генерируется непосредственно первичным электронным пучком [47]. Так, камеры ПДЭ кардинально поменяли способ сбора данных в криоПЭМ: с их помощью можно снимать фильмы до 40 кадров в секунду вместо отдельных экспозиций. Камеры ПДЭ позволили уменьшить предел размера изучаемой молекулы белка пока до ~ 90 кДа [48].

Благодаря постоянно модифицирующемуся компьютерному оборудованию программное обеспечение, используемое для восстановления карты 3D-плотности из изображений криоПЭМ, также становится все более сложным, особенно с внедрением методов анализа изображений на основе максимального правдоподобия и схем 3D-классификации. Наконец, многолетняя работа по полной автоматизации сбора и обработки данных привела к созданию платформ, которые теперь позволяют эффективно использовать инструменты и вычислительные ресурсы, делая криоПЭМ макромолекул доступной для более широкого научного сообщества. Это было впечатляюще продемонстрировано определением структуры *de novo* канала TRPV [49] с разрешением $3,4 \text{ \AA}$ (см. рис. 6), структуры β -галактозидазы с разрешением $2,2 \text{ \AA}$ [50] и структуры глютамат-дегидрогеназы с разрешением $1,8 \text{ \AA}$ [48].

Заключение

Современные методики позволяют получать структуры макромолекул с атомным разрешением. Как мы можем заключить из опыта классиков структурной биологии, для расчета атомной структуры любого белка необходимо: 1) выделить изучаемый белок в чистом виде – либо из природного источника, либо наработать его в какой-либо гетерологичной системе экспрессии; 2) вырастить достаточно большие кристаллы, с которых можно будет 3) получить качественную дифракционную картину, которая должна быть 4) обработать с использованием мощного компьютера.

Методы ЯМР и крио-ПЭМ не требуют наличия кристаллов, XFEL может работать с нанокристаллами, однако наличие очищенного белка в достаточной концентрации необходимо и для

этих методов. Это ставит биохимическую подготовку во главу угла. Компьютерная обработка данных также очень важна для получения качественной реконструкции. Используя моделирование по гомологии со структурами известных белков, можно построить модель еще неизвестного белкового комплекса. Структурная биология как наука появилась на рубеже XX в. В XXI в. она продолжает развиваться, в частности, разрабатываются новые методики, такие, как лазеры на свободных электронах. В ближайшее время оптимистичный взгляд на возможность реконструкции всех процессов в живых организмах может реализоваться.

Благодарности

Автор благодарен академику М.П. Кирпичникову за многолетнюю поддержку структурных исследований, всем сотрудникам и аспирантам кафедры биоинженерии биофака МГУ им. М.В. Ломоносова за плодотворные дискуссии и помощь в сборе данных для статьи. Финансовая поддержка осуществлялась РФФИ (проект 14-14-00234), Минобрнауки РФ (идентификатор RFMEFI61615X0044) и РФФИ (проект 16-04-01587).

Список литературы

1. The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution / Ben-Shem A., Garreau de Loubresse N., Melnikov S., Jenner L. et al. // *Science*. 2011. V. 334. P. 1524–1529.
2. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity / Doyle D.A., Cabral J.M., Pfuetzner A., Kuo J.M. et al. // *Science*. 1998. V. № 280. P. 69–76.
3. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment / Long S.B., Tao X., Campbell E.B., MacKinnon R. // *Nature*. 2007. V. 450. P. 376–82.
4. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state / Otterbein L.R., Graceffa P., Dominguez R. // *Science*. 2001. V. 293. P. 708–711.
5. Рубин А.Б. / *Биофизика*. – М.: МГУ, 2004.
6. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis / Kendrew J.C., Bodo G., Dintzis H.M., Parrish R.G. et al. // *Nature*. 1958. V. 181. № 4610. P. 662–666.
7. Structure of haemoglobin. A three-dimensional Fourier synthesis of reduced human haemoglobin at 5.5 Å resolution / Muirhead H., Perutz M.F. // *Nature*. 1963. V. 199. P. 633–638.
8. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3Å resolution / Deisenhofer J., Epp O., Miki K., Huber R. et al. // *Nature*. 1985. V. 318. P. 618–624.
9. Introduction to protein crystallization / McPherson A., Gavira J.A. // *Acta Crystallogr F*. 2014. V. 70. P. 2–20.
10. A decade of crystallization drops: crystallization of the cbb3 cytochrome c oxidase from *Pseudomonas stutzeri* / Buschmann S., Richers S., Ermler U., Michel H. // *Protein Sci*. 2014. V. 23. P. 411–422.
11. Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins / Prive G.G. // *Methods Mol. Biol*. 2007. V. 41. P. 388–397.
12. Can anomalous signal of sulfur become a tool for solving protein crystal structures? / Dauter Z., Dauter M., de La Fortelle E., Bricogne G. et al. // *J Mol. Biol*. 1999. V. 289. P. 83–92.
13. Radiation damage in macromolecular cryocrystallography / Ravelli R.B.G., Garman E.F. // *Curr Opin Struct Biol*. 2006. V. 16. P. 624–629.
14. Protein Crystallography at Sub-Zero Temperatures – Cryo-Protective Mother Liquors for Protein Crystals / Petsko G.A. // *J. Mol. Biol*. 1975. V. 96. P. 381–388.
15. Micro-crystallography comes of age / Smith J.L., Fischetti R.F., Yamamoto M. // *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2012. V. 22. P. 602–612.
16. A 7 mkm mini-beam improves diffraction data from small or imperfect crystals of macromolecules / Sanishvili R., Nagarajan V., Yoder D., Becker M. et al. // *Acta Crystallogr D*. 2008. V. 64. P. 425–435.

17. X-ray lasers for structural and dynamic biology / Spence J.C.H., Weierstall U., Chapman H.N. // *Rep. Prog. Phys.* 2012. V. 75. P. 102601.

18. Femtosecond crystallography of membrane proteins in the lipidic cubic phase / Liu W., Wacker D., Wang C., Abola E. et al. // *Philos. T R Soc. B.* 2014. V. 369. P. 20130314

19. Potential for biomolecular imaging with femtosecond X-ray pulses / Neutze R., Wouts R., van der Spoel D., Weckert E. et al. // *Nature.* 2000. V. 406. P. 752–757.

20. Determination of Protein Structures in the Solid State from NMR Chemical Shifts / Robustelli P., Cavalli A., Vendruscolo M. // *Structure.* 2008. V. 16. P. 1764–1769.

21. Protein structure determination from NMR chemical shifts / Cavalli A., Salvatella X., Dobson C.M., Vendruscolo M. // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2007. V. 104. P. 9615–9620.

22. Determination of the Structures of Symmetric Protein Oligomers from NMR Chemical Shifts and Residual Dipolar Couplings / Sgourakis N.G., Lange O.F., DiMaio F., Andre I. et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. V. 133. P. 6288–6298.

23. Nuclear magnetic resonance structural studies of a potassium channel-charybdotoxin complex / Yu L., Sun C., Song D., Shen J. et al. // *Biochemistry.* 2005. V. 44. P. 15834–15841.

24. Recherches sur la théorie des quanta, Thesis. 10 Serie. T. 3 / De Broglie. L. Paris, France: *Ann. de Physique*, 1924. 110 p.

25. Structure of the tubes of catalase: analysis of electron micrographs by optical filtering / Kiselev N.A., De Rosier D.J., Klug A. // *J. Mol. Biol.* 1968. V. 35 № 3. P. 561–566.

26. Reconstruction of three dimensional structures from electron micrographs / DeRosier D.J., Klug A. // *Nature.* 1968. V. 217. P. 130.

27. Electron microscopy of the stacked disk aggregate of tobacco mosaic virus protein. I. Three-dimensional image reconstruction / Unwin P.N., Klug A. // *J. Mol. Biol.* 1974. V. 87. P. 641–656.

28. Crystalline arrays of membrane-bound acetylcholine receptor / Kistler J., Stroud R.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1981. V. 78. № 6. P. 3678–3682.

29. An atomic model for the structure of bacteriorhodopsin / Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F. et al. // *Biochem. Soc. Trans.* 1990. V. 18. № 5. P. 844.

30. Electron microscopy of tobacco mosaic virus under conditions of minimal beam exposure / Williams R.C., Fisher H.W. // *J. Mol. Biol.* 1970. V. 52. № 1. P. 121–123.

31. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens / Dubochet J., Adrian M., Chang J.J., Homo J.C. et al. // *Q. Rev. Biophys.* 1988. V. 21. № 2. P. 129–228.

32. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy / Henderson J.R., Unwin P.N.T. // *Nature*. 1975. V. 257. P. 28–32.
33. Structural analysis of macromolecular assemblies by electron microscopy / Orlova E.V., Saibil H.R. // *Chem. Rev.* 2011. V. 111. P. 7710–7748.
34. Negative Staining and Cryoelectron Microscopy: The Thin Film Techniques / Harris J.R. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers, 1997. 224 p.
35. Радиационные повреждения в криоэлектронной микроскопии: всегда ли во вред? / Печникова Е.В., Кирпичников М.П., Соколова О.С. // *Природа*. 2015. № 3. С. 25–29.
36. Glaeser R.M., Taylor K.A. damage relative to transmission electron microscopy of biological specimens at low temperature: a review / Glaeser R.M., Taylor K.A. // *J. Microsc. Radiation*. 1978. V. 112. P. 127.
37. Beam damage to organic material is considerably reduced in cryo-electron microscopy / Knapek E., Dubochet J. // *J. Mol. Biol.* 1980. V. 141. P. 147.
38. Atomic model of the F420-reducing [NiFe] hydrogenase by electron cryo-microscopy using a direct electron detector / Allegretti M., Mills D.J., McMullan G., Kuhlbrandt W. et al. // *Elife*. 2014. V. 3. P. 01963.
39. Electron microscopy of the stacked disc aggregate of tobacco mosaic virus protein. II. The influence of electron irradiation on the stain distribution / Unwin P.N. // *J. Mol. Biol.* 1974. V. 87. P. 657.
40. Ribosome structures to near-atomic resolution from thirty thousand cryo-EM particles / Bai X.C., Fernandez I.S., McMullan G., Scheres S.H. // *eLife*. 2013. V. 2. P. 00461.
41. The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein / Saxton W.O., Baumeister W. // *J. Microscopy*, 1982. V. 127. P. 127–138.
42. Fourier shell correlation threshold criteria / van Heel M., Schatz M. // *J. Struct. Biol.* 2005. V. 151. P. 250–262.
43. Multiple distinct assemblies reveal conformational flexibility in the small heat shock protein Hsp26 / White H.E., Orlova E.V., Chen S., Wang L. et al. // *Structure*. 2006. V. 14. P. 1197–1204.
44. Visualization of release factor 3 on the ribosome during termination of protein synthesis / Klaholz B.P., Myasnikov A.G., Van Heel M. // *Nature*. 2004. V. 427. P. 862–865.
45. Maximum-likelihood multi-reference refinement for electron microscopy images / Scheres S.H.W., Valle M., Nunez R., Sorzano C.O.S. et al. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 348. P. 139–149.
46. Docking structures of domains into maps from cryo-electron microscopy using local correlation / Roseman A.M. // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2000. V. 56. P. 1332–1340.

47. Comparison of optimal performance at 300 keV of three direct electron detectors for use in low dose electron microscopy / McMullan G., Faruqi A.R., Clare D., Henderson R. // *Ultramicroscopy*. 2014. V. 147. P. 156–163.

48. Breaking Cryo-EM Resolution Barriers to Facilitate Drug Discovery / Merk A., Bartesaghi A., Banerjee S., Falconieri V. et al. // *Cell*. 2016. V. 165. P. 1698–1707.

49. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy / Liao M., Cao E., Julius D., Cheng Y. // *Nature*. 2013. V. 504. P. 107–112.

50. 2.2 Å resolution cryo-EM structure of beta-galactosidase in complex with a cell-permeant inhibitor / Bartesaghi A., Merk A., Banerjee S., Matthies D. et al. // *Science*. 2015. V. 348. P. 1147–1151.

51. Femtosecond X-ray protein nanocrystallography / Chapman H.N., Fromme P., Barty A., White T.A. et al. // *Nature*. 2011. V. 470. P. 73–77.

О.С. Соколова

**Структурная биология:
из XX в XXI век**

Формат 60 x 84/16
Гарнитура Таймс
Усл. печ. л. 1,9. Усл. изд. л. 1,2
Тираж 20 экз.

Издатель – Российская академия наук

Подготовлено к печати
Управлением научно-издательской деятельности РАН

Отпечатано на оборудовании Управления делами РАН

Издано в авторской редакции

Издается в соответствии с распоряжением
президиума Российской академии наук
от 24 октября 2017 г. №10106-765,
распространяется бесплатно.