

## ГЛАВА 5

### УТОЧНЕНИЕ НАБОРА ФАЗ ДЛЯ $\beta$ -КРИСТАЛЛИНА ШЬ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СМЕШАННОЙ АТОМНОЙ МОДЕЛИ

#### 5.1. Описание частичной модели.

В результате выполненного улучшения набора фаз структурных факторов белка  $\beta$ -кристаллин ШЬ путем построения и модификации грубой атомной модели ( глава 4 ) оказалось возможным построение частичной атомной модели структуры.

Построение атомной модели проводилось сотрудниками лаборатории структурного анализа Института белка АН СССР Ю.Н.Чиргадзе, Н.А.Невской и Н.П.Фоменковой с помощью ящика Ричардса [234,235] и с помощью интерактивной графической системы [236]. Модель строилась только для одной молекулы из двух, расположенных в независимой части элементарной ячейки. Модель для другой молекулы получалась с помощью соответствующего преобразования локальной симметрии.

При анализе карт распределения электронной плотности, соответствующих улучшенному синтезу разрешением  $2.7 \text{ \AA}$ , был уточнен ход полипептидной цепи, общее предполагаемое число остатков возросло при этом до 167. Интерпретация карт была проведена с использованием приближенных данных по аминокислотной последовательности. Достаточно хорошо была локализована большая часть остатков цистеина, метионина, фенилаланина и тирозина, которые обычно служат реперами при анализе карт распределения электронной плотности. Не удалось на данном этапе точно локализовать два остатка триптофана, которые, по-видимому, находятся близко к местам изгибов полипептидной цепи. Всего было вписано 93 боковые группы, то есть

около 56% от предполагаемого общего числа. Частичная модель  $M_{PI}$  содержала по 967 атомов на каждую молекулу, то есть около 69% от общего количества. Вся геометрия групп была близка к идеальной, за исключением углов  $\tau(NC_\alpha C)$  и  $\beta(C_\beta C_\alpha C)$ .

## 5.2. Уточнение частичной модели.

Первоначально нами была предпринята попытка кристаллографического уточнения частичной модели  $M_{PI}$  ( и, соответственно, уточнения значений фаз ).

По модели  $M_{PI}$  были рассчитаны структурные факторы  $F_{PI}(\vec{s})e^{i\varphi_{PI}(\vec{s})}$ , фазы  $\varphi_{PI}(\vec{s})$  которых использовались для построения синтеза разрешением 2.7 Å с коэффициентами Фурье

$$F(\vec{s})e^{i\varphi(\vec{s})} = \begin{cases} m_{HL}(\vec{s})F_0(\vec{s})e^{i\varphi_{HL}(\vec{s})}, & 1/|\vec{s}| > 10.0 \text{ Å} \\ m_{PI}(\vec{s})F_0(\vec{s})e^{i\varphi_{PI}(\vec{s})}, & 10.0 \text{ Å} \geq 1/|\vec{s}| \geq 2.7 \text{ Å} \end{cases} \quad (II4)$$

Данный синтез электронной плотности ( изображение его фрагмента приведено на рис. II ) свидетельствовал о плохом качестве фаз  $\varphi_{PI}(\vec{s})$ , то есть о недостаточной полноте частичной модели  $M_{PI}$ . Тем не менее, оставалась надежда на возможность уточнения  $M_{PI}$  и уточнения соответствующих значений фаз.

Были последовательно проведены 21 цикл уточнения параметров частичной модели ( 9 циклов уточнения значений температурного фактора и 12 циклов уточнения координат ) по зоне  $3.0 \text{ Å} \leq 1/|\vec{s}| \leq 10.0 \text{ Å}$  и 15 циклов уточнения ( 6 - температурного фактора и 9 - координат ) по зоне  $2.7 \text{ Å} \leq 1/|\vec{s}| \leq 10.0 \text{ Å}$ . Уточнение проводилось в обратном пространстве без учета каких-либо стереохимических ограничений путем минимизации функционала  $R_{12}$  (87). В результате уточнения удалось понизить

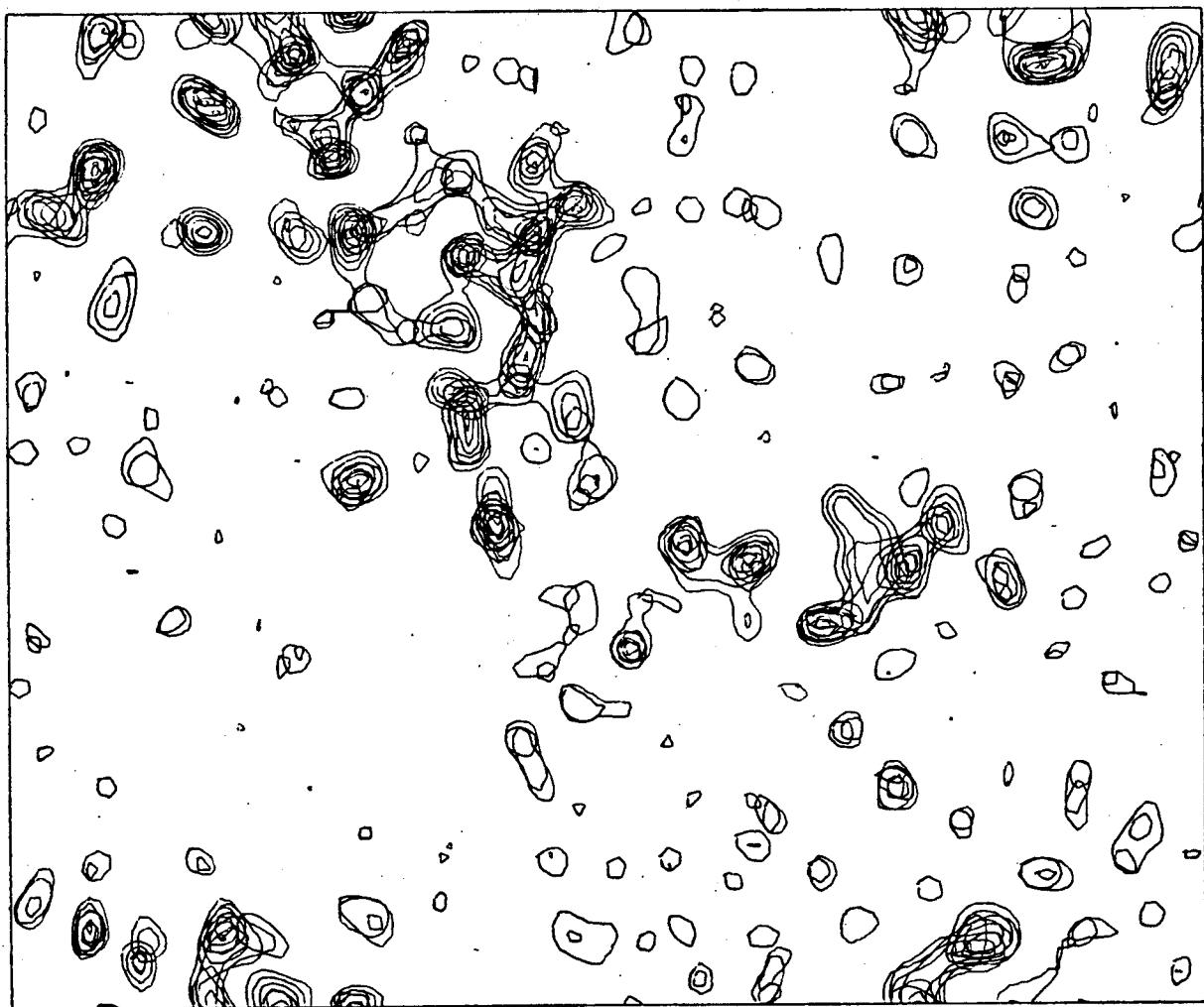


Рис.II. Изображение функции распределения электронной плотности в  $\gamma$ -кристаллине W<sub>x</sub>Cu -сечение,  $z = (27+30)/144$ . Набор фаз определен по первой частичной модели  $M_{PI}$ , разрешение 2.7 Å.

величину кристаллографического фактора достоверности  $R$  (90) с 0.53 до 0.27.

Анализ уточненной модели  $M_{PI}^R$  показал существенную деформацию стандартной геометрии в молекуле и невозможность использования  $M_{PI}^R$  для дальнейшей работы. Более существенным для данного этапа исследований был тот факт, что улучшения набора фаз также не произошло, о чем можно судить, например, по фрагменту карты, изображенном на рис. I2. Соответствующий синтез был рассчитан с коэффициентами, аналогичными (II4) с заменой  $M_{PI}(\vec{s})$  и  $\Psi_{PI}(\vec{s})$  соответственно на  $M_{PI}^R(\vec{s})$  и  $\Psi_{PI}^R(\vec{s})$ . Разностный синтез электронной плотности типа и синтез, полученный путем комбинирования фазовой информации с данными изоморфного замещения, также свидетельствовали о плохом качестве полученного набора фаз.

Дальнейшая работа велась путем дополнения частичной модели  $M_{PI}$  фиктивными атомами, располагаемыми на непроинтерпредированных участках синтеза электронной плотности, и последующей модификации этой смешанной модели.

### 5.3. Использование смешанной атомной модели.

#### 5.3.1. Построение грубой модели.

Для построения грубой модели, дополняющей частичную модель  $M_{PI}$ , необходимо было из наилучшего имевшегося синтеза с коэффициентами (II3) (см. п. 4.5) вычесть вклад атомов модели  $M_{PI}$ . Для этого атомам частичной модели было приписано значение температурного фактора, равное среднему значению температурного фактора молекулы  $B_{AV}=10 \text{ \AA}^2$ , и по этим параметрам были рассчитаны структурные факторы  $F_{PI}(\vec{s})e^{i\Psi_{PI}(\vec{s})}$  и построен синтез с коэффициентами

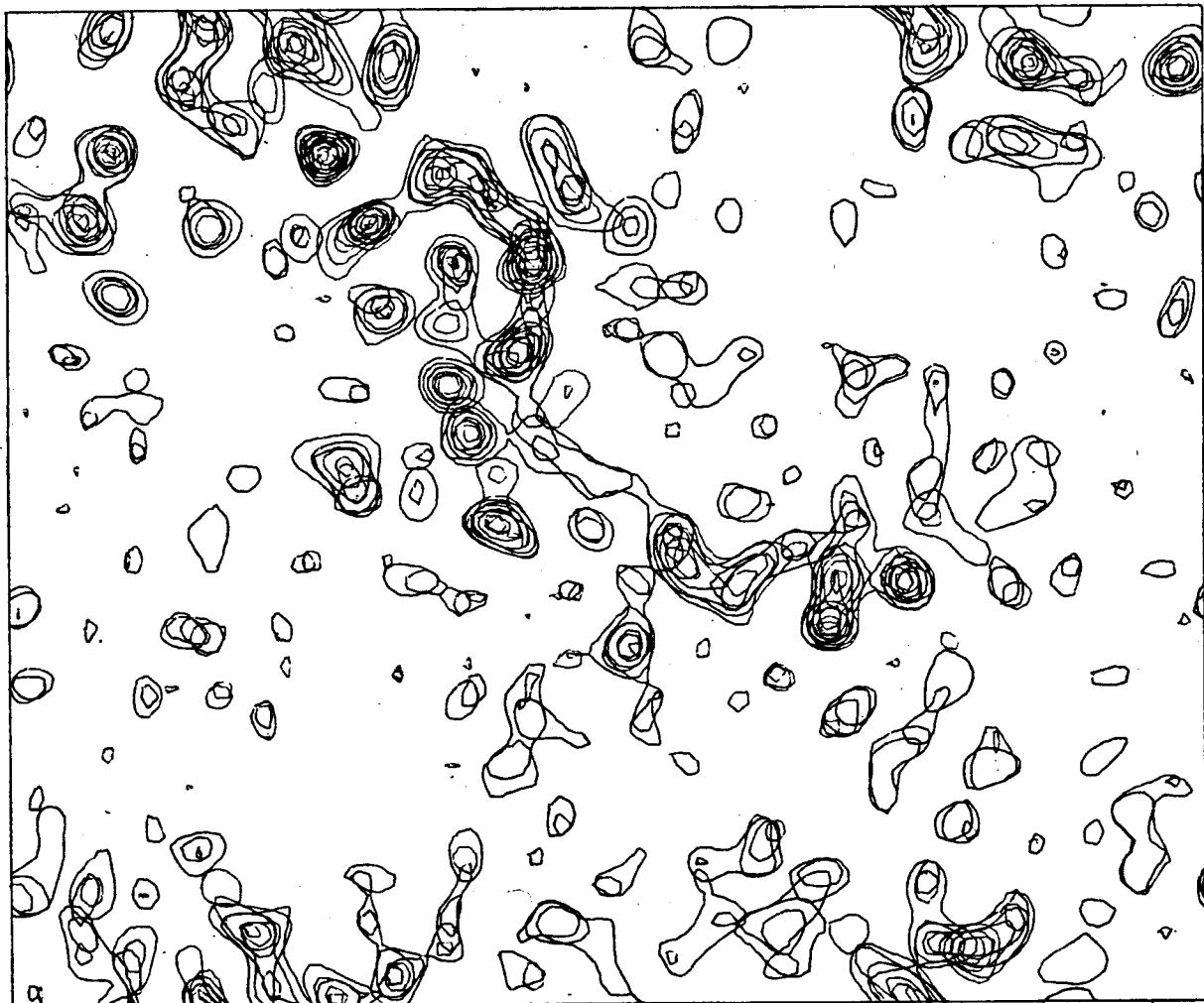


Рис.12. Изображение функции распределения электронной плотности в  $\gamma$ -кристаллине Ш.ху -сечение,  $z = (27+30)/144$ . Набор фаз определен по уточненной частичной модели  $M_{PI}^R$ , разрешение  $2.7 \text{ \AA}$ .

$$\begin{cases} m_{HL}(\vec{s}) [F_0(\vec{s})e^{i\varphi_{HL}(\vec{s})} - F_{P1}(\vec{s})e^{i\varphi_{P1}(\vec{s})}] , & 1/|\vec{s}| > 10.0 \text{ \AA} \\ m_{22}^c(\vec{s}) [F_0(\vec{s})e^{i\varphi_{22}^c(\vec{s})} - F_{P1}(\vec{s})e^{i\varphi_{P1}(\vec{s})}] , & 10.0 \text{ \AA} \geq 1/|\vec{s}| \geq 2.7 \text{ \AA} \end{cases} \quad (II5)$$

Среднее значение температурного фактора было определено из графика Вильсона, а также по среднему значению температурного фактора фиктивных атомов модели  $M_{22}$ .

По разностному синтезу (II5) были определены фиктивные атомы, дополняющие модель  $M_{P1}$ . Модификация этой смешанной атомной модели к успеху не привела, непроинтерпретированные участки функции распределения электронной плотности не улучшились. Анализ расположения фиктивных атомов показал, что они заняли, в основном, область частичной модели. Причиной этого явилось неполное вычитание вклада частичной модели из улучшаемого синтеза и неправильная тактика модификации смешанной модели.

Для успешной работы перед повторным построением грубой модели были занулены участки разностного синтеза (II5), где нахождение фиктивных атомов было нежелательным. "Запрещенная" область формировалась объединением окрестностей радиусом 0.7 Å центров атомов частичной модели. Дополнительно синтез был занулен вне области молекулы, которая задавалась как объединение окрестностей радиусом 5.5 Å центров  $C_\alpha$ -атомов модели  $M_{P1}$ . Отметим, что данный способ определения области молекулы был вынужденным и что, вероятно, эффективнее было бы провести границы вручную, более точно.

По полученному в результате зануления синтезу, максимальное значение  $\Omega_{max}$  которого составило  $2.65 \text{ e/Å}^3$ , конструировалась грубая модель с параметрами изображения атома

$B_o = 72.2 \text{ \AA}^2$  и  $C_o = 9.11 \text{ e.}$  Локальная симметрия при построении грубой модели не учитывалась, и фиктивные атомы определялись независимо во всей асимметричной части элементарной ячейки. Значение критического уровня было задано равным  $\rho_{\text{crit}} = 0.40 \text{ e/\AA}^3$ . В результате частичная модель  $M_{PI}$  была дополнена 2889 фиктивными атомами, для которых среднее и максимальное значения температурного фактора равнялись соответственно  $6.3 \text{ \AA}^2$  и  $27.6 \text{ \AA}^2$ .

### 5.3.2. Модификация смешанной модели.

При модификации полученной таким образом смешанной модели  $M_{MI}$  были учтены ошибочные действия при модификации первой, некорректно построенной смешанной модели. Эти действия, а именно поочередная модификация сначала грубой, а потом частичной моделей и модификация значений температурного фактора до модификации координат, приводили к захвату максимальных функций распределения электронной плотности фиктивными атомами и разрушению частичной модели.

Для модели  $M_{MI}$  велась модификация параметров одновременно всех атомов, причем сначала выполнялась модификация координат атомов, а затем – значений температурного фактора. Модификация, по-прежнему, велась сериями по 5 циклов ( 3 цикла модификации координат, 2 цикла модификации значений температурного фактора ).

Модификация проводилась последовательно по данным разрешением  $10.0 \text{ \AA} \geq 1/|\vec{s}| \geq 3.0 \text{ \AA}$  и  $10.0 \text{ \AA} \geq 1/|\vec{s}| \geq 2.7 \text{ \AA}$  до стабилизации параметров модели – модификация прекращалась при установлении средней величины сдвига атомов равной  $0.04 \text{ \AA}$  за цикл. Применялись специальные меры против разрушения частичной модели. В частности, была ограничена величина максималь-

но допустимого сдвига атома за цикл.

По ходу модификации выполнялась "резка" моделей. На данном этапе в этой процедуре участвовали все атомы смешанной модели, включая и атомы частичной модели. Величина уровня срезки  $B_{LM}$  ( см. п. 2.3 ) постепенно снижалась с  $25 \text{ \AA}^2$  до  $17 \text{ \AA}^2$ . В результате последняя модель  $M_{M14}$  состояла из 4348 атомов, из которых 1849 – атомы частичной модели. Среднее значение температурного фактора атомов модели составило  $6.8 \text{ \AA}^2$ .

Всего было проведено по 12 циклов модификации координат и по 6 циклов модификации значений температурного фактора в каждой из двух зон обратного пространства:  $10.0 \text{ \AA} \geq 1/|\vec{s}| \geq 3.0 \text{ \AA}$  и  $10.0 \text{ \AA} \geq 1/|\vec{s}| \geq 2.7 \text{ \AA}$ . При этом  $R$ -фактор упал с 0.38 до 0.14 при уточнении по первой зоне и с 0.19 до 0.13 при последующем уточнении по второй зоне. Некоторое повышение значений  $R$ -фактора по сравнению со значениями на предыдущем этапе улучшения фаз ( без частичной модели ) выглядит правдоподобным ввиду использования атомов частичной модели вместе группы фиктивных атомов, то есть уменьшения степеней свободы при конструировании исходной смешанной модели.

Более подробно ход модификации смешанной модели и поведение  $R$ -фактора отражены в таблице II.

Была сделана попытка использования процедуры частичной реконструкции модели. Из модели  $M_{M14}$  была удалена часть атомов с высоким значением температурного фактора, после чего по соответствующему разностному синтезу были определены дополнительные фиктивные атомы. Модель, полученная объединением оставшейся смешанной и новой грубой моделей, модифицировалась по данным разрешением  $10.0 \text{ \AA} \geq 1/|\vec{s}| \geq 2.7 \text{ \AA}$ . Однако фа-

Таблица II. План модификации смешанной атомной модели  $\chi$ -кристаллина Шв ( первый этап ).

модифи- цируемая модель	кол-во атомов всего	кол-во атомов частич. модели	зона модифи- кации, Å	кол-во отра- жений	кол-во циклов модиф. (X+B)	уровень срезки, $\text{Å}^2$	$\langle \Delta \zeta_j \rangle_j$		$\max \Delta \zeta_j$ исх.   фин.	$R$ -фактор, % исх.   фин.
							исх.	фин.		
$M_{M0}$	4823	1934	3.0-10.0	8594	3 + 2	-	0.27	0.12	0.34	0.15
$M_{M2}$	4823	1934	3.0-10.0	8594	3 + 2	-	0.12	0.08	0.23	0.15
$M_{M4}$	4823	1934	3.0-10.0	8594	3 + 2	25	0.06	0.04	0.16	0.13
$M_{M6}$	4715	1934	3.0-10.0	8594	3 + 0	-	0.05	0.04	0.19	0.14
$M_{M7}$	4715	1934	2.7-10.0	10588	3 + 2	20	0.09	0.05	0.12	0.06
$M_{M9}$	4543	1922	2.7-10.0	10588	3 + 2	17	0.08	0.05	0.15	0.09
$M_{M11}$	4348	1849	2.7-10.0	10588	3 + 2	-	0.08	0.04	0.21	0.12
$M_{M13}$	4348	1849	2.7-10.0	10588	3 + 0	-	0.04	0.03	0.13	0.10
$M_{M14}$	4348	1849	-	10588	-	-	-	-	13	-

зовая информация, определенная по новой модифицированной модели  $M_{M30}$ , уступала по качеству прежней, полученной по модели  $M_{M14}$ . Возможное объяснение этого факта приведено выше в п. 2.8.

#### 5.4. Результат первого этапа улучшения набора фаз с помощью смешанной атомной модели.

Фазовая информация, определенная по модели  $M_{M14}$ , использовалась для построения нового синтеза электронной плотности. Сравнительный анализ синтезов, где в качестве фаз структурных факторов разрешением от  $10.0 \text{ \AA}$  до  $2.7 \text{ \AA}$  использовались  $\Psi_{M14}(\vec{s})$  либо  $\Psi_{M14}^c(\vec{s})$ , определенные соответственно из распределений  $P_{\vec{s}}^{M14}(\varphi)$  и  $P_{\vec{s}}^{CM14}(\varphi) = P_{\vec{s}}^{M14}(\varphi) \cdot P_{\vec{s}}^{HL}(\varphi)$ , показал большое сходство их между собой. Как следствие, на данном этапе мы отказались от комбинирования фазовой информации при построении заключительного синтеза электронной плотности, который рассчитывался теперь с коэффициентами Фурье

$$F(\vec{s})e^{i\Psi(\vec{s})} = \begin{cases} m_{HL}(\vec{s}) F_0(\vec{s}) e^{i\Psi_{HL}(\vec{s})}, & 1/|\vec{s}| > 10.0 \text{ \AA} \\ m_{M14}(\vec{s}) F_0(\vec{s}) e^{i\Psi_{M14}(\vec{s})}, & 10.0 \text{ \AA} \geq 1/|\vec{s}| \geq 2.7 \text{ \AA} \end{cases} \quad (II6)$$

В расчет синтеза вошло 10804 отражения, максимальное значение  $Q_{MAX}$  составило  $2.83 \text{ e}/\text{\AA}^3$  (для соответствующего невзвешенного синтеза  $Q_{MAX} = 3.49 \text{ e}/\text{\AA}^3$ ). Контрастность синтеза и зашумленность изменились соответственно до 16.0 и 10.3.

Визуальный анализ карт распределения электронной плотности подтвердил улучшение синтеза по сравнению с исходным для данного этапа. Синтез стал значительно яснее, лучше прорисовывался ход основной цепи. В некоторых местах появи-

лись "вздутия" электронной плотности в области основной цепи, указывающие на локализацию пептидного карбонила. Существенно лучше стали интерпретироваться электронные облака боковых групп. Однако, как и на исходном синтезе, из двух участков, связанных локальной симметрией, один был проявлен несколько слабее, чем другой.

Фрагмент изображения заключительного синтеза данного этапа приведен на рис. I3.

### 5.5. Использование смешанной атомной модели для улучшения набора фаз ( второй этап ).

#### 5.5.1. Описание улучшенной частичной модели.

Синтез электронной плотности, полученный на предыдущем этапе улучшения набора фаз для  $\gamma$ -кристаллина Шб с помощью смешанной атомной модели, позволил исправить и значительно расширить имевшуюся частичную модель молекулы белка. Был скорректирован ход полипептидной цепи, предполагаемое количество остатков стало равным 172. Было идентифицировано 118 боковых групп, то есть около 69% от их общего числа. Частичная модель  $M_{P2}$  содержала уже по 1130 атомов для каждой молекулы, что составляло около 77% от их общего числа. Уменьшились отклонения углов  $\gamma$  и  $\beta$  от стандартных значений. По-прежнему, подробный анализ проводился лишь для одной из двух молекул  $\gamma$ -кристаллина Шб, расположенных в независимой части элементарной ячейки. Параметры атомов другой молекулы определялись с помощью соответствующего преобразования локальной симметрии. Синтез электронной плотности, рассчитанный с фазами, определенными по модели  $M_{P2}$ , воспроизводил имеющееся распределение электронной плотности уже значитель-

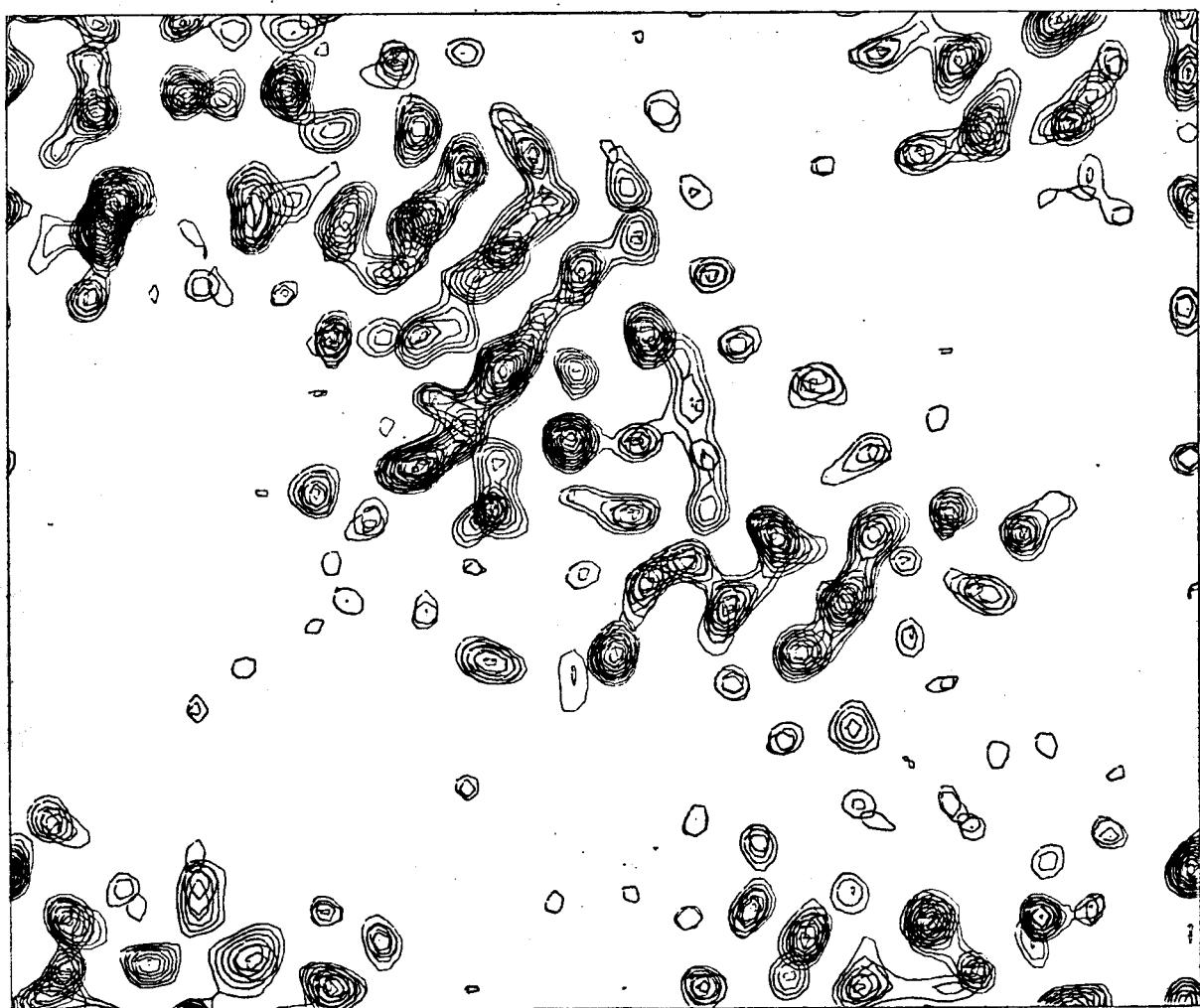


Рис. I3. Изображение функции распределения электронной плотности в  $\gamma$ -кристаллине Шб.  $x_4$  - сечение,  $z = (27 \div 30) / 144$ .  
Набор фаз определен по модифицированной смешанной модели  $M_{M4}$ , разрешение  $2.7 \text{ \AA}$ .

но лучше аналогичного предыдущего, что свидетельствовало об уже достаточно удовлетворительном качестве частичной модели ( фрагмент изображения синтеза приведен на рис. I4 ).

Ввиду достигнутого эффекта на выполненном этапе было решено продолжить улучшение набора фаз с помощью частичной модели, теперь уже более полной, чем раньше, путем дополнения ее фиктивными атомами и модификации смешанной модели.

### 5.5.2. Построение смешанной модели.

Алгоритмически построение смешанной модели было близким к аналогичному построению на предыдущем этапе. Поскольку обнаружилось, что при прежней схеме построения грубой модели на непроинтерпретированные участки синтеза попадает недостаточное количество фиктивных атомов ( ввиду существенного уменьшения общего числа фиктивных атомов ), были внесены следующие изменения.

Для атомов частичной модели  $M_{P2}$  было проведено 2 предварительных цикла модификации значений температурного фактора. По модифицированной модели  $M_{P2}^B$  были рассчитаны структурные факторы  $F_{P2}^B(\vec{s}) e^{i\varphi_{P2}^B(\vec{s})}$ , которые и использовались для построения разностного синтеза с коэффициентами Фурье

$$\begin{cases} m_{HL}(\vec{s}) [F_0(\vec{s}) e^{i\varphi_{HL}(\vec{s})} - k F_{P2}^B(\vec{s}) e^{i\varphi_{P2}^B(\vec{s})}] , & 1/|\vec{s}| > 10.0 \text{ \AA} \\ m_{M14}(\vec{s}) [F_0(\vec{s}) e^{i\varphi_{M14}(\vec{s})} - k F_{P2}^B(\vec{s}) e^{i\varphi_{P2}^B(\vec{s})}] & 10.0 \text{ \AA} \geq 1/|\vec{s}| \geq 2.7 \text{ \AA} \end{cases} \quad (II7)$$

где  $m_{M14}(\vec{s})$  и  $\varphi_{M14}(\vec{s})$  вычислены согласно (66) из распределений  $P_g^{M14}(\varphi)$ , определенных по смешанной модели  $M_{M14}$ . Величина коэффициента  $k$  равнялась 1.1. Кроме этого, с целью запрещения расположения фиктивных атомов вблизи атомов частичной модели, функция распределения электронной плотности зануля-

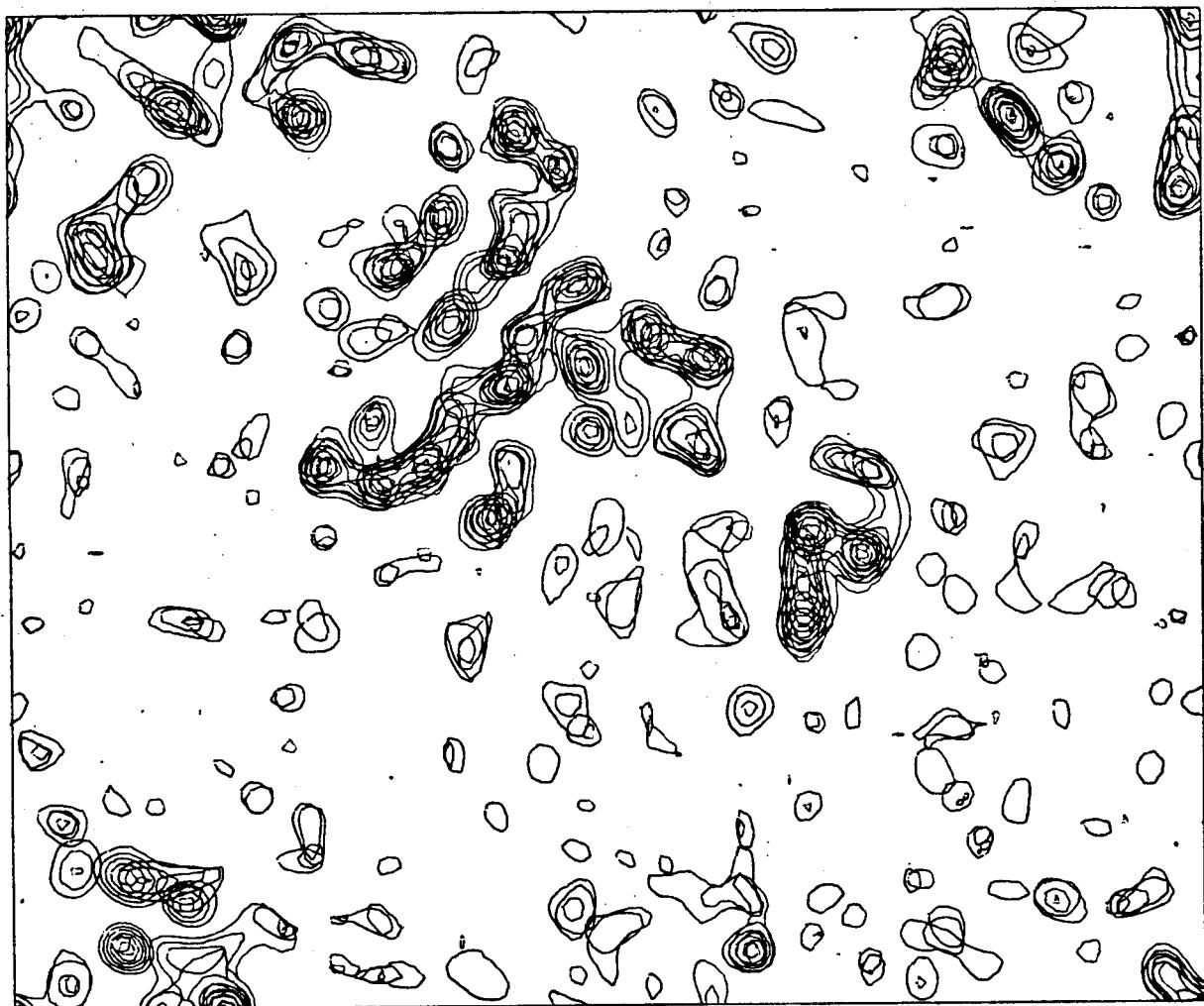


Рис.I4. Изображение функции распределения электронной плотности в  $\gamma$ -кристаллине Шб.ху -сечение,  $z = (27 \div 30)/144$ . Набор фаз определен по частичной модели  $M_{P2}$ , разрешение  $2.7 \text{ \AA}$ .

лась в окрестностях атомов модели, причем радиус окрестностей по сравнению с предыдущим этапом был увеличен до 1.0 Å.

Так как область одной из молекул, связанных локальной симметрией, прорисовывалась хуже соответствующей области второй молекулы, то построение грубой модели велось лишь во второй области, а параметры атомов грубой модели для более слабо прорисованной области определялись по соответствующим уравнениям локальной симметрии.

Остальные изменения при построении смешанной модели определялись лишь изменениями в частичной модели. В частности, несколько уточнилась область молекулы, определявшаяся, как и раньше, по координатам центров  $C_{\alpha}$ -атомов.

Максимальное значение функции распределения электронной плотности, по которой строилась новая грубая модель, составило  $\rho_{MAX} = 2.51 \text{ e}/\text{\AA}^3$ . Мы стремились дополнить частичную модель, уже саму по себе достаточно полную, фиктивными атомами, моделирующими только самые высокие пики на разностном синтезе. Поэтому, при значениях параметров изображения атома на синтезе  $B_0 = 47.4 \text{ \AA}^2$  и  $C_0 = 7.69 \text{ e}$ , значение критического уровня было выбрано достаточно высоким и равнялось  $0.65 \text{ e}/\text{\AA}^3$ . Грубая модель, построенная с использованием таких значений параметров, состояла из 1746 фиктивных атомов ( по 873 для каждой из молекул ), для которых максимальное и среднее значения температурного фактора равнялись соответственно  $14.2 \text{ \AA}^2$  и  $4.7 \text{ \AA}^2$ .

Атомы грубой модели были добавлены к атомам модели  $M_{P2}^B$  с модифицированными значениями температурного фактора и образовали вместе с ними смешанную модель  $M_{MO}$ .

### 5.5.3. Модификация смешанной модели.

Как и построение, модификация смешанной модели на данном этапе выполнялась аналогично модификации на предыдущем этапе.

Отличием от предыдущего этапа, где после выбора величины сдвига атомов по антиградиенту минимизируемого функционала (87) укорачивались вектора слишком больших сдвигов отдельных атомов, было искусственное уменьшение величины сдвига, пропорциональное по всем атомам. Целью данного изменения было уменьшение деформации частичной модели. В результате процесс минимизации сходился более медленно и потребовал выполнения 21 цикла модификации координат и 10 циклов модификации значений температурного фактора по данным разрешением  $10.0 \text{ \AA} \geq 1/|S| \geq 3.0 \text{ \AA}$  и соответственно 12 и 6 циклов для данных разрешением  $10.0 \text{ \AA} \geq 1/|S| \geq 2.7 \text{ \AA}$ .

При выполнении корректировок модели по значениям температурного фактора на этом этапе удалялись лишь атомы грубой модели. Значение  $B_{LM}$  постепенно снижалось с  $20 \text{ \AA}^2$  до  $15 \text{ \AA}^2$ .

В результате проведенной модификации последовательно по 3.0- и 2.7-ангстремным наборам данных значение R-фактора снизилось с 0.46 до 0.16 при модификации по первому набору и с 0.21 до 0.15 при последующей модификации по второму набору. Подробно процесс модификации отражен в таблице I2.

### 5.5.4. Построение заключительного синтеза.

Заключительный синтез с использованием фазовой информации, определенной по модифицированной смешанной модели  $M_{M9}$ , строился полностью аналогично заключительному синтезу предыдущего этапа. Комбинирование фазовой информации не проводилось, в качестве фаз структурных факторов разрешением от

10.0 Å до 2.7 Å использовались величины  $\varphi_{\text{ми}}(\vec{s})$ . В расчет синтеза вошло 10804 отражения, максимальное значение  $\varphi_{\text{ми}}$  составило  $3.07 \text{ e/Å}^3$ .

Из характерных особенностей последнего синтеза выделялась достаточно четкая прорисовка областей, соответствующих обеим молекулам.

Числовые характеристики заключительного синтеза, как и ряда предыдущих, даны в таблице I3. Изображение фрагмента заключительного синтеза приведено на рис. I5.

### 5.6. Эффективность методики для улучшения фаз структурных факторов $\gamma$ -кристаллина ШЬ .

В результате выполнения трех этапов улучшения набора фаз ( один этап с использованием грубой модели и два этапа - с использованием смешанной модели ) были рассчитаны карты распределения электронной плотности в кристаллах белка  $\gamma$ -кристаллин ШЬ при разрешении 2.7 Å. По этим картам удалось построить практически полную атомную модель структуры ( около 90% общего числа неводородных атомов ), пригодную для обычного кристаллографического уточнения. В исходной же ситуации, при недостаточно высоком качестве имеющихся карт и недостаточно надежных данных по аминокислотной последовательности, решение задачи построения атомной модели было невозможным.

Построенная сотрудниками Института белка АН СССР Ю.Н. Чиргадзе и Н.А.Невской пространственная модель молекулы содержала 172 аминокислотных остатка. Были идентифицированы 1279 атомов - все атомы основной цепи и атомы 118 боковых групп. Практически все пептидные группы имели значения углов

Таблица 12. План модификации смешанной атомной модели  $\chi$ -кристалличина Шв ( второй этап ).

МОДИФИ- ЦИРУЕМАЯ МОДЕЛЬ	КОЛ-ВО АТОМОВ	ЗОНА МОДИФИ- КАЦИИ, Å	КОЛ-ВО ЦИКЛОВ МОДИФ. (X+B)	УРОВЕНЬ СРЕЗКИ, Å <sup>2</sup>	$\langle \Delta \zeta_j \rangle_j$		МАХ $\Delta \zeta_j$ ИСХ.   ФИН.	R-ФАКТОР, ИСХ.   ФИН.
					ИСХ.	ФИН.		
M <sub>M0</sub>	4006	3.0-10.0	8594	3 + 2	-	0.11	0.08	0.12 0.09 45.9 35.0
M <sub>M2</sub>	4006	3.0-10.0	8594	3 + 2	20.0	0.16	0.11	0.20 0.14 35.0 27.7
M <sub>M4</sub>	3938	3.0-10.0	8594	3 + 2	17.5	0.09	0.08	0.27 0.23 27.7 23.7
M <sub>M6</sub>	3870	3.0-10.0	8594	3 + 2	15.0	0.08	0.07	0.37 0.29 23.4 21.3
M <sub>M8</sub>	3797	3.0-10.0	8594	3 + 2	15.0	0.07	0.04	0.37 0.40 21.0 18.9
M <sub>M10</sub>	3782	3.0-10.0	8594	6 + 0	-	0.05	0.03	0.23 0.13 18.5 15.8
M <sub>M12</sub>	3782	2.7-10.0	10588	3 + 2	15.0	0.07	0.06	0.31 0.52 20.5 18.7
M <sub>M14</sub>	3777	2.7-10.0	10588	3 + 2	15.0	0.05	0.03	0.38 0.18 18.3 17.2
M <sub>M16</sub>	3772	2.7-10.0	10588	3 + 2	15.0	0.03	0.02	0.18 0.19 16.9 16.3
M <sub>M18</sub>	3766	2.7-10.0	10588	3 + 0	-	0.02	0.02	0.19 0.20 16.0 15.4
M <sub>M19</sub>	3766	-	10588	-	-	-	-	15.4 -

Таблица I3. Сравнительные характеристики синтезов электронной плотности  $\chi$ -кристаллина Ш.

синтез	разре- шение, $\text{\AA}$	коэффициенты	кол-во отра- женый	$Q_{\max}$	$Q_{\max}$	контраст-	нижний	зашум- ленность
				$e/\text{\AA}^3$	неззвеш.	$d = Q_{\max}/\beta_{AV}$	$N = Q_{\max}/2\beta_{mol}$	уровень обводки
				$e/\text{\AA}^3$				карт $Q_{mol}$
исход- ный	3.0	$m_{\text{H}} \int_0 e^{i\varphi_{\text{H}}}$	6777	0.91	2.29	5.2	0.32	5.6
модифи- кация	3.0	$m_{\text{H}} \int_0 e^{i\varphi_{\text{H}}},$ $d > 10.0\text{\AA}$	8816	1.76	2.40	9.9	0.49	7.2
грубой модели		$m_{22}^c \int_0 e^{i\varphi_{22}^c},$ $10.0\text{\AA} \geq d \geq 3.0\text{\AA}$						
модифи- кация	2.7	$m_{\text{H}} \int_0 e^{i\varphi_{\text{H}}},$ $d > 10.0\text{\AA}$	10804	2.06	2.64	II.6	0.56	7.3
грубой модели		$m_{22}^c \int_0 e^{i\varphi_{22}^c},$ $10.0\text{\AA} \geq d \geq 2.7\text{\AA}$						

Таблица I3. ( Продолжение ).

модифи- кация	$m_{\text{НЧ}} F_0 e^{i\varphi_{\text{НЧ}}}$					
смешан. модели (1 этап)	2.7	$m_{\text{МЧ}} F_0 e^{i\varphi_{\text{МЧ}}}$ , $10.0\text{\AA} \geq d \geq 2.7\text{\AA}$	10804	2.83	3.49	I6.0
модифи- кация	$m_{\text{НЧ}} F_0 e^{i\varphi_{\text{НЧ}}}$ , $d > 10.0\text{\AA}$					
смешан. модели (2 этап)	2.7	$m_{\text{МЧ}} F_0 e^{i\varphi_{\text{МЧ}}}$ , $10.0\text{\AA} \geq d \geq 2.7\text{\AA}$	10804	3.07	3.66	I7.3
						0.46
						I3.4

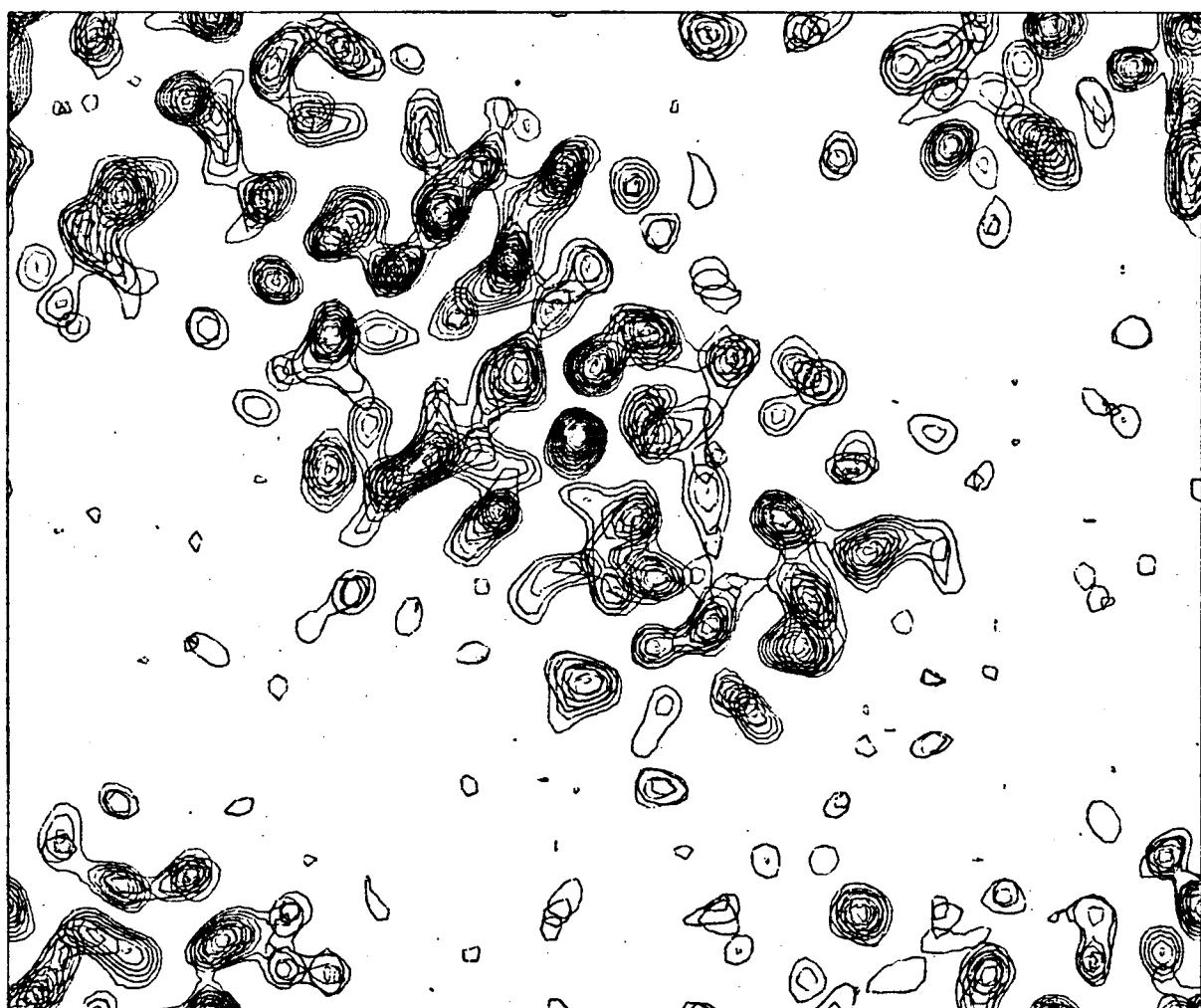


Рис. I5. Изображение функции распределения электронной плотности в  $\gamma$ -кристаллине Ш.ху -сечение,  $z = (27+30)/144$ . Набор фаз определен по модифицированной смешанной модели  $M_{II9}$ , разрешение  $2.7 \text{ \AA}$ .

$\varphi$  и  $\psi$  внутри либо вблизи допустимых областей. Среднеквадратичное отклонение длин связей от стандартных составило 0.18 Å, значение R-фактора - 0.46.

Эффективность метода была продемонстрирована на каждом из трех этапов улучшения фаз. Последовательное улучшение синтеза от этапа к этапу демонстрируется как визуально (рис. 6, I0, I3, I5), так и рядом числовых характеристик (таблица I3). Об этом же свидетельствует расширение частичной атомной модели при переходе от одного этапа к следующему. Суммарный эффект выражается переходом от невозможности построения атомной модели к построению практически полной модели и возможности обычного кристаллографического уточнения ее параметров.

## ГЛАВА 6

### УЛУЧШЕНИЕ НАБОРА ФАЗ СТРУКТУРНЫХ ФАКТОРОВ ДЛЯ АСПАРТАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ

#### 6.1. Общие сведения об аспартат-аминотрансферазе.

Аспартат-аминотрансфераза - один из ключевых ферментов метаболизма азота в живых организмах и один из наиболее изученных витамин В<sub>6</sub>-зависимых ферментов.

Химические и физико-химические исследования аспартат-аминотрансферазы позволили выявить основные стадии ферментативного трансаминирования и сделать ряд предположений о механизме этой катализитической реакции. Всестороннее изучение динамического механизма действия аспартат-аминотрансферазы

невозможно без знания пространственной структуры молекулы фермента.

Изучение пространственной структуры цитозольной куриной аспартат-аминотрансферазы ведется в Институте кристаллографии АН СССР под руководством академика Б.К.Вайнштейна. Кристаллы фермента принадлежат к пространственной группе симметрии  $P2_12_12_1$  и имеют параметры элементарной ячейки  $a=62.7 \text{ \AA}$ ,  $b=118.1 \text{ \AA}$ ,  $c=124.5 \text{ \AA}$  [237]. Молекула аспартат-аминотрансферазы состоит из двух химически идентичных субъединиц по 411 аминокислотных остатков, связанных преобразованием локальной симметрии [238]. Использование данных по изоморфным производным позволило В.В.Борисову и соавторам построить карты распределения электронной плотности при разрешении  $3.5 \text{ \AA}$  [II] и по ним определить ход полипептидной цепи и приближенные значения координат  $C_\alpha$ -атомов.

При расчете синтеза электронной плотности использовались данные лишь по приблизительно 12000 отражений в то время, как полный набор содержал значения модулей для приблизительно 22000 отражений разрешением до  $2.8 \text{ \AA}$ . Улучшение набора фаз должно было привести к улучшению синтеза, в частности, за счет перехода к более высокому разрешению, и к облегчению анализа карт при построении атомной модели. Для улучшения набора фаз был использован метод построения и модификации грубой атомной модели.

## 6.2. Построение грубой модели.

При улучшении набора фаз для такого достаточно сложного объекта, как аспартат-аминотрансфераза, необходимо было использовать имеющуюся дополнительную информацию, в частности,

наличие локальной симметрии и координаты  $C_\alpha$ -атомов.

Предварительно для экспериментально определенных значений модулей структурных факторов из графика Вильсона [I, 226] был определен коэффициент приведения к абсолютной шкале. Одновременно было определено среднее значение температурного фактора атомов  $B_{AV} = 35 \text{ \AA}^2$ . Это значение было приписано  $C_\alpha$ -атомам, и по имеющемуся набору координат  $\vec{s}$  и значений температурного фактора  $B_j = B_{AV} = 35 \text{ \AA}^2$  был рассчитан набор структурных факторов  $\{F_{CA}(\vec{s}) e^{i\varphi_{CA}(\vec{s})}\}$ .

Вычитание вклада  $C_\alpha$ -атомов из имеющегося синтеза электронной плотности осуществлялось путем построения разностного синтеза с коэффициентами Фурье

$$F(\vec{s}) e^{i\varphi(\vec{s})} = F_o(\vec{s}) e^{i\varphi_o(\vec{s})} - F_{CA}(\vec{s}) e^{i\varphi_{CA}(\vec{s})}, \quad 1/|\vec{s}| \geq 3.5 \text{ \AA} \quad (\text{II8})$$

В расчет синтеза вошло 12102 отражения. Синтез был построен в абсолютной шкале, максимальное значение  $Q_{MAX} = 1.34 \text{ e/}\text{\AA}^3$ .

Построение грубой модели велось только для одной субъединицы, для чего была определена занимаемая ею область. Область определялась как объединение окрестностей радиусом 4  $\text{\AA}$  центров  $C_\alpha$ -атомов. Вне данной области функция распределения электронной плотности была занулена.

По зануленному таким образом синтезу были определены значения температурного фактора и координат центров 3599 фiktивных атомов с параметрами изображения  $C_o = 15.8 \text{ e}$  и  $B_o = 111.9 \text{ \AA}^2$ . Максимальное и среднее значения температурного фактора были достаточно большими и составляли соответственно 129.7  $\text{\AA}^2$  и 44.0  $\text{\AA}^2$ . Как подтвердилось позднее, это было вызвано ошибкой в приведении экспериментальных данных к абсолютной шкале — коэффициент приведения был занижен приблизи-

тельно в 1.3 раза. При построении следующих синтезов эта ошибка была исправлена.

Таким образом, с учетом  $C_{\alpha}$ -атомов и наличия локальной симметрии, была сконструирована исходная модель  $M_0$ , состоявшая из 8018 фиктивных атомов, которая и явилась объектом последующей модификации.

### 6.3. Модификация грубой модели.

Дополнительные осложнения при работе с аспартат-аминотрансферазой возникали из-за ее достаточно больших размеров. В частности, используемая программа уточнения не позволяла одновременно модифицировать параметры всех атомов грубой модели. Поэтому было принято решение разделить модель на два компонента и поочередно модифицировать их с учетом вклада зафиксированного компонента в значения структурных факторов. В качестве такого разбиения было удобным использовать естественное разделение молекулы на две субъединицы.

Всего было проведено 4 этапа модификации модели, перемежавшихся реконструкцией очередной модифицированной модели по разностному синтезу. Модификация велась в зонах  $d \geq 3.5 \text{ \AA}$ ,  $d \geq 3.0 \text{ \AA}$ ,  $d \geq 2.8 \text{ \AA}$ . При модификации на первых двух этапах средний температурный фактор атомов субъединицы, изменявшейся первой, имел тенденцию устанавливаться ниже значения для второй субъединицы. Это может быть объяснено тем, что в области пересечения субъединиц участки максимумов синтеза в первую очередь занимали атомы первой субъединицы, а атомы второй субъединицы из этих участков вытеснялись. В результате удаления по ходу модификации атомов с высоким значением температурного фактора в первой субъединице оставалось фик-

тивных атомов больше, чем во второй.

На этапах 3 и 4 в модель вводился дополнительный компонент, и модификация велась поочередно уже для всех имеющихся компонентов.

Подробно ход модификации отражен в таблице I4.

#### 6.4. Использование разностных синтезов.

Анализ промежуточных результатов улучшения набора фаз после окончания второго и третьего этапов показал, что разрешение синтезов реально повысилось по сравнению с исходным. Однако на контрольном участке синтеза, содержащем одну из  $\alpha$ -спиралей, в ряде мест появились разрывы изображения полипептидной цепи. Третий и четвертый этапы модификации грубой модели имели своей целью устранение этих разрывов. Соответственно, разностные синтезы перед этими этапами строились с целью дополнения грубой модели фиктивными атомами в местах разрывов. К сожалению, по-видимому, из-за методически не до конца разработанного в то время вопроса построения разностных синтезов ( п. 2.4 ) дополнение грубой модели проводилось недостаточно эффективно, и отдельных разрывов в изображении цепи избежать не удалось.

При построении первого разностного синтеза использовался набор усредненных значений параметров ( координат и температурного фактора )  $C_\alpha$ -атомов. Усреднение значений по наборам, соответствующим двум субъединицам, проводилось следующим образом.

- I) Если температурный фактор для одного из пары  $C_\alpha$ -атомов был меньше  $20 \text{ \AA}^2$ , а для другого – больше  $60 \text{ \AA}^2$ , то в качестве новых значений параметров использовались значения

Таблица I4. План модификации грубой атомной модели аспартат-аминотрансферазы.

МОДИФИ- ЦИРУЕМАЯ МОДЕЛЬ	ВСЕГО	КОЛИЧЕСТВО АТОМОВ В КОМПОНЕНТАХ			ЗОНА МОДИФИ- КАЦИИ, Å	КОЛ-ВО ОТРА- ЖЕНИЙ	КОЛ-ВО ЦИКЛОВ МОДИФ. (B+X)	УРОВЕНЬ СРЕЗКИ, Å <sup>2</sup>	R-ФАКТОР, % ИСК.   ФИН.	
		I	2	3						
M <sub>0</sub>	8018	4009	4009	-	-	3.5-10.0	II542	2 + 3	-	49.9 24.5
M <sub>2</sub>	8018	4009	4009	-	-	3.5-10.0	II542	2 + 3	III	24.5 21.8
M <sub>4</sub>	7706	3864	3842	-	-	3.0-10.0	I8227	2 + 3	100/III	34.8 27.6
M <sub>6</sub>	7473	3664	3809	-	-	2.8-30.0	22507	2 + 3	90/95	40.0 34.1
M <sub>8</sub>	6518	3356	3162	-	-	-	22507	-	-	34.1 -
M <sub>10</sub>	8090	4299	3791	-	-	3.0-10.0	I8227	2 + 3	-	46.6 36.0
M <sub>12</sub>	8090	4299	3791	-	-	3.0-10.0	I8227	2 + 3	80	36.0 30.5
M <sub>14</sub>	7588	3942	3646	-	-	2.8-10.0	2I947	2 + 3	60	37.1 30.0
M <sub>16</sub>	6785	3558	3227	-	-	-	2I947	-	55	30.0 -

Таблица 14. ( Продолжение ).

$M_{17}^3$	8544	3437	3024	2083	-	-	-	-	-	27.2	-
$M_{17}^3$	2083	-	-	2083	-	2.8-10.0	21947	2 + 3	60	27.2	25.2
$M_{19}^3$	1886	-	-	1886	-	2.8-10.0	21947	2 + 3	55	23.4	22.5
$M_{21}^3$	1706	-	-	1706	-	2.8-10.0	21947	2 + 3	50	25.2	22.6
$M_{23}^*$	8491	3558	3227	1706	-	2.8-10.0	21947	2 + 3	50	22.8	21.6
$M_{25}$	7793	3305	2874	1614	-	2.8-10.0	21947	2 + 3	45	21.7	20.5
$M_{27}$	7313	3178	2682	1453	-	-	21947	-	-	20.5	-
$M_{28}$	10546	3178	2682	1453	3233	-	II542	-	-	40.3	-
$M_{28}^4$	3233	-	-	-	3233	3.5-10.0	II542	2 + 3	-	40.3	23.0
$M_{30}^4$	3233	-	-	-	3233	3.5-10.0	II542	2 + 3	55	23.0	17.4
$M_{32}^4$	3166	-	-	-	3166	3.0-10.0	18227	2 + 3	50	23.3	18.2
$M_{34}^4$	3038	-	-	-	3038	2.8-10.0	21947	2 + 3	45	20.8	18.3
$M_{36}^4$	2868	-	-	-	2868	-	21947	-	-	18.3	-

\*) Модель  $M_{23}$  состоит из атомов модифицированных компонентов  $M_{16}^1$ ,  $M_{16}^2$  и  $M_{21}^3$ .

Таблица 14. ( Продолжение ).

$M_{36}^*$	10181	3178	2682	4321	-	2.8-10.0	21947	2 + 3	35	19.7	I5.5
$M_{38}$	9498	2881	2296	4321	-	2.8-10.0	21947	2 + 3	25	I7.8	I8.8
$M_{40}$	7947	2609	1916	3422	-	-	21947	-	-	I8.8	-

\*<sup>k)</sup> Модель  $M_{36}$  состоит из атомов модифицированных компонентов  $M_{36}^1=M_{28}^1$ ,  $M_{36}^2=M_{28}^2$  и

$$M_{36}^3=M_{28}^3+M_{36}^4.$$

координат и температурного фактора первого атома.

2) В остальных случаях новые значения координат и температурного фактора получались линейной комбинацией соответствующих величин пары атомов. Коэффициенты линейной комбинации выбирались обратно пропорциональными значениям температурного фактора.

Полученный таким образом набор параметров размножался на обе субъединицы преобразованием локальной симметрии.

При построении последнего, третьего разностного синтеза использовался новый набор фаз  $\{\Psi_{AV}(\vec{s})\}$  структурных факторов разрешением до  $3.5 \text{ \AA}$ . Этот набор был получен в Институте кристаллографии АН СССР из исходного набора методом усреднения функции распределения электронной плотности по локальной симметрии [II2]. Данная работа проводилась независимо от улучшения набора фаз с помощью грубой модели.

В остальном построение дополнительных фиктивных атомов по разностным синтезам велось обычным путем. Основные параметры дополнительных построений приведены в таблице I5.

#### 6.5. Построение и анализ заключительного синтеза.

Набор фаз  $\{\Psi_{40}(\vec{s})\}$  структурных факторов, рассчитанных по последней грубой модели  $M_{40}$ , был передан в Институт кристаллографии АН СССР для дальнейшей работы. По имевшимся данным был рассчитан синтез электронной плотности разрешением  $2.8 \text{ \AA}$ , где в качестве значений фаз коэффициентов Фурье разрешением до  $3.5 \text{ \AA}$  использовались фазы  $\Psi_{AV}(\vec{s})$ , полученные путем усреднения функции распределения электронной плотности по локальной симметрии, а для остальных коэффициентов фазы брались равными  $\Psi_{40}(\vec{s})$ . С данным синтезом была повторена

Таблица 15. Характеристики синтезов для построения грубых моделей аспартат-аминотрансферазы.

синтез	разре- шение, $\text{\AA}$	коэффициенты Фурье	кол-во отра- жений	зануле- ние вне I субъед.	$\rho_{\text{MAX}}$	$\rho_{\text{AV}}$	$\rho_{\text{сгт}}$	$B_o$ , $e/\text{\AA}^3$	$C_o$ , $e$	опреде- лено атомов
исходный	3.5	$F_0 e^{i\varphi_0} - F_{CA} e^{i\varphi_{CA}}$	12102	да	1.34	0.05	0.18	III.9	15.8	$2 \times 3599$
I-й раз- ностный	3.0	$F_0 e^{i\varphi_8} - F_9 e^{i\varphi_9}$	18787	да	2.75	0.01	0.28	66.4	12.2	$2 \times 2360$
2-й раз- ностный	2.8	$F_0 e^{i\varphi_0} - F_{17} e^{i\varphi_{17}},$ $d > 10.0 \text{\AA}$	22507	нет	1.10	0.00	0.39	54.7	II.4	2083
3-й раз- ностный	3.5	$F_0 e^{i\varphi_{AV}} - F_{27} e^{i\varphi_{27}}$	12122	нет	2.03	0.00	0.42	III.9	15.8	3233

процедура пересчета фаз ( уже полного набора структурных факторов разрешением до  $2.8 \text{ \AA}$  ) путем усреднения синтеза по локальной симметрии, и с пересчитанными фазами был построен заключительный синтез разрешением  $2.8 \text{ \AA}$ .

По сравнению с исходным синтезом заметно было реальное повышение разрешения. Основной яркой деталью, подтверждающей эффект улучшения синтеза, было появление сгущений электронной плотности по ходу полипептидной цепи, расположенных с периодом  $3.8 \text{ \AA}$ .

## ВЫВОДЫ

1. Разработана методика улучшения наборов фаз структурных факторов макромолекул при среднем разрешении. Улучшение набора фаз производится путем построения и модификации грубой либо смешанной атомной модели исследуемой структуры.
2. Разработано и создано программное обеспечение метода.
3. Предложенная методика опробована на данных по известной структуре белка актинидин. Продемонстрирована эффективность метода для расширения набора фаз и для уточнения зашумленных значений фаз.
4. Методика улучшения набора фаз путем построения и модификации грубой модели использована для улучшения набора фаз структурных факторов белка  $\gamma$ -кристаллин Шь. Улучшение набора фаз позволило приступить к построению атомной модели структуры.

5. Использование методики улучшения набора фаз путем построения и модификации смешанной атомной модели позволило практически завершить построение атомной модели  $\gamma$ -кристаллина Ш и перейти к обычному кристаллографическому уточнению этой модели.
6. Расширение набора фаз структурных факторов аспартат-аминотрансферазы с  $3.5 \text{ \AA}$  до  $2.8 \text{ \AA}$  позволило реально повысить разрешение синтеза электронной плотности и облегчить работу по построению и анализу атомной модели.

В заключение автор выражает глубокую благодарность доктору биологических наук Ю.Н.Чиргадзе и кандидату физико-математических наук В.Ю.Лунину за научное руководство при выполнении данной работы;

заведующему лабораторией вычислительной математики НИВЦ АН СССР д.ф.-м.н. Э.Э.Шнолю - за внимание к данной работе;

сотрудникам лаборатории структурного анализа Института белка АН СССР к.ф.-м.н. Ю.В.Сергееву, к.ф.-м.н. Н.А.Невской и Н.П.Фоменковой и сотруднику лаборатории структуры белка Института кристаллографии АН СССР к.ф.-м.н. В.В.Борисову - за предоставленный экспериментальный материал и плодотворные обсуждения методики и результатов;

сотруднику лаборатории вычислительной математики НИВЦ АН СССР Е.А.Вернословой - за помощь в разработке программного обеспечения и выполнении ряда расчетов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бландел Т., Джонсон Л. Кристаллография белка. М.: "Мир", 1979.
2. Green D.W., Ingram V.M., Perutz M.F. The structure of haemoglobin. IV. Sign determination by the isomorphous replacement method. Proc. Roy. Soc., 1954, v.A225, p.287-307.
3. Blake C.C.F., Koenig D.F., Mair G.A., North A.C.T., Phillips D.C., Sarma V.R. Structure of hen egg-white lysozyme. Nature, 1965, v.206, p.757-761.
4. Rossmann M.G. Molecular replacement method. - New York, London, Paris: Gordon and Breach, 1972.
5. Gull S.F., Daniell G.J. Image reconstruction from incomplete and noisy data. Nature, 1978, v.272, p.686-690.
6. Agarwal R.C., Isaacs N.W. Method for obtaining a high resolution protein map starting from a low resolution map. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, v.74, N 7, p.2835-2839.
7. Боровиков В.А., Вайнштейн Б.К., Гельфанд И.М., Калинин Д.И. Применение методов минимизации функций многих переменных к рентгеноструктурному анализу белков. Кристаллография, 1979, т.24, вып.2, с.227-233.
8. Калинин Д.И. О восстановлении электронной плотности частично расшифрованной структуры. - М., 1981.-14 стр. (Препринт/Институт прикладной математики, № II7).
9. Bernstein F.C., Koetzle T.F., Williams G.J.B., Meyer E.F., Jr., Brice M.D., Rodgers J.R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M. A Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. J. Molec. Biol., 1977, v.112, p.535-542.

10. Chirgadze Yu.N., Sergeev Yu.V., Fomenkova N.P., Oreshin V.D. Polypeptide chain pathway in  $\beta$ -crystallin IIIb from calf lens at 3 Å resolution. FEBS Letters, 1981, v.131, N 1, p.81-84.
11. Borisov V.V., Borisova S.N., Sosfenov N.I., Vainstein B.K. Electron density map of chicken heart cytosol aspartate transaminase at 3.5 Å resolution. Nature, 1980, v.284, p.189-190.
12. Sayre D. The squaring method: a new method for phase determination. Acta Crystallogr., 1952, v.5, p.60-65.
13. Cochran W. A relation between the signs of structure factors. Acta Crystallogr., 1952, v.5, p.65-67.
14. Hughes E.W. The signs of product of structure factors. Acta Crystallogr., 1953, v.6, p.871.
15. Karle J., Hauptman H. A theory of phase determination for the four types of non-centrosymmetric space groups 1P222, 2P222, 3P<sub>1</sub>2, 3P<sub>2</sub>2. Acta Crystallogr., 1956, v.9, p.635-651.
16. Karle J., Karle I.L. The symbolic addition procedure for phase determination for centrosymmetric and noncentrosymmetric crystals. Acta Crystallogr., 1966, v.21, p.849-859.
17. Giacovazzo C. A probabilistic theory in P̄ of the invariant  $E_h E_k E_l E_{h+k+l}$ . Acta Crystallogr., 1975, v.A31, p.252-259.
18. Бахвалов Н.С. Численные методы.- М.: "Наука", 1975.
19. Woolfson M.M. An equation between structure factors for structures containing unequal or overlapped atoms. I. The equation and its properties. Acta Crystallogr., 1958,

v.11,p.277-283.

20. Rothbauer R. Zur Teorie der Strukturfactorrelationen.II. Neues Jahrb.Miner.Monatsh, 1975, v.3, p.121-134.
21. Rothbauer R. An empirical test of a convolution-type structure-factor equation. Acta Crystallogr., 1975, v.A31, S20.
22. Rothbauer R. An empirical test of a convolution-type structure-factor equation. Acta Crystallogr., 1976, v.A32, p.169-170.
23. Krabbendam H.,Kroon J. A step-by-step algorithm for phase refinement with the aid of Sayre's equation. Acta Crystallogr., 1971, v.A27, p.48-53.
24. Sayre D. Least-squares phase refinement.II.High-resolution phasing of a small protein. Acta Crystallogr., 1974, v.A30, p.180-184.
25. Sint L.,Schenk H. Phase extension and refinement in non-centrosymmetric structures containing large molecules. Acta Crystallogr., 1975, v.A31,S22.
26. Olthof G.J.,Sint L.,Schenk H. Phase extension and refinement. Acta Crystallogr., 1979, v.A35, p.941-946.
27. Allegra G.,Colombo A. A new figure of merit for multi-solution methods of phase determination. Acta Crystallogr., 1974, v.A30, p.727-729.
28. Schenk H. The relation between space group symmetry and the properties of direct solution based on the  $\sum_2$  formula. A method for using centrosymmetric  $\sum_2$  solution for solving non-centrosymmetrical structures. Acta Crystallogr., 1972, v.A28, p.412-422.

29. Hull S.E., Irwin M.J. On the application of phase relationships to complex structures.XIV.The additional use of statistical information in tangent-formula refinement. *Acta Crystallogr.*, 1978, v.A34, p.863-870.
30. Giacovazzo C. A theoretical weighting scheme for tangent-formula development and refinement and Fourier synthesis. *Acta Crystallogr.*, 1979, v.A35, p.757-764.
31. Karle I.L., Karle J. An application of the symbolic addition procedure to space group  $P2_1$  and the structure of the alkaloid panamine,  $C_{20}H_{33}N_3$ . *Acta Crystallogr.*, 1966, v.21, p.860-868.
32. Coulter C.L. A possible new method for the determination of crystallographic phases for proteins. *J.Molec.Biol.*, 1965, v.12, p.292-295.
33. Cooley J.W., Tukey J.W. An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series. *Math.Comput.*, 1965, v.19, p.297-301.
34. Weinzierl J.E., Eisenberg D., Dickerson R.E. Refinement of protein phases with the Karle-Hauptman tangent-formula. *Acta Crystallogr.*, 1969, v.B25, p.380-387.
35. Reeke G.N., Jr., Lipscomb W.N. On the use of the tangent formula to extend the resolution of protein phases. *Acta Crystallogr.*, 1969, v.B25, p.2614-2623.
36. Coulter C.L. Tangent formula applications in structural biochemistry. *Acta Crystallogr.*, 1969, v.A25, S190.
37. Coulter C.L., Dewar R.B.K. Tangent formula applications in protein crystallography: an evaluation. *Acta Crystallogr.*, 1971, v.B27, p.1730-1740.

38. Olthof G.J., Schenk H. On the phase extension and refinement of metmyoglobin using direct methods. *Acta Crystallogr.*, 1981, v.A37, S, C-15.
39. Olthof G.J., Schenk H. Phase extension and refinement.II. Application to metmyoglobin 2.0 Å data. *Acta Crystallogr* 1982, v.A38, p.117-122.
40. Bywater R.P., Carlisle C.H., Gorinsky B.A., Palmer R.A. Ribonuclease. *Acta Crystallogr.*, 1969, v.A25, S189.
41. Hendrickson W.A., Love W.F., Karle J. Crystal structure analysis of sea lamprey hemoglobin at 2 Å resolution. *J.Molec.Biol.*, 1973, v.74, p.331-361.
42. Hendrickson W.A. Use of tangent-formula in phase determination for proteins. *Trans.Am.Crystallogr.Assoc.*, 1973, v.9, p.61-83.
43. Hendrickson W.A., Karle J. Carp muscle calcium-binding protein.III. Phase refinement using the tangent-formula. *J.Biol.Chem.*, 1973, v.248, p.3327-3334.
44. Hendrickson W.A. Quantification of phase improvement in the tangent formula application to carp muscle calcium-binding protein. *J.Molec.Biol.*, 1975, v.91, p.226-228.
45. Tickle I.J., Glover I.D., Pitts J.E., Wood S.P., Blundell T.L. Refinement of avian pancreatic polypeptide at 0.98Å resolution. *Acta Crystallogr.*, 1981, v.A37, S, C-14.
46. Hoppe W. Eine "Phasen verfeinerung" in der Kristallstrukturanalyse. *Z.Kristallogr.*, 1969, v.118, p.121-126.
47. Sayre D. On least-square refinement of the phases of crystallographic structure factors. *Acta Crystallogr.*, 1972, v.A28, p.210-212.

48. Krabbendam H., Kroon J. A step-by-step algorithm for phase refinement with the aid of Sayre's equation. *Acta Crystallogr.*, 1969, v.A25, S75-S76.
49. Gassmann J. Least-squares refinement of phases in direct and reciprocal space. *Acta Crystallogr.*, 1976, v.A32, p.274-280.
50. Sayre D., Toupin R. Major increase in speed of least-squares phase refinement. *Acta Crystallogr.*, 1975, v.A31, S 20.
51. Sayre D. Recent developments in the technique of least-squares phase refinement based on squaring-method equations; overview of other direct methods available for the phasing of protein crystal diffraction data. In: "Crystallographic Computing Techniques" (Ahmed F.R., Huml K., Sedlacek B., eds.). Copenhagen: Munksgaard, 1976, p.322-327.
52. Ким К.В., Нестеров Ю.Е., Черкасский Б.В. Оценка трудоемкости вычисления градиента. Докл.АН СССР, 1984, т.275, № 6, с.1306-1309.
53. Лунин В.Ю., Уржумцев А.Г. Конструирование программ для уточнения атомной структуры макромолекул на базе алгоритмов быстрого преобразования Фурье и быстрого дифференцирования. Пущино, 1983.- 23 стр. (Препринт/ОНТИ НЦБИ).
54. Lunin V.Yu., Urzhumtsev A.G. Program construction for refinement of the atomic structure of macromolecules based on the fast differentiation algorithm. *Acta Crystallogr.*, 1984, v.A40, S, C-18.
55. Лунин В.Ю. Использование алгоритма быстрого дифференцирования в задаче уточнения значений фаз структурных факторов. Пущино, 1984.- 14 стр. (Препринт/ОНТИ НЦБИ).

56. Cutfield J.F., Dodson E.J., Dodson G.G., Hodgkin D.C., Isaacs N.W., Sakabe K., Sakabe N. The high resolution structure of insulin: a comparison of results obtained from least-squares phase refinement and difference Fourier refinement. *Acta Crystallogr.*, 1975, v.A31, S21.
57. Сэйр Д. Расширение области значений фаз и их уточнение с помощью систем уравнений типа свертки. В: "Прямые методы в рентгеновской кристаллографии" (Лэдд М., Палмер Р., ред.). М.: "Мир", 1983, с. 268-282.
58. Qurashi M.M. An extension of the inequalities method of sign determination by means of negative-density transforms. *Acta Crystallogr.*, 1953, v.6, p.103.
59. Hoppe W. Phasenbestimmung durch Quadrierung der Elektronendichte im Bereich von 2 Å- bis 1,5 Å- Auflösung. *Acta Crystallogr.*, 1962, v.15, p.13-17.
60. Hoppe W., Gassmann J. Phasenbestimmung an Proteinen im Bereich von 2-Å-bis 1,5-Å-Auflösung. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 1964, v.68, p.808-817.
61. Lipson H., Cochran W. The determination of crystal structures. 3-rd edition. London: Bell and Sons, 1966.
62. Gold B., Rader C.M. Digital processing of signals. New York: McGraw-Hill, 1969.
63. Collins D.M. Efficiency in Fourier phase refinement for protein crystal structures. *Acta Crystallogr.*, 1975, v.A31, p.388-389.
64. Hoppe W., Gassmann J. Phase correction, a new method to solve partially known structures. *Acta Crystallogr.*, 1968, v.B24, p.97-107.

65. Kartha G. Phase refinement and extension by Fourier transform. *Acta Crystallogr.*, 1969, v.A25, S87.
66. Barrett A.N., Zwick M. A method for the extension and refinement of crystallographic protein phases utilizing the Fast Fourier transform. *Acta Crystallogr.*, 1971, v.A27, p.6-11.
67. Gassmann J., Zechmeister K. Limits of phase expansion in direct methods. *Acta Crystallogr.*, 1972, v.A28, p.270-280.
68. Gassmann J. Real-space analogue of reflexion quartets. *Acta Crystallogr.*, 1975, v.A31, p.825-831.
69. Simonov V.I., Sirota M.I., Tovbis A.B. Automation of the superposition method for analysis of the Patterson function. *Acta Crystallogr.*, 1975, v.A31, S10.
70. Simonov V.I. Phase refinement by the method of modification and Fourier transformation of an approximate electron density distribution. In: "Crystallographic Computing Techniques" (Ahmed F.R., Huml K., Sedlacek B., eds.). Copenhagen: Munskgaard, 1976, p.138-143.
71. Nixon P.E., North A.C.T. Crystallographic relationship between human and hen-egg lysozymes. II. Weighting of electron-density maps phased from an incomplete model structure and comparison with map obtained by isomorphous replacement. *Acta Crystallogr.*, 1976, v.A32, p.325-333.
72. Вайнштейн Б.К., Хачатуян А.Г. Нахождение фаз структурных амплитуд методом модификации нормированных распределений электронной плотности. I. Теоретические основы метода. *Кристаллография*, 1977, т.22, с.706-710.

73. Hoppe W., Gassmann J., Zechmeister K. Some automatic procedures for the solution of crystal structures with direct methods and phase corrections. In: "Crystallographic Computing" (Ahmed F.R., Hall S.R., Huber C.P., eds.). Copenhagen: Munksgaard, 1970, p.26-36.
74. Сирота М.И., Симонов В.И. Уточнение фаз структурных амплитуд при расшифровке кристаллических структур суперпозиционным методом. Кристаллография, 1970, т.15, с.681-685.
75. Gassmann J. Improvement and extension of approximate phase set in structure determination. In: "Crystallographic Computing Techniques" (Ahmed F.R., Huml K., Sedlacek B., eds.). Copenhagen: Munksgaard, 1976, p.144-154.
76. Zwick M., Bantz D., Hughes J. Enhancing the power of density modification. Ultramicroscopy, 1976, v.1, p.275-277.
77. Вайнштейн Б.К., Хачатуян А.Г., Каюшина Р.Л., Смирнов М.А., Андрушевский Н.М. Нахождение фаз структурных амплитуд методом модификации нормированных распределений электронной плотности. I. Проверка метода на модельном кристалле. Кристаллография, 1977, т.22, с.711-713.
78. Буквецкая Л.В., Шишова Т.Г., Андрианов В.И., Симонов В.И. Автоматизированная процедура уточнения фаз структурных амплитуд. Кристаллография, 1977, т.22, вып. 3, с.494.
79. Collins D.M., Cotton F.A., Hasen E.E., Jr., Meyer E.F., Jr., Morimoto C.N. Protein crystal structures - quicker, cheaper approaches. Science, 1975, v.190, p.1047-1052.
80. Collins D.M., Brice M., la Cour T., Legg M., Fourier phase refinement and extension by modification of electron-density maps. In: "Crystallographic Computing Techniques" (Ahmed F.R., Huml K., Sedlacek B., eds.). Copenhagen:

- Munksgaard, 1976, p.330-335.
81. Cannillo E., Oberti R., Ungaretti L. Phase extension and refinement by density modification in protein crystallography. *Acta Crystallogr.*, 1983, v.A39, p.68-74.
  82. Mavridis I.M., Hatada M.H., Tulinsky A., Lebioda L. Structure of 2-keto-3-deoxy-6-phosphoglucanate aldolase at 2.8 Å resolution. *J.Molec.Biol.*, 1982, v.162, p.419-444.
  83. Radhavan N.V., Tulinsky A. The structure of  $\alpha$ -chymotrypsin. II. Fourier phase refinement and extension of the dimeric structure at 1.8 Å resolution by density modification. *Acta Crystallogr.*, 1979, v.B35, p.1776-1785.
  84. Schevitz R.W., Podjarny A.D., Zwick M., Hughes J.J., Sigler P.B. Improving and extending the phases of medium- and low-resolution macromolecular structure factors by density modification. *Acta Crystallogr.*, 1981, v.A37, p.669-677.
  85. Schevitz R.W., Podjarny A.D., Zwick M., Hughes J., Westbrook E.M., Feldman D., Sigler P.B. Phase improvement by density modification in three large structures. *Acta Crystallogr.*, 1981, v.A37, S, C-15.
  86. Bentley G.A., Lewit-Bentley A. Crystal structure of the nucleosome core particle at 16 Å resolution. *J.Molec.Biol.*, 1984, v.176, N 1, p.55-75.
  87. Davies A.R., Rollett J.S. Phase extension by means of the square root of the electron density. *Acta Crystallogr.*, 1976, v.A32, p.17-23.
  88. Biraud Y. A new approach for increasing the resolution power by data processing. *Astr.Astrophys.*, 1969, v.1, p.124-127.

89. Karle J., Hauptman H. The phases and magnitudes of the structure factors. *Acta Crystallogr.*, 1950, v.3, p.181-187.
90. Achieser N., Krein M. Über Fouriersche Reihen beschränkter summierbarer Funktionen und ein newes Extremumproblem (I Teil). Труды мат.общества, Харьков, 1934, сер.4, № 9, с.9-28.
91. Achieser N., Krein M. Über eine Transformation der rullen Toeplitzschen Formen und das Momentenproblem in einem endlichen Intervalle. Труды мат.общества, Харьков, 1935, сер.4, № II, с.21-26.
92. De Rango C., Tsoucaris G., Zelwer C. Two new methods for crystal structure determination. *Acta Crystallogr.*, 1969, v.A25, S85.
93. Tsoucaris G. Lois de probabilités composees conditionnelles et determinants de Karle et Hauptman. *C.R.Acad. Sci., Paris*, 1969, v.B268, p.875-877.
94. De Rango C., Tsoucaris G., Zelwer C. Determination directe des signes des facteurs de structure par la methode du "determinant maximal". *C.R.Acad.Sci., Paris*, 1969, v.B268, p.1090-1093.
95. Tsoucaris G. A new method for phase determination. The "Maximum Determinant Rule". *Acta Crystallogr.*, 1970, v.A26, p.492-499.
96. Mauguin Y., de Rango C., Tsoucaris G. Full use of symmetry in the maximum-determinant rule. *Acta Crystallogr.*, 1973, v.A29, p.574-575.

97. Heinerman J.J.L. The joint probability distribution of structure factors: the first order terms. *Acta Crystallogr.*, 1975, v.A31, S14.
98. Knossow M., de Rango C., Mauguen Y., Sarrasin M., Tsoucaris G. New algebraic and probabilistic relations between structure factors and direct space information. *Acta Crystallogr.*, 1977, v.A33, p.119-125.
99. Podjarny A.D., Yonath A. Use of matrix direct methods for low-resolution phase extension for tRNA. *Acta Crystallogr.*, 1977, v.A33, p.655-661.
100. Podjarny A.D., Faerman C. A new determinantal theory for solving the phase problem using stereochemical information. *Acta Crystallogr.*, 1981, v.A37, S, C-325.
101. Podjarny A.D., Faerman C. A new determinantal theory for solving the phase problem using stereochemical information. *Acta Crystallogr.*, 1982, v.A38, p.401-407.
102. De Rango C., Mauguen Y., Tsoucaris G. Use of high-order probability laws in phase refinement and extension of protein structures. *Acta Crystallogr.*, 1975, v.A31, p.227-233.
103. De Rango C., Mauguen Y., Tsoucaris G. Application of high order probability laws in phase extension of insulin. *Acta Crystallogr.*, 1975, v.A31, S21.
104. Podjarny A.D., Yonath A., Traub W. Application of multivariate distribution theory to phase extension for a crystalline protein. *Acta Crystallogr.*, 1976, v.A32, p.281-292.

105. Carlisle C.H., Gorinsky B.A., Moss D.S., Palmer R.A. An extension of the heavy atom phase of ribonuclease using the maximum determinant method. *Acta Crystallogr.*, 1975, v.A31, S21.
106. Podjarny A.D., Schevitz R., Sigler P.B. Prediction of very low resolution phases in tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup>. *Acta Crystallogr.*, 1978, v.A34, S47.
107. Schevitz R.W., Podjarny A.D., Krishnamachar N., Hughes J.J., Sigler P.B., Sussmann J.J. Crystal structure of a eukaryotic initiator tRNA. *Nature*, 1979, v.278, p.188-190.
108. Podjarny A.D., Schevitz R.W., Sigler P.B. Phasing low-resolution macromolecular structure factors by matrix direct methods. *Acta Crystallogr.*, 1981, v.A37, p.662-668.
109. Piro O.E. Information theory and the "phase problem" in crystallography. *Acta Crystallogr.*, 1983, v.A39, p.61-68.
110. Steenstrup S. Karle-Hauptman determinants and entropy. *Acta Crystallogr.*, 1984, v.A40, p.66-67.
- III. Апро П., Россман М. Метод молекулярного замещения. В: "Прямые методы в рентгеновской кристаллографии" (Лэдл М., Палмер Р., ред.). М.: "Мир", 1983, с.350-406.
- II2. Вагин А.А. Использование некристаллографической симметрии в структурной кристаллографии белков.-Дисс.на соиск.уч.степ.канд.физ.-мат.наук.-Москва, 1983.-134 стр.
113. Rossmann M.G., Blow D.M. The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallogr.*, 1962, v.15, p.24-31.

114. Rossmann M.G., Blow D.M. Determination of phases by the conditions of non-crystallographic symmetry. *Acta Crystallogr.*, 1963, v.16, p.39-45.
115. Rossmann M.G., Blow D.M. Solution of the phase equations representing non-crystallographic symmetry. *Acta Crystallogr.*, 1964, v.17, p.1474-1475.
116. Main P., Rossmann M.G. Relationships among structure factors due to identical molecules in different crystallographic environments. *Acta Crystallogr.*, 1966, v.21, p.67-72.
117. Rossmann M.G. Application of the molecular replacement equations to the heavy atom technique. *Acta Crystallogr.*, 1967, v.23, p.173.
118. Crowther R.A. A linear analysis of the non-crystallographic symmetry problems. *Acta Crystallogr.*, 1967, v.22, p.758-764.
119. Crowther R.A. The use of non-crystallographic symmetry for phase determination. *Acta Crystallogr.*, 1969, v.B25, p.2571-2580.
120. Main P. Phase determination using non-crystallographic symmetry. *Acta Crystallogr.*, 1967, v.23, p.50-54.
121. Colman P.M. Noncrystallographic symmetry and the sampling theorem. *Z.Kristallogr.*, 1974, b.140, p.344-349.
122. Bricogne G. Geometric sources of redundancy in intensity data and their use for phase determination. *Acta Crystallogr.*, 1974, v.A30, p.395-405.
123. Bricogne G. Methods and programs for direct space exploitation of geometric redundancies. *Acta Crystallogr.*, 1976, v.A32, p.832-847.

124. Bricogne G. Use of non-crystallographic symmetry in structure determination. In: "Crystallographic Computing Techniques" (Ahmed F.R., Huml K., Sedlacek B., eds.). Copenhagen: Munksgaard, 1976, p.239-247.
125. Rayment I., Johnson J.E., Suck D., Akimoto T., Rossmann M.G. An 11 Å resolution electron density map of southern bean mosaic virus. *Acta Crystallogr.*, 1978, v.B34, p.567-578.
126. Matthews B.M., Sigler P.B., Henderson R., Blow D.M. Three-dimensional structure of tosyl- $\alpha$ -chymotrypsin. *Nature*, 1967, v.214, p.652-656.
127. Sigler P.B., Blow D.M., Matthews B.W., Henderson R. Structure of crystalline  $\alpha$ -chymotrypsin.II.A preliminary report including a hypothesis for the activation mechanism. *J.Molec.Biol.*, 1968, v.35, p.143-164.
128. Birktoft J.J., Blow D.M. Structure of crystalline  $\alpha$ -chymotrypsin.V.The atomic structure of tosyl- $\alpha$ -chymotrypsin at 2 Å resolution. *J.Molec.Biol.*, 1972, v.68, p.187-240.
129. Holmgren A., Söderberg B.-O., Eklund H., Bränden C.-I. Three-dimensional structure of Escherichia coli thioredoxin-S<sub>2</sub> to 2.8 Å resolution. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 1975, v.72, N 6, p.2305-2309.
130. Muirhead H., Cox J., Mazzarella L., Perutz M.F. Structure and function of haemoglobin.III.A three-dimensional Fourier synthesis of human deoxyhaemoglobin at 5.5 Å resolution. *J.Molec.Biol.*, 1967, v.28, p.117-156.

131. Buehner M., Ford G.G., Moras D., Olsen K.W., Rossmann M.G. Structure determination of crystalline lobster D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J.Molec.Biol.*, 1974, v.82, N 4, p.563-585.
132. Argos P., Ford G.G., Rossmann M.G. An application of the molecular replacement technique in direct space to a known protein structure. *Acta Crystallogr.*, 1975, v.A31, p.499-506.
133. Fermi G. Three-dimensional Fourier synthesis of human deoxyhaemoglobin at 2.5 Å resolution: refinement of the atomic model. *J.Molec.Biol.*, 1975, v.97, p.237-256.
134. Eventoff W., Hackert M.L., Rossmann M.G. A low-resolution crystallographic study of porcine heart lactate dehydrogenase. *J.Molec.Biol.*, 1975, v.98, p.249-258.
135. Hendrickson W.A., Klippenstein G.L., Ward K.B. Tertiary structure of myohemerythrin at low resolution. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA*, 1975, v.72, p.2160-2164.
136. Ward K.B., Hendrickson W.A., Klippenstein G.L. Quaternary and tertiary structure of haemerythrin. *Nature*, 1975, v.257, p.818-821.
137. Moras D., Olsen K.W., Sabesan M.N., Buehner M., Ford G.G., Rossmann M.G. Studies of asymmetry in the three-dimensional structure of lobster d-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J.Biol.Chem.*, 1975, v.250, p.9137-9162.
138. Fletterick R., Steitz T.A. MIR phase combination and refinement: optimal utilization of phase information in multisubunit system. *Acta Crystallogr.*, 1975, v.A31, S22.

139. Fletterick R.J., Steitz T.A. The combination of independent phase information obtained from separate protein structure determination of yeast hexokinase. *Acta Crystallogr.*, 1976, v.A32, p.125-132.
140. Steitz T.A., Fletterick R.J., Anderson W.F., Anderson C.M. High resolution X-ray structure of yeast hexokinase, an allosteric protein exhibiting a non-symmetric arrangement of subunits. *J.Molec.Biol.*, 1976, v.104, p.197-222.
141. Musick W.D.L., Adams A.D., Rossmann M.G., Wheat T.E., Goldberg E. A low-resolution study of testicular lactate dehydrogenase using the molecular replacement technique. *J.Molec.Biol.*, 1976, v.104, p.659-668.
142. Biesecker G., Harris J.I., Thierry J.C., Walker J.E., Wonacott A.J. Sequence and structure of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Nature*, 1977, v.266, p.328-333.
143. Wright C.S. The crystal structure of wheat germ agglutinin at 2.2 Å resolution. *J.Molec.Biol.*, 1977, v.111, p.439-458.
144. Adman E.T., Stenkamp R.E., Sieker L.C., Jensen L.H. A crystallographic model for azurin at 3 Å resolution. *J.Molec.Biol.*, 1978, v.123, p.35-47.
145. Murthy M.R.N., Garavito R.M., Johnson J.E., Rossmann M.G. Structure of lobster apo-d-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at 3.0 Å resolution. *J.Molec.Biol.*, 1980, v.138, p.859-872.
146. Rees D.C., Lipscomb W.N. Structure of the potato inhibitor complex of carboxypeptidase A at 2.5-Å resolution. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 1980, v.77, N 8, p.4633-4637.

147. Grau U.M., Rossmann M.G., Trommer W.E. The crystallization and the structure determination of an active ternary complex of pig heart lactate dehydrogenase. *Acta Crystallogr.*, 1981, v.B37, p.2019-2026.
148. Szebenyi D.M.E., Obendorf S.K., Moffat K. Structure of vitamin D-dependent calcium-binding protein from bovine intestine. *Nature*, 1981, v.294, p.327-332.
149. Mauguen Y., Hartley R.W., Dodson E.J., Dodson G.G., Briconne G., Chothia C., Jack A. Molecular structure of a new family of ribonucleases. *Nature*, 1982, v.297, p.162-164.
150. Honzatko R.B., Crawford J.L., Monaco H.L., Ladner J.E., Edwards B.F.P., Evans D.R., Warren S.G., Wiley D.C., Ladner R.C., Lipscomb W.N. Crystal and molecular structure of native and CTP-liganded aspartate carbamoyltransferase from *Escherichia coli*. *J.Molec.Biol.*, 1982, v.160, p.219-263.
151. Agard D.A., Stroud R.M.  $\alpha$ -bungarotoxin structure revealed by a rapid method for averaging electron density of non-crystallographically translationally related molecules. *Acta Crystallogr.*, 1982, v.A38, p.186-194.
152. Rossmann M.G., Henderson R. Phasing electron diffraction amplitudes with the molecular replacement method. *Acta Crystallogr.*, 1982, v.A38, p.13-20.
153. Gaykema W.P.J., Hol W.G.J., Vereijken J.M., Soeter N.M., Bak H.J., Beintema J.J. 3.2 Å structure of the copper-containing, oxygen-carrying protein *Pannlirus interruptus* haemocyanin. *Nature*, 1984, v.309, N 5963, p.23-29.

154. Perutz M.F., Fermi G., Shih T.-B. Structure of deoxyhemoglobin cowtow [HisHC3(146) $\beta \rightarrow$  Leu]: origin of the alkaline Bohr effect and electrostatic interactions in hemoglobin. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1984, v.81, p.4781-4784.
155. Pavlovsky A.G., Vagin A.A., Vainstein B.K., Chepurnova N.K., Karpeisky M.Ya. Three-dimensional structure of ribonuclease from *Bacillus intermedius* 7P at 3.2  $\text{\AA}$  resolution. FEBS Letters, 1983, v.162, N 1, p.167-170.
156. Rees D.C. Largest likely values for R-factors calculated after phase refinement by non-crystallographic symmetry averaging. Acta Crystallogr., 1983, v.A39, p.916-920.
157. Rayment I. Molecular replacement method at low resolution: optimum strategy and intrinsic limitations as determined by calculations on icosahedral virus models. Acta Crystallogr., 1983, v.A39, p.102-116.
158. Rayment I., Baker T.S., Caspar D.L.D. A description of the techniques and application of molecular replacement used to determine the structure of polyoma virus capsid at 22.5  $\text{\AA}$  resolution. Acta Crystallogr., 1983, v.B39, p.505-516.
159. Jack A., Harrison S.C., Crowther R.A. Structure of tomato bushy stunt virus.II. Comparison of results obtained by electron microscopy and X-ray diffraction. J.Molec. Biol., 1975, v.97, N 2, p.163-172.
160. Harrison S.C., Jack A. Structure of tomato bushy stunt virus.III. Three-dimensional X-ray diffraction analysis at 16  $\text{\AA}$  resolution. J.Molec.Biol., 1975, v.97, p.173-191.

161. Strandberg B., Lentz D.J., Jr., Kannan K.K., Vaara I., Unge T., Fridborg K., Borell A., Petef G. The structure of satellite tobacco necrosis virus: three-dimensional X-ray diffraction analysis at 10 Å resolution. *Acta Crystallogr.*, 1975, v.A31, S46.
162. Champness J.N., Bloomer A.C., Bricogne G., Butler P.J.G., Klug A. The structure of the protein disc of tobacco virus to 5 Å resolution. *Nature*, 1976, v.259, p.20-24.
163. Johnson J.E., Akimoto T., Suck D., Rayment I., Rossmann M.G. The structure of southern bean mosaic virus at 22.5 Å resolution. *Virology*, 1976, v.75, p.394-400.
164. Winkler F.K., Schutt C.E., Harrison S.C., Bricogne G. Tomato bushy stunt virus at 5.5-Å resolution. *Nature*, 1977, v.265, p.509-513.
165. Bloomer A.C., Champness J.N., Bricogne G., Staden R., Klug A. Protein disc of tobacco mosaic virus at 2.8 Å resolution showing the interaction within and between subunits. *Nature*, 1978, v.276, N 5686, p.362-368.
166. Suck D., Rayment I., Johnson J.E., Rossmann M.G. The structure of southern bean mosaic virus at 5 Å resolution. *Virology*, 1978, v.85, p.187-197.
167. Nordman C.E. Procedures for detection and idealization of non-crystallographic symmetry with application to phase refinement of the satellite tobacco necrosis virus structure. *Acta Crystallogr.*, 1980, v.A36, p.747-754.
168. Stubbs G., Stauffacher C. Protein - RNA interactions in tobacco mosaic virus. *Biophys. Journal*, 1980, v.32, N 1, p.244-246.

169. Unge T., Liljas L., Strandberg B., Vaara I., Kannan K.K., Fridborg K., Nordman C.E., Lettz P.J., Jr. Satellite tobacco necrosis virus structure at 4.0 Å resolution. *Nature*, 1980, v.285, p.373-377.
170. Abad-Zapatero C., Abdel-Meguin S.S., Johnson J.E., Leslie A.G.W., Rayment I.R., Rossmann M.G., Suck D., Tsukihara T. Structure of southern bean mosaic virus at 2.8 Å resolution. *Nature*, 1980, v.286, N 5768, p.33-39.
171. Abad-Zapatero C., Abdel-Meguin S.S., Johnson J.E., Leslie A.G.W., Rayment I., Rossmann M.G., Suck D., Tsukihara T. A description of techniques used in the structure determination of southern bean mosaic virus at 2.8 Å resolution. *Acta Crystallogr.*, 1981, v.B37, p.2002-2018.
172. Rayment I., Baker T.S., Caspar D.L.D., Murakami W.T. Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature*, 1982, v.295, p.110-115.
173. Robinson I.K., Harrison S.C. Structure of the expanded state of tomato bushy stunt virus. *Nature*, 1982, v.297, p.563-568.
174. Liljas L., Unge T., Jones T.A., Fridborg K., Lövgren S., Skoglund U., Strandberg B. Structure of satellite tobacco necrosis virus at 3.0 Å resolution. *J.Molec.Biol.*, 1982, v.159, N 1, p.93-108.
175. Rossmann M.G., Abad-Zapatero C., Hermodson M.A., Erickson J.W. Subunit interaction in southern bean mosaic virus. *J.Molec.Biol.*, 1983, v.166, p.37-83.
176. Olson A.J., Bricogne G., Harrison S.C. Structure of tomato bushy stunt virus.IV.The virus particle at 2.9 Å resolution. *J.Molec.Biol.*, 1983, v.171, p.61-93.

- I77. Калинин Д.И. Использование цилиндрической модели белка для расшифровки пространственной структуры ромбической модификации леггемоглобина. Кристаллография, 1980, т.25, вып.3, с.535-544.
- I78. Калинин Д.И. Применение методов минимизации функции многих переменных к рентгеноструктурному анализу белков типа миоглобина.- Дисс.на соиск.уч.степ.канд.физ.-мат. наук.- Москва, 1981.- II9 стр.
- I79. Гельфанд И.М., Вул Е.Б., Гинсбург С.Л., Федоров Ю.Г. Метод оврагов в задачах рентгеноструктурного анализа.- М.: "Наука", 1966.
180. Rabinovich D., Shakked Z. A new approach to structure determination of large molecules by multi-dimensional search methods. *Acta Crystallogr.*, 1984, v.A40, p.195-200.
181. Watenpaugh K.D., Sieker L.C., Herriott J.R., Jensen L.H. Refinement of the model of a protein: rubredoxin at 1.5 Å resolution. *Acta Crystallogr.*, 1973, v.B29, p.943-956.
182. Karle J. Partial structure information combined with the tangent formula for noncentrosymmetric crystals. *Acta Crystallogr.*, 1968, v.B24, p.182-186.
183. Karle J. Partial structures and the tangent formula. In: "Crystallographic Computing" (Ahmed F.R., Hall S.R., Huber C.P., eds.). Copenhagen: Munksgaard, 1970, p.37-40.
184. Karle J. Partial structures and use of the tangent formula and translation functions. In: "Crystallographic Computing Techniques" (Ahmed F.R., Huml K., Sedlacek B., eds.). Copenhagen: Munksgaard, 1976, p.155-164.

185. Beurskens P.T., van der Hark T.E.M., Beurskens G. Application of direct methods on difference Fourier coefficients for the solution of partially known structures. *Acta Crystallogr.*, 1976, v.A32, p.821-822.
186. Huber R., Bode W., Schwager P., Fehlhammar H., Colman P.M., Kukla D., Steigemann W., Deisenhofer J. Crystallographic studies of trypsin-trypsin inhibitor complex and its components: the elucidation of a very strong and specific protein-protein interaction. *Acta Crystallogr.*, 1975, v.A31, S24.
187. Schmid M.F., Herriott J.R. The structure of carboxipeptidase B: a model at 2.8 Å resolution obtained without the use of heavy atom derivatives. *Acta Crystallogr.*, 1975, v.A31, S30.
188. Quigley G.J., Wang A.H.J., Seeman N.C., Rich A. Refinement and phasing of yeast phenylalanine tRNA to 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr.*, 1975, v.A31, S40.
189. Deisenhofer J., Steigemann W. Crystallographic refinement of the structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor at 1.5 Å resolution. *Acta Crystallogr.*, 1975, v.B31, p.238-250.
190. Schmid M.F., Herriott J.R. Structure of carboxipeptidase B at 2.8 Å resolution. *J.Molec.Biol.*, 1976, v.103, p.175-190.
191. Schmidt Jr., Girling R.L., Amma E.L. Application of restraint least-square refinement procedure to sickling deer haemoglobin. *Acta Crystallogr.*, 1977, v.B33, p.3618-3620.

192. Anderson C.M., McDonald R.C., Steitz T.A. Sequencing a protein by X-ray crystallography. I. Interpretation of yeast hexokinase B at 2.5 Å resolution by model building. *J. Molec. Biol.*, 1978, v. 123, p. 1-13.
193. Furey W.Jr., Wang B.C., Yoo C.S., Sax M. Phase extension and refinement of Bence-Jones protein RHE (1.9 Å). *Acta Crystallogr.*, 1979, v. A35, p. 810-817.
194. Rao S.T., Hogle J., Sundaralingam M. Refinement of the monoclinic hen egg white lysozyme at 2 Å resolution. *Acta Crystallogr.*, 1981, v. A37, S, C-16.
195. Remington S., Wiegand C., Huber R. Crystallographic refinement and atomic model of two different forms of citrate synthase at 2.7 and 1.7 Å resolution. *J. Molec. Biol.*, 1982, v. 158, p. 111-152.
196. Rice D.W. The use of phase combination in the refinement of phosphoglycerate kinase at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr.*, 1981, v. A37, p. 491-500.
197. Rice D.W. Map improvement by the combination of partial structure and isomorphous replacement information. In: "Refinement of protein structures", Daresbury Lab., 1981.
198. Hendrickson W.A., Konnert J.N. Stereochemically restrained crystallographic least-squares refinement of macromolecular structures. In: "Biomolecular structure, function, conformation and evolution" (Srinivasan R.S., ed.). Oxford: Pergamon Press, 1980, v. 1, p. 43-57.
199. Agarwal R.C. A new least-square refinement technique based on the Fast Fourier Transform algorithm. *Acta Crystallogr.*, 1978, v. A34, p. 791-809.

200. Evans P.R., Hudson P.J. Structure and control of phosphofructokinase from *Bacillus stearothermophilus*. *Nature*, 1979, v.279, p.500-504.
201. Лунин В.Ю., Уржумцев А.Г. Повышение разрешения карт электронной плотности белков путем уточнения модельной структуры. I. Описание метода. — Пущино, 1981. — 24 стр. (Препринт/ОНТИ НЦБИ).
202. Лунин В.Ю., Уржумцев А.Г. Повышение разрешения карт электронной плотности белков путем уточнения модельной структуры. *Кристаллография*, 1983, т.28, вып.2, с.310-315.
203. Lunin V.Yu., Urzhumtsev A.G. Improvoment of protein phases by coarse model modification. *Acta Crystallogr.*, 1984, v.A40, N 3, p.269-277.
204. Chirgadze Yu.N., Sergeev Yu.V., Fomenkova N.P., Lunin V.Yu., Urzhumtsev A.G. The structure  $\gamma$ -crystallin IIIb from calf lens. *Acta Crystallogr.*, 1981, v.A37, S, C-40.
205. Уржумцев А.Г., Лунин В.Ю. Повышение разрешения карт электронной плотности белков путем уточнения модельной структуры. II. Улучшение набора фаз для  $\gamma$ -криSTALLина Ш. Пущино, 1982. — 24 стр. (Препринт/ОНТИ НЦБИ).
206. Фоменкова Н.П., Чиргадзе Ю.Н., Сергеев Ю.В., Невская Н.А., Никонов С.В., Лунин В.Ю., Уржумцев А.Г. Структура  $\gamma$ -криSTALLина: ход цели, пространственная симметрия доменов, расположение функциональных групп. Москва, 1982. — I Все-сюзный биофизический съезд, тезисы докладов пленарных лекций и симпозиальных заседаний, с.17.
207. Bhat T.N., Blow D.M. A density modification method for the improvement of poorly resolved protein electron-density maps. *Acta Crystallogr.*, 1982, v.A38, p.21-29.

208. Bhat T.N., Blow D.M. A computer procedure for extension of model electron density for density modification or for refinement process. *Acta Crystallogr.*, 1981, v.A37, S, C-15.
209. Bhat T.N., Blow D.M., Brick P., Hyborg J. Tyrosil-tRNA-synthetase forms a mononucleotide-binding fold. *J.Molec.Biol.*, 1982, v.158, p.699-709.
210. Monteilhet C., Blow D.M., Brick P. Interaction of crystalline tyrosil-tRNA-synthetase with adenosine, adenosine monophosphate, adenosine triphosphate and pyrophosphate in the presence of tyrosinol. *J.Molec.Biol.*, 1984, v.173, p.477-485.
211. Bhat T.N., Blow D.M. A method for refinement of partially interpreted protein structures including a procedure for scaling between a model and an electron-density maps. *Acta Crystallogr.*, 1983, v.A39, p.166-170.
212. Лунин В.Ю., Уржумцев А.Г., Вернослова Е.А., Чиргадзе Ю.Н., Фоменкова Н.П., Невская Н.А. Использование смешанной модели электронной плотности для улучшения набора фаз в белковой кристаллографии.-Пущино, 1984.-19 стр. (Препринт ОНТИ НЦБИ).
213. Chirgadze Yu.N., Nevskaya N.A., Sergeev Yu.V., Lunin V.Yu. Urzhumtsev A.G. Crystal structure of the calf eye lens protein gamma-crystallin III. *Acta Crystallogr.*, 1984, v.A40, S, C-32.
214. Ten Eyck L.F. Efficient structure-factor calculation for large molecules by the Fast Fourier Transform. *Acta Crystallogr.*, 1977, v.A33, p.486-492.

215. Sweet R.M., Wright H.T., Janin J., Chothia C.H., Blow D.M. Crystal structure of the complex of porcine trypsin with soybean trypsin inhibitor (Kunitz) at 2.6- $\text{\AA}$  resolution. *Biochemistry*, 1974, v.13, p.4212-4228.
216. Blow D.M., Crick F.H.C. The treatment of errors in the isomorphous replacement method. *Acta Crystallogr.*, 1959, v.12, p.794-802.
217. Rossmann M.G., Blow D.M. The refinement of structure partially determined by the isomorphous replacement method. *Acta Crystallogr.*, 1961, v.14, p.641-647.
218. Sim G.A. The distribution of phase angles for structures containing heavy atoms.I.Space group P1 with one heavy atom in the asymmetric unit. *Acta Crystallogr.*, 1957, v.10, p.536-537.
219. Sim G.A. The distribution of phase angles for structures containing heavy atoms.II.A modification of the normal heavy atom method for non-centrosymmetrical structures. *Acta Crystallogr.*, 1959, v.12, p.813-815.
220. Sim G.A. A note on the heavy-atom method. *Acta Crystallogr.*, 1960, v.13, p.511-512.
221. Hendrickson W.A., Lattmann E.E. Representation of phase probability distributions for simplified combination of independent phase information. *Acta Crystallogr.*, 1970, v.B26, p.136-143.
222. Karle J. A generalization of the tangent formula. *Acta Crystallogr.*, 1971, v.B27, p.2063-2065.
223. Hauptman H. New theory of the structure invariants  $\Psi = \Psi_h + \Psi_k + \Psi_l + \Psi_m$ . *Acta Crystallogr.*, 1975, v.A31, S12.

224. Сринивасан Р., Партасарати С. Применение статистических методов в рентгеновской кристаллографии. М.: "Мир", 1979.
225. Лунин В.Ю. Использование метода максимального правдоподобия для оценки ошибок при определении фаз в кристаллографии белка. Пущино, 1982.-22 стр. (Препринт/ОНТИ НЦБИ)
226. Wilson A.J.C. The probability distribution of X-ray intensities. *Acta Crystallogr.*, 1949, v.2, p.318-321.
227. Лунин В.Ю. Оптимизация расчета структурных факторов в кристаллографии белка. Пущино, 1982.-16 стр. (Препринт/ОНТИ НЦБИ).
228. Booth A.D. Application of the method of steepest descent to X-ray structure analysis. *Nature*, 1947, v.160, p.196.
229. Phillips S.E.V. Structure and refinement of oxymyoglobin at 1.6 Å resolution. *J.Molec.Biol.*, 1980, v.148, p.531-554.
230. Лунин В.Ю. Комплекс программ "Быстрое преобразование Фурье".-Пущино, 1979.-46 стр. (Материалы по мат.обесп. ЭВМ, ФОРТРАН, вып.3/ОНТИ НЦБИ).
231. Ten Eyck L.F. Crystallographic Fast Fourier Transform. *Acta Crystallogr.*, 1973, v.A29, p.183-191.
232. Лунин В.Ю. Фазовая программа Тен Эйка.-Пущино, 1979.-52 стр. (Материалы по мат.обесп. ЭВМ, ФОРТРАН, вып.4/ОНТИ НЦБИ).
233. Croft L.R., Slingsby G. In: "The human lens - in relation to cataract", CIBA Found.Symp., v.19. Amsterdam-New York: Elsevier-Excerpta Medica, 1973, p.212-213.

234. Richards F.M. The matching of physical models to three-dimensional electron-density maps: a simple optical device. *J.Molec.Biol.*, 1968, v.37, p.225-230.
235. Colman P.M., Jansonius J.N., Matthews B.W. The structure of thermolysin: an electron density map at 2.3 Å resolution. *J.Molec.Biol.*, 1972, v.70, p.701-724.
236. Невская Н.А., Курочкина Н.А., Чиргадзе Ю.Н. Построение пространственной модели белка по картам электронной плотности с использованием молекулярной графики.-  
Пущино, 1983.-12 стр. (Препринт/ОНТИ НЦБИ).
237. Волкова Г.А., Кочкина В.М., Синицына Н.И., Торчинский Ю.М., Браунштейн А.Е., Воронова А.А., Вайнштейн Б.К. Получение ромбических кристаллов куриной цитозольной аспартат-трансаминазы и определение элементарной ячейки. *Кристаллография*, 1978, т.23, с.852-853.
238. Борисов В.В., Борисова С.Н., Качалова Г.С., Сосченов Н.И., Воронова А.А., Вайнштейн Б.К., Торчинский Ю.М., Волкова Г.А., Браунштейн А.Е. Рентгеноструктурное исследование аспартат-трансаминазы при разрешении 5 Å. *Докл.АН СССР*, 1977, т.235, с.212-215.