

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ МАТЕМАТИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ БИОЛОГИИ**

На правах рукописи
УДК 548.737

ВЕРНОСЛОВА ЕЛЕНА АНАТОЛЬЕВНА

**РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ ПРОГРАММНОГО
ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЛЯ ЗАДАЧ БЕЛКОВОЙ
КРИСТАЛЛОГРАФИИ**

Специальность 01.04.18 - Кристаллография, физика
кристаллов

**Автореферт
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук**

Пущино 1996

Пущино 1996

Работа выполнена в Институте математических проблем

биологии РАН, г.Пущино.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук

В.Ю.Лунин

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук

В.Р.Мелик-Адамян

кандидат биологических наук

Н.Н.Втюрин

Ведущая организация: Институт теоретической и
экспериментальной биофизики РАН

Защита диссертации состоится " " 1996 г. в
час. на заседании диссертационного совета Д 002.58.01 при
Институте кристаллографии РАН по адресу: 117333 Москва,
Ленинский проспект, 59.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Инсти-
тута кристаллографии РАН.

Автореферат разослан 1996 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат физ.-мат. наук

В.М.КАНЕВСКИЙ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Рентгеноструктурный анализ является одним из важнейших методов исследования пространственной структуры молекул, позволяющий получить подробную информацию о строении биологически важных молекул на атомном уровне. Один из его необходимых этапов - кристаллографическое уточнение модели - отнимает большую часть необходимого для расшифровки структуры компьютерного времени. Поэтому актуальным является максимальная эффективность и быстродействие программы уточнения, что приводит к сложным алгоритмам и архитектуре таких программ. Возможности автоматической корректировки сильно зависят и от типа информации, которую использует программа уточнения, ее разнообразия и полноты. Ввиду постоянного усложнения и увеличения объема информации важным условием становится гибкая архитектура, удобство использования программы и возможность включения новых типов данных в процесс уточнения. Кроме того, в связи с развитием и широким применением в научных исследованиях персональных компьютеров все более актуальным становится разработка программ для компьютеров класса IBM PC, использующих преимущества интерактивной машинной графики и современного графического интерфейса.

Цель работы - разработка новых алгоритмов, создание и применение программного обеспечения для задач белковой кристаллографии: комплекса программ уточнения макромолекул FROG и серии программ для персональных компьютеров IBM PC, использующих интерактивную компьютерную графику, для расчета и визуализации синтезов электронной плотности и атомных моделей.

Научная новизна работы. Разработаны новые алгоритмы и создано программное обеспечение в рамках комплекса программ FROG для решения задач белковой кристаллографии. Его можно применять на любых типах ЭВМ (в том числе и на персональных компьютерах) в любой операционной системе для решения задач уточнения структуры макромолекулы по данным рентгеновского эксперимента с возможным использованием стереохимических ограничений и жестких групп; энергетического уточнения структуры; уточнения ориентации и положения молекулы как целого.

Создано программное обеспечение для компьютеров IBM PC для расчета, визуализации и исследования синтезов распределения электронной плотности Фурье и Паттерсона в любой пространственной группе (в режиме моно- или стерео-) и атомной модели исследуемого объекта. При этом реализована возможность работы в интерактивном графическом

режиме с быстрым выводом изображения на экран и с широким набором функций по формированию и изменению картины. В программу заложен алгоритм быстрого рисования линий уровней, который основан на развертке изображения на экране аналогично растровому способу.

Разработанное программное обеспечение применялось при расшифровке структуры γ -кристаллина III из хрусталика глаза теленка на разрешении 2.5 Å; для компьютерного моделирования белковых гибридов (лизоцима фага T4 с CA^{2+} , связывающим модулем); при определении пространственной структуры комплекса белка лектина гороха с глюкозидом на разрешении 2.4 Å; в работе по уточнению положения модели и расширению набора фаз до разрешения 6 Å структуры *CMtV* капсида вируса крапчатости гвоздики; при тестировании и применении метода прямого определения фаз для макромолекул на низком разрешении с модельными и реальными данными по рибосомной частице 50S.

Основные научные результаты работы получены автором лично, часть результатов получена в соавторстве с сотрудниками ИМПБ РАН, сотрудниками Института белка РАН и Института молекулярной и клеточной биологии г.Страсбурга (Франция).

Практическая ценность работы: созданное программное обеспечение может быть использовано для решения задач рентгеновской кристаллографии, конформационного анализа, расчетных задач белковой инженерии. Комплекс FROG можно легко адаптировать к новым постановкам задач, сохраняя при этом высокую эффективность работы. Высокое быстродействие программ комплекса, возможность его использования на любых типах компьютеров, легкая адаптируемость к размеру доступной памяти позволяет применять его для работы в нестандартных ситуациях с большими биологическими молекулами. Серия программ, применяющих компьютерную графику для IBM PC, имеет единый графический интерфейс, простой и удобный для пользователя, и их можно использовать для расчета и визуализации синтезов распределения электронной плотности и атомных моделей молекул белка.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на V конференции по биоорганической химии молодых ученых социалистических стран (Пущино, 1988), на I Международной конференции по структуре и химическом строении рибонуклеаз (Москва, 1989), на XII Европейской кристаллографической конференции (Москва, 1989), на XV Европейской кристаллографической конференции (Дрезден, 1994).

Публикации. По теме диссертации опубликована 21 работа. Список публикаций приведен в конце авторефера.

Объем работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов, списка литературы. Она изложена на 148 страницах, содержит 19 рисунков и 3 таблицы. Список цитируемой литературы содержит 137 наименований.

Основное содержание работы.

Введение включает в себя общую постановку задачи и краткое изложение содержания и основных результатов работы.

Глава 1. Уточнение макромолекул в белковой кристаллографии

В главе дается постановка задачи уточнения, анализируются основные проблемы, возникающие при уточнении белковых структур, и способы их преодоления. Приводится алгоритм уточнения, основанный на применении метода наименьших квадратов (МНК), и обсуждается вытекающая из такой постановки задачи проблема переопределенности метода минимизации МНК для белков. Даётся одно из решений проблемы переопределенности задачи путем проведения уточнения с ограничениями ("constraints" и "restraints"). Обсуждается необходимость повышения надежности и требований, предъявляемых к полученным атомным моделям, перечисляются характеристики модели, за которыми надо следить в процессе уточнения, и приводится классификация возможных ошибок моделей.

На основе многочисленных работ анализируются различные подходы и дается сравнение эффективности критериев, применяемых в настоящее время для обнаружения ошибок и оценки качества моделей молекул белка. К ним относятся: стандартный кристаллографический R-фактор; оценка ошибок в координатах атомов модели; соответствие модели и синтеза электронной плотности; R_{free} фактор; оценка геометрических параметров модели; распределение температурного фактора и сдвига координат при уточнении; предпочтительные конформации; потенциальная энергия; правильность молекулярной укладки.

Дается подробный анализ преимуществ использования R_{free} фактора, предложенного впервые А.Брюнгером /1/, в качестве дополнительной статистической оценки в кристаллографии. R_{free} фактор рассчитывается по набору рефлексов, которые исключаются из процесса уточнения и построения модели и используются только для контроля. Это делает R_{free} фактор более надежным и объективным критерием при оценки качества модели, полученной методами рентгеноструктурного анализа. В конце главы приводится обзор существующих методов и программ уточнения макромолекул, а также некоторых наиболее распространенных и типичных графических программ, применяемых в рентгеновской кристаллографии.

Глава 2. FROG - комплекс программ уточнения атомной структуры макромолекул.

В этой главе описывается разработанный с участием автора комплекс программ уточнения, который позволяет изменить в модели исследуемого объекта значения координат атомов, их температурных факторов и коэффициентов заполнения таким образом, чтобы добиться:

- лучшего соответствия данным рентгеновского эксперимента;
- более точного соответствия стандартным стереохимическим соотношениям (длины связей, валентные углы, плоские группы, хиральность и т.д.);
- меньшего значения энергии невалентных взаимодействий (в том числе межмолекулярных);
- лучшего вписывания молекулы в электронную плотность;
- выполнения любых других требований, выражаемых формально через координаты атомов модели, значения соответствующей функции распределения электронной плотности или ее коэффициентов Фурье.

Основными особенностями комплекса FROG являются:

- **быстродействие**, основанное на последовательном применении алгоритма быстрого дифференцирования /2/ и быстрого преобразования Фурье/3/. На IBM PC 486/487 цикл уточнения молекулы белка размером около 5000 атомов на разрешении 1.7 \AA (55000 рефлексов) с учетом стереохимии составляет 5 минут.
- **работа с атомно-блочной моделью**, состоящей из свободных атомов и/или жестких групп, которыми могут быть вся молекула, отдельные домены, спиральные участки, пептидные звенья, боковые цепи и т.д.
- **задание критериев уточнения внешними файлами**, что позволяет менять предъявляемые к модели требования без корректировки текста программы. Это дает возможность вводить новые ограничения и уточнять модели разных типов макромолекул (белков, ДНК, различных комплексов) со своими собственными стереохимическими ограничениями.
- **применение R-free фактора** для оценки качества модели. В файле структурных факторов выбирается случайным образом подмножество рефлексов и им приписывается признак "free". Уточнение проводится по оставшейся части рефлексов, а по рефлексам с признаком "free" производится только расчет R фактора для контроля за процессом уточнения.
- **учет некристаллографической симметрии**. При "жестком" введении симметрии изменяются параметры атомов одной субъединицы, а остальные генерируются при помощи преобразований симметрии. При "мягком" введении симметрии параметры атомов всех субъединиц меняются независимо, а в минимизируемый критерий включается штраф за нарушение симметрии.

- **проверка геометрии модели.** В комплексе имеются программы сбора статистики, позволяющие получить информацию о нарушении стереохимических и энергетических соотношений в модели молекулы белка. Программы сообщают по каждому из типов контролируемых параметров не только величины средних ошибок, но и максимальные отклонения от стандартных значений, а также гистограммы распределения отклонений от заданных значений по всем включенным в уточнение критериям.

- **адаптируемость к размеру доступной памяти.** Имеется две версии программы: файловая версия использует вывод промежуточных результатов во внешние файлы, освобождая оперативную память для последующих действий, что позволяет работать на любой доступной памяти, но увеличивает время работы. Ограничением является лишь то, что в буферный массив должно помещаться по крайней мере два сечения электронной плотности. В бесфайловой версии все необходимые данные хранятся в памяти, за счет чего ускоряется процесс уточнения, но эта версия рассчитана на большие объемы памяти.

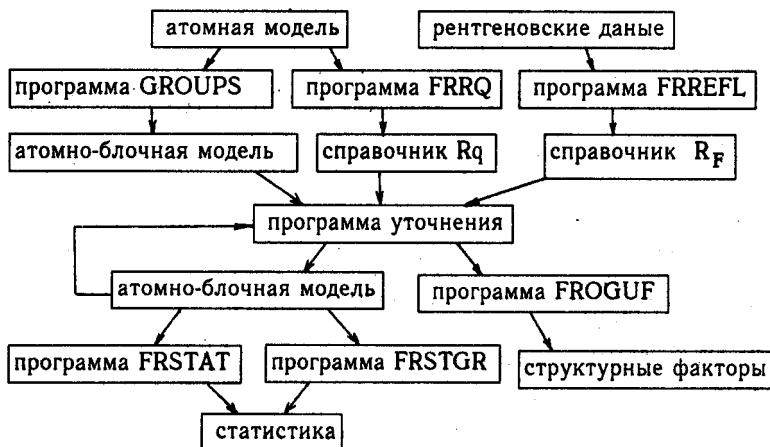


Рис.1. Схема связи программ и файлов комплекса FROG.

Количество атомов в модели, размеры элементарной ячейки, разрешение набора дифракционных данных не ограничиваются. Комплекс написан на языке ФОРТРАН, его объем - около 35000 операторов. Схема связи основных программ комплекса и файлов данных приведена на рис.1. В реализации комплекса принимали участие 3 разработчика; программы GROUPS, FRRQ, FRREFL, FROGUF, FRSTAT, FRSTGR созданы автором и содержат около 15000 операторов ФОРТРАНа.

Основные характеристики программы уточнения комплекса.

Программа уточнения фиксирует общую структуру минимизируемого критерия, но не его конкретную форму, которая описывается специальными входными файлами-справочниками, позволяющими его легко варьировать, не внося изменений в текст программы.

В общем виде минимизируемый критерий R можно записать как

$$R = w_F R_F + \sum_{j=1}^6 w_{q,j} R_{q,j}, \quad (1)$$

где R_F описывает соответствие модели рентгеновскому эксперименту;

$R_{q,j}$ описывает точность выполнения стереохимических соотношений;
 w_i - весовые константы, задаваемые в управляемых данных.

Критерий R_F может иметь следующий вид:

$$R_F = \sum_s w_s (|F_{obs}(s)| - k |F_{calc}(s)|)^2 \quad (2)$$

$$R_F = \sum_s w_s | |F_{obs}(s)| - k |F_{calc}(s)| | \quad (3)$$

$$R_F = \sum_s w_s (|F_{obs}(s)|^2 - k |F_{calc}(s)|^2)^2 \quad (4)$$

$$R_F = \sum_s (A_s \cos(\varphi_s) + B_s \sin(\varphi_s) + C_s \cos(2\varphi_s) + D_s \sin(2\varphi_s)), \quad (5)$$

A_s, B_s, C_s, D_s - коэффициенты функции распределения вероятности фаз.

Критерии $R_{q,j}$ задаются на языке параметров атомов модели и описывают соответствие модели стереохимическим соотношениям:

$$R_{q,1} = \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{|r_i - r_j|^2} + \frac{B_{ij}}{|r_i - r_j|^6} \right) \text{ - энергия взаимодействий по невалентно} \quad (6)$$

связанным парам атомов, находящихся в пределах заданного расстояния друг от друга;

$$R_{q,2} = \sum_{i,j} (|r_i - r_j|^2 - d_0^2)^2 \quad \text{по всем валентным связям} \quad (7)$$

$$R_{q,3} = \sum_k (1 - \cos(\alpha_k - \alpha_0)) \quad \text{по всем валентным углам} \quad (8)$$

$$R_{q,4} = \sum_k (1 - \cos m(\theta_k - \theta_0)) \quad \text{по всем торсионным углам} \quad (9)$$

$$R_{q,5} = \sum_k d^2(r_{j,k}, L_{opt}) \quad \text{отклонения атомов от плоскостей} \quad (10)$$

$$R_{q,6} = \sum_k (V_k - V_0)^2 \quad \text{по атомам, образующим хиральные объемы} \quad (11)$$

Центральную часть программы уточнения составляют подпрограммы, организующие расчет минимизируемой функции и ее градиента. Для

минимизации применяется метод спуска с выбором направления по антиградиенту либо метод сопряженных градиентов. Для поиска оптимальной точки на найденном направлении спуска применяется аппроксимация минимизируемой функции многочленом третьей степени по значениям функции и ее производной на концах отрезка аппроксимации.

В программе используется несколько уровней описания модели:

- χ - обобщенные параметры жестких групп, на которые разбита модель;
- q - параметры атомов, входящих в модель;
- ρ - распределение электронной плотности в ячейке кристалла, рассчитанное по атомной модели на трехмерной равномерной сетке r ;
- F - структурные факторы, отвечающие рентгеновскому рассеянию распределением электронов $\rho(r)$.

В соответствии с этим общий минимизируемый функционал R представляется в виде суммы большого числа условий (ограничений), выраженных в терминах χ , q , ρ или F , и подразделяется на 4 компоненты: $R = R_\chi + R_q + R_\rho + R_F$. (12)

Во входных данных функциям R_χ , R_q , R_ρ , R_F отвечают файлы-справочники. Например, в справочнике R_q для каждого элемента критерия, контролирующего отклонение длин валентных связей от стандартных значений, задаются номера атомов, образующих валентную связь, и стандартная величина связи d_{jk}^0 . Аналогично в справочнике R_F для каждого слагаемого рентгеновского критерия задаются индексы рефлекса h,k,l и экспериментальное значение модуля структурного фактора $|F_{obs}(h,k,l)|$.

Иерархия уровней описания модели и возможность представления общего функционала R в виде компонентов (12) позволяет применить следующую оптимальную схему расчета функции R и градиента (рис.2).

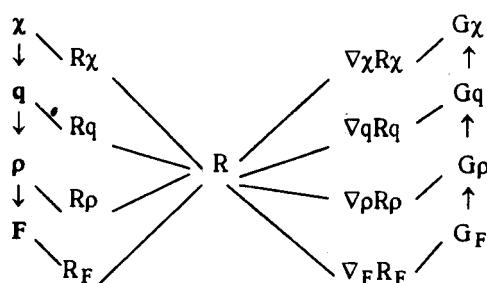


Рис.2. Схема расчета функционала и его градиента.

Здесь $\nabla x R_x$ - градиент функции R_x по переменной x , $G_F = \nabla_F R_F$, $G_p = \nabla p (R_p + R_F)$, $G_q = \nabla q (R_q + R_p + R_F)$, $G_\chi = \nabla \chi (R_\chi + R_q + R_p + R_F)$ (13)

Суть алгоритма быстрого дифференцирования заключается в том, что процесс вычисления минимизируемого функционала представляется в виде цепочки наиболее простых замен переменных. Градиент затем вычисляется как обратная цепочка переходов от градиента по одним переменным к градиенту по предшествующим (в расчете значения функционала) переменным. Здесь каждое преобразование $x \rightarrow y$ с предыдущего уровня параметров x к последующему y влечет за собой преобразование $\nabla y \rightarrow \nabla x$ в схеме вычисления градиента. При этом для преобразования $x \rightarrow y$ обратное преобразование $\nabla x \rightarrow \nabla y (\frac{dy}{dx})$ можно вычислить за ту же цену, что и прямое преобразование, т.е. вычисление всех n компонент градиента любой функции $R(x_1, \dots, x_n)$ можно осуществить за то же время $T\nabla$, что и вычисление самого критерия TR ($T\nabla \approx TR$, а не $T\nabla \approx nTR$).

Подготовка атомно-блочной модели: программа GROUPS.

Программа уточнения может работать как с атомными моделями, так и с жесткими группами, которые включают в себя координаты всех входящих в группу атомов: Текущее положение группы задается углами Эйлера и вектором трансляции, остальными параметрами являются групповой температурный фактор и коэффициент заполнения. Для группы, состоящей из N атомов, можно уточнять всего 8 параметров вместо $5N$ параметров модели со свободными атомами, при этом не накладывается никаких ограничений на количество и состав жестких групп. В частности, все атомы могут уточняться как индивидуальные; всю молекулу можно уточнять как жесткое тело; возможны и все промежуточные варианты. Специальная программа комплекса GROUPS позволяет легко конструировать на основе исходного файла координат атомов файл с атомно-блочной моделью, который кроме параметров атомов содержит информацию о том, каким образом атомы объединяются в группы.

Жесткой группой можно объявить:

- боковую цепь, начиная с C_β^k -атома,
- пептидное звено $(CO)^{k-1} \cdot N^k \cdot C_\alpha^k$,
- пептидное звено с прилегающей боковой цепью $(CO)^{k-1} \cdot N^k \cdot C_\alpha^k \cdot R^k$.

Можно ввести более крупные группы, объявляя ими произвольный набор пептидных звеньев (с прилегающими боковыми группами или без них). Например, можно объявить жесткой группой α -спираль, β -слой,

главную цепь, аминокислотные остатки внутри белковой глобулы, всю молекулу. Жесткая группа в процессе уточнения может премещаться только как твердое тело, т.е. взаимное расположение атомов, входящих в такую группу, не меняется в процессе уточнения.

**Подготовка справочника R_q стереохимических критериев:
программа FRRQ.**

Программа FRRQ позволяет ввести в процесс уточнения штрафы за нарушение стандартных стереохимических требований: заданных величин длин валентных связей, валентных и двугранных углов, выход из плоскости атомов, принадлежащих плоским группам, нарушение ориентированного объема заданной четверки атомов (хиральность) и т.п. Кроме того, программа может заносить в справочник R_q перечень пар атомов, между которыми существуют невалентные контакты, для расчета при уточнении модели энергии невалентных взаимодействий.

При этом могут учитываться как контакты внутри молекулы, так и контакты атомов молекулы с окружающими ее в кристалле атомами других молекул. Основные типы штрафных функций, используемых в программе FRRQ, перечислены в формулах (6)-(11). Значения стандартных стереохимических параметров вводятся из внешнего файла и согласованы с последними данными и словарями, используемыми в современных программах уточнения X-PLOR, TNT, PROLSQ, EREF.

**Подготовка справочника R_f рентгеновских критериев:
программа FRREFL.**

Справочник R_f описывает критерии уточнения, выражющиеся через модули и фазы структурных факторов, рассчитанных по текущей модели (2)-(5). Программа FRREFL позволяет преобразовать исходный файл с рентгеновскими данными в справочник R_f, введя указанные пользователем типы критериев.

В уточняемых критериях может использоваться одна из следующих весовых схем:

- 1) $w_s = |s|^\alpha$, где α - заданный параметр (при $\alpha=0$ все веса $w=1$); (14)
- 2) $w_s = 1/\sigma_s$, где σ_s - индивидуальное для данного рефлекса (15) значение, взятое из исходного файла с рентгеновскими данными.

Чтобы при уточнении использовать R-free фактор в качестве критерия оценки качества модели, во входном файле структурных факторов выбирается случайнным образом подмножество рефлексов (например, 10% от полного набора,) и они заносятся в справочник R_f со специальным признаком "free". В дальнейшем уточнение проводится по оставшейся части рефлексов, а по рефлексам с признаком "free" производится только расчет R-фактора для контроля за процессом уточнения.

Версия комплекса FROG для персокомпьютеров.

Комплекс программ FROG несколько лет использовался в его первоначальном варианте на EC-1055М и IBM PC 486/487. Для облегчения управления процессом уточнения и задания управляющих данных Ивановым М.Е. /4/ была создана программная "оболочка" на IBM PC (рис.3), позволяющая пользователю войти в среду комплекса и в интерактивном графическом режиме проводить все необходимые действия: подготовить и задать управляющие данные и файлы, запустить программы на счет, получить листинги и результаты уточнения, т.е. организовать любую необходимую последовательность действий в удобном пользователю режиме работы, не выходя из среды комплекса FROG.

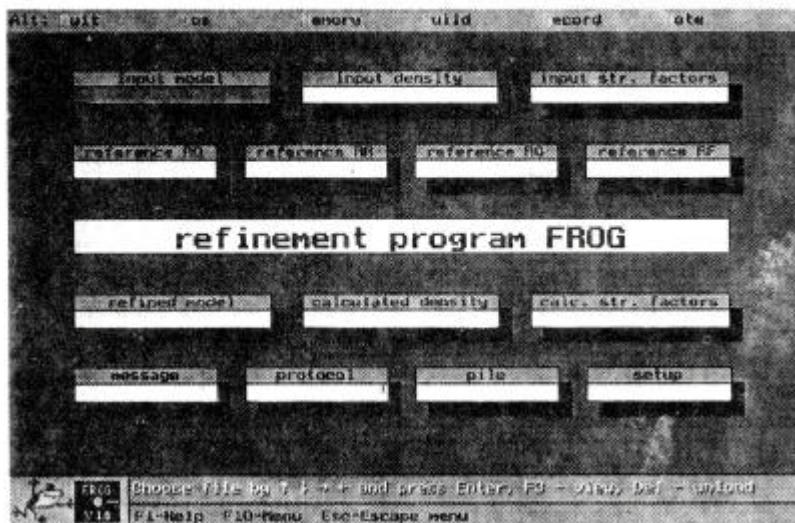


Рис.3. Комплекс программ FROG на IBM PC.

Глава 3. Серия графических программ на IBM PC для задач рентгеноструктурного анализа.

Глава посвящена описанию графических программ для персональных компьютеров IBM PC для расчета, визуализации и исследования синтезов распределения электронной плотности и атомных моделей молекул белка. Все программы этой серии имеют единый графический интерфейс, простой и удобный для пользователя, и взаимодействуют друг с другом посредством файлов фиксированных форматов. Набор возможных операций в каждой программе достаточно разнообразен для решения

поставленных задач, но это не делает их громоздкими и запутанными при их эксплуатации, что свойственно большим программным комплексам.

В описываемую серию входят программы FFT, FAN, CAN и FANS, позволяющие рассчитать синтезы Фурье и Паттерсона в любой пространственной группе; вывести синтезы на экран монитора в режиме моно или стерео и провести их визуальное исследование; сравнить несколько синтезов, накладывая их один на другой; одновременно с синтезом вывести на экран атомную модель исследуемого объекта и провести с ней некоторые манипуляции (вращение, трансляцию).

Программа FFT расчета дискретного трехмерного преобразования Фурье.

На различных этапах работы по расшифровке структуры возникает потребность вычисления трехмерного преобразования Фурье при расчете функции распределения электронной плотности

$$\rho(r) = \rho(x,y,z) = \sum_{hkl} F_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}, \quad (16)$$

где F_{hkl} - заданные числа (в общем случае комплексные). Величины F_{hkl} могут быть структурными факторами, интенсивностями отражений (при расчете функции Паттерсона), а в общем случае - произвольными коэффициентами Фурье. Поскольку функция $\rho(r)$ - периодическая, то ее значения в единичной элементарной ячейке (в относительной системе координат) полностью определяют значения функции на всем пространстве. На практике ее вычисляют на равномерной трехмерной сетке, т.е. разбивают ребра элементарной ячейки, идущие вдоль осей, на NX , NY , NZ частей соответственно, и вычисляют величины

$$\rho_{jx,jy,jz} = \rho\left(\frac{jx}{NX}, \frac{jy}{NY}, \frac{jz}{NZ}\right) = \sum_{h=0}^{NX-1} \sum_{k=0}^{NY-1} \sum_{l=0}^{NZ-1} F_{hkl} e^{-2\pi i(h\frac{jx}{NX} + k\frac{jy}{NY} + l\frac{jz}{NZ})} \quad (17)$$

$jx=0,1,\dots,NX-1; \quad jy=0,1,\dots,NY-1; \quad jz=0,1,\dots,NZ-1$

Вычисления в программе FFT осуществляются на базе алгоритма Кули-Тьюки быстрого преобразования Фурье /5/. Программа определяет область допустимой для работы памяти и рассчитывает синтез порциями, используя рабочий файл для хранения промежуточных результатов, что позволяет осуществлять расчет практически любого по размеру синтеза, единственным условием является размещение в памяти целиком по крайней мере одного сечения.

После запуска программа переходит в графический интерактивный режим работы, позволяя задавать и корректировать все параметры и контролировать процесс расчета. В любой момент можно получить подсказку "Help".

Для расчета синтеза необходимо задать три группы параметров:

В первой группе можно выбрать один из вариантов синтеза:

$$\text{- синтез Фурье с коэффициентами } W_s \times (K \times F_s) \times e^{i\varphi_s} \quad (18)$$

$$\text{- синтез Паттерсона} \quad W_s \times (K \times F_s)^2 \quad (19)$$

$$\text{- разностный синтез Фурье} \quad W_s \times (K_1 \times F_{1s} - K_2 \times F_{2s}) \times e^{i\varphi_s} \quad (20)$$

$$\text{- разностный синтез Паттерсона} \quad W_s \times (K_1 \times F_{1s} - K_2 \times F_{2s})^2 \quad (21)$$

$$\text{- синтез в общем виде} \quad \sum_{j=1}^N W_s^j \times (K_j \times F_s^j) \times e^{i\varphi_s^j} \quad (22)$$

Здесь s - трехмерный индекс (миллеровские индексы рефлекса);

W_s , F_s , φ_s - определены для каждого рефлекса во входном файле;

K , K_1 , K_2 - определяются пользователем в процессе работы.

Нужно также задать границы разрешения D_{MIN} и D_{MAX} ; номера позиций во входном файле, из которых берутся значения модулей F_s , фаз φ_s и весов W_s ; шкальные коэффициенты K , K_1 , K_2 (рис.4).

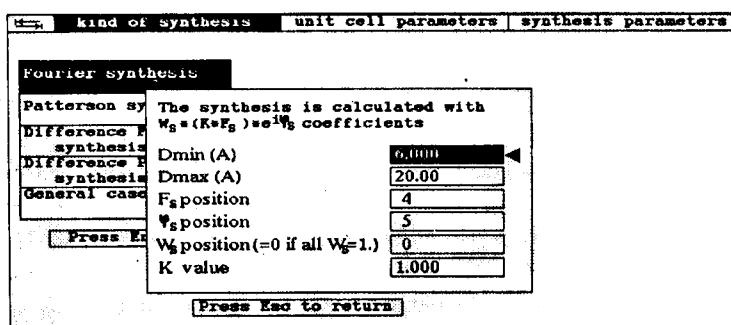


Рис.4. Задание правила формирования коэффициентов Фурье.

Во второй группе данных задаются параметры элементарной ячейки и пространственная группа кристалла (рис.5).

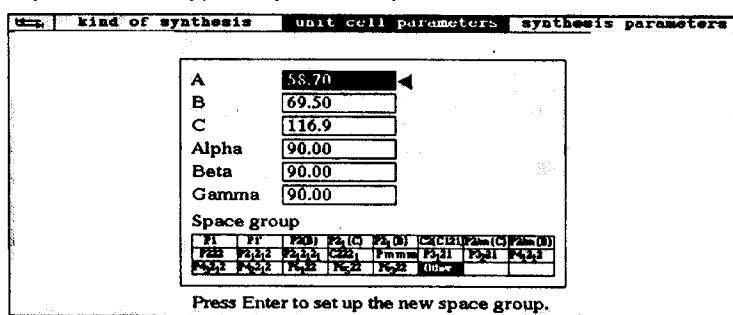


Рис.5. Задание параметров ячейки и пространственной группы

В третьей группе данных задается заголовок для выводного синтеза, разбиение элементарной ячейки NX, NY, NZ; границы для расчета синтеза и ориентация (рис.6). Кроме того, выбирается тип шкалирования и формат выводного синтеза. Можно задать одну из 6 ориентаций, которая определяет порядок индексов выводного трехмерного массива, содержащего рассчитанный синтез. Наиболее быстро меняется индекс, соответствующий оси абсцисс, затем оси ординат, в выводной файл синтез заносится сечениями по третьей оси.

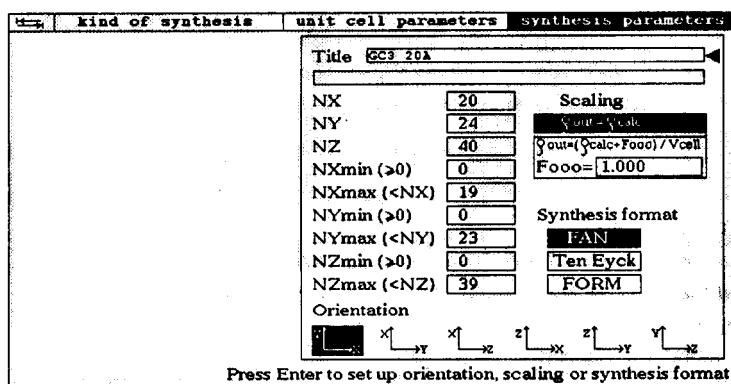


Рис.6. Задание разбиения синтеза, его ориентации и формата.

В процессе расчета осуществляется контроль за полнотой входного набора данных: на экран выводятся сечения обратного пространства ($h=0$; $k=0$; $l=0$), на которых отражено наличие рефлексов (рис.7).

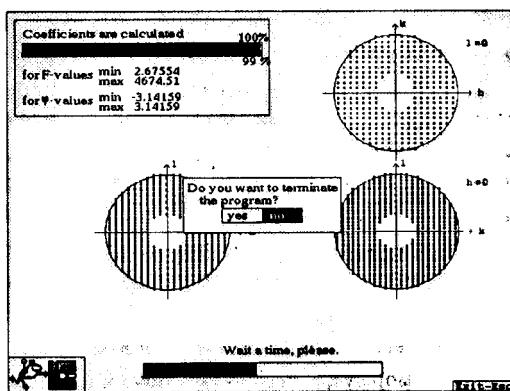


Рис.7. Контроль за полнотой набора данных.

После окончания работы можно сохранить текущие параметры (имена входного и выводного файлов, тип синтеза, способ выбора коэффициентов Фурье, параметры элементарной ячейки, пространственная группа, разбиение и ориентация синтеза и т.д.) в специальном файле и при дальнейших запусках программы FFT подавать этот файл на вход, облегчив себе работу по установке параметров для расчета синтеза.

Программы FAN, CAN и FANS - визуальный анализ синтезов электронной плотности и атомной модели.

Данная серия программ предназначена для визуализации функций трех переменных (распределения электронной плотности) на IBM PC - совместимых компьютерах. Исследуемая функция $\rho(r)$ задана как массив чисел $\rho_{ijk} = \rho\left(\frac{i}{NX}, \frac{j}{NY}, \frac{k}{NZ}\right)$ и выводится на экран монитора в виде изолиний (линий, соединяющих точки с равными значениями функции), отвечающих ее двумерным сечениям.

Программа FAN (scalar Field ANalysis) позволяет :

- получать на экране дисплея картину линий уровня в одном или нескольких двумерных сечений;
- добавлять и удалять отдельные сечения;
- изменять масштаб изображения и сдвигать "окно" в пространстве;
- легко варьировать набор и цвет изображаемых линий уровня;
- определять относительные координаты любой точки экрана.

Программа FANS (scalar Field Analysis Stereo) позволяет:

- выполнять все функции программы FAN в стереорежиме;
- выводить на экран стереоизображение скелетной модели;
- сдвигать и вращать изображение модели как жесткого тела относительно изображения анализируемой функции.

Программа CAN (Comparative ANalysis) позволяет получить на экране дисплея по отдельности или одновременно изображение двух функций распределения электронной плотности и атомной модели белковой молекулы. Атомная модель задается набором координат атомов и изображается в виде проекции на экран скелетной модели, в которой атомы представляются шариками, а химические связи - отрезками.

Помимо перечисленных для предыдущих программ возможностей, CAN может выводить функции сечениями по любой из трех координатных осей, сдвигать изображение дополнительной функции относительно основной и отражать его зеркально в координатных плоскостях (переходить к энантиоморфу), выводить помимо атомной модели молекулы белка изображения молекул, связанных с исходной заданными преобразованиями симметрии.

Некоторые возможности программ визуализации синтезов и модели можно проиллюстрировать на примере программы CAÑ. Синтез выводится на экран в виде набора наложенных двумерных сечений (рис.8).

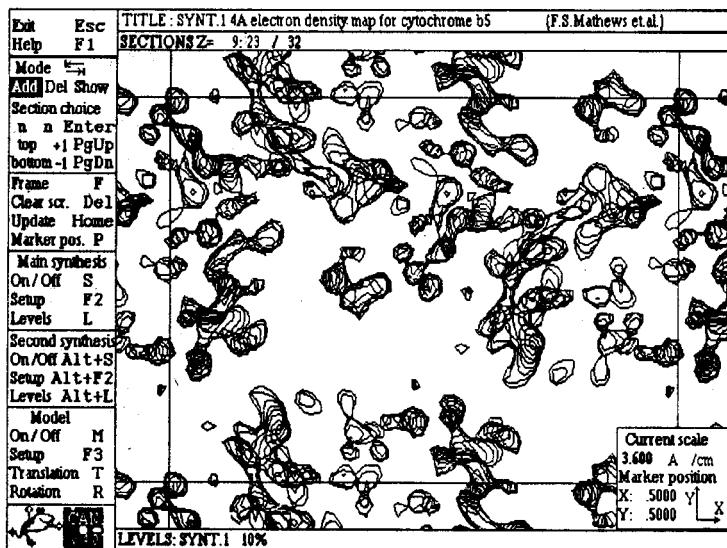


Рис.8. Изображение функции электронной плотности (9-23 сечения).

В верхней части экрана появляется заголовок файла, под ним находится информация о номерах сечений, изображенных в данный момент на экране. В нижней части показаны относительные значения уровней, отображенных на экране. В центре расположен маркер, который можно двигать с помощью клавиш со стрелками и снимать относительные координаты интересующей точки.

Формирование набора отображаемых на экране сечений может происходить в режимах **Add**, **Del** или **Show** - добавление к имеющемуся изображению линий уровня нового сечения; удаление с экрана линий уровня одного из сечений; отображение на экране линий уровня только одного (выбранного пользователем) сечения. Во всех трех режимах для задания сечения можно либо набрать его номер, либо вывести необходимую группу сечений, манипулируя клавишами "PgUp" и "PgDn".

Изменение масштаба изображения и сдвиг окна.

Сцена изменения масштаба ("Frame") вызывается нажатием клавиши "F". В левое информационное поле выводятся значения масштаба, координаты центра и границы окна, а в центре появляется маркер, который можно перемещать. Положение маркера задает центр нового окна, которое появится после возвращения в основную сцену. Текущий масштаб можно изменить либо вводом числового значения, либо нажатием клавиш "+" ("."). При уменьшении значения масштаба движущиеся границы в окне показывают область, которая займет все окно, если будет взято данное значение масштаба.

Задание значений уровней.

Сцена выбора значений линий уровней ("Levels"), в которой можно изменить количество изолиний, значения уровней, цвет изолиний, вызывается нажатием клавиши "L". С каждой поверхностью уровня функции $\rho(r)$ связаны две величины: абсолютное значение ρ_0 , которому соответствует поверхность $\rho(r)=\rho_0$; относительный объем (по отношению к полному объему V_{cell}) части элементарной ячейки V_p , ограниченной этой поверхностью:

$$V = (V_p / V_{cell}) \times 100\%,$$

где V_p - объем области в ячейке, в точках которой $\rho(r) \geq \rho_0$. Для задания уровня можно использовать любую из этих двух характеристик, при этом другая будет рассчитана программой автоматически.

Установка и изменение параметров модели.

В этой сцене можно ввести или изменить имя файла с моделью, которую требуется вывести на экран; шаг трансляции и шаг вращения, используемые при модификации модели; номер первого остатка и шаг, с которым выводятся номера остатков; цвет для изображения модели; пространственную группу в случае необходимости вывода на экран всех связанных по симметрии молекул. После установки нужных параметров пользователь имеет возможность ввести в работу либо всю атомную модель, либо только последовательность Сα атомов (рис.9).

Модификация модели (сдвиг и вращение).

Выведенную на экран модель (рис.10) можно двигать и вращать как жесткое тело. В этом режиме возможны следующие действия:

Translation / Rotation - переход в режим трансляции/вращения;

Update - восстановление исходного положения;

Save - запоминание текущего положения модели;

Get - восстановление положения модели, которое запомнили ранее;

New step - увеличение/уменьшение шага трансляции или вращения;

Shift - трансляция или вращение модели вокруг осей координат.

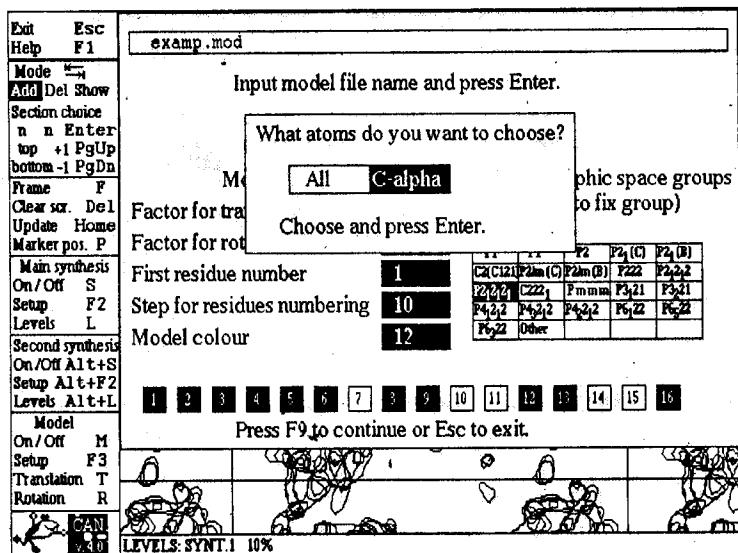


Рис.9. Задание параметров для рисования атомной модели.

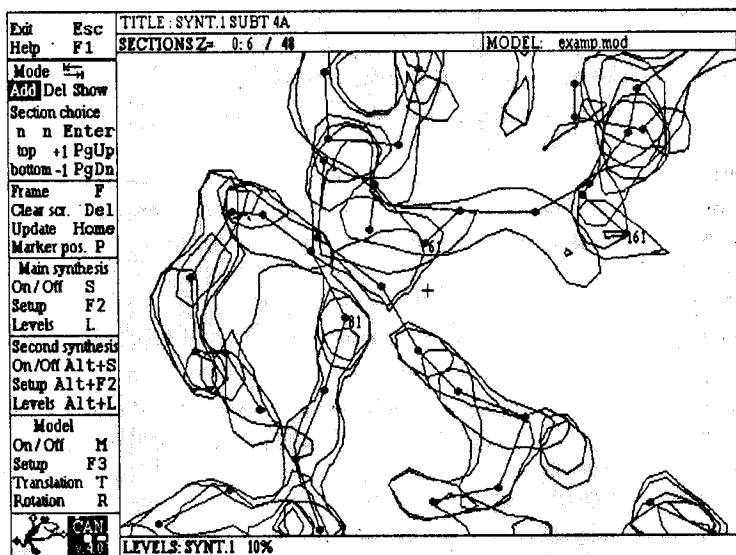


Рис.10. Изображение синтеза электронной плотности с наложенной атомной моделью.

Глава 4. Применение комплекса программ FROG и графических программ в работах с реальными объектами.

По запросам пользователей графические программы были разосланы более чем по 20 адресам в зарубежные университеты, институты и научно-исследовательские центры. Программы, полученные в университетах, применяются в качестве учебных тренажеров для расчетов и сравнения синтезов разных типов, демонстрации моделей молекул белка, их пространственной упаковки в кристалле, иллюстрации синтезов разного разрешения и т.д. При изучении курса кристаллографии биологических макромолекул программы эффективно использовались на практических занятиях магистрантов Пущинского ГУ.

Часть лабораторий работает с программами на реальных объектах, используя их для визуализации нескольких вариантов рассчитанных карт электронной плотности с различными весовыми схемами на разном разрешении, т.е. в тех случаях, когда приходится иметь дело с многочисленными расчетами и просмотром карт электронной плотности.

Тестирование и применение метода FAM прямого определения фаз для макромолекул.

Активное использование программ CAN и FFT позволило провести тестирование метода FAM (Few Atoms Model) прямого определения фаз для макромолекул на низком разрешении, разработанного в лаборатории кристаллографии макромолекул ИМПБ РАН совместно с лабораторией структурной биологии Института молекулярной и клеточной биологии, г.Страсбург (Франция).

Метод состоит из следующих шагов:

- a) в элементарной ячейке случайным образом генерируется множество атомных моделей, состоящих из небольшого числа псевдоатомов;
- b) по каждой модели рассчитываются структурные факторы;
- c) отбираются и сохраняются наборы фаз таких моделей, для которых соответствующие рассчитанные модули структурных факторов и экспериментальные амплитуды имеют высокий коэффициент корреляции;
- d) для отобранных наборов фаз применяется процедура кластеризации, строится кластерное дерево, в котором каждый ветвящийся узел соответствует синтезу Фурье, рассчитанному с фазами, усредненными по элементам данного кластера.

В результате остается несколько возможных решений фазовой задачи, и на этом этапе необходимым инструментом исследования становится визуальный анализ и сравнение возможных вариантов решения. Для каждого из кластеров определяется набор усредненных фаз, затем с помощью программы FFT рассчитывается синтез распределения

электронной плотности и производится его визуальная оценка (программой CAN или FAN). В совокупности с применением количественных критериев фазовой оценки, визуальный просмотр результирующих синтезов дает возможность отобрать набор фаз, наилучшим образом воспроизводящий исследуемый объект.

Описанная процедура успешно применялась для работы с данными нейтронной дифракции комплекса AspRS-tRNA^{Asp} на разрешении 50Å, с модельным кристаллом рибосомы на разрешении 60Å и с реальными данными по рибосоме. В случае применения метода FAM к модельным данным в качестве точной модели использовалась электронная плотность, построенная по данным электронной микроскопии для рибосомной частицы 50S на разрешении 28Å [6]. Модельная плотность была размещена в элементарную ячейку с параметрами $a=b=495\text{Å}$, $c=196\text{Å}$, и были рассчитаны структурные факторы разрешения 60-500Å, имитирующие экспериментальные рентгеновские данные. Рис.11(a) демонстрирует эталонный синтез на разрешении 60Å. На рис.11(b) изображено кластерное дерево, соответствующее 1000000 генераций атомных моделей, состоящих из 5 атомов. При этом отобрано 90 наборов фаз с коэффициентом корреляции модулей $\text{cog}(F)>0.85$. Если в качестве решения взять набор фаз, усредненный по отобранным вариантам (это соответствует всему кластерному дереву C00), то синтез с такими фазами выглядит как на рис.11(c). Если двигаться по дереву в точки C11, C12, C21, C22, C23, C24 и в качестве решений брать усредненные по соответствующим подмножествам наборы фаз, то синтезы выглядят как на рис.11(d). Эксперименты показали, что достаточно спуститься по дереву на 2-3 уровня, т.е. построить и просмотреть порядка 6-8 синтезов, чтобы выбрать нужное решение. В данном случае правильному решению соответствует набор фаз, отвечающий кластеру C24. Топология кластерного дерева не зависит от числа случайных генераций атомных моделей и от количества атомов в модели.

При работе на реальных данных по рибосомной частице 50S процедура проводилась аналогичным образом: был сгенерирован миллион вариантов моделей, каждая из которых состояла из 5 атомов диаметром около 25Å. Из них было отобрано 560 вариантов с высоким коэффициентом корреляции (выше 86%) для последующего кластерного анализа. Неподходящие в качестве возможного решения кластеры легко идентифицировались визуально, поскольку рассчитанная для них электронная плотность концентрировалась на поворотных осях симметрии. Из оставшихся вариантов решения было выбрано одно, которое хорошо коррелировало с результатами, полученными другими методами.

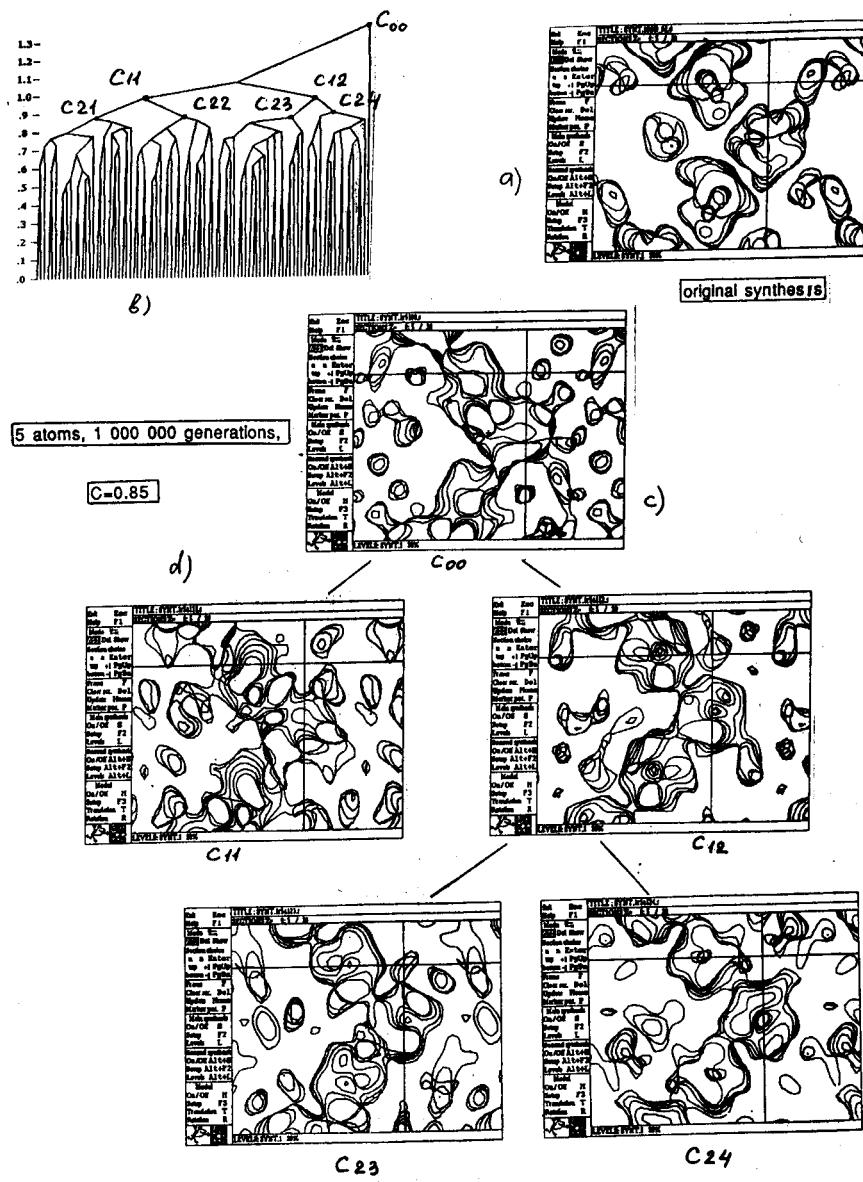


Рис.11. Метод FAM прямого определения фаз на примере модельных данных по рибосоме на разрешении 60 Å.

Расшифровка структуры γ -кристаллина III b .

Совместно с сотрудниками Института белка РАН с использованием комплекса программ FROG расшифрована структура белка γ -кристаллина III b из хрусталика глаза теленка (пространственная группа P2₁2₁2₁, параметры элементарной ячейки $a=58.7\text{\AA}$, $b=69.5\text{\AA}$, $c=116.9\text{\AA}$). Асимметричная часть ячейки содержит две молекулы белка, каждая весом 21 кДа (173 аминокислотных остатка).

Работа проводилась в два этапа. На первом этапе определение структуры велось по данным разрешения 2.5 \AA , собранным с одного монокристалла нативного белка. Набор содержал 13326 рефлексов в области 20–2.5 \AA , фазы структурных факторов в зоне разрешения до 3.0 \AA были получены ранее методом изоморфного замещения с использованием аномального рассеяния. Была построена исходная для уточнения модель, содержащая 95% всех неводородных атомов. Кристаллографическое уточнение с использованием комплекса программ FROG с рентгеновским критерием и стереохимическими и энергетическими ограничениями дало возможность получить модель с R-фактором 0.25. В процессе уточнения оказалось полезным попеременное ослабление и усиление требований, накладываемых на геометрические параметры.

На втором этапе использовался набор данных, полученный на источнике синхротронного излучения в Дарсбери (Англия) на разрешении 1.9 \AA . Изменение условий съемки привели к модификации структуры молекулы и упаковки таким образом, что параметры элементарной ячейки стали $a=57.4\text{\AA}$, $b=69.2\text{\AA}$, $c=115.5\text{\AA}$. Новую форму кристалла обозначили как "dry" форму в отличие от предыдущей "wet" формы. Набор дифракционных данных, полученных с кристаллического образца "dry" формы, отличается от данных, снятых с кристалла "wet" формы, с R(F) = 25.5%, т.е. это разные кристаллические формы γ -кристаллина III b с несколько отличающейся упаковкой молекул в элементарной ячейке. Это потребовало проведения предварительного уточнения модели "wet" формы, которая была взята как стартовая, как жесткого тела, за чем последовало постепенное увеличение числа степеней свободы. На каждом этапе уточнения модель состояла из все более мелких жестких групп.

Компьютерное моделирование белковых гибридов: лизоцим фага T4 с CA²⁺ - связывающим модулем (EF-рукой).

Создание белковых гибридов, объединяющих структурно-функциональные участки разных белков, представляет перспективное направление белковой инженерии. Трансплантация в определенный белок фрагмента "чужой" белковой структуры позволяет контролировать его функции или адресовать его действие. Для этого необходимо, чтобы все компоненты

гирида были структурно совместимы, т.е. чтобы они состыковывались без сильных искажений нативной конформаций и нарушения принципов структурной организации белковых молекул. Наиболее эффективным методом проверки структурной совместимости является компьютерное моделирование с использованием программ уточнения и анализа структуры макромолекул.

Фрагмент 37-73 лизоцима фага T4 напоминает структуру так называемой 'EF-руки' - CA²⁺- связывающего центра некоторых белков (парвальбумин, тропонин С), хотя структура лизоцима не имеет CA²⁺- связывающей конформации. Участок 51-62 лизоцима в первой позиции отличается от трафаретной последовательности, и было предположено, что точечная замена 51 Gly→Asp придаст этому участку конформацию CA²⁺-связывающей петли. Был проведен вычислительный эксперимент с помощью комплекса программ FROG, чтобы установить, может ли фрагмент лизоцима при такой замене принять форму EF-руки без серьезного нарушения стереохимии. Стартовая модель - набор координат лизоцима с добавлением боковой группы Asp, закрепленной на Сα-атоме Gly51 - постепенно модифицировалась таким образом, чтобы придать участку 51-62 конформацию участка 90-101 парвальбумина с соблюдением стереохимических, конформационных и упаковочных критериев. Области молекулы, не взаимодействующие с изменяемым участком, были зафиксированы, некоторые элементы вторичной структуры (α -спирали 1-11, 40-46, 63-80; β -стренд 14-33) двигались как жесткие группы. Петли и оставшаяся часть α -спирали (47-62 остатки) моделировались свободными атомами с наложенными стереохимическими и энергетическими ограничениями. Анализ полученной модели показал, что замена 51 Gly→Asp вписывается в нативную структуру фагового лизоцима без стерических затруднений.

Расширение набора фаз структуры лектина гороха.

Совместно с сотрудниками Института молекулярной генетики РАН методом рентгеноструктурного анализа определена пространственная структура комплекса белка лектина из семян гороха с глюкозидом /7/.

Лектин гороха - димер, состоящий из идентичных мономеров с молекулярной массой 52 кДа (около 480 остатков), пространственная группа P2₁2₁2₁, параметры элементарной ячейки a=51.0 Å, b=61.7 Å, c=137.6 Å. Результаты по определению структуры этого белка методом изоморфного замещения при разрешении 3 Å с установлением хода полипептидной цепи описаны в /8/. Невысокое качество карт электронной плотности вследствие ограниченного числа изоморфных производных при разрешении 3 Å позволило локализовать лишь 40% неводородных атомов

белка. Для улучшения качества и повышения разрешения синтезов электронной плотности был использован метод смешанной модели с фиктивными атомами, реализованный в комплексе программ FROG. Такая модель содержала атомы частичной стартовой модели с наложенными стереохимическими ограничениями и независимые фиктивные атомы, посаженные в оставшуюся часть электронной плотности. В конце работы набор фаз был расширен с 3.0 \AA до 2.4 \AA , что позволило улучшить карты электронной плотности. При этом повышение разрешения до 2.4 \AA позволило определить координаты уже 66% неводородных атомов белка.

Расширение набора фаз структуры капсида вируса крапчатости гвоздики.

Структура на низком разрешении (до 18 \AA) и приблизительное положение в ячейке молекулы вируса крапчатости гвоздики (*CM_tV*) были ранее определены в Институте кристаллографии РАН /9/. Кристаллы *CM_tV* принадлежат к пространственной группе F23 с $a=b=c=482.6\text{\AA}$. Среди расшифрованных структур сферических вирусов наиболее сходное с *CM_tV* строение имеет *TBSV*, атомная модель которого была взята в качестве стартовой для уточнения положения модели *CM_tV* и расширения набора фаз до разрешения 6 \AA /10/. Реконструирование модели *CM_tV* по данным атомной структуры *TBSV* проводилось при помощи программ комплекса FROG. Ассиметрическая часть икосаэдрической вирусной частицы была составлена из А, В- и С-молекул *TBSV*, каждая из которых включала в себя по 6642 неводородных атомов. Высокая гибкость управления, быстродействие, возможность объединения атомов в жесткие группы сделали FROG наиболее приемлемой программой для проведения расчетов с такими большими объектами, как вирусы.

На первом этапе проводилось уточнение положения и ориентации каждой из молекул А, В, С независимой части капсида как жесткого тела. В работе использовались 18050 модулей структурных факторов независимой части области 10 - 6 \AA дифракционного спектра *CM_tV*. На следующем шаге уточнялись положение и ориентация раздельно Р- и S-доменов, объявленных жесткими телами. На третьем этапе было проведено уточнение параметров вторичной структуры модели, для чего в доменах жесткими группами были объявлены все β -ленты и α -спирали. На заключительном этапе построения модели каждый из составляющих ее атомов объявлялся независимым. В результате проделанной работы R-фактор снизился с 42.4% до 25.1%.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ:

1. Разработаны алгоритмы и создано программное обеспечение в рамках комплекса программ FROG для решения задач рентгеновской кристаллографии, конформационного анализа, расчетных задач белковой инженерии. Его характерными особенностями являются высокое быстродействие на основе применения алгоритма быстрого дифференцирования и быстрого преобразования Фурье, возможность работы с атомно-блочной моделью, задание критериев уточнения внешними файлами, применение R-free фактора как дополнительного критерия оценки качества модели, адаптируемость к размеру доступной памяти, возможность работы на любых типах компьютеров.
2. Создано программное обеспечение для персональных компьютеров IBM PC для расчета, визуализации и исследования синтезов распределения электронной плотности Фурье и Паттерсона любого типа в любой пространственной группе (в режиме моно- или стерео-) и атомной модели исследуемого объекта.
3. Совместно с сотрудниками Института белка РАН комплекс программ уточнения FROG применялся при расшифровке структуры γ -кристаллина IIIb из хрусталика глаза теленка на разрешении 2.5 Å и 1.9 Å.
4. С применением комплекса FROG проведены эксперименты по компьютерному моделированию белковых гибридов (лизоцима фага T4 с CA²⁺- связывающим модулем).
5. Сотрудниками Института молекулярной генетики РАН совместно с сотрудниками лаборатории кристаллографии макромолекул ИМПБ РАН с помощью программ уточнения FROG определена пространственная структура комплекса белка лектина из семян гороха с глюкозидом на разрешении 2.4 Å.
6. Проведено уточнение положения модели и расширение набора фаз с 18 Å до 6 Å структуры CM_tV капсида вируса крапчатости гвоздики совместно с сотрудниками Института кристаллографии РАН.
7. Графические программы активно использовались в работах с модельными и реальными данными на разрешении 60 Å по рибосомной частице 50S при тестировании и применении метода FAM (Few Atom Models) прямого определения фаз для макромолекул на низком разрешении.
8. Графические программы переданы более чем в 20 зарубежных лабораторий в университетах, институтах и научно-исследовательских центрах.

Материалы диссертации опубликованы в следующих работах:

1. В.Ю.Лунин, А.Г.Уржумцев, Е.А.Вернослова, Ю.Н.Чиргадзе, Н.П.Фоменкова, Н.А.Невская (1984) "Использование смешанной модели электронной плотности для улучшения набора фаз в белковой кристаллографии", препринт, Пущино
2. Lunin V.Yu., Urzhumtsev A.G., Vernoslova E.A., Chirgadze Yu.N., Nevskaya N.A., Fomenkova N.P. (1985) "Phase Improvement in Protein Crystallography Using a Mixed Electron Density Model", *Acta Cryst.*, A41, p.166-171
3. Ю.Н.Чиргадзе, Н.А.Невская, Н.П.Фоменкова, Ю.В.Сергеев, С.В.Никонов, Е.В.Бражников, М.Б.Гарбер, В.Ю.Лунин, А.Г.Уржумцев, Е.А.Вернослова (1986) "Пространственная структура гамма-кристаллина III из хрусталика глаза теленка при разрешении 2.5 Å", ДАН СССР, т.290, N2, стр.492-495
4. Murzin A.G., Vernoslova E.A. (1988) "Computer Modelling of Protein Hybrids: Phage T4 Lysozyme with a Ca^{2+} -binding Module (EF-Hand)", 5th Conference of Young Scientists of Socialist Countries on Bioorganic Chemistry, Pushchino, USSR, p.83-84
5. А.Г.Уржумцев, В.Ю.Лунин, Е.А.Вернослова (1988) "Комплекс программ FROG", материалы по математическому обеспечению ЭВМ, серия "Фортран", программный выпуск N 10, Пущино
6. A.G.Urzhumtsev, V.Yu.Lunin, E.A.Vernoslova (1989) "New Refinement Program FROG Gives New Possibilities to Study Macromolecular Models", Proceedings of the First international meeting on Structure and Chemistry of Ribonucleases, 410-415, Moscow
7. А.Г.Уржумцев, В.Ю.Лунин, Е.А.Вернослова (1989) "FROG - комплекс программ для локального уточнения атомной структуры макромолекул", Программное обеспечение ЭВМ, вып.86 "Компьютерные методы белковой инженерии", стр.86-97, Минск
8. Chirgadze Yu.N., Nevskaya N.A., Vernoslova E.A., Nikonorov S.V., Sergeev Yu.V., Brazhnikov E.V., Fomenkova N.P., Lunin V.Yu., Urzhumtsev A.G. (1989) "Refined Structure of Calf Lens γ -crystallin IIIb at 2.5Å Resolution", Twelfth European Crystallographic meeting, Collected Abstracts, vol.2, p.362, Moscow
9. Chirgadze Yu.N., Nevskaya N.A., Vernoslova E.A., Urzhumtsev A.G., Lindley P., Bibby M. (1989) "Structure Refinement of "dry" Crystal Form of Calf Eye Lens γ -crystallin IIIb at 1.9Å Resolution", Twelfth European Crystallographic meeting, Collected Abstracts, vol.2, p.363, Moscow

- 10.Urzhumtsev A.G., Lunin V.Yu., Vernoslova E.A. (1989) "FROG: New Refinement Program", Twelth European Crystallographic meeting, Collected Abstracts, vol.3, p.193, Moscow
- 11.A.G.Urzhumtsev, V.Yu.Lunin, E.A.Vernoslova (1989) "High-speed Restraint-Constraint Refinement Program FROG for Macromolecular Models", J.Appl.Cryst., 22, p.500-506
- 12.E.A.Vernoslova, V.Yu.Lunin (1990) "FAN. Visual Analysis of Functions Depending on Three Variables. User Manual.", Ed. by Applied Biomathematics, Setauket, New York
- 13.E.A.Vernoslova, V.Yu.Lunin (1991) "FAN. Scalar Field Analysis", in Tools for Learning, Courseware Catalog, 1990-91 Academic Year, Academic Information Systems, IBM
- 14.V.Yu.Lunin, E.A.Vernoslova (1991) "Frequencies-Restrained Structure Factor Refinement. II. Comparison of Methods", Acta Cryst., A47, p.238-243
- 15.Yu.Chirgadze, N.Nevskaya, E.Vernoslova, S.Nikonov, Yu.Sergeev, E.Brazhnikov, N.Fomenkova, V.Lunin, A.Urzhumtsev (1991) "Crystal Structure of Calf Eye Lens Gamma-crystallin IIIb at 2.5Å Resolution: Its Relation to Function", Experimental Eye Research, 53, p.295-304
- 16.E.A.Vernoslova, V.Yu.Lunin (1993) "FROG PC series. Programs for Electron Density and Model Investigation for Proteins", J.Appl.Cryst., v.26, part 2, p.291-294
- 17.Vernoslova E.A., Urzhumtsev A.G. (1994) "Current Development in the Program Package FROG for Atomic Model Refinement", Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography, 30, p.27-28
- 18.Lunin V.Yu., Lunina N.L., Petrova T.E., Vernoslova E.A., Urzhumtsev A.G., Podjarny A.D. (1994) "On the ab-initio Solution of the Phase Problem for Macromolecules at Very Low Resolution", Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography, 30, p.37-44
- 19.Urzhumtsev A.G., Lunin V.Yu., Vernoslova E.A., Lunina N.L., Petrova T.E., Navaza J., Podjarny A.D. (1994) "Very Low Resolution Phasing with Simple Models", 15th Eur.Cryst.Meeting, Dresden,Germany, 29.8-2.9/1994, Coll.Abstr., R.Oldenbourg Verlag, Munchen, p.217
- 20.J.Navaza, E.Vernoslova "On the Fast Translation Function for Molecular Replacement" (1995), Acta Cryst., A51, p.445-449
- 21.Lunin V.Yu., Lunina N.L., Petrova T.E., Vernoslova E.A., Urzhumtsev A.G., Podjarny A.D. (1995) "On the ab-initio Solution of the Phase Problem for Macromolecules at Very Low Resolution: The Few Atoms Model Method", (1995), Acta Cryst., D51, 896-903

Список цитированной литературы:

- 1.Brünger,A.T. "Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures", Nature, 1992, **355**, p.472-475
- 2.Лунин В.Ю. "Использование алгоритма быстрого дифференцирования в задаче уточнения значений фаз структурных факторов", 1984, препринт, Пущино
- 3.Ten Eyck,L.F. "Efficient structure-factor calculation for large molecules by the fast Fourier transform", Acta Cryst., 1977, **A33**, p.486-492
- 4.Ivanov,M.E., Urzhumtsev,A.G. "FROG PC - a menu-based environment for atomic model refinement program on a personal computer", Joint CCP4 and ESF-EACBM newsletter on protein crystallography, 1995, 31, p.20-22
- 5.Cooley,J.W., Tukey,J.W. "An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series", Math.Comput., 1965, **19**, p.297-301
- 6.Berkovitch-Yellin,Z., Wittmann,H.G., Yonath,A. "Law-resolution models for ribosomal particles reconstructed from electron micrographs of tilted two-dimensional sheets", Acta Cryst., 1990, **B46**, p.637-643
- 7.Лобсанов Ю.Д., Плетнев В.З., Втюрин Н.Н., Лубнин М.Ю., Мокульский М.А., Уржумцев А.Г., Лунин В.Ю., Лузянина Т.Б. "Рентгеноструктурные исследования комплекса лектина из гороха с углеводом при разрешении 2.4Å. I. Атомная модель", Биоорганическая химия, 1990, **16**, p.1589-1598
- 8.Рискулов Р.Р., Кузев С.В., Лобсанов Ю.Д., Лубнин М.Ю., Мокульская Т.Д., Мокульский М.А., "Рентгеновское исследование структуры лектина гороха с разрешением 3Å", ДАН СССР, 1987, **292**, №2, стр.486-490
- 9.Моргунова Е.Ю., Михайлов А.М., Некрасов Ю.В., Кафтанова А.С., Вайнштейн Б.К. "Локализация вирионов крапчатости гвоздики в кристалле", ДАН СССР, 1988, **299**, №5, стр.1129-1134
- 10.Моргунова Е.Ю., Михайлов А.М., Уржумцев А.Г., Вайнштейн Б.К. "Строение капсида CMV при разрешении 6Å в кристаллическом состоянии", Кристаллография, 1992, **37**, стр.396-404

14.08.96 г. Усл. печ. л. 1,7. Тир. 100 экз. Зак. 7176Р.
Отпечатано на ротапринте в ОНТИ ПНЦ РАН.