

# ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В СТРУКТУРНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ В НАЧАЛЕ XXI ВЕКА

© 2002 г.

И. Н. СЕРДЮК

*Институт белка РАН, Пущино, Московская область  
Лаборатория нейтронной физики ОИЯИ, Дубна, Московская область*

I. Введение. II. Физические методы в пре-геномную эру.  
III. Физические методы в пост-геномную эру. IV. Физические  
методы и будущая структурная биология. V. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

Датой рождения структурной молекулярной биологии принято считать 1953 год, когда Дж. Уотсон и Ф. Крик предложили модель ДНК в виде двойной спирали и объяснили с ее помощью механизм воспроизведения жизни. Этот год явился началом нового направления в биологической науке, главной целью которого было установление связи между структурой и функцией макромолекул. В процессе своего развития она потребовала от физиков разработки новых методов, пригодных для исследования молекул, гораздо более сложных в структурном отношении, чем ДНК. В настоящее время мы располагаем рядом физических методов, позволяющих изучать структуру молекул с разным пространственным разрешением: от низкого, соответствующего размерам целой молекулы, до высокого, соответствующего расстояниям между отдельными атомами в молекуле.

Прогресс в развитии физических методов к концу этого столетия достиг столь впечатляющих успехов, что это дает возможность говорить о начале второго этапа в развитии структурной биологии, который иногда называют новой биологической революцией. В этой революции решающая роль принадлежит двум физическим методам: рентгеновской кристаллографии с использованием синхротронных источников, и ядерному магнитному резонансу, обеспечивающим сегодня основной поток информации о структуре биологических макромолекул с высоким пространственным разрешением. Все

возрастающий поток этой информации позволяет утверждать, что уже в ближайшем будущем нам предстоит узнать пространственную структуру огромного числа биологических макромолекул.

Это привело к зарождению новой ветви науки, называемой сегодня структурной геномикой, предметом которой является не только установление структуры генома как последовательности генов, но и установление структуры всех белков, которые эти гены кодируют. Несомненно, что следующим шагом в этом направлении будет выяснение структурных основ функционирования все более сложных образований, от простейших организмов, состоящих из относительно небольшого числа генов, вплоть до человека, о предварительной расшифровке полного генома которого недавно объявлено.

Последние достижения в технике разделения белков с помощью двумерного гель-электрофореза и их последующий анализ с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения создали предпосылки для дальнейшего развития структурной геномики, получившей название функциональной протеомики — науки, главной задачей которой является выяснение механизма функционирования клетки в динамическом режиме, когда белки классифицируются не только по массе, но и по функции.

В обзоре описано развитие физических методов в прошлом и настоящем и дано представление об их развитии в будущем. Первый раздел охватывает период развития физических методов с 1953 до 1995 года, то есть с даты рождения молекулярной биологии и до года полной расшифровки структуры первого генома. Во втором разделе рассматривается состояние позднейших исследований вплоть до настоящего времени. И, наконец, в третьем разделе обсуждаются перспективы развития методов в XXI веке.

## **II. ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ПРЕ-ГЕНОМНУЮ ЭРУ**

### **СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ**

Датой рождения молекулярной биологии принято считать 1953 год, когда Дж.Уотсон и Ф.Крик предложили модель структуры ДНК в виде двойной спирали и объяснили на ее основе механизм репликации ДНК. Согласно модели Уотсона и Крика [115] репликация двойной цепи ДНК приводит к образованию двух гибридных молекул, каждая из которых состоит из одной родительской и одной дочерней цепей. Обе новые молекулы полностью идентичны друг другу и повторяют исходную двойную цепь. Выдвигая модель двойной спирали, Уотсон и Крик располагали рентгенограммами частично

ориентированных волокон ДНК. Эти рентгенограммы прямо не доказывали существование двойной спирали, а лишь свидетельствовали о наличии спирали с постоянным шагом и диаметром. Однако авторы модели ДНК гениально догадались, что двойная спираль будет иметь постоянный шаг и диаметр, если допустить уникальность спаривания А–Т и Г–Ц пар, поскольку главной структурной особенностью этих пар является полная тождественность их суммарных размеров.

Отсутствие строгих экспериментальных доказательств существования двойной спирали дало основание другой группе авторов подвергнуть сомнению эту модель и выдвинуть альтернативную, так называемую бок-о-бок (side-by-side) модель ДНК [86]. С чисто структурных позиций авторы этой модели формально были правы: спираль с шагом и диаметром, близкими к модели двойной спирали, можно образовать просто стыкованием двух однонитчатых спиралей ДНК. И хотя эта модель не выдержала испытания временем, однако она ясно продемонстрировала необходимость разработки метода, позволяющего получать структуру биологической макромолекулы с более высоким пространственным разрешением.

Появление такого метода не заставило себя долго ждать, и уже в 1957 году М.Перутц и Д.Кендрю нашли способ решения фазовой проблемы методом изоморфного замещения с помощью тяжелоатомных производных и продемонстрировали всю мощь метода рентгеновской дифракции на примере исследования структуры гемоглобина [79]. Для расшифровки структуры этого белка потребовалось много времени, и тогда казалось, что необходимость кристаллизации и большая трудоемкость метода сильно ограничивают возможность получения информации о пространственной структуре других биологических макромолекул. Такого же рода сомнения возникали и в отношении метода нейтронного структурного анализа. В 1969 году Б.Шоенборн реализовал на практике уникальные возможности этого метода, локализовав атомы водорода и молекулы воды в миоглобине уже при разрешении близком к  $2,5 \text{ \AA}$ . Однако это потребовало огромных финансовых и временных затрат [93]. Поэтому основное внимание физиков было переключено на разработку и совершенствование относительно более простых методов изучения структуры макромолекул с низким и средним пространственным разрешением.

#### ГИДРОДИНАМИКА

К таким методам относились прежде всего гидродинамические методы, основанные на анализе диффузии, седиментации и вязкости. Теоретические и экспериментальные основы этих подходов были заложены еще задолго до появления работы Крика и Уотсона.

Классическими работами А. Стокса, Ф. Перрена и А. Эйнштейна было показано, что константа поступательного трения молекулы, определяемая из опытов по седиментации и диффузии, дает возможность определять ее линейные размеры. Так впервые были определены гидродинамические размеры белков. Оказалось, что при сочетании методов седиментации и диффузии можно определять их молекулярные массы. Ряд принципиальных результатов, полученных с помощью метода седиментации — открытие рибосом, доказательство полуконсервативного механизма репликации ДНК, эффект изменения размеров молекулы гемоглобина при оксигенировании — обеспечили этому методу очень широкую популярность в 60–70-е годы.

Трудами уже упоминавшихся трех авторов было показано, что расчет константы вращательного трения молекулы, основанный на опытах по измерению характеристической вязкости биологических макромолекул, их ориентации в гидродинамическом поле (эффект Максвелла) и электрическом поле (эффект Керра), позволяет определять объем макромолекул. Было продемонстрировано, что измерения вязкости растворов биологических макромолекул, не требующие сложной аппаратуры, позволяют разделить нативные биологические макромолекулы, например белки и вирусы, на три класса. Первый класс составляют глобулярные белки и сферические вирусы, характеристическая вязкость которых не зависит от молекулярной массы, а ее величина составляет 4–6 см<sup>3</sup>/г [14]. Во второй класс попадают фибриллярные белки и палочкообразные вирусы, характеристическая вязкость которых сильно увеличивается с ростом молекулярной массы и степени вытянутости, а ее значения, как в случае коллагена, составляют сотни, а иногда и тысячи см<sup>3</sup>/г. И, наконец, к третьему классу можно отнести белки любой формы в «универсальном растворителе» (8 М мочевины или 6 М гуанидингидрохлорид с добавкой агента, разрывающего дисульфидные связи), в котором молекула принимает конформацию развернутого беспорядочного клубка. В этом растворителе характеристическая вязкость белков монотонно возрастает с ростом их молекулярной массы.

Для характеристики гибкости биологических макромолекул наиболее адекватным оказался метод динамического двойного лучепреломления в потоке. Открытый еще в 1856 году Дж. Максвеллом на чистых жидкостях эффект двойного лучепреломления стал применяться для исследования белков и нуклеиновых кислот в начале 70-х годов прошлого века. Оказалось, что при ориентации молекул белков в гидродинамическом поле имеет место чисто ориентационный эффект, свидетельствующий о том, что молекулы белков являются жесткими частицами. Для нуклеиновых кислот кроме ориентацион-

ного эффекта, при больших градиентах скорости гидродинамического поля становится заметным эффект деформации структуры [2]. Последнее проявляется в нелинейном ходе зависимости угла ориентации молекул от градиента скорости и означает, что обладая ярко выраженной вторичной структурой, эти молекулы, в отличие от белков, не имеют уникальной жесткой третичной структуры.

Электрическое двойное лучепреломление, открытое Дж. Керром в 1800 году, до недавнего времени относительно мало применялось в биологии в силу специфики приложения длительного электрического поля к водным растворам.

Однако внедрение в практику коротких импульсных полей и современных методов регистрации позволило создать высокочувствительный метод исследования спектра вращательных времен молекулы под действием электрического поля [41]. Магнитное двойное лучепреломление использовалось для изучения ориентации асимметричных биологических молекул в магнитных полях [107].

Теоретические основы метода поляризованной флуоресценции были разработаны Ф. Перреном и Г. Вебером в первой половине XIX века. В явлении флуоресценции между актом поглощения кванта света и его испусканием всегда проходит конечное время ( $10^{-8}$ — $10^{-9}$  сек), которое по порядку величины равно времени вращательной диффузии молекул глобулярных белков. Эти два факта легли в основу создания относительно простых экспериментальных схем определения коэффициентов вращательного трения молекул белков методом поляризованной флуоресценции как в статическом, так и в импульсном режиме [14].

Принципиально новый шаг в развитии метода флуоресценции, не имеющий прямого отношения к гидродинамике, был сделан в 70-ых годах, когда Т. Ферстер теоретически и Л. Стриер и Р. Хогланд экспериментально показали, что используя специальным образом подобранную пару молекул донор—акцептор, можно методом исследования переноса энергии электронного возбуждения определить расстояние между ними [28, 101]. Так была создана *флуоресцентная линейка*, позволяющая определять расстояния в несколько десятков ангстрем между мечеными частями молекулы с точностью в несколько ангстрем и применяющаяся сегодня для исследования самых разных биологических систем [122]. Последние достижения в создании высокоскоростной аппаратуры на импульсных лазерах расширили сферу применения метода флуоресценции, создав фактически новое направление, главной задачей которого является исследование динамических процессов в окружении люминофора с высоким временным разрешением [62]. Использование методов сайт-специфического мутаге-

неза, позволяющего варьировать число люминофоров в белке, дает возможность создавать белки с уникальными спектроскопическими особенностями. Регистрация спада интенсивности флюоресценции методом счета единичных фотонов с последующим корреляционным анализом, использование лазеров на кристаллах сапфира с примесью титана, микроканальных пластинчатых фотоэлектронных фотоумножителей позволяет достичь рекордного на сегодняшний день временного разрешения в несколько пикосекунд [37].

#### ДИНАМИЧЕСКОЕ РАССЕЙНИЕ СВЕТА

В начале XX века трудами Л.Бриллюена и Л.Мандельштама было найдено, что интенсивность света, рассеянного ансамблем макромолекул, должна быть промодулирована спонтанными флуктуациями плотности. В 1964 году Р.Пекора теоретически показал, что в оптическом спектре излучения света, рассеянного диффундирующими частицами, содержится информация как о трансляционной, так и о вращательной диффузии [78]. С использованием лазеров и быстродействующих временных анализаторов интенсивности света (корреляторов) в практике молекулярной биологии появилась возможность методом динамического рассеяния света (ДРС) в считанные минуты определять коэффициенты поступательного трения [10]. Столь малые времена регистрации связаны с тем, что для получения значимого сигнала в методе ДРС макромолекуле достаточно пройти путь, соизмеримый с длиной волны света, тогда как в методе определения диффузионной подвижности стандартным методом переноса границы макромолекула должна пройти путь, равный половине длины ячейки (обычно несколько сантиметров). Было показано, что коэффициенты вращательного трения очень асимметричных молекул и спектр мод внутренних движений гибких молекул могут быть определены методом ДРС в том случае, если их размеры сравнимы с длиной волны света [118]. Кроме того, эффективность применения этого метода сильно возрастает по мере увеличения молекулярной массы изучаемой молекулы. Для гигантских макромолекул типа ДНК оказывается возможным наблюдать колебания интенсивности рассеянного света, связанного с флуктуацией числа молекул в объеме [19]. В методе локализованного ДРС лазерный пучок фокусируется на одиночной частице микронных размеров. Спектр колебаний такой одиночной частицы во времени и его изменение под действием сил различной природы может быть изучен методом временных корреляционных функций [106].

РАССЕЯНИЕ СВЕТА, РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ  
И НЕЙТРОНОВ В РАСТВОРЕ

Классическим методом определения размеров макромолекул в середине 50-х годов было светорассеяние, теоретические основы которого были разработаны Лордом Реллеем, П. Дебаем и Б. Зиммом. Однако огромная по сравнению с размерами большинства белков длина волны видимого света ограничивала его широкое применение в молекулярной биологии. Место светорассеяния заняло рассеяние рентгеновских лучей, длина волны которых составляет единицы Å. Теоретические основы этого метода созданы А. Гинье, который в начале 60-х годов обратил внимание на то, что при переходе от рассеяния света к рассеянию рентгеновских лучей основной поток рассеянного излучения должен сосредотачиваться в области малых углов [38]. Это привело к появлению термина малоугловое рассеяние. Гинье показал, что в области очень малых углов интенсивность рассеяния от частицы любой формы падает по экспоненте, показатель которой связан с обобщенным размером частицы, ее радиусом инерции. Величина последнего зависит от распределения рассеивающих центров в пространстве частицы и, как следствие этого, от ее размеров и формы [38]. Так появилась *рентгеновская линейка*, позволяющая с высокой точностью определять размеры макромолекул в растворе. Далее было найдено, что с увеличением угла рассеяния спад интенсивности тесно связан с формой частицы и существенно различен для трех базовых конформаций биологических макромолекул, таких как глобула, палочка, клубок. Этот факт лег в основу метода моделирования, когда на основании кривой рассеяния выдвигается метод проб и ошибок модель, не противоречащая кривой рассеяния, а также экспериментальным данным, полученным с помощью других методов [25]. В последнее время разработаны прямые методы интерпретации малоугловых экспериментальных данных компактных частиц, на основе которых предложены алгоритмы построения моделей, пространственное разрешение которых поддается более объективной оценке [103].

Метод рентгеновского малоуглового рассеяния обладает одним существенным недостатком. Он в основном обусловлен тем, что изменить рассеивающие свойства частицы по отношению к рассеивающим свойствам растворителя, то есть изменить контраст в рассеянии рентгеновских лучей, на практике крайне трудно. Для этого в раствор исследуемых молекул необходимо добавить вещество, электронная плотность которого больше таковой у воды. Круг этих веществ очень ограничен (сахароза, глицерин), к тому же интервал изменения контраста невелик [50]. Намного проще решается эта задача для

малоуглового рассеяния нейтронов. К настоящему времени предложено несколько способов, позволяющих менять рассеивающие свойства частицы по отношению к растворителю. В одном из вариантов рассеивающие свойства растворителя изменяются путем использования смесей легкой и тяжелой воды, плотности амплитуд рассеяния которых отличаются не только по величине, но и по знаку. Такой подход получил самое широкое распространение в силу своей простоты и возможности менять контраст в относительно широких пределах. Одним из первых интересных открытий, сделанных с его помощью, было доказательство существования гидрофобного ядра в глобулярных белках, исследования распределения РНК и белка в сферических и палочкообразных вирусах, демонстрация наличия в нуклеосомах белкового ядра [44].

Особенно плодотворной для развития метода нейтронного рассеяния оказалась возможность менять плотность амплитуд рассеяния самой частицы, а не растворителя. Этот подход, получивший название биосинтетического дейтерирования, основан на выращивании клеток микроорганизмов на синтетических средах, содержащих дейтерий. В процессе такого выращивания атомы дейтерия замещают атомы водорода в биологических макромолекулах, что приводит к сильному изменению их рассеивающих свойств. Манипулируя долей дейтерия в среде выращивания можно получать макромолекулы с заданными рассеивающими свойствами, вплоть до получения макромолекул, в которых все атомы водорода в необмениваемых местах макромолекулы замещены на атомы дейтерия. Это позволило не только существенно увеличить отношение сигнал/фон в эксперименте, но и создать *нейтронную линейку*, с помощью которой можно измерять расстояние между центрами тяжести селективно меченных дейтерием двух участков макромолекулы. Такая линейка лежит в основе экспериментальных схем вариации контраста, основанных на использовании смесей биологических макромолекул, дейтерированных в разной степени. Одной из таких схем является схема метода «триангуляции», позволяющая восстанавливать пространственную структуру олигомерного комплекса на основе измерения многих расстояний между отдельными, мечеными дейтерием по специальному правилу, мономерами. Применение этой схемы к 30S рибосомной частице *E. coli* позволило восстановить в ее пространстве положения всех ее 21 белков [15]. Другая схема реализована в методе тройного изотопического замещения, в котором используются три типа частиц, дейтерированных в разной степени (протонированные, частично дейтерированные и полностью дейтерированные) [77]. Этот метод позволяет высвечивать из рассеивающего ансамбля только те частицы или их части, которые мечены дейтерием по правилам метода тройного изотопического замещения [97].

## МИКРОСКОПИЯ

Световая микроскопия является одним из старейших методов клеточной структурной биологии. Традиционно в ней используется оптическая схема, когда линза фокусирует свет на объекте, рассматриваемом глазом. Такая оптическая схема обладает двумя серьезными недостатками. Первый состоит в том, что большинство биологических объектов прозрачны в светосильных полях (малый контраст), что затрудняет их визуализацию. Для улучшения визуализации был предложен ряд подходов: гистохимическое окрашивание образца цветными реактивами, фазовая, поляризационная и интерференционная микроскопия, микроскопия темного поля [99]. Использование флюоресцентных красителей в микроскопии позволяет достичь замечательного результата: визуализовать биологический объект с высокой контрастностью. Развитые на этой основе две схемы, эпифлюоресцентная и конфокальная флюоресцентная микроскопия, позволяют исследовать кинетику и динамику клеточных процессов [32, 57]. Вторым серьезным недостатком традиционной световой микроскопии связан с дифракционным барьером, ограничивающим пространственное разрешение, который не может превышать около  $1/2$  длины волны падающего света. Для зеленого света максимально возможное разрешение составляет около 2500 Å. Недавно в трех публикациях было сообщено о новых подходах, позволяющих преодолеть этот барьер. В первой использовался вариант интерферометрического метода, в котором удалось достичь рекордного разрешения объекта по высоте в несколько ангстрем [20]. Во второй — улучшение обычного инструмента для получения двумерного и трехмерного изображения [61]. И, наконец, в третьей — использование безлинзового светового микроскопа, в котором свет собирается в ограниченной зоне у поверхности исследуемого объекта. Такая микроскопия носит название микроскопии ближнего поля [9]. В заключение следует отметить принципиально новые возможности для исследования клеточной динамики, которые открываются при манипуляции с амплитудой и фазой коротких лазерных импульсов [49, 117].

Применение метода электронной микроскопии в биологии долгое время осложнялось тем, что разность электронных плотностей молекулы белка и подложки очень мала. Как следствие этого молекулы видны на подложке в виде слабых бесструктурных пятен. Для визуализации молекул на подложке были разработаны различные методы контрастирования с помощью солей тяжелых металлов. Это позволяло получать прекрасные модели биологических макромолекул, например рибосомных частиц, однако их пространственное разрешение ограничивалось 30–40 Å [111]. За последние 10–15 лет электронная

микроскопия претерпела драматические изменения. Просвечивающая электронная микроскопия фактически уступила место криоэлектронной микроскопии. В этом методе нативная молекула замораживается в жидком этане и тысячи таких изображений усредняются. Оказалось, что такой подход позволяет получить более высокое пространственное разрешение исследуемых макромолекул, чем при использовании методов контрастирования при сохранении их нативности. Так, при увеличении числа изображений до 73 000 удалось получить модель 70S рибосомной частицы с пространственным разрешением 11,5 Å, что в три раза выше, чем при использовании методов контрастирования [33].

В начале 90-х годов Р.Биннинг и Х.Роррер ввели в физическую практику метод туннельной электронной микроскопии (СТМ). Непосредственное применение СТМ для изучения структуры биологических макромолекул оказалось мало эффективным. Ее место заняла сканирующая силовая микроскопия, чаще называемая атомной силовой микроскопией (АСМ). В этом типе микроскопии удается сочетать высокое пространственное разрешение, свойственное электронному микроскопу, со способностью оптического микроскопа рассматривать объект не в вакууме, а в водной среде [12]. В простейшей модификации АСМ, так называемом «контактном» способе, микроскопическое острие атомных размеров располагается на гибком рычаге, который сканирует поверхность образца. Отражение лазерного луча от рычага создает топографический образ макромолекулы [105]. В другой, более сложной модификации АСМ – так называемом «вибрационном способе» – рычаг осциллирует, когда сканирует поверхность молекулы. В этом способе изображение образуется за счет изменения амплитуды осцилляции в каждой точке образца. Достижимое сегодня пространственное разрешение при «вибрационном способе» составляет 10–15 Å в горизонтальной плоскости и около 1 Å в вертикальной плоскости [66]. Обе эти схемы оказались очень притягательны для биологов, поскольку позволяют проводить измерения топографии поверхности макромолекул в растворе и в режиме реального времени [47, 65]. Из последних достижений применения метода АСМ отметим возможность изучения механики растяжения одиночной белковой молекулы [85] и возможность получения контуров индивидуальных пептидов [64].

#### КАЛОРИМЕТРИЯ

Биологическая микрокалориметрия имеет давнюю историю и первые эксперименты были проведены в 1930-х годах. Сканирующая микрокалориметрия появилась в начале 70-х годов, когда П. При-

валовым был построен первый сканирующий микрокалориметр [82], а Е.Ферейре и Р.Билтонен разработали методы извлечения структурной информации из кривой теплопоглощения [30]. Его применение к небольшим глобулярным белкам показало, что они плавятся единым кооперативным пиком по принципу «все или ничего». Для мультидоменных белков кривые теплопоглощения при плавлении гораздо сложнее и эти белки представляют собой дискретные структуры, состоящие из набора кооперативных блоков, плавающих почти независимо друг от друга [92]. Одним из важных наблюдений, сделанных с помощью сканирующей микрокалориметрии, было открытие того, что рибосомные белки в растворе обладают хорошо выраженной и кооперативно плавящейся третичной структурой. Дополнительным доказательством, полученным с помощью нейтронного рассеяния, послужил вывод о том, что при этом рибосомные белки имеют и высокую степень компактности. Это позволило утверждать, что рибосомные белки являются обычными глобулярными белками и, как следствие этого, способны кристаллизоваться [96]. Впоследствии это открытие было блестяще подтверждено успешной кристаллизацией ряда рибосомных белков и расшифровкой их структуры методом рентгеновской дифракции и ЯМР [34]. За последние годы активное развитие получила изотермическая калориметрия титрования, которая незаменима для изучения взаимодействия между белками и малыми лигандами (протоны, соли, кофакторы и т.д.) [31].

#### ОПТИЧЕСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Уже первые исследования электронных оптических спектров белков показали, что они обладают рядом характерных черт, которые тесно связаны с их структурой [14]. Так, исследования поглощения белков в дальнем ультрафиолете обнаружили, что оно определяется пептидными хромофорами, а в ближнем ультрафиолете — главным образом боковыми группами ароматических аминокислот. В нуклеиновых кислотах основной вклад в поглощение вносят основания. На этом факте основан широко применяющийся на практике спектрофотометрический метод определения концентрации белков и нуклеиновых кислот в растворе. Несмотря на высокие коэффициенты экстинкции как нуклеиновых оснований, так и ароматических остатков аминокислот, из спектров поглощения нуклеиновых кислот и белков в ближнем и дальнем ультрафиолете, получение детальной информации об их структуре невозможно из-за сильного перекрытия полос поглощения. Вместе с тем, многие быстропротекающие биологические процессы могут быть исследованы с высоким временным разрешением ( $\approx 10^{-15}$  сек) с помощью оптической спектроскопии.

К ним, в первую очередь, относятся исследования фемтосекундной лазерной спектроскопии разных фотобиологических систем: фотосинтетических реакционных центров [83], светособирающих пигментных систем фотосинтетических организмов [27], бактериородопсина [40].

Исследования ультрафиолетовых спектров кругового дихроизма белков в области длин волн  $160 < \lambda < 240$  нм показали, что спектр белка весьма чувствителен к вкладу разных элементов вторичной структуры и может быть разложен на три базисных спектра, один из которых принадлежит спектру  $\alpha$ -спиралей, второй –  $\beta$ -структуре, а третий – клубкообразной части белка. Для построения базисных спектров наиболее перспективным оказался метод Д.Ветлауфера, в котором для построения базисных спектров используется набор различных белков с известной пространственной структурой [91]. Недавно набор белковых структур, лежащих в основе расчета базисных спектров, был расширен с использованием различных семейств и анализа нейронных цепей [6].

Использование инфракрасных спектров белков в области длин волн, соответствующих колебаниям атомов в молекуле ( $200\text{--}4000$   $\text{см}^{-1}$ ), осложняется несколькими обстоятельствами [14]. Во-первых, для колебательных переходов характерна значительно меньшая интенсивность, чем для перехода в видимой и ультрафиолетовой областях. Во-вторых, ряд полос инфракрасных спектров белков и нуклеиновых кислот располагаются в области, где наблюдается сильное поглощение воды. В-третьих, спектральное разрешение хотя и выше, чем в электронных спектрах поглощения, однако оно остается существенно ниже, чем в спектроскопии ядерного магнитного резонанса. Спектр колебаний условно разбивается на интервалы. Так, в области от  $4000$  до  $2000$   $\text{см}^{-1}$  основной вклад вносят валентные колебания N–H-связи, тогда как полосы  $1650$  (Амид I) и  $1535$   $\text{см}^{-1}$  (Амид II) соответствуют двум основным колебаниям карбоксильной группы C=O. Наблюдение за изменением поглощения в этих полосах, и в первую очередь за полосой Амид II, дает возможность исследовать быструю кинетику, сопровождающую процессы сворачивания-разворачивания белков, поиск промежуточных состояний, кинетику связывания дыхательных белков (миоглобин, гемоглобин, цитохром) с лигандами [18, 108]. Практическая реализация такой возможности требует создания условий для синхронизации молекул, вступающих в реакцию. В качестве такого условия чаще всего выступает мощный короткий световой импульс, индуцирующий либо реакцию фотодиссоциации, либо скачкообразное повышение температуры [80]. Получение временного разрешения в фемтосекундном диапазоне предъяв-

ляет специальные требования к параметрам светового импульса и к системе регистрации инфракрасного спектрометра [98].

Флюоресцентная корреляционная спектроскопия (ФКС), появившаяся около 25 лет назад, сегодня является одним из мощных методов изучения структуры макромолекул. ФКС успешно используется для измерения коэффициентов поступательной и вращательной диффузии биологических макромолекул, для исследования потоков и скоростей химических реакций [23]. Объединение лазера и микроскопа дает возможность исследовать процессы движения отдельных молекул в живой клетке. Сфокусировав лазерный луч на определенный участок клетки и пометив интересующие нас молекулы флюоресцентным красителем, можно обесцветить краситель мощным лазерным импульсом. Последующее наблюдение за восстановлением свечения красителя позволяет отличать свободную диффузию от направленного движения в разных участках клетки в двумерном пространстве [51]. Для наблюдения за поведением частиц в трехмерном пространстве используется метод многофотонной флюоресценции [8]. При использовании метода локализованной оптической спектроскопии лазерный луч фокусируется на одиночной частице микронных размеров и ее флуктуация в пространстве измеряется через временную корреляционную функцию [11]. Такой подход открывает путь изучения динамического поведения одиночных макромолекул под действием различных сил.

#### ЯДЕРНЫЙ МАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС

Метод ядерного магнитного резонанса в 50-ые годы прекрасно зарекомендовал себя при исследовании соединений небольшой молекулярной массы. Появившиеся первые образцы магнитных ЯМР-спектрометров работали на частоте 40 МГц, что позволяло констатировать только факт сложности спектров белков, а в исключительных случаях — визуализировать отдельные характерные аминокислотные остатки. Первым белком, исследованным методом ЯМР в 1957 году, была бычья панкреатическая рибонуклеаза, в спектре которой были обнаружены четыре области перекрывающихся пиков [90]. Разрешение спектров ЯМР быстро росло с увеличением рабочей частоты спектрометра, и уже при частоте 220 МГц оказалось возможным различить C-2 протоны имидазольных колец четырех гистидиновых остатков небольшого по массе белка, стафилококковой нуклеазы. Эта работа показала, что трудности, которые стоят перед методом ЯМР в расшифровке пространственной структуры белков, огромны и будут возрастать в геометрической прогрессии при увеличении их молекулярной массы. Причина таких трудностей заключалась в том, что в те годы в методе ЯМР оперировали такими понятия-

ми, как химический сдвиг, площадь и ширина пика. Это давало возможность изучать только структурное окружение, химические свойства и колебательные свойства атомов в белковых молекулах, фиксировать процесс денатурации белков. Получение трехмерных структур белков из данных ЯМР казалось почти нереальной задачей [123].

### III. ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ПОСТ-ГЕНОМНУЮ ЭРУ

За 30 лет, прошедших после открытия двойной спирали, физики разработали и ввели в практику молекулярной биологии ряд физических методов, позволяющих изучать структуру биологических макромолекул с разным пространственным разрешением. Постепенно на первый план стали выдвигаться методы, позволяющие исследовать структуру биологических макромолекул в атомарном разрешении. Пальма первенства перешла к рентгеноструктурному анализу. Число структур, расшифрованных с помощью этого метода, стало медленно, но неуклонно расти. Однако плавное развитие этого процесса было прервано в 80-х годах двумя революционными событиями.

#### ДВА РЕВОЛЮЦИОННЫХ СОБЫТИЯ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Первое из них произошло в физике и связано, в первую очередь, с появлением синхротронных источников и быстродействующих рентгеновских детекторов. Их использование в рентгеноструктурном анализе, наряду с активным внедрением в научную жизнь политики «No crystal – no grant» [53], привело к тому, что число расшифрованных белковых структур стало быстро расти. Это увеличение началось в 1988 году, и если до этого года в Брукхейвенский банк белковых структур поступало всего 2–3 структуры в месяц, то в 1997 году в банк поступало уже 5 структур в день. К концу 2000 года это число составило около 30 структур в день.

Другое событие произошло в биологии. В 1981 году Ф.Сангер показал, что последовательность аминокислотных остатков белка гораздо быстрее можно определить по его ДНК последовательности [89]. Эти исследования сразу были автоматизированы и взяли такой высокий темп, что число известных последовательностей белков стало необычайно быстро расти. Эра определения последовательности аминокислот в разных белках сменилась эрой ДНК последовательности одного гена, затем эрой определения последовательности ДНК целого генома. Так родилась новая наука, *геномика*, датой рождения которой считается 1995 год, когда был впервые расшифрован бактериальный геном *Mycoplasma genitalium* [29]. Сегодня уже известен геном нематод-

ного червя *Caenorhabditis elegans*, который содержит 19099 генов, что составляет около 97 миллионов пар оснований [42]. Полным ходом решалась задача определения генома человека, и в 2000 году было объявлено об ее окончании в черновом варианте [21, 43]. В 1998 году оформилась новая наука, *структурная геномика*, главной задачей которой является определение трехмерных структур белков, кодируемых данным геном или геномом [88].

Сравнение последствий этих двух событий оказалось не в пользу физики. Число трехмерных структур белков, определяемых физиками сегодня с помощью рентгеновской кристаллографии за день, намного меньше аналогичного числа одномерных структур, определяемых биологами. Есть все основания полагать, что этот разрыв в ближайшие годы станет еще большим. Возникает естественный вопрос, «какими дополнительными возможностями располагает сегодня физика, чтобы “помочь” рентгеновской кристаллографии?» Обсуждение этих возможностей мы начнем с метода ядерного магнитного резонанса.

#### ЯДЕРНЫЙ МАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС

За последние 15 лет в развитии метода ядерного магнитного резонанса достигнут огромный технический прогресс. Принципиальными достижениями в развитии этого метода были: 1) создание сверхпроводящих магнитов, что позволило увеличить рабочую частоту ЯМР-спектрометров более чем на порядок (в 2001 году ожидается появление серийного спектрометра с рабочей частотой в 1 ГГц), 2) селективное изотопическое замещение, позволяющее разрешать индивидуальные резонансы для  $^{13}\text{C}$ -,  $^2\text{H}$ -,  $^{15}\text{N}$ -атомов, 3) применение импульсных полей в одном, двух, трех и четырех измерениях. Все это позволило в методе ЯМР перейти от анализа химических сдвигов и положения и ширины отдельных пиков к получению координат атомов белка [70]. Сегодня этому методу становятся доступны белки все большей и большей молекулярной массы, вплоть до 30–40 кДа, что соответствует 2,2–2,0 Å разрешению в рентгеновской кристаллографии. Однако, делая такое сопоставление, следует помнить принципиальное отличие методологий получения структур в методах ЯМР и рентгеноструктурного анализа. Оно состоит в том, что трехмерная структура в методе ЯМР строится по принципу: от локальной геометрии к трехмерной структуре, тогда как в рентгеновской дифракции структура строится по принципу: от низкого разрешения к высокому. Это отличие рождает целый ряд вопросов при сравнении структур белков обоими методами [60]. Практическая мощь метода ЯМР сегодня такова, что каждая 15-ая–20-ая структура, поступающая в банк белковых структур, решается этим методом, что дает основание

рассматривать метод ЯМР как серьезную поддержку метода рентгеновской кристаллографии. Важная особенность метода состоит в том, что все этапы получения структуры могут быть автоматизированы [125].

Кроме того, следует отметить три важные области применения метода ЯМР. Во-первых, метод ЯМР позволяет исследовать процессы сворачивания–разворачивания белков, поиск и характеристику промежуточных состояний [22]. Во-вторых, исследовать динамическое поведение белков в области времен  $10^{-6}$ – $10^{-9}$  сек [76]. И, наконец, проводить исследования в твердой фазе, которые оказываются незаменимыми при исследовании мембранных белков [74]. Из последних достижений отметим применение метода ЯМР для определения контактирующих поверхностей в белок-белковых комплексах [104].

#### НЕЙТРОННАЯ КРИСТАЛЛОГРАФИЯ

Нейтронная кристаллография сегодня переживает свое второе рождение. Как отмечалось ранее, главным ее преимуществом является возможность локализации атомов водорода и молекул воды в структуре белковой молекулы при относительно низком разрешении. Сравнительное исследование возможностей рентгеновской и нейтронной дифракции на примере белка конканавалина А ясно показывает, что по числу локализуемых водородных атомов нейтронная дифракция при разрешении  $2,4 \text{ \AA}$  сравнима с ультравысоким рентгеновским разрешением ( $0,94 \text{ \AA}$ ) [39]. Однако широкому применению нейтронной кристаллографии мешает, в первую очередь, очень низкая по сравнению с синхротронными интенсивность нейтронных источников. Тем не менее, применение метода Лауэ с использованием панхроматического излучения, разработка и использование новых детекторов большой площади позволяет получать структуру белка за разумное время. Так, для тетрагонального кристалла белка куриного лизоцима, предварительно вымоченного в тяжелой воде, расшифровка структуры с  $2 \text{ \AA}$  разрешением заняла 10 дней. При этом локализовано 157 молекул связанной воды, 696 атомов водорода и 264 атома дейтерия [69]. Однако главным препятствием широкому распространению нейтронной кристаллографии пока остается требование относительно большого размера кристалла (несколько кубических миллиметров). Отсюда следует, что нейтронная кристаллография белков в ближайшем будущем вряд ли составит серьезную конкуренцию рентгеновской кристаллографии и сегодня не может рассматриваться как серьезная дополнительная возможность.

### ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПРЕДСКАЗАНИЯ ТРЕХМЕРНЫХ СТРУКТУР

Методы теоретической физики позволяют сегодня предсказывать трехмерную структуру белка на основе его первичной последовательности. Стремительный рост числа трехмерных структур белков позволил расклассифицировать их на семейства, которые в свою очередь были объединены в суперсемейства. В процессе этой классификации выяснилось, что 60% всех белков содержат всего 9 структурных мотивов сворачивания [75]. Отсюда следует, что определив структурный мотив сворачивания, в ряде случаев нет необходимости решать структурную задачу до конца. Кроме того, сегодня интенсивно развиваются методы предсказания третичной структуры по первичной последовательности, и для высокомолекулярных белков в ряде случаев получается блестящее совпадение с точностью до 1,5 Å с экспериментально полученной структурой (если судить по величине среднеквадратичного отклонения между C $\alpha$ -атомами модели и экспериментальной структуры [16]). В этих случаях вообще можно не решать структурную задачу, обратившись к специальным программам. Однако в большинстве случаев методы предсказания дают величину совпадения около 2–6 Å, что связано, как правило, с неправильным моделированием петель в глобулярных белках. Поэтому предсказательные методы при всей их дешевизне и привлекательности пока не могут быть альтернативой эксперименту [45].

### ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Электронная микроскопия (ЭМ) обладает высокими потенциальными возможностями и сегодня позволяет получить гораздо более высокое пространственное разрешение, чем это было возможно ранее. Так, при использовании криометодов на двумерно упорядоченных слоях или на образцах с высокой степенью симметрии удалось получить высокое пространственное разрешение (3 Å) для аквапорина-1 [67], бактериородопсина из пурпурных мембран [102], светособирающего комплекса [52], димера тубулина [71]. Есть все основания полагать, что в недалеком будущем ЭМ высокого разрешения составит конкуренцию таким методам, как ЯМР и структурный анализ.

### МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

Особо следует выделить метод масс-спектрометрии. Фантастическое увеличение точности современных масс-спектрометров позволяет сегодня определять молекулярную массу макромолекул с точностью до долей дальтона. Это обстоятельство существенно

расширяет область применения масс-спектрометрии, и в настоящее время она в сочетании с методами лазерной десорбции и ионизации применяется для исследования первичной структуры белков, определения точных молекулярных масс, взаимодействий между макромолекулами, пост-транскрипционных модификаций в нуклеиновых кислотах [48, 95]. Отличительной особенностью ее применения является очень небольшое (на уровне фемтограмм) количество вещества, необходимое для исследования. В 1995 году появился термин «протеомика», под которым понималась детальная массовая характеристика набора белков из целых организмов [119]. Недавно этот термин расширился до «функциональной протеомики» [5] (см. раздел IV.2).

#### РЕНТГЕНОВСКАЯ КРИСТАЛЛОГРАФИЯ НА СИНХРОТРОННЫХ ИСТОЧНИКАХ

Но главный козырь, которым сегодня располагает физика, лежит в самой рентгеновской кристаллографии, развивающейся стремительными темпами. Разработаны новые методы решения фазовой проблемы: метод аномальной дисперсии, фазирование с использованием данных других методов (электронная микроскопия, нейтронная дифракция), метод молекулярного замещения, прямые методы [3, 109]. В строй вступили синхротронные источники нового поколения [63], новые быстродействующие детекторы [36]. Все это привело к тому, что время от начала сбора данных и до получения первых карт электронной плотности стало стремительно уменьшаться. Так, получение первой карты электронной плотности белка ModE из *E. coli* методом аномальной дисперсии для селенметиониновых производных этого белка на камере VM14 синхротрона ESRF в Гренобле в 1997 году заняло 7 час. Сегодня это время составляет один час и несомненно в дальнейшем будет еще меньше [114].

Достижения рентгеновской кристаллографии особенно заметны на примере решения задачи века – определении структуры рибосомы. Открытие в 1991 году того, что большая (50S) рибосомная частица может быть закристаллизована и полученные кристаллы дифрагируют до 3,0 Å, фактически положило начало новому этапу в рентгеновской кристаллографии крупных РНК-белковых комплексов [112]. В настоящее время расшифрованы структуры полной (70S) рибосомной частицы с разрешением 5 Å, большой (50S) и малой (30S) рибосомных частиц с разрешением в 2,5 Å [7, 17, 121]. Получена структура центрального домена малой рибосомной частицы [4]. Структура большинства рибосомных белков известна с разрешением 2–2,5 Å [84].

Другой характерный пример прогресса в рентгеновской кристаллографии — исследование структуры нуклеосомы, ДНК-белкового комплекса, являющегося основным структурным мотивом упаковки ДНК в клетках эукариот. Этот комплекс состоит из центрального ядра, образованного четырьмя гистонными белками (известными как H2A, H2B, H3 и H4), на которое наворачивается спиральная ДНК. Кристаллы нуклеосомы, выделенные непосредственно из ядер эукариотических клеток, были получены относительно давно, однако в силу гетерогенности ДНК разрешение достигало всего 7 Å. И только недавно, используя рекомбинантные гистонные белки и искусственно синтезированную ДНК строго одинаковой длины (146 оснований), удалось достичь разрешения 2,8 Å [59].

#### IV. ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ И БУДУЩАЯ СТРУКТУРНАЯ БИОЛОГИЯ

##### СТРУКТУРНАЯ ГЕНОМИКА И СТРУКТУРНАЯ БИОЛОГИЯ

Из изложенного в предыдущем разделе следует, что решающая роль в получении информации о структуре биологических макромолекул с высоким пространственным разрешением сегодня принадлежит двум физическим методам: рентгеновской кристаллографии и ядерному магнитному резонансу. Означает ли это, что только эти два метода определяют будущее структурной биологии?

Ответ на этот вопрос должен быть положительным, если речь идет о ее части, *структурной геномике*. Именно эта наука ставит сегодня перед биологией и физикой четко очерченные задачи, которые в случае исследования структуры методом рентгеновской кристаллографии сводятся к следующим этапам: 1) выбор и клонирование функционального участка гена; 2) выбор системы экспрессии; 3) экспрессия и очистка белка — продукта гена; 4) кристаллизация; 5) расшифровка структуры с использованием синхротронных источников. Для решения этих задач предполагается объединение усилий физиков и биологов под одной крышей и под одним флагом, называемым структурной геномикой [54, 87].

Ответ на сформулированный выше вопрос должен быть отрицательным, если речь идет о *структурной биологии в целом*. Стоящие перед ней задачи гораздо более сложны и обширны, и их решение может быть связано с использованием практически всех методов, о которых шла речь выше. В первую очередь это седиментация, которая сегодня переживает второе рождение после появления нового поколе-

ния высокоточных и автоматизированных центрифуг типа XL фирмы Beckman [56]; оптическая спектроскопия, разрешенная во времени вплоть до фемтосекунд и дающая львиную долю информации о быстрой кинетике [58, 120]; сканирующая микрокалориметрия и микрокалориметрия титрования, поставляющие уникальные сведения о природе стабильности белков и их взаимодействиях с лигандами [81]; электронная микроскопия, сфера применения которой простирается от кристаллографии до томографии и которой скорее всего уготована роль моста между исследованиями на одиночных изолированных макромолекулах и исследованиями в клетке [100]; микроскопия силового поля, дающая профиль поверхности макромолекул и их изменений в режиме реального времени [13]; нейтронная спектроскопия, дающая сведения о функциональной термодинамике в белках [124]; малоугловое рассеяние рентгеновских лучей и нейтронов, обеспечивающее прецизионное сравнение структур макромолекул в растворе и в кристалле [110], и, наконец, синхротронное излучение, позволяющее получать спектры циркулярного дихроизма в далеком ультрафиолете [113]. Говоря о будущем этих методов, надо всегда помнить, что перспективы их развития неотделимы от перспектив развития компьютеров, электроники, лазеров, нейтронных и синхротронных источников. В этом контексте отметим, что четвертое поколение синхротронных источников, яркость которых будет на три порядка больше, чем у источников третьего поколения, позволяет обсуждать принципиально новые перспективы для исследования структуры и динамики биологических макромолекул [55].

#### ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ПРОТЕОМИКА

Около 25 лет назад О'Фаррелл предложил метод двумерного электрофореза высокого разрешения в полиакриламидном геле, основанный на разделении белков одновременно по заряду и по массе [75]. Вскоре было показано, что 1100 белков из *E. coli* могут быть разрешены с помощью этого метода. Однако потребовалось почти 20 лет, чтобы стандартизировать метод и существенно повысить его чувствительность. К настоящему времени метод усовершенствован настолько, что может быть одновременно разрешено до 10000 белков при использовании тонкого геля размером 30 на 40 см [1, 46]. Чувствительность детектирования отдельных белковых пятен зависит от процедуры окрашивания и составляет от нескольких нанограмм при окрашивании серебром до долей нанограмм в случае использования радиохимических методов. Развитие новых методов детектирования, основанных на использовании последних достижений масс-спектрометрии,

позволило довести эту чувствительность до нескольких фемтограмм [35]. Столь высокая чувствительность, сочетаемая с возможностью масс-спектрометрического высокоточного определения массы анализируемых белков и пептидов, открыла принципиально новые возможности изучения функционирования клетки на молекулярном уровне. Статические исследования генома дополнились исследованием динамического протеома, то есть полного набора белков как продукта действия генома, который существует в живущей клеточной системе. Так возникла еще одна ветвь структурной биологии, получившая название функциональной протеомики, одной из главных задач которой является изучение фенотипа организма — то есть свойств организма, вытекающих из комбинации его генотипа и окружающих факторов среды [5].

#### ОТ ТЕРМОДИНАМИКИ К ОДИНОЧНЫМ МАКРОМОЛЕКУЛАМ

В конце обзора хотелось бы отметить появление принципиально нового подхода в науке о жизни. В этом подходе исследования проводятся не на ансамбле макромолекул, а на одиночных макромолекулах. Не сбылось предсказание Э.Шредингера, полагавшего, что физические законы накладывают принципиальный запрет на возможность исследования одиночных молекул. Сегодня конформационная динамика одиночных макромолекул успешно исследуется методом флуоресцентной резонансной спектроскопии [116]. Методом исследования переноса энергии электронного возбуждения можно измерить расстояние между парой донор—акцептор в одиночной макромолекуле. Использование генетически кодируемых флуоресцентных меток, таких как зеленый флуоресцентный белок и его производных (голубой, сиреневый, желтый), и генетически не кодируемых меток, таких как атомы лантаноидной группы, позволяет революционизировать исследования динамики живых клеток [94]. Сканирующая оптическая микроскопия ближнего поля обеспечивает получение информации о динамических свойствах одиночной макромолекулы в конденсированной фазе [68]. Атомная силовая микроскопия позволяет манипулировать с одиночными белками [24], а в режиме «пинцета» исследовать упругие свойства белков [26]. Эпифлуоресцентная микроскопия дает возможность непосредственно наблюдать вращение субъединиц друг относительно друга в сложных белках, демонстрируя на молекулярном уровне работу белка как шагового мотора, превращающего химическую энергию в механическую [72].

## У. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Заклучая этот обзор, мы приходим к выводу, что перед физикой в XXI веке стоят фантастической сложности задачи получения знаний о пространственной структуре все большего числа биологических макромолекул, структурных изменений в процессе функционирования отдельной макромолекулы, переноса этих знаний на уровень клетки, а в последующем — на уровень целого организма. Глобальность этих задач, а также изящность и сложность их осуществления поражает воображение.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Государственная поддержка интеграции высшего образования и фундаментальной науки» (1997-2000).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Малыгин А.Г. // Успехи биол. химии. 1993. Т. 33. С. 173–213.
2. Цветков В.Н. Двойное лучепреломление в растворе. Современные методы исследования полимеров. Москва: Мир, 1966.
3. Abrahams J.P., DeGraaff R.A.G. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1998. Vol. 8. P. 601–605.
4. Agalarov S.Ch., Prasad S., Funke P.M., Stout S.D., Williamson J.R. // Science. 2000. Vol. 288. P. 107–113.
5. Andersen J.S., Mann M. // FEBS Lett. 2000. Vol. 480. P. 25–31.
6. Andrade M.A., Chacon P., Merelo J.J., Moran F. // Protein Eng. 1993. Vol. 6. P. 383–390.
7. Ban N., Nissen P., Hansen J.C., Capel M., Moore P.B., Steitz T.A. // Nature. 1999. Vol. 400. P. 841–847.
8. Berland K.M., So P.T.C., Gratton E. // Biophys. J. 1995. Vol. 68. P. 694–701.
9. Betzig E., Trautman J.K. // Science. 1992. Vol. 257. P. 189–195.
10. Bloomfield V.A. // Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1981. Vol. 10. P. 421–450.
11. Brown B.E., Wu E.Sh., Zipfel W., Webb W.W. // Biophys. J. 1999. Vol. 7. P. 2837–2849.
12. Bustamante C., Erie D.A., Keller D.J. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1994. Vol. 4. P. 750–760.
13. Bustamante C., Rivetti C., Keller D.J. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1997. Vol. 7. P. 709–716.
14. Cantor Ch.R., Shimmel P.R. Biophysical Chemistry. San Francisco: Freeman and Company, 1984. Vol. 2.
15. Capel M.S., Engelman D.M., Freeborn B.R., Kjeldgaard M., Langer J.A., Ramakrishnan V., Schindler D.G., Schneider D.K., Schoenborn B.P., Sillers I.-Y., Yabuki S., Moore P.B. // Makromol. Chem., Macromol. Symp. 1988. Vol. 15. P. 123–130.
16. CASP1 // Proteins. 1995. Vol. 23. P. 295–462.
17. Cate J.H., Yusupov M.M., Yusupova G.Z., Earnest T.N., Noller H.F. // Science. 1999. Vol. 285. P. 2095–2104.
18. Caugrove T.P., Dyer R.B. // Biochemistry. 1993. Vol. 32. P. 11985–11991.
19. DeGennes P.G. // Macromolecules. 1976. Vol. 9. P. 587–593.
20. Denk W.M., Webb W.W. // Appl. Optics. 1990. Vol. 29. P. 2382–2391.
21. Draft data leave geneticists with a mountain still to climb. // Nature. 2000. Vol. 405. P. 984–986.

22. *Eliezer D., Yao J., Dyson J., Wright P.E.* // Nature Struct. Biol. 1998. Vol. 5. P. 148–155.
23. *Elson E.L., Magde* // Biopolymers. 1974. Vol. 13. P. 1–27; 29–61.
24. *Engel A., Muller D.J.* // Nature Struct. Biol. 2000. Vol. 7. P. 715–718.
25. *Feigin L.A., Svergun D.I.* Structure Analysis by Small Angle X-ray and Neutron Scattering. Plenum Press, 1987.
26. *Fisher T.E., Marszalek P.E., Fernandez J.M.* // Nature Struct. Biol. 2000. Vol. 7. P. 719–723.
27. *Flemming G.R., Van Grondelle R.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 1997. Vol. 7. P. 738–748.
28. *Forster Th.* // Ann. Phys. (Leipzig). 1948. Vol. 2. P. 55–75.
29. *Fraser C.M., Gocayne J.D., White O., Adams M.D., Clayton R.A., Fleischmann R.D., Bult C.J., Kerlavage A.R., Sutton G., Kelley J.M., Fritchman J.L., Weidman J.F., Small K.V., Sandusky M., Fuhrmann J., Nguyen D., Utterback T.R., Saudek D.M., Phillips C.A., Merrick J.M., Tomb J.-F., Dougherty B.A., Bott K.F., Hu P.-C., Lucier T.S., Peterson S.N., Smith H.O., Hutchison III C.A., Venter J.C.* // Science. 1995. Vol. 270. P. 397–403.
30. *Freire E., Biltonen R.* // Biopolymers. 1978. Vol. 17. P. 463–479.
31. *Friere E., Mayorga O.L., Straume M.* // Anal. Chem. 1990. Vol. 62. P. 950A–959A.
32. *Funatsu T., Harada Y., Tokunaga M., Saito K., Yanigada T.* // Nature. 1995. Vol. 374. P. 555–559.
33. *Gabashvili I.S., Agrawal R.K., Spahn C.M.T., Grassucci R.A., Svergun D.I., Frank J., Penczek P.* // Cell. 2000. Vol. 100. P. 537–549.
34. *Garber M., Davydova N., Eliseikina I., Fomenkova N., Gryznova O., Grishkovskaya I., Nevskaya N., Nikonov S., Rak A., Sedelnikova S., Serganov A., Shcherbakov D., Tishchenko S., Vysotskaya V., Zheltonosova J., Liljas A., Aevansson A., Al-Karadaghi S.* // J. Cryst. Growth. 1996. Vol. 168. P. 301–307.
35. *Godovac-Zimmerman J., Brown L.R.* // Mass Spectr. Rev. 2001. Vol. 20. P. 1–57.
36. *Gruner C.M.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 1994. Vol. 4. P. 765–769.
37. *Gryczynski I., Malak H., Lakowicz J.R.* // Biospectroscopy. 1996. Vol. 2. P. 9–15.
38. *Guinier A., Fournet A.* Small Angle Scattering of X-rays. N.Y.: Wiley, 1955.
39. *Habash J., Raftery J., Nuttall R., Price H.J., Wilkinson C., Kalb A.J. (Gilboa), Helliwell J.R.* // Acta Crystallogr. 2000. Vol. D56. P. 541–550.
40. *Hage W., Kim M., Frei H., Mathies R.A.* // J. Phys. Chem. 1995. Vol. 100. P. 16026–16033.
41. *Hagerman P.J.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 1996. Vol. 6. P. 643–649.
42. *Hodgkin J., Herman R.K.* // Trends Genet. 1998. Vol. 14. P. 352–357.
43. Human genome projects: work in progress. // Nature. 2000. Vol. 405. P. 981.
44. *Jacrot B.* // Rep. Progr. Phys. 1976. Vol. 39. P. 911–953.
45. *Janin J.* // Struct. Dynam. Biomol. Hercules. 2000. Vol. IV. P. 3–13.
46. *Jungblut P., Thiede B.* // Mass Spectr. Rev. 1997. Vol. 16. P. 145–162.
47. *Kasas S., Thompson N.H., Smith B.L., Hansma H.G., Zhu X., Guthold M., Bustamante C., Kool E.T., Kashlev M., Hansma P. K.* // Biochemistry. 1997. Vol. 36. P. 461–468.
48. *Kirpekar F., Douthwaite S., Roepstorff P.* // RNA. 2000. Vol. 6. P. 296–306.
49. *Klar Th.A., Jakobs S., Dyba M., Egner A., Hell S.W.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 8206–8210.
50. *Koch M.H.J., Stuhmann H.B.* // Meth. Enzymol. 1979. Vol. 59. P. 670–701.
51. *Koppel D.E., Axelrod D., Schlessinger J., Elson E.L., Webb W.W.* // Biophys. J. 1976. Vol. 16. P. 1315–1329.
52. *Kuhlbrandt W., Wang D.N., Fujiyoshi Y.* // Nature. 1994. Vol. 367. P. 614–621.

53. *Lattman E.E.* // Proteins, Structure, Function, and Genetics (Editor's corner). 1996. Vol. 26, P. i–ii.
54. *Lattman E.* // Nature (Editor's corner). 1999. Vol. 397. N6715. P. 89–92.
55. *Lattman E.* // Proteins: Structure, Function, and Genetics (Editor's corner). 2000. Vol. 38. P. 1–2.
56. *Laue T.M., Stafford III, W.F.* // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1999. Vol. 28. P. 75–100.
57. *Lichtman J.W.* // Sci. Am. 1994. Vol. 271(2). P. 40–45.
58. *Lim M., Jackson T.A., Anfinsen P.A.* // Nature Struct. Biol. 1997. Vol. 4. P. 209–214.
59. *Luger K., Møder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J.* // Nature. 1997. Vol. 389. P. 251–261.
60. *MacArthur M.W., Laskowski R.A., Janet Thornton* // Curr. Opin. Struct. Biol. 1994. Vol. 4. P. 731–737.
61. *Mansfield S.M., Kino G.S.* // Appl. Phys. Lett. 1990. Vol. 57. P. 2615–2616.
62. *Millar D.P.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 1996. Vol. 6. P. 637–642.
63. *Moffat K., Ren Zhong* // Curr. Opin. Struct. Biol. 1997. Vol. 7. P. 689–696.
64. *Moller C., Allen M., Elings V., Engel A., Muller D.* // Biophys. J. 1999. Vol. 77. P. 1150–1158.
65. *Mou J., Sheng S., Ho R., Shao Z.* // Biophys. J. 1966. Vol. 71. P. 2213–2221.
66. *Muller D.J., Schabert F.A., Buldt G., Engel A.* // Biophys. J. 1966. Vol. 68. P. 1681–1686.
67. *Murata K., Mitsuoka K., Hirai T., Walz T., Agre P., Heymann J.B., Engel A., Fujiyoshi Y.* // Nature. 2000. Vol. 407. P. 599–605.
68. *Nie S., Zare R.N.* // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1997. Vol. 26. P. 567–596.
69. *Niimura N., Minezaki Y., Nonaka T., Castagna J.C., Cipriani F., Hoghoj P., Lehmann M.S., Wilkinson C.* // Nature Struct. Biol. 1997. Vol. 4. P. 909–914.
70. *Nilges M.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 1996. Vol. 6. P. 617–623.
71. *Nogales E., Wolf S.G., Downing K.H.* // Nature. 1998. Vol. 391. P. 199–203.
72. *Noi H.* // Science. 1998. Vol. 282. P. 1844–1845.
73. *O'Farrell P.H.* // J. Biol. Chem. 1975. Vol. 250. P. 4007–4021.
74. *Opella S.J., Stewart P.L.* // Methods Enzymol. 1989. Vol. 176. P. 242–275.
75. *Orengo C.A., Jones D.T., Thornton J.M.* // Nature. 1994. Vol. 372. P. 631–634.
76. *Palmer III, A.G.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 1997. Vol. 7. P. 732–737.
77. *Pavlov M.Yu., Rublevskaya I.N., Serdyuk I.N., Zaccai G., Leberman R., Ostanevich Yu. M.* // J. Appl. Cryst. 1991. Vol. 24. P. 243–254.
78. *Pekora R.* // J. Chem. Phys. 1964. Vol. 40. P. 1604–1614.
79. *Perutz M.F., Rossmann M.G., Cullis A.F., Muirhead H., Will G., North A.C.* // Nature. 1960. Vol. 185. P. 416–422.
80. *Philips C.M., Mizutani Y., Hochstrasser R.M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. Vol. 92. P. 7292–7296.
81. *Plum G.E., Breslauer K.J.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 1995. Vol. 5. P. 682–690.
82. *Privalov P.L.* // Adv. Prot. Chem. 1979. Vol. 33. P. 167–241.
83. *Pullerits T., Sundstrom V.* // Chem. Res. 1996. Vol. 29. P. 381–389.
84. *Ramakrishnan V., White S.* // TIBS. 1998. Vol. 23. P. 208–212.
85. *Rief M., Gautel M., Oesterheit F., Fernandez G.M., Gaub H.E.* // Science. 1997. Vol. 276. P. 1109–1112.
86. *Rodley G.A., Scobie R.S., Bates R.H.T., Lewitt R.M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1976. Vol. 73. P. 2959–2963.
87. *Sali A.* // Nature Struct. Biol. 1998. Vol. 5. P. 1029–1032.
88. *Sali A., Kuriyan J.* Challenges at the frontiers of structural biology (Millenium Issue TSB·TIBS·TIG), M20–M24, 1999.
89. *Sanger F.* // Science. 1981. Vol. 214. P. 1305–1312.

90. *Saunders M., Wishnia A., Kirkwood J.G.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1957. Vol. 79. P. 3289–3290.
91. *Saxena V.P., Wetlaufer D.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1971. Vol. 68. P. 969–972.
92. *Schellman J.A.* // *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 1987. Vol. 16. P. 115–137.
93. *Schoenborn B.P.* // *Nature.* 1969. Vol. 224. P. 143–146.
94. *Selvin P.R.* // *Nature Struct. Biol.* 2000. Vol. 7. P. 730–734.
95. *Senko M.W., McLafferty* // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1994. Vol. 23. P. 763–785.
96. *Serdyuk I.N., Zaccai G., Spirin A.S.* // *FEBS Lett.* 1978. Vol. 94. P. 349–352.
97. *Serdyuk I.N., Pavlov M.Yu., Rublevskaya I.N., Zaccai G., Leberman R.* // *Biophys. Chem.* 1994. Vol. 53. P. 123–130.
98. *Slayton R.M., Anfinsen P.A.* // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1997. Vol. 7. P. 717–721.
99. *Stevenson R.* // *Bioapplications and instrumentation for light microscopy in the 1990–s.* *Amer. Lab.* 1996, April. P. 28–63.
100. *Stowell M.H.B., Miyazawa A., Unwin N.* // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1998. Vol. 8. P. 595–600.
101. *Stryer L., Haugland R.P.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1967. Vol. 58. P. 719–726.
102. *Subramaniam S., Lindahl I., Bullough P., Faruqi A.R., Tittor J., Oesterheld D., Brown L., Lanyi J.K., Henderson R.* // *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 287. P. 145–161.
103. *Svergun D.I.* // *Biophys. J.* 1999. Vol. 76. P. 2879–2886.
104. *Takahashi H., Nakanishi T., Kami K., Arata Y., Shimada I.* // *Nature Struct. Biol.* 2000. Vol. 7. P. 220–223.
105. *Takeyasu K., Omote H., Nettikadan S., Tokomasu T., Iwamoto-Kihara A., Futai M.* // *FEBS Lett.* 1996. Vol. 392. P. 110–113.
106. *Teller A., Bar-Ziv R., Tlustý T., Moses E., Stavans J., Safran S.* // *Biophys. J.* 1998. Vol. 74. P. 1541–1548
107. *Torbet J.* // *Trends Biochem. Sci.* 1987. Vol. 12. P. 327–330.
108. *Trouiller A., Reinstadler D., Dypont Y., Naumann D., Forge V.* // *Nature Struct. Biol.* 2000. Vol. 7. P. 78–85.
109. *Uson I., Sheldrick* // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1999. Vol. 9. P. 643–648.
110. *Vachette P., Svergun D.I.* // *Struct. Dynam. Biomol., Hercules.* 1999. Vol. IV. P. 199–237.
111. *Vasiliev V.D., Shatsky I.N.* // *Soviet Sci. Rev. D, Physicochem. Biol.* 1984. Vol. 5. P. 141–178.
112. *von Bohlen K., Makowski I., Hansen H.A., Bartels H., Berkovitch T., Yellin Z., Zaytzev-Bashan A., Meyer S., Paulke C., Franceschi F., Yonath A.* // *J. Mol. Biol.* 1991. Vol. 222. P. 11–15.
113. *Wallace B.A.* // *Nature Struct. Biol.* 2000. Vol. 7. P. 708–709.
114. *Walsh M.A., Dementieva I., Evans G., Sanishvili R., Joachimiak A.* // *Acta Crystallogr.* 1999. Vol. D55. P. 1168–1173.
115. *Watson J.D., Crick F.H.C.* // *Nature.* 1953. Vol. 171. P. 737–738.
116. *Weiss S.* // *Nature Struct. Biol.* 2000. Vol. 7. P. 724–729.
117. *Weiss Sh.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. Vol. 97. P. 8747–8749.
118. *Weissman M., Schinder H., Feher G.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1976. Vol. 73. P. 2776–2780.
119. *Wilkins M.R., Pasquali Ch., Appei R.D., Ou K., Golaz O., Sanchez J.-Ch., Yan J.X., Gooley A.A., Huges G., Humphery-Smith I., Williams K.L., Hochstrasser D.F.* // *Biotechnology.* 1996. Vol. 14. P. 61–65.
120. *Williams S., Causgrove T.P., Gilman-shin R., Fang K.S., Callender R.H., Woodruff W.H., Dyer R.B.* // *Biochemistry.* 1996. Vol. 35. P. 691–697.

- 
121. *Wimberly B.T., Brodersen D.E., Clemons W.M., Jr., Morgan-Warren R.J., Carter A.P., Wanhrein C., Harrsch T., Ramakrishnan V.* // *Nature*. 2000. Vol. 407. P. 327–339.
122. *Wu P., Brand L.* // *Anal. Biochem.* 1994. Vol. 218. P. 1–13.
123. *Wutrich K.* NMR in Biological Research: Peptides and Proteins. New-York-Amsterdam: Elsevier, 1976.
124. *Zaccai G.* // *Science*. 2000. Vol. 288. P. 1604–1607.
125. *Zimmerman D.E., Montelione T.G.* // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1995. Vol. 5. P. 664–673.