Успехи биологической химии, т. 58, 2018, с. 347-376

ИССЛЕДОВАНИЯ ФОТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ПОТОЧНОЙ КРИСТАЛЛОГРАФИИ

©2018 г. Г. К. СЕЛИХАНОВ, М. С. ФАНДО, М. В. ДОНЦОВА, А. Г. ГАБДУЛХАКОВ

Институт белка РАН, Пущино, Московская область

I. Введение. II. Технология лазера на свободных электронах. III. Метод поточной кристаллографии и его преимущества. IV. Кинетические исследования. V. Недостатки метода ПРСА. VI. Примеры применения поточной кристаллографии для исследования фоточувствительных белков. VII. Заключение.

І. ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день одним из самых мощных инструментов для определения и исследования атомарного строения макромолекул, в том числе и биополимеров, является рентгеноструктурный анализ (PCA). PCA хорошо зарекомендовал себя при изучении водорастворимых (глобулярных) белков, однако, его применение для мембранных белков пока находится на стадии разработки и усовершенствования. На данный момент количество структур мембранных белков в банке белковых структур (http://www.rcsb.org/) составляет лишь около трех процентов от общего количества.

В последние годы популярность набирает модернизированный вариант рентгеноструктурного анализа – поточный рентгеноструктурный анализ (ПРСА) с использованием фемтосекундных импульсов лазера на свободных электронах. Эта перспективная технология обладает рядом преимуществ и дает шанс для решения задач недоступных

Принятые сокращения: РСА – рентгеноструктурный анализ; ПРСА – поточный рентгеноструктурный анализ; РЛСЭ – рентгеновский лазер на свободных электронах; ЛКФ – липидная кубическая фаза; ЛГФ – липидная губчатая фаза; ФЖБ – фотоактивный желтый белок; ФСІ – фотосистема I; ФСІІ – фотосистема II; РЦ – реакционный центр.

Адрес для корреспонденции: azat@vega.protres.ru

Работа выполнена при поддержке программ президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии».

Г.К.	Селиханов	и	соавт.
------	-----------	---	--------

классическому PCA, в том числе и в исследованиях мембранных белков. Одно из достоинств ПРСА в сравнении с классической кристаллографией – возможность изучения ферментативных реакций в фемтосекундном временном диапазоне при условии, что реакцию можно запустить во всем объеме кристалла одновременно. В этой категории фоточувствительные белки являются наиболее предпочтительными объектами.

Фоточувствительные белки представляют собой функционально важные объекты. В частности, благодаря им возможны такие процессы как фотосинтез и фототаксис. Для наиболее полной характеристики фоточувствительных белков и определения механизма их функционирования необходимо изучение пространственной организации этих молекул. При этом значительная часть фоточувствительных белков представляет собой интегральные мембранные комплексы, что существенно усложняет их кристаллизацию. Тем не менее, в последнее время получены крайне интересные результаты, обзору которых и посвящена данная статья.

II. ТЕХНОЛОГИЯ ЛАЗЕРА НА СВОБОДНЫХ ЭЛЕКТРОНАХ

Поточная кристаллография имеет длительную, но относительно нечастую историю использования. В прошлом для проведения PCA, из-за быстрого разрушения кристаллов под воздействием рентгеновского излучения, иногда приходилось использовать несколько изоморфных кристаллов, для получения полного набора дифракционных данных [1–3]. С увеличением мощности и улучшения фокусировки излучения, появилась возможность сбора данных с нескольких позиций на одном кристалле получаемых до момента разрушения образца [4–6], что существенно повысило совместимость фрагментов наборов данных. Дальнейшие разработки программного обеспечения позволили собирать дифракционные данные с множества кристаллов относительно небольшого размера замороженных вместе на различных носителях [7].

Наибольшее развитие поточный метод сбора дифракционных данных получил с появлением технологии рентгеновского лазера на свободных электронах (РЛСЭ, англ. *X-Ray Free Electron Laser, XFEL*).

Лазер на свободных электронах – это тип лазера, в котором рабочая среда состоит из высокоскоростных электронов, свободно распространяющихся в ондуляторе (рис. 1) [8]. Ондулятор (или вигглер) – устройство для генерации когерентного излучения,



Рис. 1. Схема конструкции ондулятора [11].

- 1) Место вхождения пучка электронов из ускорителя в ондулятор.
- 2) Ловушка для электронов.
- 3) Электромагнитный луч, генерируемый ондулятором.
- 4) Система сопряженных дипольных магнитов.

представляющее собой последовательность коротких дипольных магнитов. В таком устройстве регулирование параметров ондулятора и скорости вхождения в него электронов позволяет изменять характеристики излучения. В отличие от ондуляторов, которые устанавливают на синхротроны, длина которых составляет несколько метров, в рентгеновских лазерах они значительно длиннее и достигают нескольких сотен метров.

Электрон, разогнанный на ускорителе, попадает в ондулятор, где начинает двигаться по синусоидальной траектории. При этом частицы теряют энергию, которая преобразуется в поток фотонов. Для получения излучения в рентгеновском диапазоне, электроны должны входить в ондулятор на скорости, близкой к скорости света. В РЛСЭ, благодаря значительной длине ондулятора, электроны, под воздействием силы Лоренца, сбиваются в пучки. Частицы в пучке колеблются синхронно и их излучение становится когерентным, что приводит к дополнительному росту интенсивности электромагнитного излучения и его импульсной природе [8–10]. Результативность усиливающего эффекта прямо пропорциональна длине ондулятора. РЛСЭ способны генерировать когерентные ультракороткие (10-100 фс) электромагнитные импульсы, пиковая спектральная сила излучения которых значительно выше (до 10³³ фотонов/ с/ мм²/ мрад²/ 0,1% спектральной полосы) чем у синхротронных источников 3-го поколения (до 10²⁰ фотонов/ с/ мм²/ мрад²/ 0,1% спектральной полосы).

Γ.	К.	Селиханов	и	соавт.

С 2009 года в Гамбурге ведется строительство нового центра РЛСЭ (European XFEL). В таблице показана сравнительная характеристика этого РЛСЭ и американского LCLS и японского SACLA. Многие исследования, которые проводятся на LCLS, на European XFEL станут проходить значительно быстрее, а также будет возможным сделать ранее технологически недоступные эксперименты.

Таблица. Сравнительные характеристики LCLS, SACLA и European XFEL

Характеристика / Объект	LCLS*	SACLA**	European XFEL***
Местонахождение	Калифор- ния, США	Япония	Германия
Ввод в эксплуатацию	2009	2011	2017
Частота импульсов, Гц	120	60	27000
Минимальная длина волны, Å	1,5	0,8	0,5
Максимальная энергия электронов, ГэВ	14,3	6-8	17,5
Длина ускорителя, км	3	0,750	3,4
Количество ондуляторов	1	3	3, с возмож- ностью увели- чения до 5
Количество экспериментальных станций	3–5	4	6, с возмож- ностью увели- чения до 10
Пиковая спектральная сила излучения [фотоны / с / мм ² / мрад ² / 0,1% спектральной полосы]	2 × 10 ³³	1 × 10 ³³	5 × 10 ³³
Средняя спектральная сила излучения [фотоны / с / мм ² / мрад ² / 0,1% спектральной полосы]	2,4 × 10 ²²	1,5 × 10 ²³	1,6 × 10 ²⁵

(таблица адаптирована с сайта [12])

*LCLC – Linac Coherent Light Source. **SACLA – SPring-8 Angstrom Compact Free Electron Laser. ***European XFEL – European X-Ray Free-Electron Laser.

III. МЕТОД ПОТОЧНОЙ КРИСТАЛЛОГРАФИИ И ЕГО ПРЕИМУЩЕСТВА

Физический принцип последовательной кристаллографии не отличается от принципа классического рентгеноструктурного анализа. Этот метод также основан на взаимодействии рентгеновского излучения с молекулами, пространственную структуру которых необходимо определить. Первичный пучок фотонов, представляющий собой плоскую монохроматическую электромагнитную волну, попадает на объект, каждый электрон которого способен к дифракции, то есть является источником вторичной сферической электромагнитной волны. Это излучение фиксируется детекторами, в результате чего получаются дифракционные картины, которые затем обрабатываются с помощью программного обеспечения, а после этого решается проблема фаз и, в конечном итоге, рассчитывается карта электронной плотности, по которой и строится пространственная структура объекта.

Одной из основных проблем классического РСА является деградация кристаллов под воздействием излучения. Разрушение происходит вследствие таких факторов как: нагревание, разрушение ковалентных связей, изменение зарядов молекул и образование свободных радикалов [13]. Из-за появления свободных радикалов повреждение образца продолжается даже после прекращения облучения [14]. Для РСА обычно используют сравнительно крупные трехмерные кристаллы, размеры сторон которых превышают 10 мкм [15]. Кристаллы меньшего размера не дают достаточного уровня усиления сигнала для получения дифракционных данных, кроме этого, существуют трудности в центрировании пучка на микрокристаллах. Хотя современные синхротроны способны генерировать интенсивные рентгеновские импульсы, кристаллографы, как правило, используют их не в полную силу. Существует определенный компромисс в выборе параметров излучения: оно, с одной стороны, не должно быть слишком мощным, так как это приведет к быстрому разрушению кристалла, а с другой стороны, должно быть достаточно интенсивным для получения дифракционных данных высокого разрешения. Для того чтобы замедлить разрушение образцов, применяют криопротекцию, однако это не решает проблему полностью [13].

Еще до того как технология РЛСЭ стала доступна для использования в структурной биологии, было выдвинуто предположение, что высокие дозы рентгеновского излучения, доставляемые короткими и сверхинтенсивными импульсами, могут быть применены для получения дифракционных данных [16]. Несмотря на то, что высокая доза рентгеновского излучения уничтожает крис-

Г.К.Селиханов и соавт.



Рис. 2. Первый эксперимент сбора дифракционных данных фемтосекундным лазером (рисунок адаптирован из статьи [17]).

1) Микрофотография мембраны до облучения лазером, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа.

2) Изображение, реконструированное из дифракционных данных.

 Микрофотография мембраны после облучения лазером, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа.

талл, при малой продолжительности импульса удается получить качественные дифракционные данные до возникновения повреждений. Теоретически, размер изучаемого образца можно уменьшать вплоть до уровня единичной молекулы при условии соответствующего увеличения интенсивности электромагнитного импульса. Пространственные структуры в таком случае решаются с использованием наложения дифракционных данных, полученных от тысяч изоморфных кристаллов.

Впервые на практике такой подход применили в 2006 году. С помощью РЛСЭ FLASH, расположенного в Гамбурге, получены дифракционные данные с мембраны из нитрида кремния с выжженным на нем изображением [17]. Длительность импульса составляла 25 фс. Реконструированное по дифракционным данным изображение не показало каких либо повреждений, хотя мембрана оказалась полностью разрушена после облучения (рис. 2). Позже, в 2007 году, провели рентгеноструктурный анализ сферы из полистирола, фикси-



Рис. 3. Схема экспериментальной установки для фемтосекундной поточной кристаллографии (рисунок адаптирован из статьи [26]).

Нанокристаллы распыляются в вакууме газо-динамическим распылителем. Рентгеновское излучение проходит перпендикулярно через полученную струю. Дифракционные данные после каждого импульса записываются детекторами. Передний детектор отвечает за высокое разрешение, а задний за низкое.

рованной на мембране из нитрида кремния, с использованием этой же установки [18]. Разрешающая способность метода в этом эксперименте составляла 60 Å.

В методике ПРСА с использованием РЛСЭ неизбежное разрушение объекта после его облучения требует постоянного обновления исследуемого материала в области взаимодействия с рентгеновскими лучами. Существует несколько систем доставки. Выбор той или иной зависит во многом от типа исследуемого образца. В большинстве экспериментов используется струя жидкости, как правило, материнский раствор для выращивания кристаллов, которая вводится в вакуумный отсек прибора, где и происходит облучение [19]. Использование струи жидкости для доставки микрокристаллов объясняется тем, что интенсивность дифракционных пиков для них значительно выше, чем для водного окружения, что позволяет отфильтровать водяной «шум». Диаметр такой струи составляет несколько сотен нм [20].

На рис. 3 представлена схема установки работающей в Стэндфорском университете в Калифорнии, США.

В отличие от глобулярных белков, мембранные белки обладают обширными гидрофобными поверхностями и в клетке располагаются в липидном бислое, что вызывает дополнительные трудности как

Г.К.Селиханов и соае	зт.
----------------------	-----

при их очистке и кристаллизации, так и при доставке полученных кристаллов к рентгеновскому лучу. Для исследования таких объектов существуют различные методы работы с подобными образцами. Одним из них является кристаллизация и доставка в липидной кубической фазе (ЛКФ) [21] (рис. 4). ЛКФ представляет собой липид, чаще всего моноолеин, смешанный с водой и исследуемым белком в определенных пропорциях. Матрица ЛКФ поддерживает рост кристаллов мембранных белков, способствуя такой упаковке молекул, в которой белки контактируют друг с другом и гидрофобными и гидрофильными поверхностями [22]. Позднее ЛКФ модернизировали для получения липидной губчатой фазы (ЛГФ), путем смешивания моноолеина с полиэтиленгликолем или джеффамином [23,24]. В отличии от ЛКФ, являющейся твердым веществом, липидная губчатая фаза представляет собой вязкую жидкость, которую можно, по аналогии с водными растворами, распылять, создавая поток из микрокристаллов, попадающих в область взаимодействия с рентгеновским импульсом.

Еще одним способом доставки мембранных белков является метод формирования текучих бислойных пленок, пересекающих рентгеновский пучок и обеспечивающих постоянную доставку мембранных белков в область взаимодействия [25]. Этот метод эффективен для изучения двухмерных белковых кристаллов.

Многие молекулы, не образующие крупных кристаллов, способны формировать микро-и нанокристаллы. Они настолько малы, что их зачастую невозможно зафиксировать с помощью оптического микроскопа [12]. Тем не менее, благодаря значительной интенсивности рентгеновского излучения на РЛСЭ, даже такие небольшие кристаллы дают достаточный уровень усиления сигнала для извлечения дифракционных данных.

Для снижения темпов деградации, кристаллы, во время проведения стандартного эксперимента PCA, держат в криогенных условиях. Возможным негативным следствием заморозки белков в условиях сверхнизких температур может являться нарушение их способности к конформационным перестройках. Показано, что около 35% боковых групп аминокислотных остатков могут иметь иное пространственное расположение в криогенных условиях, чем при комнатной температуре [27]. Такие изменения часто затрагивают структуру каталитических центров, необходимых для функционирования белка. При проведении эксперимента методом ПРСА, в особенности с использованием РЛСЭ кристаллы находятся при комнатной температуре. Это важно, поскольку изучение пространственных структур молекул без заморозки позволяет обнаружить конформационные особенности, ключевые для



355

Рис. 4. Схематическая модель кубической фазы, состоящей из моноолеина, воды и мембранного белка [22].

Слева: матрица, состоящая из трехмерной периодической мембранной сетки, пронизанной системой протяженных водных каналов.

Справа: увеличенная секция матрицы, показывающая липидный бислой со встроенной молекулой мембранного белка, обволакивающий водный канал.

функционирования белка, которые элиминируются при сверхнизких температурах. Кроме этого, нахождение белков в нормальных для них температурных условиях крайне важно для кинетических экспериментов, так как скорость реакций, как правило, зависит от температуры.

ІV. КИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа многих белков сопряжена с определенными молекулярными конформационными перестройками. Для детального понимания механизмов функционирования таких объектов необходима информация не только об их пространственной организации в состоянии «покоя», но также обо всех переходных формах, которые появляются в результате конформационных изменений. Среди наиболее чувствительных методов, позволяющих изучать молекулярную динамику, таких как ядерный магнитный резонанс, нейтронного рассеивания, ультрафиолетовой и инфракрасной микроскопии, рентгеноструктурный анализ играет центральную роль [28].

Это возможно благодаря тому, что многие белки остаются функ-

Г.К.	Селиханов	и	соавт.
------	-----------	---	--------

ционально активными, находясь в кристаллической форме. Однако, для того чтобы получить структуру промежуточного состояния, требуется либо чтобы такая форма белка была стабильна и могла формировать кристалл, либо чтобы конформационные перестройки начались одновременно во всех молекулах белка, формирующих кристалл, и при этом не произошло разрушение кристалла. Это практически невозможно для всех молекул, за исключением светочувствительных. К примеру, в случае ферментов, которые активируются при контакте с определенным соединением, мы не можем доставить молекулу субстрата к каждой молекуле белка в кристалле одновременно, а значит, не можем привести все ячейки к одному конформационному состоянию. Молекулы же светочувствительных белков можно активировать синхронно, облучая их светом с определенными характеристиками. Именно поэтому кинетические эксперименты в кристаллах проводятся преимущественно на таких объектах.

Ранее, отдельные этапы эксперимента были достаточно разнесенными по времени: облучению подвергали кристалл, находящийся в состоянии «покоя», а затем кристалл, находящийся после активирующего воздействия. Полученные структуры затем сравнивали. Таким образом, например, получили информацию об изменениях, происходящих под действием света в структуре фотосинтетического реакционного центра *Rhodobacter sphaeroides* [29]. Один кристалл исследовали в темноте, а другой на свету. Разрешение полученных структур составило 2,2 Å и 2,6 Å, соответственно. Это позволило обнаружить существенные изменения в структуре молекул реакционного центра. Однако такой способ позволяет показать только начальную и конечную конформации, что недостаточно для полноценного анализа механизма работы белков.

Современный подход к кинетическим рентгеноструктурным исследованиям – это метод «накачки и зондирования» («pump and probe»). Метод заключается в запуске конформационных перестроек молекул в кристалле лазерным импульсом с последующей обработкой рентгеновским импульсом, который уже дает дифракционные данные, необходимые для построения пространственной структуры. Накачка и зондирование должны повторяться множество раз для того, чтобы получить необходимое количество данных с кристаллов в их случайных ориентациях, а также для получения информации с различной задержкой между возбуждающим и рентгеновским импульсами для сбора кинетических данных. На данный момент величина задержки варьируется в диапазоне от секунд до наносекунд [28]. Такие эксперименты являются действительно кинетическими,

так как позволяют не только обнаружить и построить структуры интермедиатов, но и определить время их существования и скорость взаимопревращений. Этот подход использовали, например, для получения данных о промежуточных конформациях таких фоточувствительных белков как фотоактивный желтый белок [30, 31] и бактериальный фотосинтетический реакционный центр [32].

Одно из основных ограничений метода кинетического PCA – это минимальное время рентгеновского облучения, необходимое для получения дифракционных данных. До появления мощных синхротронных источников радиации продолжительность облучения была дольше, чем время существования интермедиатов. С появлением синхротронов третьего поколения стало возможным «ловить» переходные конформации молекул. При этом используется метод Лауэ, в котором дифракционные данные получают экспозицией фиксированного кристалла с помощью мощного полихроматического рентгеновского излучения, что отличается от стандартного метода PCA, где вращающийся кристалл облучается монохроматическим лучом [33]. Метод Лауэ позволяет сократить время воздействия рентгеновского излучения на 3–4 порядка по сравнению с монохроматическими экспериментами, что дает возможность получать микросекундные дифракционные данные.

При этом кинетический РСА имеет те же недостатки что и обычный РСА. Это проблема получения кристаллов и их повреждения в ходе эксперимента. Использование жесткого полихроматического рентгеновского излучения усугубляет ситуацию тем, что кристаллы деградируют быстрее и дифракционные данные получаются низкого качества [28]. Еще одним важным недостатком метода является невозможность сокращения времени экспозиции кристалла ниже порогового значения, около 100 пс, необходимого для получения дифракционных данных, что не позволяет изучать интермедиаты, время существования которых меньше [34].

С помощью поточного рентгеноструктурного анализа тоже возможно исследовать кинетику различных процессов. Для кинетического ПРСА на РЛСЭ используется тот же подход – «накачки и зондирования». Эта технология уже показала свою эффективность в изучении кинетики в глобулярных белках. Примером одного из последних успехов метода является достижение разрешающей способности в 250 фс в исследовании ультрабыстрых структурных изменений, происходящих в результате фотолизиса Fe–CO связи в комплексе миоглобина с монооксидом углерода [35]. Эти изменения занимают около 500 фс, что делает кинетический ПРСА на сегодняшний день единственным

Г.К.	Селиханов	и	соавт.
------	-----------	---	--------

методом с достаточной разрешающей способностью для фиксирования таких короткоживущих промежуточных состояний.

Кроме возможности исследования короткоживущих интермедиатов у кинетического ПРСА есть ряд других преимуществ: 1) белки в составе микро- и нанокристаллов могут быть более гомогенно активированы чем в составе больших кристаллов; 2) нет необходимости получать данные о структуре белка и в состоянии покоя, и в возбужденном состоянии из одного кристалла, что зачастую требуется для проведения кинетического РСА; 3) кинетический ПРСА более приспособлен к получению данных из кристаллов различной морфологии, чем кинетический РСА, и применим к кристаллам со сравнительно слабыми отражающими свойствами [36].

V. НЕДОСТАТКИ МЕТОДА ПРСА

Метод поточного рентгеноструктурного анализа, конечно же, имеет свои недостатки. Одним из них являются высокие затраты кристаллов белка на проведение эксперимента, по сравнению с классическим PCA. В экспериментах на РЛСЭ только малая их часть поражается рентгеновскими импульсами, а большая часть проскакивает и не взаимодействует с излучением. Например, в работе по получению структуры полиэдрина капсида вируса CPV17, процент попадания составлял лишь 4% от общего количества кристаллов [37]. Для проведения эксперимента потребовалось 632 мкл суспензии с концентрацией около 3×10^9 микрокристаллов на литр. При этом было сделано 144803 снимка, из которых только 5787 оказались пригодны для дальнейшего использования. Такие высокие потери характерны для ПРСА, где подача кристаллов осуществляется струей жидкости.

Для уменьшения количества используемого образца разрабатываются методы доставки с помощью кристаллографических сеток с небольшими ячейками, которые используются по аналогии с кристаллографической петлей, в которую помещают крупные кристаллы [38]. Однако, при таком способе доставки, кристаллы изымаются из своего материнского раствора, что может приводить к их повреждению и ухудшению качества.

Еще одной возможностью сократить затраты белка на проведение анализа является увеличение частоты рентгеновских импульсов. Рентгеновские лазеры на свободных электронах, на данный момент используемые для ПРСА, имеют частоты импульсов 60 Гц у японского SACLA и 120 Гц у американского LCLS. Вводимый в эксплуатацию European XFEL будет иметь частоту импульсов 27000 Гц, что должно

существенно увеличить эффективность использования кристаллов на этой установке по сравнению с другими РЛСЭ.

Другие недостатки метода – это высокие затраты компьютерной памяти, необходимой для хранения отсортированных дифракционных данных, а также проблемы с анализом суспензий, содержащих несколько кристаллических форм микрокристаллов.

Кроме этого, существует вероятность того, что для метода ПРСА все же существует предел интенсивности рентгеновского излучения, после преодоления которого кристалл будет разрушаться еще до окончания извлечения дифракционных данных [39]. Существующие на данный момент РЛСЭ не позволяют проверить это утверждение на практике, так как не имеют достаточной мощности.

VI. ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПОТОЧНОЙ КРИСТАЛЛОГРАФИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФОТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ

ΦΟΤΟСИСТЕМА Ι (ΦCI)

Фотосистема I является пластоцианин-ферредоксин-оксидоредуктазой. Она представляет собой крупный мембранный мультипигментный белковый комплекс, располагающийся в хлоропластах и необходимый растениям, водорослям и цианобактериям для осуществления фотосинтеза [45]. Фотосистема I преобразует солнечную энергию в поток электронов. При поглощении света происходит передача электрона по электрон-транспортной цепи сначала к пластоцианину, а затем к ферредоксину [40]. Квантовый выход данного процесса крайне высок и приближается к 100 процентам [41]. Анализ кристаллической структуры фотосистемы І термофильных цианобактерий Synechococcus elongatus показал, что полный функциональный комплекс у этих организмов представлен тримером. При этом один мономер состоит из 12 белков и 127 кофакторов, которые включают 96 хлорофиллов, два филлохинона, 3 Fe₄S₄ кластера, 22 каротиноида, четыре липида, предполагается наличие иона Са²⁺ и 201 молекулы воды [42]. Полный тримерный комплекс имеет молекулярную массу около 1 МДа.

Фотосистема I Synechococcus elongatus стала первым из фоточувствительных мембранных комплексов, на котором в 2011 году применили метод ПРСА с использованием РЛСЭ [26]. Анализ проводился при комнатной температуре. Доставка микрокристаллов осуществлялась в струе жидкости, длительность рентгеновского импульса составляла 70 фс. Исследователи получили структуру с

Г.К.	Селиханов	и	соавт.
------	-----------	---	--------

разрешением 8,5 Å. Несмотря на низкое разрешение, этот результат был достаточно впечатляющим, так как размер используемых микрокристаллов составлял от 0,2 до 2 мкм и, учитывая размеры самого белкового комплекса, усиление дифракционного сигнала от кристаллов такого размера было сравнительно небольшим.

В 2012 году на ФСІ продемонстрировали возможность проведения кинетических исследований методом ПРСА [43]. С помощью установки с синхронизированными возбуждающим лазером и РЛСЭ анализировали кристаллы комплекса фотосистемы I с ферредоксином с задержками после активации в 5 и 10 мкс. Получены данные о фотоиндуцированных изменениях в кристаллах, которые коррелируют с микросекундной кинетикой переноса электрона от ФСІ к ферредоксину. Стоит отметить, что после передачи электрона происходит расстыковка комплекса, что ведет к значительным перестройкам в кристалле и последующему его разрушению. Это был первый пример применения кинетического ПРСА для необратимых фотохимических реакций.

ФОТОАКТИВНЫЙ ЖЕЛТЫЙ БЕЛОК (ФЖБ)

ФЖБ – это небольшой глобулярный белок, который выполняет фотосенсорную функцию у пурпурных фотосинтезирующих бактерий [44].

Для поглощения фотона в синей области спектра, в структуру ФЖБ входит хромофор – *p*-кумаровая кислота – связанный с остатком цистеина (Cys69) тиоэфирной связью [44, 45]. В темноте хромафор находится в депротонированной транс-изомерной форме. В результате поглощения фотона, он переходит в возбужденное состояние и белок входит в обратимый фотоцикл, который включает множество интермедиатов. Основным фотохимическим событием, контролирующим вхождение в фотоцикл, является изомеризация хромофора из транс- в цис-конформацию, которая проходит по торсионному углу связи С₂=С₂. ФЖБ является идеальной моделью для изучения пространственных перестроек необходимых белку для функционирования в ответ на внешний сигнал. Благодаря белковому окружению, для большинства фотобиологических систем характерны высокая скорость и эффективность реакции изомеризации хромофора. Скорость прохождения этого процесса измеряется фемто- и пикосекундами и интермедиаты процесса существуют недолго, что является проблемой при определении их структуры, а значит и для изучения механизма реакции [46].

Впервые метод кинетического поточного рентгеноструктурного анализа применили для ФЖБ в 2014 году [47]. Предшествующие



Рис. 5. Упрощенная схема фотоцикла фотоактивного желтого белка (рисунок адаптирован из [47]).

Представленный цикл получен с помощь данных кинетического PCA. pG – состояние белка в темноте; pG* – возбужденное состояние белка после поглощения фотона с длиной волны 450 нм. Кристаллические структуры сравнительно долгоживущих интермелиатов $I_{\rm T}, I_{\rm CT}, pR_1, pR_2, pB_1$ и pB2 известны.

исследования с помощью кинетического PCA методом Лауэ позволили поделить фотоцикл на 6 интермедиатов: I_{17} , I_{CT} , pR_{1} , pR_{2} , pB_{1} и pB₂ (рис. 5).

Наиболее сильные особенности проявляются в разностных картах электронной плотности, при заселенности состояний pR_1 и pR_2 , так как сера, принадлежащая аминокислотному остатку Сузб9, с которой хромофор ковалентно связан, значительно меняет свое пространственное расположение в обоих этих интермедиатах. Это происходит во временном промежутке между 200 нс и 100 мкс. Для того чтобы выявить эти изменения в эксперименте выбрали время задержки в 1 мкс.

Второй массив данных собрали с задержкой в 10 нс, в течение которой наблюдалась заселенность тремя различными интермедиатами. Максимальное разрешение составляло 1,6 Å. При сравнении с данными, полученными с помощью кинетического PCA с использованием дифракции Лауэ, установили, что разностные карты, полученные двумя методами, очень похожи.

Г.К.	Селиханов	и	соавт.
------	-----------	---	--------

В более позднем исследовании методом кинетического ПРСА изучали структурную динамику цис- транс-изомеризации в ФЖБ на самых ранних стадиях фотоцикла [45]. Получен ряд структур с задержкой после активации от 100 фс до 3 пс, длительность рентгеновского импульса составляла 40 фс, при этом также достигнуто разрешение 1,6 Å.

ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ РЕАКЦИОННЫЙ ЦЕНТР (РЦ) ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ

Фотосинтетические РЦ – это макромолекулярные комплексы, состоящие из белков, пигментов и других кофакторов, которые участвуют в превращении энергии света в химическую энергию при фотосинтезе [40]. Энергия в РЦ может поступать при непосредственном возбуждении собственных пигментов, но чаще происходит перенос энергии от светособирающих комплексов.

Бактериальные РЦ интересны тем, что их архитектура схожа с центральной частью фотосистемы II, поэтому их многие годы используют в качестве структурных и функциональных моделей для изучения более сложно организованной ФСII. Именно бактериальный фотосинтетический РЦ бактерии *Blastochloris viridis* стал первым мембранным белком, для которого, в 1985 году, получили пространственную структуру методом РСА [48]. Данный фотореакционный центр представляет собой четырех-субъединичный мембранный белок, молекулярной массой примерно 135 кДа. В качестве кофакторов в нем выступают четыре молекулы бактериохлорофиллов, две из которых формируют специальную пару, две молекулы бактериофеофетинов, две молекулы хинонов, один каротиноид и ион Fe^{2+} , а также четыре гема.

В отличие от РЦ пурпурных бактерий, кристаллизация фотосистемы I проходит в растворе с низкой ионной силой (9 мМ MgSO₄) [49]. Однако такие условия для мембранных белков редкость. Обычно для их кристаллизации используют высокие концентрации солей (50–300 мМ) с добавлением полиэтиленгликоля (от 10–35 %) [24]. Такой раствор не пригоден для доставки кристаллов к рентгеновскому пучку в струе жидкости, из-за его высокой вязкости и риска образования кристаллов соли, которые могут заблокировать инжектор. В 2012 году метод ПРСА использовали на РЦ *Blastochloris viridis* [24]. Полученная структура имела разрешение 8,2 Å. Именно тогда, для доставки микрокристаллов струей жидкости, адаптировали и впервые применили методику кристаллизации в липидной губчатой фазе. ЛГФ можно безопасно использовать при доставке микрокристаллов и теперь ее применяют для многих мембранных белков.



Рис. 6. Повреждение ковалентной тиоэфирной связи, чувствительной к рентгеновскому излучению в РЦ *Blastochloris viridis* (рисунок адаптирован из [50]).

1) Карта электронной плотности, полученная из данных РСА при 100 К с использованием рентгеновского излучения мощностью 4,4 МГр.

 Карта электронной плотности, полученная из данных РСА при 100 К с использованием рентгеновского излучения мощностью 77 МГр.

 Карта электронной плотности, полученная из данных ПРСА при комнатной температуре с использованием рентгеновского излучения мощностью 33 МГр.

Совершенствование методики ПРСА и качества кристаллов привело к улучшению разрешения структуры РЦ *Blastochloris viridis* в 2013 году до 3,5 Å [50]. Повышение разрешения позволило обнаружить несколько отличий между структурами полученными методами РСА и ПРСА. Показательным является сравнение данных о ковалентной тиоэфирной связи между N-концевым цистеином С-субъединицы РЦ и молекулой диацилглицерола (рис. 6).

Как видно из рисунка 6, непрерывная электронная плотность, продемонстрированная на первой панели, значительно нарушается на второй, что является следствием разрыва тиоэфирной связи мощным рентгеновским излучением. На третьей панели не наблюдается разрыва ковалентной связи, хотя мощности излучения для этого достаточно, что демонстрирует способность метода ПРСА извлекать полностью интактные дифракционные данные.

ΦΟΤΟCИСТЕМА ΙΙ (ΦCII)

Фотосистема II, также, как и фотосистема I, является белок-пигментным комплексом. Она расположена в тилакоидной мембране хлоропластов в виде димера, каждый мономер которого содержит от 19 до 31 белковых субъединиц, в зависимости от вида организма [51]. ФСІІ выделяется тем, что обладает способностью осуществлять реакцию окисления воды с образованием молекулярного кислорода, и является единственной биологической системой способной на это [40].

Уникальная часть фотосистемы II – марганцевый кластер, также известный как водоокисляющий комплекс. Он состоит из четырех атомов марганца в различной степени окисления от ³⁺ до ⁵⁺, пяти связывающих их атомов кислорода и одного атома кальция. В 1970 году предложен пятистадийный цикл работы водоокисляющего комплекса [52]. Стадии обозначаются от S₀ до S₄, где индексом отображается количество накопленных в комплексе окислительных эквивалентов.

В течение нескольких десятков лет различные группы исследователей пытались определить пространственную структуру компонентов, составляющих комплекс фотосистемы II. В итоге, методом рентгеноструктурного анализа, в 2001 г. А. Зоуни с коллегами впервые удалось получить пространственную структуру ФС II из цианобактерии *Synechococcus elongatus* с разрешением 3,8 Å [53]. Далее в течение нескольких лет качество структуры фотосистемы II и предел ее разрешения постепенно повышались [54–58].

В 2011 году структуру фотосистемы II из цианобактерии *Thermosynechococcus vulcanus* получили с помощью PCA с разрешением 1,9 Å. Это позволило описать структуру Mn_4CaO_5 -кластера и его белкового окружения и предложить более детальный механизм его функционирования [59]. К сожалению, эта и другие структуры, полученные с помощью PCA, оказались не совсем достоверными, так как атомы марганца могут восстанавливаться под воздействием рентгеновского излучения. Происходит переход примерно 25% ионов со степенью окисления Mn^{IIIAV} в степень окисления Mn^{II} [60]. Данный процесс значительно меняет расстояния между атомами и искажает структуру кластера [60–62]. Таким образом, даже в условиях криогенных температур, которые сами по себе препятствуют получению нативной структуры, применение классического рентгеноструктурного анализа для этого объекта имеет ограничения.

Поточную кристаллографию с использованием РЛСЭ впервые применили для фотосистемы II в 2012 году [63]. Этот метод позволил и решить проблему восстановления ионов марганца, и провести анализ при комнатной температуре. Дифракционные данные, полученные с микрокристаллов фотосистемы II термофильной цианобактерии *Thermosynechococcus elongatus*, дали возможность реконструировать структуру с разрешением 6,5 Å. В 2013 году, благодаря оптимизации процедуры микрокристаллизации и доставки микрокристаллов, разрешение было улучшено до 5,7 Å [64,65].

Значительно более качественную структуру фотосистемы II цианобактерии *Thermosynechococcus vulcanus* получили в 2014 [66]. Достигнуто разрешение 1,95 Å, что позволило изучить структуру

марганцевого кластера и сравнить ее со структурой, полученной на синхротроне. Однако, в отличии от предыдущих опытов ПРСА, этот эксперимент проводился на крупных кристаллах при 100 К, поэтому, хотя в структуре и не наблюдалось фотоиндуцированных повреждений, так как использовался рентгеновский лазер на свободных электронах, она все же была получена в неестественных для белка условиях.

Примером успешного применения метода ПРСА стало исследование 2016 года, в котором получили структуру ФСІІ на S₁-стадии в темновой форме и две структуры ФСІІ на S₃-стадии, одна из них в присутствии молекул аммиака [67]. Дифракционные данные собирались при комнатной температуре, с использованием подхода кинетического ПРСА, для перехода в S₂-состояние. Аммиак использовали в качестве аналога воды для изучения сайтов ее связывания в марганцевом кластере. Достигнуто разрешение 3,0 Å для S₁-стадии, 2,8 Å для S₃-стадии с аммиаком и 2,25 Å для S₃-стадии без аммиака. При сравнении со структурой, полученной в криогенных условиях [66], выявлены различия в пространственном расположении мономеров ФСІІ друг относительно друга и трансмембранных α-спиралей внутри мономеров. Кроме этого обнаружили некоторые различия в длинах связей вблизи пигментов, вовлеченных в процесс переноса энергии. Предполагается, что большинство этих изменений объясняется именно разницей в температурах съемки. Полученные данные о ФСІІ на S₂-стадии послужили источником новой информации о важных для функционирования фотосистемы элементов структуры. Еще больше информации о механизме функционирования Mn₄CaO₅-кластера было получено благодаря исследованию 2017 года [68]. Были обнаружены неизвестные до этого фотоактивируемые структурные изменения водоокисляющего комплекса, а максимальное разрешение структур интермедиатов составило 2,35 Å.

БАКТЕРИОРОДОПСИН

Бактериородопсин представляет собой архейный белок, который встречается у представителей рода *Halobacterium* и участвует в фотосинтезе. Бактериородопсиновый фотосинтез примитивнее, чем хлорофилльный – белок является протонной помпой, которая, с использованием энергии света, переносит протоны из клетки в окружающую среду через мембрану. Образующийся протонный градиент далее используется для конвертирования в химическую энергию [69].

Бактериородопсин является интегральным мембранным белком. Характерной его особенностью служит то, что в мембранах он участ-

Г.К.Селиханов и соавт.

вует в формировании специфических участков, которые называются пурпурными мембранами. Пурпурные мембраны представляют собой двумерный кристаллический слой, который может занимать до 50% площади поверхности клеток архей. Бактериородопсин образует повторяющиеся элементы, организованные в цепи. Каждая цепь имеет по семь трансмембранных альфа-спиралей, содержащих по одной молекуле ретиналя внутри. Ретиналь является хромофором и соединен с бактериородопсином при помощи Шиффова основания [69, 70].

Благодаря тому, что бактериородопсин в мембранах архей самостоятельно формирует двумерные кристаллы, он является удобным модельным объектом для рентгеноструктурных исследований. Метод поточного рентгеноструктурного анализа с использованием РЛСЭ впервые применен к кристаллам этого белка в 2013 году [71]. Пурпурные мембраны изолировали из *H. salinarum*, затем, при помощи детергентов, получили небольшие бактериородопсиновые пластинки. Суспензию двумерных кристаллов, содержащую сахарозу, поместили на тонкую мембрану из нитрида кремния, формирующую окошко силиконового чипа, помещенного в вакуум. Кристаллы не подвергались криоконсервации, при этом сахароза предотвращала их дегидратацию. Использование фиксированных мишеней для рентгеновских импульсов позволило провести исследование с затратой всего нескольких микрограммов двумерных кристаллов. Максимально достигнутое разрешение дифракционных данных составило 8 Å. В дальнейшем техника была оптимизирована, что позволило получить данные с разрешением 7 Å [72].

Надо отметить, что форма двумерного кристалла для многих мембранных белков является наиболее естественной, так как это состояние схоже с их расположением в мембранах клеток [73]. Кроме этого, считается, что конформация мембранных белков в двумерных кристаллах схожа с их конформацией *in vivo* и потенциальные структурные изменения в молекулах не так ограничены, как могут быть в трехмерных кристаллах, что особо важно для исследований механизмов функционирования белков [74].

БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ФИТОХРОМ

Фитохромы представляют собой семейство фоторецепторов, которые участвуют в фотосенсорных реакциях растений, грибов и бактерий. Эти белки детектируют свет и запускают внутриклеточные сигнальные каскады, отвечающие за ответную реакцию организма на освещенность. В бактериях они часто функционируют в качестве

гистидин-киназ в двухкомпонентных сигнальных системах и могут отвечать, например, за контроль синтеза каротиноидов [75, 76].

Все фитохромы похожи по архитектуре. Они имеют три консервативных домена PAS, GAF и PHY, а так же тетрапирольный билиновый хромофор. Хромофор ковалентно связан тиоэфирной связью с остатком цистеина в PAS домене у бактерий или в GAF домене у цианобактерий и растений. Бактериальные фитохромы в качестве хромофора содержат биливердин [76]. Поглощение хромофором света ведет к ряду последовательных структурных изменений в белке, которые приводят к смещению спектра поглощения этих молекул из красной в дальнюю красную область. Детали реакции изомеризации и последовательности структурных изменений пока изучены не до конца.

В 2016 году кристаллическую структуру хромофор-связывающего домена (PAS-GAF) бактерии *Deinococcus radiodurans* получили методом поточного рентгеноструктурного анализа с использованием РЛСЭ при комнатной температуре с разрешением 2,1 Å [77]. Для сравнения определили еще одну кристаллическую структуру PAS-GAF с разрешением 1,35 Å с использованием обычного рентгеноструктурного анализа в криогенных условиях. Для обоих методов РСА для кристаллизации использовали похожие условия, а процесс выделения и очистки белка был идентичен. При этом для поточного анализа выбирали как непосредственно выращенные микрокристаллы, так и расколотые крупные кристаллы. Для доставки микрокристаллов использовали струю материнского раствора, а для доставки расколотых кристаллов брали их смесь с вязкой субстанцией, в обоих вариантах была продемонстрирована возможность получения качественных дифракционных данных.

Сравнение кристаллических структур PAS-GAF фрагмента продемонстрировало, что кристаллические структуры, полученные и с применением ПРСА и классического РСА, очень похожи и расхождения в основном регистрируются в неструктурированных участках, а в атомах основной цепи и хромофора различий практически не наблюдается. В кристаллической структуре, полученной при комнатной температуре, повреждений не наблюдалось.

Полученного в этом исследовании методом ПРСА разрешения в 2,1 Å достаточно для исследования реакций изомеризации в хромофоре, изменений в пространственном расположении молекул воды и движений боковых групп аминокислотных остатков. Для получения этих данных исследователи планируют в дальнейшем применить к бактериофитохрому метод кинетического ПРСА.

Г.К.Селиханов и соавт.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение пространственной организации белковых молекул стало неотъемлемой частью многих современных биологических исследований. На сегодняшний день банк данных белковых структур пополняется ежедневно, и наибольший вклад в этот процесс вносит рентгеноструктурная кристаллография с использованием синхротронного излучения. При всех своих достоинствах этот метод имеет серьезные ограничения, которые не позволяют использовать его универсально для любых белков.

В связи с этим в последнее время активно развивается метод поточного рентгеноструктурного анализа с использованием РЛСЭ. Он обладает возможностями, которые позволяют вывести изучение кинетических процессов, в частности у фоточувствительных белков, на ранее недостижимый уровень.

Таким образом, в будущем, мы надеемся, что этот метод перейдет из разряда экспериментальных разработок в категорию рутинных методов структурной биологии. Исследования станут проходить значительно быстрее и менее трудоемко, а их результаты будут более качественными и достоверными.

ЛИТЕРАТУРА

- Skarzynski, T., Mistry, A., Wonacott, A., Hutchinson, S.E., Kelly, V.A., Duncan, K. (1996) Structure of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, an enzyme essential for the synthesis of bacterial peptidoglycan, complexed with substrate UDP-N-acetylglucosamine and the drug fosfomycin, *Structure*, 4, 1465–1474.
- Liu, J., Tse, A.G.D., Chang, H.-C., Liu, J. -h., Wang, J., Hussey, R.E., Chishti, Y., Rheinhold, B., Spoerl, R., Nathenson, S.G., Sacchettini, J.C., Reinherz, E.L. (1996) Crystallization of a Deglycosylated T Cell Receptor (TCR) Complexed with an Anti-TCR Fab Fragment, J. Biol. Chem., 271, 33639–33646.
- 3. Wikoff, W.R., Tsai, C.J., Wang, G., Baker, T.S., Johnson, J.E. (1997) The Structure of Cucumber Mosaic

Virus: Cryoelectron Microscopy, X-Ray Crystallography, and Sequence Analysis, *Virology*, **232**, 91–97.

- 4. Wenzel, S., Martins, B.M., Rösch, P., Wöhrl, B.M. (2010) Crystal structure of the human transcription elongation factor DSIF hSpt4 subunit in complex with the hSpt5 dimerization interface, *Biochem. J.*, **425**, 373–380.
- Hamiaux, C., Stanley, D., Greenwood, D.R., Baker, E.N., Newcomb, R.D. (2009) Crystal Structure of Epiphyas postvittana Takeout 1 with Bound Ubiquinone Supports a Role as Ligand Carriers for Takeout Proteins in Insects, *J. Biol. Chem.*, 284, 3496–3503.
- Gabdulkhakov, A.G., Dontsova, M.V., Saenger, W. (2011) Three-dimensional structure of photosystem II from Thermosynechococcus elongates in complex with terbutryn, *Crystallogr. Rep.*, 56, 1054–1059.

- Gabadinho, J., Beteva, A., Guijarro, M., Rey-Bakaikoa, V., Spruce, D., Bowler, M.W., Brockhauser, S., Flot, D., Gordon, E.J., Hall, D.R., Lavault, B., McCarthy, A.A., McCarthy, J., Mitchell, E., Monaco, S., Mueller-Dieckmann, C., Nurizzo, D., Ravelli, R.B.G., Thibault, X., Walsh, M.A., Leonard, G.A., McSweeney, S.M. (2010) *MxCuBE*: a synchrotron beamline control environment customized for macromolecular crystallography experiments, *J. Synchrotron Radiat.*, **17**, 700–707.
- Huang, Z., Kim, K.-J. (2007) Review of x-ray free-electron laser theory, *Phys. Rev. Spec. Top. – Accel. Beams*, 10, 034801-034826.
- Margaritondo, G., Rebernik Ribic, P. (2011) A simplified description of X-ray free-electron lasers, *J. Synchrotron Radiat.*, 18, 101–108.
- 10. Strüder, L., Epp, S., Rolles, D., Hartmann, R., Holl, P., Lutz, G., Soltau, H., Eckart, R., Reich, C., Heinzinger, K., Thamm, C., Rudenko, A., Krasniqi, F., Kühnel, K.-U., Bauer, C., Schröter, C.-D., Moshammer, R., Techert, S., Miessner, D., Porro, M., Hälker, O., Meidinger, N., Kimmel, N., Andritschke, R., Schopper, F., Weidenspointner, G., Ziegler, A., Pietschner, D., Herrmann, S., Pietsch, U., Walenta, A., Leitenberger, W., Bostedt, C., Möller, T., Rupp, D., Adolph, M., Graafsma, H., Hirsemann, H., Gärtner, K., Richter, R., Foucar, L., Shoeman, R.L., Schlichting, I., Ullrich, J. (2010) Large-format, high-speed, X-ray pnCCDs combined with electron and ion imaging spectrometers in a multipurpose chamber for experiments at 4th generation light sources, Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. Accel. Spectrometers Detect. Assoc. Equip., 614, 483–496.
- 11. Carroll, D. (2011) Overview of High Energy Lasers: Past, Present,

and Future, 42nd AIAA Plasmadynamics and Lasers Conference in conjunction with the 18th International Conference on MHD Energy Conversion (ICMHD). 3102 p.

- European XFEL Overview In comparison, http://www.xfel.eu/ overview/in_comparison/.
- Massover, W.H. (2007) Radiation damage to protein specimens from electron beam imaging and diffraction: a mini-review of anti-damage approaches, with special reference to synchrotron X-ray crystallography, J. Synchrotron Radiat., 14, 116–127.
- 14. Smyth, M.S. (2000) x Ray crystallography, *Mol. Pathol.*, **53**, 8–14.
- Holton, J.M., Frankel, K.A. (2010) The minimum crystal size needed for a complete diffraction data set, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 66, 393–408.
- Neutze, R., Wouts, R., van der Spoel, D., Weckert, E., Hajdu, J. (2000) Potential for biomolecular imaging with femtosecond X-ray pulses, *Nature*, 406, 752–757.
- Chapman, H.N., Barty, A., Bogan, M.J., Boutet, S., Frank, M., Hau-Riege, S.P., Marchesini, S., Woods, B.W., Bajt, S., Benner, W.H., London, R.A., Plönjes, E., Kuhlmann, M., Treusch, R., Düsterer, S., Tschentscher, T., Schneider, J.R., Spiller, E., Möller, T., Bostedt, C., Hoener, M., Shapiro, D.A., Hodgson, K.O., van der Spoel, D., Burmeister, F., Bergh, M., Caleman, C., Huldt, G., Seibert, M.M., Maia, F.R.N.C., Lee, R.W., Szöke, A., Timneanu, N., Hajdu, J. (2006) Femtosecond diffractive imaging with a soft-Xray free-electron laser, *Nat. Phys.*, 2, 839–843.
- Chapman, H.N., Hau-Riege, S.P., Bogan, M.J., Bajt, S., Barty, A., Boutet, S., Marchesini, S., Frank, M., Woods, B.W., Benner, W.H.,

London, R.A., Rohner, U., Szöke, A., Spiller, E., Möller, T., Bostedt, C., Shapiro, D.A., Kuhlmann, M., Treusch, R., Plönjes, E., Burmeister, F., Bergh, M., Caleman, C., Huldt, G., Seibert, M.M., Hajdu, J. (2007) Femtosecond time-delay X-ray holography, *Nature*, **448**, 676–679.

- Weierstall, U., Spence, J.C.H., Doak, R.B. (2012) Injector for scattering measurements on fully solvated biospecies, *Rev. Sci. Instrum.*, 83, 035108–035120.
- Deponte, D.P., Mckeown, J.T., Weierstall, U., Doak, R.B., Spence, J.C.H. (2011) Towards ETEM serial crystallography: Electron diffraction from liquid jets, *Ultramicroscopy*, **111**, 824–827.
- Liu, W., Wacker, D., Wang, C., Abola, E., Cherezov, V. (2014) Femtosecond crystallography of membrane proteins in the lipidic cubic phase, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 369, 20130314–20130324.
- Landau, E.M., Rosenbusch, J.P. (1996) Lipidic cubic phases: A novel concept for the crystallization of membrane proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 14532–14535.
- Wadsten, P., Wöhri, A.B., Snijder, A., Katona, G., Gardiner, A.T., Cogdell, R.J., Neutze, R., Engström, S. (2006) Lipidic Sponge Phase Crystallization of Membrane Proteins, *J. Mol. Biol.*, 364, 44–53.
- 24. Johansson, L.C., Arnlund, D., White, T.A., Katona, G., DePonte, D.P., Weierstall, U., Doak, R.B., Shoeman, R.L., Lomb, L., Malmerberg, E., Davidsson, J., Nass, K., Liang, M., Andreasson, J., Aquila, A., Bajt, S., Barthelmess, M., Barty, A., Bogan, M.J., Bostedt, C., Bozek, J.D., Caleman, C., Coffee, R., Coppola, N., Ekeberg, T., Epp, S.W., Erk, B., Fleckenstein, H., Foucar, L., Graafsma, H., Gumprecht, L., Hajdu, J., Hampton,

C.Y., Hartmann, R., Hartmann, A., Hauser, G., Hirsemann, H., Holl, P., Hunter, M.S., Kassemeyer, S., Kimmel, N., Kirian, R.A., Maia, F.R.N.C., Marchesini, S., Martin, A.V., Reich, C., Rolles, D., Rudek, B., Rudenko, A., Schlichting, I., Schulz, J., Seibert, M.M., Sierra, R.G., Soltau, H., Starodub, D., Stellato, F., Stern, S., Strüder, L., Timneanu, N., Ullrich, J., Wahlgren, W.Y., Wang, X., Weidenspointner, G., Wunderer, C., Fromme, P., Chapman, H.N., Spence, J.C.H., Neutze, R. (2012) Lipidic phase membrane protein serial femtosecond crystallography, *Nat. Methods*, **9**, 263–265.

- Beerlink, A., Wilbrandt, P.-J., Ziegler, E., Carbone, D., Metzger, T.H., Salditt, T. (2008) X-ray Structure Analysis of Free-Standing Lipid Membranes Facilitated by Micromachined Apertures, *Langmuir*, 24, 4952–4958.
- 26. Chapman, H.N., Fromme, P., Barty, A., White, T.A., Kirian, R.A., Aquila, A., Hunter, M.S., Schulz, J., DePonte, D.P., Weierstall, U., Doak, R.B., Maia, F.R.N.C., Martin, A.V., Schlichting, I., Lomb, L., Coppola, N., Shoeman, R.L., Epp, S.W., Hartmann, R., Rolles, D., Rudenko, A., Foucar, L., Kimmel, N., Weidenspointner, G., Holl, P., Liang, M., Barthelmess, M., Caleman, C., Boutet, S., Bogan, M.J., Krzywinski, J., Bostedt, C., Bajt, S., Gumprecht, L., Rudek, B., Erk, B., Schmidt, C., Hömke, A., Reich, C., Pietschner, D., Strüder, L., Hauser, G., Gorke, H., Ullrich, J., Herrmann, S., Schaller, G., Schopper, F., Soltau, H., Kühnel, K.-U., Messerschmidt, M., Bozek, J.D., Hau-Riege, S.P., Frank, M., Hampton, C.Y., Sierra, R.G., Sta-rodub, D., Williams, G.J., Hajdu, J., Timneanu, N., Seibert, M.M., Andreasson, J., Rocker, A., Jönsson, O., Svenda, M., Stern, S., Nass, K., Andritschke, R., Schröter, C.-

D., Krasniqi, F., Bott, M., Schmidt, K.E., Wang, X., Grotjohann, I., Holton, J.M., Barends, T.R.M., Neutze, R., Marchesini, S., Fromme, R., Schorb, S., Rupp, D., Adolph, M., Gorkhover, T., Andersson, I., Hirsemann, H., Potdevin, G., Graafsma, H., Nilsson, B., Spence, J.C.H. (2011) Femtosecond X-ray protein nanocrystallography, *Nature*, **470**, 73–77.

- Fraser, J.S., van den Bedem, H., Samelson, A.J., Lang, P.T., Holton, J.M., Echols, N., Alber, T. (2011) Accessing protein conformational ensembles using room-temperature X-ray crystallography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 16247–16252.
- Bourgeois, D., Schotte, F., Brunori, M., Vallone, B. (2007) Time-resolved methods in biophysics. 6. Time-resolved Laue crystallography as a tool to investigate photo-activated protein dynamics, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6, 1047–1056.
- Stowell, M.H. (1997) Light-Induced Structural Changes in Photosynthetic Reaction Center: Implications for Mechanism of Electron-Proton Transfer, *Science*, **276**, 812–816.
- 30. Ihee, H., Rajagopal, S., Srajer, V., Pahl, R., Anderson, S., Schmidt, M., Schotte, F., Anfinrud, P.A., Wulff, M., Moffat, K. (2005) From The Cover: Visualizing reaction pathways in photoactive yellow protein from nanoseconds to seconds, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 7145–7150.
- 31. Ren, Z., Perman, B., Šrajer, V., Teng, T.-Y., Pradervand, C., Bourgeois, D., Schotte, F., Ursby, T., Kort, R., Wulff, M., Moffat, K. (2001) A Molecular Movie at 1.8 Å Resolution Displays the Photocycle of Photoactive Yellow Protein, a Eubacterial Blue-Light Receptor, from Nanoseconds to Seconds, *Biochemistry (Mosc.)*, 40, 13788–13801.

- 32. Baxter, R.H.G., Ponomarenko, N., Srajer, V., Pahl, R., Moffat, K., Norris, J.R. (2004) Time-resolved crystallographic studies of light-induced structural changes in the photosynthetic reaction center, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 5982–5987.
- Moffat, K., Szebenyi, D., and Bilderback, D. (1984) X-ray Laue diffraction from protein crystals, *Science*, 223, 1423–1425.
- Schotte, F. (2003) Watching a Protein as it Functions with 150-ps Time-Resolved X-ray Crystallography, *Science*, **300**, 1944–1947.
- 35. Barends, T.R.M., Foucar, L., Ardevol, A., Nass, K., Aquila, A., Botha, S., Doak, R.B., Falahati, K., Hartmann, E., Hilpert, M., Heinz, M., Hoffmann, M.C., Kofinger, J., Koglin, J.E., Kovacsova, G., Liang, M., Milathianaki, D., Lemke, H.T., Reinstein, J., Roome, C.M., Shoeman, R.L., Williams, G.J., Burghardt, I., Hummer, G., Boutet, S., Schlichting, I. (2015) Direct observation of ultrafast collective motions in CO myoglobin upon ligand dissociation, *Science*, **350**, 445–450.
- Panneels, V., Wu, W., Tsai, C.-J., Nogly, P., Rheinberger, J., Jaeger, K., Cicchetti, G., Gati, C., Kick, L.M., Sala, L., Capitani, G., Milne, C., Padeste, C., Pedrini, B., Li, X.-D., Standfuss, J., Abela, R., Schertler, G. (2015) Time-resolved structural studies with serial crystallography: A new light on retinal proteins, *Struct. Dyn.*, 2, 041718–041726.
- 37. Ginn, H.M., Messerschmidt, M., Ji, X., Zhang, H., Axford, D., Gildea, R.J., Winter, G., Brewster, A.S., Hattne, J., Wagner, A., Grimes, J.M., Evans, G., Sauter, N.K., Sutton, G., Stuart, D.I. (2015) Structure of CPV17 polyhedrin determined by the improved analysis of serial

femtosecond crystallographic data, *Nat. Commun.*, **6**, 6435–6443.

- 38. Cohen, A.E., Soltis, S.M., González, A., Aguila, L., Alonso-Mori, R., Barnes, C.O., Baxter, E.L., Brehmer, W., Brewster, A.S., Brunger, A.T., Calero, G., Chang, J.F., Chollet, M., Ehrensberger, P., Eriksson, T.L., Feng, Y., Hattne, J., Hedman, B., Hollenbeck, M., Holton, J.M., Keable, S., Kobilka, B.K., Kovaleva, E.G., Kruse, A.C., Lemke, H.T., Lin, G., Lyubimov, A.Y., Manglik, A., Mathews, I.I., McPhillips, S.E., Nelson, S., Peters, J.W., Sauter, N.K., Smith, C.A., Song, J., Stevenson, H.P., Tsai, Y., Uervirojnangkoorn, M., Vinetsky, V., Wakatsuki, S., Weis, W.I., Zadvornyy, O.A., Zeldin, O.B., Zhu, D., Hodgson, K.O. (2014) Goniometer-based femtosecond crystallography with X-ray free electron lasers, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111, 17122–17127.
- Lunin, V.Y., Grum-Grzhimailo, A.N., Gryzlova, E.V., Sinitsyn, D.O., Petrova, T.E., Lunina, N.L., Balabaev, N.K., Tereshkina, K.B., Stepanov, A.S., Krupyanskii, Y.F. (2015) Efficient calculation of diffracted intensities in the case of nonstationary scattering by biological macromolecules under XFEL pulses, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 71, 293–303.
- Blankenship, R.E. (2014) Molecular mechanisms of photosynthesis, Wiley/Blackwell, Chichester, West Sussex., 296.
- Nelson, N. (2009) Plant Photosystem I – The Most Efficient Nano-Photochemical Machine, J. Nanosci. Nanotechnol., 9, 1709–1713.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W., Krauß, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature*, 411, 909–917.

- 43. Aquila, A., Hunter, M.S., Doak, R.B., Kirian, R.A., Fromme, P., White, T.A., Andreasson, J., Arnlund, D., Bajt, S., Barends, T.R.M., Barthel-mess, M., Bogan, M.J., Bostedt, C., Bottin, H., Bozek, J.D., Caleman, C., Coppola, N., Davidsson, J., DePonte, D.P., Elser, V., Epp, S.W., Erk, B., Fleckenstein, H., Foucar, L., Frank, M., Fromme, R., Graafsma, H., Grotjohann, I., Gumprecht, L., Hajdu, J., Hampton, C.Y., Hartmann, A., Hartmann, R., Hau-Riege, S., Hauser, G., Hirsemann, H., Holl, P., Holton, J.M., Hömke, A., Johansson, L., Kimmel, N., Kassemeyer, S., Krasniqi, F., Kühnel, K.-U., Liang, M., Lomb, L., Malmerberg, E., Marchesini, S., Martin, A.V., Maia, F.R.N.C., Messerschmidt, M., Nass, K., Reich, C., Neutze, R., Rolles, D., Rudek, B., Rudenko, A., Schlichting, I., Schmidt, C., Schmidt, K.E., Schulz, J., Seibert, M.M., Shoeman, R.L., Sierra, R., Soltau, H., Starodub, D., Stellato, F., Stern, S., Strüder, L., Timneanu, N., Ullrich, J., Wang, X., Williams, G.J., Weidenspointner, G., Weierstall, U., Wunderer, C., Barty, A., Spence, J.C.H., Chapman. H.N. (2012) Time-resolved protein nanocrystallography using an X-ray free-electron laser, Opt. Express, 20, 2706-2716.
- Imamoto, Y., Kataoka, M. (2007) Structure and Photoreaction of Photoactive Yellow Protein, a Structural Prototype of the PAS Domain Superfamily, *Photochem. Photobiol.*, 83, 40–49.
- 45. Pande, K., Hutchison, C.D.M., Groenhof, G., Aquila, A., Robinson, J.S., Tenboer, J., Basu, S., Boutet, S., DePonte, D.P., Liang, M., White, T.A., Zatsepin, N.A., Yefanov, O., Morozov, D., Oberthuer, D., Gati, C., Subramanian, G., James, D., Zhao, Y., Koralek, J., Brayshaw, J., Kupitz, C., Conrad, C., Roy-Chowdhury, S., Coe, J.D., Metz, M., Xavier, P.L.,

Grant, T.D., Koglin, J.E., Ketawala, G., Fromme, R., rajer, V., Henning, R., Spence, J.C.H., Ourmazd, A., Schwander, P., Weierstall, U., Frank, M., Fromme, P., Barty, A., Chapman, H.N., Moffat, K., van Thor, J.J., Schmidt, M. (2016) Femtosecond structural dynamics drives the trans/ cis isomerization in photoactive yellow protein, *Science*, **352**, 725–729.

- Moffat, K. (1989) Time-Resolved Macromolecular Crystallography, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 18, 309–332.
- 47. Tenboer, J., Basu, S., Zatsepin, N., Pande, K., Milathianaki, D., Frank, M., Hunter, M., Boutet, S., Williams, G.J., Koglin, J.E., Oberthuer, D., Heymann, M., Kupitz, C., Conrad, C., Coe, J., Roy-Chowdhury, S., Weierstall, U., James, D., Wang, D., Grant, T., Barty, A., Yefanov, O., Scales, J., Gati, C., Seuring, C., Srajer, V., Henning, R., Schwander, P., Fromme, R., Ourmazd, A., Moffat, K., Van Thor, J.J., Spence, J.C.H., Fromme, P., Chapman, H.N., Schmidt, M. (2014) Time-resolved serial crystallography captures highresolution intermediates of photoactive yellow protein, *Science*, 346, 1242–1246.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., Michel, H. (1985) Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of Rhodopseudomonas viridis at 3Å resolution, *Nature*, **318**, 618–624.
- Fromme, P., Witt, H.T. (1998) Improved isolation and crystallization of photosystem I for structural analysis, *Biochim. Biophys. Acta BBA – Bio*energ., 1365, 175–184.
- Johansson, L.C., Arnlund, D., Katona, G., White, T.A., Barty, A., DePonte, D.P., Shoeman, R.L., Wickstrand, C., Sharma, A., Williams, G.J., Aquila, A., Bogan, M.J., Caleman, C., Davidsson, J., Doak, R.B., Frank, M.,

Fromme, R., Galli, L., Grotjohann, I., Hunter, M.S., Kassemeyer, S., Kirian, R.A., Kupitz, C., Liang, M., Lomb, L., Malmerberg, E., Martin, A.V., Messerschmidt, M., Nass, K., Redecke, L., Seibert, M.M., Sjöhamn, J., Steinbrener, J., Stellato, F., Wang, D., Wahlgren, W.Y., Weierstall, U., Westenhoff, S., Zatsepin, N.A., Boutet, S., Spence, J.C.H., Schlichting, I., Chapman, H.N., Fromme, P., Neutze, R. (2013) Structure of a photosynthetic reaction centre determined by serial femtosecond crystallography, *Nat. Commun.*, **4**, 2911–2917.

- Vinyard, D.J., Ananyev, G.M., Charles Dismukes, G. (2013) Photosystem II: The Reaction Center of Oxygenic Photosynthesis, *Annu. Rev. Biochem.*, 82, 577–606.
- 52. Kok, B., Forbush, B., McGloin, M. (1970) Cooperation of charges in photosynthetic O2 evolution-I. A linear four step mechanism, *Photochem. Photobiol.*, **11**, 457–475.
- Zouni, A., Witt, H.-T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., Orth, P. (2001) Crystal structure of photosystem II from Synechococcus elongatus at 3.8 Å resolution, *Nature*, 409, 739–743.
- Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A., Saenger, W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16, 334–342.
- Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., Biesiadka, J. (2005) Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II, *Nature*, 438, 1040–1044.
- Ferreira, K.N. (2004) Architecture of the Photosynthetic Oxygen-Evolving Center, *Science*, 303, 1831–1838.

- 57. Biesiadka, J., Loll, B., Kern, J., Irrgang, K.-D., Zouni, A. (2004) Crystal structure of cyanobacterial photosystem II at 3.2 Å resolution: a closer look at the Mn-cluster, *Phys Chem Chem Phys*, **6**, 4733–4736.
- Kamiya, N., Shen, J.-R. (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from Thermosynechococcus vulcanus at 3.7-A resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 98–103.
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.-R., Kamiya, N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å, *Nature*, 473, 55–60.
- 60. Yano, J., Kern, J., Irrgang, K.-D., Latimer, M.J., Bergmann, U., Glatzel, P., Pushkar, Y., Biesiadka, J., Loll, B., Sauer, K., Messinger, J., Zouni, A., Yachandra, V.K. (2005) X-ray damage to the Mn4Ca complex in single crystals of photosystem II: A case study for metalloprotein crystallography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12047–12052.
- Glockner, C., Kern, J., Broser, M., Zouni, A., Yachandra, V., Yano, J. (2013) Structural Changes of the Oxygen-evolving Complex in Photosystem II during the Catalytic Cycle, *J. Biol. Chem.*, 288, 22607–22620.
- Grabolle, M., Haumann, M., Muller, C., Liebisch, P., Dau, H. (2006) Rapid Loss of Structural Motifs in the Manganese Complex of Oxygenic Photosynthesis by X-ray Irradiation at 10–300 K, *J. Biol. Chem.*, 281, 4580–4588.
- Kern, J., Alonso-Mori, R., Hellmich, J., Tran, R., Hattne, J., Laksmono, H., Glockner, C., Echols, N., Sierra, R.G., Sellberg, J., Lassalle-Kaiser, B., Gildea, R.J., Glatzel, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Latimer, M.J., McQueen, T.A., DiFiore, D., Fry, A.R., Messerschmidt, M., Miahnahri,

A., Schafer, D.W., Seibert, M.M., Sokaras, D., Weng, T.-C., Zwart, P.H., White, W.E., Adams, P.D., Bogan, M.J., Boutet, S., Williams, G.J., Messinger, J., Sauter, N.K., Zouni, A., Bergmann, U., Yano, J., Yachandra, V.K. (2012) Room temperature femtosecond X-ray diffraction of photosystem II microcrystals, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 9721–9726.

- 64. Kern, J., Alonso-Mori, R., Tran, R., Hattne, J., Gildea, R.J., Echols, N., Glockner, C., Hellmich, J., Laksmono, H., Sierra, R.G., Lassalle-Kaiser, B., Koroidov, S., Lampe, A., Han, G., Gul, S., DiFiore, D., Milathianaki, D., Fry, A.R., Miahnahri, A., Schafer, D.W., Messerschmidt, M., Seibert, M.M., Koglin, J.E., Sokaras, D., Weng, T.-C., Sellberg, J., Latimer, M.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Zwart, P.H., White, W.E., Glatzel, P., Adams, P.D., Bogan, M.J., Williams, G.J., Boutet, S., Messinger, J., Zouni, A., Sauter, N.K., Yachandra, V.K., Bergmann, U., Yano, J. (2013) Simultaneous Femtosecond X-ray Spectroscopy and Diffraction of Photosystem II at Room Temperature, Science, 340, 491-495.
- Gabdulkhakov, A., Dontsova, M., (2013) Structural studies on photosystem II of cyanobacteria, *Biochemystry (Moscow)*, 78, 1524–1538.
- 66. Suga, M., Akita, F., Hirata, K., Ueno, G., Murakami, H., Nakajima, Y., Shimizu, T., Yamashita, K., Yamamoto, M., Ago, H., Shen, J.-R. (2014) Native structure of photosystem II at 1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses, *Nature*, 517, 99–103.
- 67. Young, I.D., Ibrahim, M., Chatterjee, R., Gul, S., Fuller, F.D., Koroidov, S., Brewster, A.S., Tran, R., Alonso-Mori, R., Kroll, T., Michels-Clark, T., Laksmono, H., Sierra, R.G., Stan, C.A., Hussein, R., Zhang, M., Douthit,

L., Kubin, M., de Lichtenberg, C., Vo Pham, L., Nilsson, H., Cheah, M.H., Shevela, D., Saracini, C., Bean, M.A., Seuffert, I., Sokaras, D., Weng, T.-C., Pastor, E., Weninger, C., Fransson, T., Lassalle, L., Bräuer, P., Aller, P., Docker, P.T., Andi, B., Orville, A.M., Glownia, J.M., Nelson, S., Sikorski, M., Zhu, D., Hunter, M.S., Lane, T.J., Aquila, A., Koglin, J.E., Robinson, J., Liang, M., Boutet, S., Lyubimov, A.Y., Uervirojnangkoorn, M., Moriarty, N.W., Liebschner, D., Afonine, P.V., Waterman, D.G., Evans, G., Wernet, P., Dobbek, H., Weis, W.I., Brunger, A.T., Zwart, P.H., Adams, P.D., Zouni, A., Messinger, J., Bergmann, U., Sauter, N.K., Kern, J., Yachandra, V.K., Yano, J. (2016) Structure of photosystem II and substrate binding at room temperature, Nature, 540, 453-457.

- 68. Suga, M., Akita, F., Sugahara, M., Kubo, M., Nakajima, Y., Nakane, T., Yamashita, K., Umena, Y., Nakabayashi, M., Yamane, T., Nakano, T., Suzuki, M., Masuda, T., Inoue, S., Kimura, T., Nomura, T., Yonekura, S., Yu, L.-J., Sakamoto, T., Motomura, T., Chen, J.-H., Kato, Y., Noguchi, T., Tono, K., Joti, Y., Kameshima, T., Hatsui, T., Nango, E., Tanaka, R., Naitow, H., Matsuura, Y., Yamashita, A., Yamamoto, M., Nureki, O., Yabashi, M., Ishikawa, T., Iwata, S., Shen, J.-R. (2017) Light-induced structural changes and the site of O=O bond formation in PSII caught by XFEL, *Nature*, **543**, 131–135.
- 69. Voet, D., Voet, J.G. (2011) *Biochemistry*, John Wiley & Sons, 1428 p.
- 70. Hucho, F. (1986) *Neurochemistry: fundamentals and concepts*, VCH Verl.-Ges, 326 p.
- Frank, M., Carlson, D.B., Hunter, M.S., Williams, G.J., Messerschmidt, M., Zatsepin, N.A., Barty, A., Benner, W.H., Chu, K., Graf, A.T., Hau-

Riege, S.P., Kirian, R.A., Padeste, C., Pardini, T., Pedrini, B., Segelke, B., Seibert, M.M., Spence, J.C.H., Tsai, C.-J., Lane, S.M., Li, X.-D., Schertler, G., Boutet, S., Coleman, M., Evans, J.E. (2014) Femtosecond X-ray diffraction from two-dimensional protein crystals, *IUCrJ*, **1**, 95–100.

- Pedrini, B., Tsai, C.-J., Capitani, G., Padeste, C., Hunter, M.S., Zatsepin, N.A., Barty, A., Benner, W.H., Boutet, S., Feld, G.K., Hau-Riege, S.P., Kirian, R.A., Kupitz, C., Messerschmitt, M., Ogren, J.I., Pardini, T., Segelke, B., Williams, G.J., Spence, J.C.H., Abela, R., Coleman, M., Evans, J.E., Schertler, G.F.X., Frank, M., Li, X.-D. (2014) 7 A resolution in protein two-dimensional-crystal X-ray diffraction at Linac Coherent Light Source, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **369**, 20130500–20130505.
- Fujiyoshi, Y. (2011) Electron crystallography for structural and functional studies of membrane proteins, *Microscopy*, **60**, S149–S159.
- Srivastava, S.K., Gayathri, S., Manjasetty, B.A., Gopal, B. (2012) Analysis of Conformational Variation in Macromolecular Structural Models, *PLoS ONE*, 7, e39993.
- Davis, S.J. (1999) Bacteriophytochromes: Phytochrome-Like Photoreceptors from Nonphotosynthetic Eubacteria, *Science*, 286, 2517–2520.
- Auldridge, M.E., Forest, K.T. (2011) Bacterial phytochromes: More than meets the light, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 46, 67–88.
- 77. Edlund, P., Takala, H., Claesson, E., Henry, L., Dods, R., Lehtivuori, H., Panman, M., Pande, K., White, T., Nakane, T., Berntsson, O., Gustavsson, E., Båth, P., Modi, V., Roy-Chowdhury, S., Zook, J., Berntsen, P., Pandey, S., Poudyal, I., Tenboer, J., Kupitz, C., Barty, A., Fromme, P., Koralek, J.D., Tanaka, T., Spence, J.,

Г.К.Селиханов и соавт.

Liang, M., Hunter, M.S., Boutet, S., Nango, E., Moffat, K., Groenhof, G., Ihalainen, J., Stojković, E.A., Schmidt, M., Westenhoff, S. (2016) The room temperature crystal structure of a bacterial phytochrome determined by serial femtosecond crystallography, *Sci. Rep.*, **6**, 35279–35288.