

To understand the function of proteins and potentially investigate the pharmacological interactions of new drugs at the molecular level, it is essential to determine the three-dimensional structure of biomolecules. X-ray crystallography is currently the method of choice that is widely utilized in the field of structural biology in order to provide important structural information. Most of the structures deposited in the Protein Data Bank (PDB; www.pdb.org) were determined via this method (about 89% as of November 2014) due to its ability to provide atomic resolution structures of a wide range of proteins. There are however a number of obstacles in macromolecular X-ray crystallography to overcome. The biggest two hurdles are (1) obtaining good single crystals diffracting to high resolution in the X-ray diffraction experiment and (2) the so called "phase problem". The latter occurs because detectors used in X-ray diffraction experiments are only able to measure the intensity of the diffracted light, but not its phase information which carries the bulk of the structural information. The state of the art approach to tackle this problem is either using the phases of a structurally related protein as a starting point for refinement (molecular replacement, MR) or for new protein classes where no homologous protein is available, the introduction of heavy atoms and/or anomalous scatterers via either soaking or co-crystallization. Initial phases can then be obtained by single or multiple isomorphous replacement (SIR, MIR), single- or multiple-wavelength anomalous dispersion (SAD, MAD) or a combination of both techniques such as single or multiple isomorphous replacement with anomalous scattering (SIRAS, MIRAS) [1-3]. Due to the fast technological progress of synchrotron facilities and particularly the development of software suites for the automated structure determination in the past decades, the phase problem is becoming more and more of a minor obstacle. Thus, obtaining high quality single crystals remains the real bottleneck in macromolecular crys-

Чтобы понимать функции белков и начать изучение фармакологического взаимодействия новых лекарств на молекулярном уровне, чрезвычайно важно определить пространственную структуру биомолекул. На данный момент для исследования структурной биологии используется рентгеновская кристаллография, - именно даёт почву для изучения важных данных о строении молекул. Большинство белковых структур, занесенных в **Protein Data Bank (PDB, www.pdb.org)**, выявили как раз с помощью этого метода (около 89% состоянием на ноябрь 2014 года), так как именно он позволяет определять атомную структуру большинства веществ, в нашем случае - белков. Однако, существует некоторое количество препятствий в, например, использовании рентгеноструктурного анализа на макромолекулярном уровне. Наиболее существенные из них, это, во-первых, кристаллы высокой твёрдости, подвергающиеся дифракции в монокристаллическом состоянии, а, во вторых, так называемая "фазовая проблема". Последняя возникает из-за того, что детекторы, используемые в рентгеновской кристаллографии, способны лишь определять интенсивность дифракционного света, то есть, учёные могут выяснить лишь модули амплитуд структуры белка, но никак не их фазы. На данный момент эта проблема решается с помощью введения в структуру молекулы белка с похожим строением для обработки нативного (молекулярное замещение), либо нового белка, содержащего тяжёлые атомы, которые не искажают изоморфную структуру нативного. Определения фаз в таком случае определяется синглетным или мультиплетным изоморфным замещением (СИЗ, МИЗ), синглетным или мультиплетным аномальным рассеиванием (САР, МАР) либо комбинацией обеих техник, как, например, сингл- или мультиплетное изоморфное замещение с аномальным рассеиванием атомов (СИЗАР, МИЗАР) [1-3]. В связи со скоростью технологического прогресса в использовании синхротронного излучения и в разработке специального программного обеспечения, предназначенного для

tallography to date [4]. Protein crystallization is still mainly a "trial and error" procedure which depends on various factors e.g. protein and precipitant concentration, pH, buffer, temperature, ionic strength, the presence of impurities and other unknown factors [5]. Therefore, protein crystallization can be very time consuming with no guarantee of success, which is especially true for membrane proteins [6]. This group of proteins is poorly soluble in aqueous conditions because of their membrane interacting hydrophobic portions and thus presents a tough challenge in protein crystallization.

автоматического определения молекулярной структуры, фазовая проблема близка к разрешению. Однако, исследование синглплетных кристаллов - все еще вызов для рентгеновской кристаллографии. Кристаллизация белков всё еще производится методом проб и ошибок, ведь успех процедуры зависит от разных факторов, включая температуру, кислотность, поляризацию рентгеновского пучка, поглощение в самом кристалле и т.д. [5]. Как бы там ни было, иногда кристаллизация белков - дело очень затратное, и, к тому же, не гарантирующее успеха, - например, если это мембранные белки. Эта группа белков слабо растворима в жидком состоянии из-за гидрофобной мембраны, так что их кристаллизация - вызов для учёных.