

УДК: 577.3

Компьютерное моделирование дифракции импульсов рентгеновских лучей на нанокристаллах биологических макромолекул с использованием унитарной аппроксимации нестационарных факторов атомного рассеяния

Лунин В.Ю.*¹, Грум-Гржимайло А.Н.**², Грызлова Е.В.²,
Синицын Д.О.³, Балабаев Н.К.¹, Лунина Н.Л.¹, Петрова Т.Е.¹,
Терешкина К.Б.³, Абдулнасыров Э.Г.³, Степанов А.С.³,
Крупянский Ю.Ф.**³

¹Институт математических проблем биологии, Российская академия наук, Пущино,
Московская область, 142290, Россия

²Научно-исследовательский институт ядерной физики имени Д.И. Скобельцына
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Москва, 119991, Россия

³Институт химической физики имени Н.Н. Семенова, Российская академия наук,
Москва 119991, Россия

Аннотация. Использование в процессе рентгеновского дифракционного эксперимента мощных импульсных источников может приводить к существенному изменению электронной структуры объекта за время действия импульса. Учет этих изменений существенно усложняет решение прямой задачи рентгеновского рассеяния - расчета дифракционной картины на основе имеющейся атомной модели исследуемого объекта. Нами предложены две упрощенные схемы, позволяющие проводить подобный расчет с использованием стандартных методов стационарной (предполагающей неизменность объекта в процессе эксперимента) биологической кристаллографии, оставаясь в рамках точности, достижимой на сегодняшний день при исследовании биологических макромолекул. Продемонстрировано, что при использовании импульсов умеренной интенсивности и работе с наборами экспериментальных данных среднего разрешения ослабление во времени интенсивности рассеянных лучей происходит почти синхронно для всех брэгговских рефлексов. Это позволяет проводить расчет картины рассеяния по стандартным формулам, адаптируя к эксперименту лишь общий масштабирующий коэффициент. Для работы с более мощными пучками предложена модификация стандартных расчетных формул, которая сводится к замене стандартных факторов атомного рассеяния (формфакторов) их эффективными аналогами, вычисляемыми на основе нестационарных формфакторов.

Ключевые слова: рентгеновский лазер на свободных электронах, фемтосекундные рентгеновские импульсы, рассеяние рентгеновских лучей, дифракция, нанокристаллы, биомacroмолекулы.

* lunin@impb.psn.ru

** algrgr1492@yahoo.com

*** yufk@chph.ras.ru

ВВЕДЕНИЕ

Рентгеновский структурный анализ (РСА) является основным источником информации о структуре биологических макромолекул на атомном уровне. Однако его применение осложнено необходимостью приготовления исследуемого образца в виде монокристалла. Основной информацией, получаемой в рентгеновском эксперименте, являются значения интенсивностей рассеянных в разных направлениях рентгеновских лучей. Необходимость кристаллов для дифракционного эксперимента обусловлена тем, что рассеивается лишь ничтожно малая часть первичного рентгеновского пучка, а кристалл позволяет увеличить интенсивность рассеянных лучей для некоторых направлений рассеяния (брэгговских рефлексов). Это увеличение пропорционально квадрату числа молекул, присутствующих в кристалле. Получение кристаллов с размерами, пригодными для РСА, зачастую является сложной проблемой, особенно при попытках кристаллизации мембранных белков и больших макромолекулярных комплексов. Ожидается, что с введением в эксплуатацию новых мощных источников рентгеновского излучения - рентгеновских лазеров на свободных электронах (XFEL) [1] - будет существенно ослаблена зависимость метода от размеров кристалла [2–4]. Разрабатываются экспериментальные методики, предусматривающие использование большого числа нанокристаллов биологического объекта вместо одного более крупного кристалла [5–7] или даже исследование единичных копий больших макромолекулярных комплексов и наночастиц [8–10].

Лазеры на свободных электронах генерируют мощные короткие импульсы рентгеновского излучения. Продолжительность этих импульсов в настоящее время составляет от единиц до сотен фемтосекунд (фс, $1 \text{ фс} = 10^{-15}$ секунды). Высокая интенсивность импульса приводит к тому, что электронная структура атомов исследуемого объекта может существенно деградировать за время эксперимента, как следствие фотоионизации, последующей цепочки оже-распадов и повторных процессов фотоионизации образующихся ионов различной кратности. Фотоионизация и оже-распады приводят к образованию положительно заряженных ионов с их последующим разлетом ("кулоновским взрывом") [11]. Процесс разлета, однако, в некоторой мере замедляется ввиду образования в образце значительного числа свободных электронов, нейтрализующих положительный заряд ионизированных атомов. Таким образом, важной особенностью эксперимента с использованием рентгеновских лазеров является существенное изменение исследуемого объекта во время эксперимента. Это обстоятельство требует критического анализа основных расчетных формул, используемых в РСА, поскольку эти формулы были выведены в предположении о неизменности или незначительности изменений объекта в процессе облучения.

Данная работа посвящена анализу необходимых изменений, которые должны быть внесены в базовую формулу РСА - формулу расчета интенсивности рассеянных волн по известной структуре рассеивающего объекта (прямая задача рентгеновского рассеяния). Расчет дифракционной картины (совокупности интенсивностей рассеянных волн) является элементарным шагом при решении обратной задачи теории рассеяния - восстановлении трехмерной структуры объекта по дифракционной картине. Этот шаг может повторяться тысячи и миллионы раз, поэтому практическая возможность определения структуры в существенной мере определяется наличием эффективной процедуры расчета картины дифракции по предложенной модели объекта. В данной работе мы предлагаем аппроксимацию формул расчета дифракционной картины изменяющегося во времени объекта, позволяющую осуществлять этот расчет за такие же времена, какие требуются при работе со стандартными расчетными формулами современной рентгеновской кристаллографии, используемыми при работе со стационарными объектами. Полученная аппроксимация, помимо использования в процессе решения обратной задачи, позволяет существенно ускорить модельные

расчеты, предназначенные для определения оптимальных параметров используемых рентгеновских импульсов и размеров нанокристаллов, обеспечивающих заданные условия детектирования пространственной структуры и функционально важных конформационных изменений.

Изучение методом рентгеновской дифракции объектов со структурой, существенно меняющейся в процессе эксперимента, требует пересмотра некоторых основных положений метода. Поэтому мы напомним в разделе 1 расчетные формулы метода и обсуждаем необходимые модификации. Основой для вывода упрощенной формулы является распространение на нестационарный случай идеи использования "унитарных" формфакторов. Подходы, базирующиеся на использовании стационарных унитарных формфакторов, имеют давнюю историю использования в кристаллографии [12]; краткое напоминание о них дано в разделе 2. В разделе 3 дано краткое описание методов, позволяющих рассчитать изменение во времени формфакторов отдельных атомов под воздействием мощного рентгеновского излучения. Полученные нестационарные формфакторы являются основой для построения нестационарных унитарных и "эффективных" (стационарных) формфакторов.

Очевидно, что использование различных аппроксимаций вносит погрешности в вычисляемые величины. Поэтому ответ на вопрос о приемлемости той или иной аппроксимации связан с выбранной мерой для оценки погрешности и допустимыми границами погрешности. В данной работе мы используем при сравнении наборов структурных факторов, рассчитанных разными методами, стандартную кристаллографическую характеристику - R -фактор. R -факторы, описывающие расхождение рассчитанной по модели картины дифракции с экспериментом, рассчитываются и публикуются для всех структур, определенных методом РСА. Статистический анализ значений R -факторов для структур биологических макромолекул, депонированных в банк белковых структур (PDB, [13]), позволяет оценить типичные значения этой величины в зависимости от разрешения используемого набора экспериментальных данных [14]. Эти значения показывают достигаемую на сегодняшний день точность соответствия модели эксперименту, и они используются нами в этой работе как допустимая граница погрешности при использовании той или иной аппроксимации структурных факторов.

1. СТАЦИОНАРНЫЕ СТРУКТУРНЫЕ ФАКТОРЫ

1.1 Кинематическая теория рассеяния

Стандартная схема рентгеновского эксперимента изображена на рис. 1. Объект помещается в поле первичной электромагнитной волны (с длиной волны λ), распространяющейся в направлении, задаваемом единичным вектором σ_0 . Регистрируется вторичная (рассеянная) волна, имеющая ту же длину волны и распространяющаяся от объекта в направлении, задаваемом единичным вектором σ . Измерение интенсивности рассеянной волны проводится для разных сочетаний векторов σ_0, σ (в реальном эксперименте направление падающего пучка остается неизменным, но вращается исследуемый объект). Угол между векторами σ_0, σ традиционно обозначается 2θ и называется углом рассеяния. В тех случаях, когда значение угла θ мало, говорят о рассеянии "под малыми углами". Наоборот, слова о рассеянии "под большими углами" подразумевает существенное отличие угла θ от нуля.

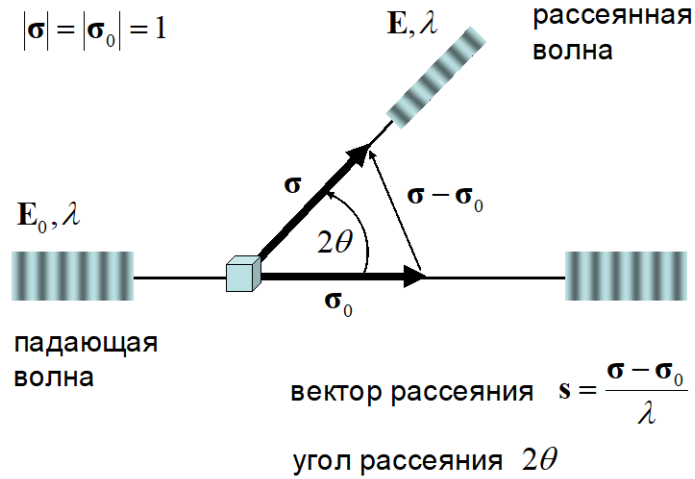


Рис. 1. Схема эксперимента по измерению интерференции рентгеновского излучения на кристалле (молекуле).

Основой кинематической теории рассеяния является модель рассеяния электромагнитной волны свободными электронами. В рамках этой модели каждый электрон под воздействием переменного электрического поля (плоской монохроматической электромагнитной волны) становится независимым осциллятором и превращается в источник вторичной (сферической) волны, имеющей ту же самую длину волны [15–16]. Вторичные волны интерферируют и тем определяют картину рассеяния. Следует отметить, что влияние вторичных волн на движение электронов считается при этом пренебрежимо малым и не учитывается. В случае плоско поляризованной волны решение уравнений Ньютона (для движения электрона) и Максвелла (для излучаемой движущимся электроном вторичной волны) позволяет представить амплитуду волны, рассеянной одним электроном, в виде (в системе единиц СГСЭ):

$$E_e = \frac{E_0}{r} \left(\frac{e^2}{mc^2} \right) \sin \phi \quad . \quad (1)$$

Здесь E_0 - амплитуда падающей волны, ϕ - угол между вектором E_0 и направлением рассеяния, r - расстояние от объекта до точки наблюдения (детектора), существенно превышающее длину волны, m - масса электрона, e - заряд электрона, c - скорость света. Средний поток рассеянной энергии определяется квадратом амплитуды рассеянной волны.

Для случая неполяризованной падающей волны формула для потока энергии рассеянной волны приобретает вид

$$I_e = \frac{P_T(\theta)}{r^2} \left(\frac{e^2}{mc^2} \right)^2 I_0 \quad , \quad (2)$$

где $I_0 = cE_0^2/8\pi$ - поток энергии падающей волны, $P_T(\theta)$ - фактор поляризации

$$P_T(\theta) = \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} \quad . \quad (3)$$

Следует заметить, что

$$\left(\frac{e^2}{mc^2}\right)^2 \approx 7.9 \cdot 10^{-26} \text{ см}^2, \quad (4)$$

а обычное для биологической кристаллографии расстояние r от объекта до детектора составляет 10-20 см, т. е. рассеивается лишь ничтожно малая часть энергии первичной волны. Это объясняет сложность регистрации рассеяния одиночной молекулой и необходимость комплекса мер (таких как повышение интенсивности первичной волны, приготовление образца в виде кристалла, повышение чувствительности детектора) для обеспечения регистрации рассеянного излучения.

При наличии нескольких рассеивающих электронов вторичные волны, исходящие от разных электронов, имеют фазовый сдвиг, зависящий от взаимного расположения электронов. Однако они имеют одинаковую длину волны, поэтому их сложение приводит к суммарной волне с той же длиной волны.

Двумя основными объектами изучения в рентгеновской кристаллографии являются распределение электронной плотности $\rho(\mathbf{r})$ в исследуемом объекте и (комплексные) структурные факторы $\mathbf{F}(\mathbf{s})$, соответствующие этому распределению электронов. Функция $\rho(\mathbf{r})$ описывает распределения рассеивающих электронов в пространстве и нормирована таким образом, что количество электронов в произвольной области Ω в трехмерном пространстве вычисляется как интеграл по области Ω от функции $\rho(\mathbf{r})$. Это эквивалентно тому, что количество электронов в элементарном объеме dV_r , окружающем точку трехмерного пространства \mathbf{r} , равно $\rho(\mathbf{r})dV_r$. Описание распределения электронов в пространстве при помощи стационарной (не зависящей от времени) функцией $\rho(\mathbf{r})$ подразумевает, что либо за время эксперимента распределение плотности меняется несущественно, либо что изменения столь быстры, что мы в состоянии "видеть" только усредненную по времени картину. Это предположение может становиться неверным при использовании для эксперимента сверхмощных импульсных источников рентгеновского излучения.

Структурный фактор может быть введен как отношение комплексной амплитуды рассеянной волны \mathbf{E} к амплитуде волны \mathbf{E}_e , рассеиваемой единичным электроном:

$$\mathbf{F}_{\sigma, \sigma_0} = \frac{\mathbf{E}}{\mathbf{E}_e} \quad . \quad (5)$$

В рамках кинематической теории рассеяния величина структурного фактора зависит только от разности направлений падающей и рассеянной волн и длины волны λ :

$$\mathbf{s} = (\boldsymbol{\sigma} - \boldsymbol{\sigma}_0) / \lambda, \quad (6)$$

называемой вектором рассеяния. При этом распределение электронной плотности связано со значениями структурных факторов трехмерным интегральным преобразованием Фурье:

$$\mathbf{F}_{\sigma, \sigma_0} = \mathbf{F}(\mathbf{s}) = \int \rho(\mathbf{r}) \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}] dV_r, \quad (7)$$

$$\rho(\mathbf{r}) = \int \mathbf{F}(\mathbf{s}) \exp[-2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}] dV_s. \quad (8)$$

Формула (8) может рассматриваться как разложение электронной плотности по гармоникам Фурье $\exp[-2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}]$. Каждая гармоника, рассматриваемая как функция \mathbf{r} , сохраняет постоянное значение в плоскостях, перпендикулярных направлению \mathbf{s} , и изменяется по синусоидальному закону вдоль направления \mathbf{s} . Длина волны этой

синусоиды называется в макромолекулярной кристаллографии разрешением, отвечающим гармонике Фурье $\exp[-2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}]$, и вычисляется как

$$d = |\mathbf{s}| = \frac{2 \sin \theta}{\lambda} . \quad (9)$$

Это же значение разрешения приписывается и соответствующему структурному фактору $\mathbf{F}(\mathbf{s})$. В тех случаях, когда величина d мала, говорят о структурных факторах высокого разрешения. Соответственно, структурные факторы низкого разрешения имеют большое значение d (и малое значение s). Термин "разрешение d_{\min} " применяется также к набору структурных факторов и подразумевает, что в набор включены все структурные факторы разрешения $d \geq d_{\min}$.

Для вектора рассеяния \mathbf{s} введем относительную интенсивность соответствующей рассеянной волны равенством

$$I(\mathbf{s}) = F^2(\mathbf{s}) . \quad (10)$$

Тогда при неполяризованной падающей волне поток энергии рассеянной волны

$$I_{\sigma, \sigma_0} = I(\mathbf{s}) I_e = I(\mathbf{s}) \frac{P_T(\theta)}{r^2} \left(\frac{e^2}{mc^2} \right)^2 I_0 , \quad (11)$$

где I_e и $P_T(\theta)$ даются формулами (2) и (3), $I_0 = cE_0^2/8\pi$. Для упрощения формул мы будем дальше говорить только об относительной интенсивности (10), подразумевая, что поток энергии определяется по ней формулой (11). В процессе эксперимента полная энергия, пришедшая на детектор, пропорциональна потоку энергии (11), а также продолжительности облучения и площади детектора.

1.2. Рассеяние атомом

В случае, когда рассеивающий объект состоит из одного атома, структурные факторы называют обычно фактором атомного рассеяния или атомным формфактором. Если центр атома помещен в начало координат и распределение электронной плотности в атоме сферически симметрично:

$$\rho(\mathbf{r}) = \rho_0(r) , \quad (12)$$

то формфактор атома тоже является вещественной сферически симметричной функцией:

$$\mathbf{F}(\mathbf{s}) = f(s) , \quad (13)$$

где $r = |\mathbf{r}|$ и $s = |\mathbf{s}| = 2 \sin \theta / \lambda$. При этом формулы (7) и (8), связывающие распределение электронной плотности в атоме с его формфактором, приобретают вид синус-преобразования Фурье:

$$f(s) = \frac{2}{s} \int_0^{+\infty} r \rho_0(r) \sin(2\pi sr) dr , \quad (14)$$

$$\rho_0(r) = \frac{2}{r} \int_0^{+\infty} s f(s) \sin(2\pi sr) ds . \quad (15)$$

Формфакторы для различных типов атомов и ионов рассчитаны (как правило, методом Хартри-Фока-Слэтера [17]) и табулированы в соответствующих таблицах [18]. Сферически симметричная модель распределения электронной плотности в атоме предполагает усреднение по всевозможным ориентациям плотностей, отвечающих

отдельным орбиталям. Более сложные модели распределения электронной плотности ("мультипольные" приближения [19–21]) в атоме используются в биологической кристаллографии крайне редко. Их использование требует введения в модель чрезмерно большого количества подгоняемых параметров, превышающего количество данных, получаемых в обычном рентгеновском эксперименте.

В случае, когда распределение электронной плотности в атоме можно аппроксимировать гауссовой функцией

$$\rho(\mathbf{r}) = \rho_0(r) = C \left(\frac{4\pi}{B} \right)^{3/2} \exp \left[-\frac{4\pi^2 r^2}{B} \right], \quad (16)$$

соответствующий формфактор тоже является гауссовой функцией

$$f(s) = C \exp \left[-\frac{Bs^2}{4} \right]. \quad (17)$$

При этом, чем больше "размазано" распределение электронной плотности (чем больше значение параметра B), тем быстрее значение формфактора убывает с ростом угла рассеяния θ (или с ростом величины вектора рассеяния s). Хотя графики формфакторов и выглядят внешне как колоколообразные кривые, аппроксимация формфактора одной гауссовой функцией является слишком грубой для приложений. Однако аппроксимация формфакторов суммой нескольких (от двух до шести, в зависимости от требуемой точности) гауссовых функций

$$f(s) \approx \sum_{m=1}^M C_m \exp \left[-\frac{B_m s^2}{4} \right] \quad (18)$$

обеспечивает нужную точность и широко используется в макромолекулярной кристаллографии. Для разных типов атомов и ионов наборы коэффициентов аппроксимации $\{C_m, B_m\}$ определены и табулированы [18, 22].

1.3. Рассеяние системой атомов

За редкими исключениями в работах по биологической кристаллографии предполагается, что распределение электронной плотности в изучаемом объекте может быть с достаточной точностью описано суммой электронных плотностей отдельных атомов:

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{j=1}^N \rho_{0,j}(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_j|), \quad (19)$$

Здесь $\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N$ - координаты центров атомов, функция $\rho_{0,j}(r)$ описывает распределение электронной плотности в j -ом атоме, помещенном в начало координат. Из формулы (7) следует, что структурные факторы в таком случае могут быть вычислены как

$$\mathbf{F}(\mathbf{s}) = \sum_{j=1}^N f_j(s) \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}_j] \quad (20)$$

Учет тонких эффектов перераспределения электронной плотности в процессе образования валентных связей (моделирование деформационной плотности) становится возможным лишь при наличии экспериментальных данных очень высокого разрешения (лучше 0.8 \AA).

1.4. Учет неопределенности в параметрах атомов

Формулы (19) и (20) предполагают, что координаты атомов однозначно определены и не меняются в процессе эксперимента. Однако в реальной ситуации может существовать как динамическая, так и статическая неопределенность в координатах атомов. Динамическая неопределенность связана с возможным движением атомов в процессе эксперимента (например, с тепловыми колебаниями). Статическая неопределенность связана с тем, что положение конкретного атома может быть различным в разных копиях элементарной ячейки в кристалле, либо в разных экземплярах объекта, использованных для эксперимента. Неопределенность в положении j -го атома может быть описана посредством задания плотности распределения вероятностей смещений центра атома $P_j(\mathbf{r})$. Распределение электронной плотности в атоме в этом случае не определено однозначно, и мы можем говорить лишь об ожидаемой (средней) электронной плотности

$$\rho_j^{ave}(\mathbf{r}) = \langle \rho_j(\mathbf{r}) \rangle = \int \rho_j(\mathbf{r}-\mathbf{u}) P_j(\mathbf{u}) dV_{\mathbf{u}} = (\rho_j * P_j)(\mathbf{r}). \quad (21)$$

Здесь * обозначает операцию свертки. Используя в формуле (19) средние значения плотности (21) и учитывая, что преобразование Фурье переводит свертку в произведение, мы получаем формулу для расчета структурных факторов в виде

$$\mathbf{F}(\mathbf{s}) = \sum_{j=1}^N f_j(s) T_j(\mathbf{s}) \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}_j]. \quad (22)$$

Входящие в эту формулу множители - факторы Дебая $T_j(\mathbf{s})$ - являются преобразованием Фурье функций $P_j(\mathbf{r})$, описывающих неопределенность в положении атомов,

$$T_j(\mathbf{s}) = \int P_j(\mathbf{r}) \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}] dV_{\mathbf{r}}. \quad (23)$$

В простейшем случае, когда неопределенность моделируется сферически симметричной гауссовой функцией

$$P_j(\mathbf{r}) = \left(\frac{4\pi}{B_j^{iso}} \right)^{3/2} \exp \left[-\frac{4\pi^2 r^2}{B_j^{iso}} \right], \quad (24)$$

факторы Дебая тоже сферически симметричны и имеют вид

$$T_j(\mathbf{s}) = \exp \left[-B_j^{iso} \frac{s^2}{4} \right]. \quad (25)$$

Традиционно они называются температурными факторами, а параметры $\{B_j^{iso}\}$ - параметрами тепловых колебаний. В последнее время более употребительным становится термин "параметры атомных смещений" (Atomic Displacement Parameters, ADP), подчеркивающий, что неопределенность в положениях атомов может вызываться не только тепловыми колебаниями. Более сложной моделью неопределенности является анизотропная гауссова функция общего вида, определяемая тензором смещений \mathbf{B}_j^{aniso} . В этом случае фактор Дебая принимает вид [23–25]

$$T_j(\mathbf{s}) = \exp \left[-\mathbf{s} \cdot \mathbf{B}_j^{aniso} \cdot \mathbf{s} \right]. \quad (26)$$

Параметры атомных смещений B_j^{iso} или \mathbf{B}_j^{aniso} определяются индивидуально для каждого атома наряду с координатами центра в процессе расшифровки структуры по

данным рентгеновского рассеяния и входят в описание структуры, хранящееся в банке белковых структур. Следует отметить, что при использовании анизотропных параметров атомных смещений ни среднее распределение электронной плотности в атоме, ни фактор Дебая не являются больше сферически симметричными, хотя и сохраняют центральную симметрию, т. е. $\rho(-\mathbf{r}) = \rho(\mathbf{r})$, $T(-\mathbf{s}) = T(\mathbf{s})$.

Еще один распространенный тип неопределенности в параметрах структуры связан с тем, что некоторые атомы могут присутствовать не во всех элементарных ячейках кристалла, либо присутствовать не во все моменты времени (например, атомы молекулы воды, связанные с белком водородными связями). Для моделирования этой ситуации в формулу для расчета структурных факторов вводятся коэффициенты заселенности C_j , показывающие, с какой вероятностью тот или иной атом присутствует в структуре

$$\mathbf{F}(\mathbf{s}) = \sum_{j=1}^N f_j(s) C_j T_j(\mathbf{s}) \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}_j]. \quad (27)$$

Мы будем далее полагать, что эти множители включены в фактор Дебая, и считать основной формулой для расчета стационарных структурных факторов формулу (22).

1.5. Рассеяние кристаллом

Рассмотрим теперь случай, когда исследуемый объект состоит из M идентичных блоков, сдвинутых относительно друг друга без поворотов. В этом случае

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{\alpha=1}^M \rho_{UC}(\mathbf{r} - \mathbf{t}_\alpha), \quad (28)$$

где $\rho_{UC}(\mathbf{r})$ - распределение плотности в единичном блоке, из которых построен объект, $\mathbf{t}_1, \mathbf{t}_2, \dots, \mathbf{t}_M$ - векторы сдвигов блоков. Структурные факторы в этом случае могут быть представлены в виде произведения

$$\mathbf{F}(\mathbf{s}) = \mathbf{F}_{UC}(\mathbf{s}) \mathbf{G}(\mathbf{s}; A), \quad (29)$$

где $\mathbf{F}_{UC}(\mathbf{s})$ - структурные факторы соответствующие базовому блоку $\rho_{UC}(\mathbf{r})$, а так называемая "интерференционная функция" $\mathbf{G}(\mathbf{s}; A)$ имеет вид

$$\mathbf{G}(\mathbf{s}; A) = \sum_{\alpha=1}^M \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{t}_\alpha]. \quad (30)$$

Здесь A обозначает множество векторов сдвига: $A = \{\mathbf{t}_1, \mathbf{t}_2, \dots, \mathbf{t}_M\}$. Первый сомножитель $\mathbf{F}_{UC}(\mathbf{s})$ содержит всю информацию о внутренней структуре блока. Вторым сомножителем $\mathbf{G}(\mathbf{s}; A)$ не содержит никакой информации о внутренней структуре блока и определяется композицией объекта из блоков - набором векторов трансляции $A = \{\mathbf{t}_1, \mathbf{t}_2, \dots, \mathbf{t}_M\}$.

Это разложение становится особенно важным, если исследуется кристаллический образец, т. е.

- распределение электронной плотности в объекте полностью определяется содержимым элементарной ячейки - параллелепипеда V , построенного на векторах $\{\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}\}$;
- объект построен из идентичных элементарных ячеек, сдвинутых на целочисленные комбинации векторов $\{\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}\}$.

Выбрав векторы $\{\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}\}$ в качестве базиса пространства, мы можем задать каждый вектор \mathbf{r} его координатами в этом базисе

$$\mathbf{r} = x\mathbf{a} + y\mathbf{b} + z\mathbf{c}. \quad (31)$$

В кристаллографии координаты (x, y, z) называются относительными координатами точки прямого пространства, а базис $\{\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}\}$ - базисом прямого пространства. Сопряженный базис (или базис "обратного пространства") $\{\mathbf{a}^*, \mathbf{b}^*, \mathbf{c}^*\}$ определяется условиями

$$\begin{aligned} \mathbf{a} \cdot \mathbf{a}^* &= \mathbf{b} \cdot \mathbf{b}^* = \mathbf{c} \cdot \mathbf{c}^* = 1, \\ \mathbf{a} \cdot \mathbf{b}^* &= \mathbf{a} \cdot \mathbf{c}^* = \mathbf{b} \cdot \mathbf{a}^* = \mathbf{b} \cdot \mathbf{c}^* = \mathbf{c} \cdot \mathbf{a}^* = \mathbf{c} \cdot \mathbf{b}^* = 0. \end{aligned} \quad (32)$$

Вектор рассеяния \mathbf{s} принято задавать координатами в базисе обратного пространства

$$\mathbf{s} = h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^*, \quad (33)$$

и называть (h, k, l) индексами рефлекса. При таком выборе координат скалярное произведение векторов \mathbf{r} и \mathbf{s} записывается

$$\mathbf{s} \cdot \mathbf{r} = hx + ky + lz. \quad (34)$$

Пусть множество A , задающее интерференционную функцию (30), состоит из векторов \mathbf{t}_α , имеющих целочисленные относительные координаты $(u_\alpha, v_\alpha, w_\alpha)$, т. е. все сдвиги кратны базисным векторам элементарной ячейки. В таком случае для любого вектора рассеяния \mathbf{s} с целочисленными индексами (h, k, l) имеем

$$\mathbf{G}(\mathbf{s}; A) = \sum_{\alpha=1}^M \exp[2\pi i(hu_\alpha + kv_\alpha + lw_\alpha)] = M, \quad (35)$$

поскольку все показатели экспонент кратны $2\pi i$. Из последней формулы следуют два важных вывода. Во-первых, регистрируемые в эксперименте структурные факторы для векторов рассеяния с целочисленными индексами пропорциональны структурным факторам, рассчитанным по содержимому одной элементарной ячейки, с одним и тем же коэффициентом пропорциональности, не зависящим от индексов рефлекса. Ввиду указанной пропорциональности термин "структурные факторы" применяется в кристаллографии и к величинам $\mathbf{F}_{UC}(\mathbf{s})$, рассчитанным по содержимому одной элементарной ячейки. Следует также подчеркнуть, что эта пропорциональность имеет место только для векторов рассеяния с целочисленными индексами и не имеет места для произвольных векторов рассеяния. Во-вторых, при целочисленных индексах структурный фактор кристаллического образца превосходит структурный фактор одной ячейки в M раз, а соответствующая интенсивность рассеяния в M^2 раз, где M - число элементарных ячеек, повторенных в кристалле. Нетрудно оценить, что кристалл с линейными размерами 0.1 мм и линейными размерами элементарной ячейки 100 Å содержит 10^{12} экземпляров элементарной ячейки, что дает усиление интенсивности рассеянной волны в 10^{24} раз, позволяя на практике компенсировать потерю интенсивности, вызванную множителем (4). Указанные два обстоятельства приводят к тому, что рентгеновский эксперимент с кристаллом позволяет определить экспериментальные значения модулей структурных факторов $F^{obs}(\mathbf{s}) = F^{obs}(h, k, l)$ для векторов рассеяния с целочисленными индексами ("брэгговских рефлексов"), в то время как информация о прочих структурных факторах остается недоступной. Говоря далее о структурных факторах, мы будем подразумевать структурные факторы с целочисленными индексами и использовать для них термин "рефлексы" ("отражения").

1.6. Рассеяние неупорядоченным растворителем

При проведении рентгеновского эксперимента с кристаллами биологических макромолекул следует также иметь в виду, что помимо рассеяния молекулами изучаемого объекта (белка, например) существенный вклад в картину рассеяния может вносить содержащийся в кристаллах белка растворитель, не являющийся кристаллографически упорядоченным. В кристаллах белка существенная часть объема элементарной ячейки (от 20% до 80%) занята растворителем, как правило, водой. Часть молекул воды ассоциирована посредством водородных связей с поверхностными остатками белковой глобулы и имеет фиксированные позиции в элементарной ячейке, проявляя кристаллографическую упорядоченность. Такие молекулы воды включаются в атомную модель объекта, и рассеивание ими учитывается обычным образом. Однако существенная часть молекул растворителя может не иметь фиксированных позиций, их положение может различаться в разных копиях элементарных ячеек. Такие молекулы образуют неупорядоченный растворитель (bulk solvent). Существуют различные подходы к моделированию рассеяния неупорядоченным растворителем [26–29], однако общая основа подхода обычно такова:

- На основе имеющейся атомной модели кристаллографически упорядоченной части структуры в элементарной ячейке определяется (более или менее гладкая) область Ω_{sol} , интерпретируемая как область, занятая растворителем.
- Распределение электронной плотности для неупорядоченного растворителя моделируется в виде характеристической функции области растворителя, сглаженной путем свертки с гауссовой функцией:

$$\rho_{sol}(\mathbf{r}) = k_{sol} \chi(\mathbf{r}; \Omega_{sol}) * g(\mathbf{r}, B_{sol}) \quad (36)$$

Здесь $\chi(\mathbf{r}; \Omega_{sol}) = 1$ в области Ω_{sol} и $\chi(\mathbf{r}; \Omega_{sol}) = 0$ вне ее, $g(\mathbf{r}, B_{sol})$ - гауссова функция типа (24), параметры k_{sol}, B_{sol} определяются в процессе подгонки теоретически рассчитанных структурных факторов к результатам рентгеновского эксперимента.

- Структурные факторы $\mathbf{F}_{sol}(\mathbf{s})$ неупорядоченного растворителя определяются посредством преобразования Фурье функции $\rho_{sol}(\mathbf{r})$.
- "Общий" структурный фактор элементарной ячейки кристалла вычисляется как сумма

$$\mathbf{F}(\mathbf{s}) = \mathbf{F}_{atoms}(\mathbf{s}) + \mathbf{F}_{sol}(\mathbf{s}), \quad (37)$$

где вклад в рассеяние атомной модели $\mathbf{F}_{atoms}(\mathbf{s})$ определяется согласно (22).

При использовании в дифракционном эксперименте мощных рентгеновских импульсов электронная плотность "неупорядоченного растворителя" и амплитуда его рассеяния могут возрасти за счет свободных электронов, покинувших атомы вследствие фотоионизации и процесса Оже, но не покинувших пределов кристалла.

1.7. Определение параметров модели из эксперимента. Критерии соответствия модели и эксперимента

Неизвестные параметры модели (координаты атомов, параметры атомных смещений, заселенности, масштабирующие коэффициенты и т. п.), в конечном итоге, определяются подгонкой рассчитанных по модели модулей структурных факторов к величинам, полученным из эксперимента

$$Q_{X-ray}(\{\mathbf{r}_j, \mathbf{B}_j, C_j\}, \kappa, \dots) = \sum_{\mathbf{s} \in S} \left(F^{obs}(\mathbf{s}) - \kappa F^{calc}(\mathbf{s}; \{\mathbf{r}_j, \mathbf{B}_j, C_j\}) \right)^2 \Rightarrow \min. \quad (38)$$

Здесь $F^{obs}(\mathbf{s})$ обозначает значения модулей структурных факторов, определенные из эксперимента, а $F^{calc}(\mathbf{s})$ - величины, рассчитанные по модели с использованием текущих значений определяемых параметров. Минимизация функционала (38) называется "уточнением структуры". Получение начальных значений параметров - предварительной модели структуры - находится за рамками данной статьи (см., например, [30]). Вместо (38) могут применяться более изощренные критерии соответствия расчетных и экспериментальных значений, например, статистическое правдоподобие [31–36].

Следует отметить, что хотя формально дифракционный эксперимент позволяет определять модули структурных факторов, характеризующиеся разрешением $d \geq \lambda/2$ (λ - длина волны используемого излучения; величина d определена формулой (9)), на практике удается собрать только часть этих данных. Количество регистрируемых данных определяется, в первую очередь, степенью упорядоченности кристалла, поскольку всевозможные проявления неупорядоченности приводят к экспоненциальному ослаблению рассеянных под большими углами волн посредством фактора Дебая (25). Набор S векторов рассеяния \mathbf{s} , для которых в эксперименте удалось измерить величины модулей структурных факторов, принято характеризовать "разрешением набора" d_{min} , подразумевая под этим, что удалось измерить все (или почти все) модули структурных факторов с $d \geq d_{min}$. На сегодняшний день при работе с кристаллами биологических макромолекул разрешение собираемых наборов данных часто составляет около 2 Å. При этом длина волны используемого излучения составляет обычно около 1 Å, т. е. теоретический предел разрешения равен 0.5 Å. Количество данных в наборе S определяет возможности уточнения структуры - допустимое количество параметров, используемых для описания структуры, и точность их определения. Поэтому одной из основных характеристик структуры, определенной методом рентгеноструктурного анализа, является разрешение, при котором была уточнена эта структура, т. е. разрешение набора S экспериментальных данных, использованного при минимизации (38).

Независимо от выбора минимизируемого критерия, в публикациях достигнутое соответствие модели эксперименту принято оценивать величиной "R-фактора":

$$R = R(d_{min}, \{F^{obs}, F^{calc}\}) = \frac{\sum_{\mathbf{s} \in S} |F^{obs}(\mathbf{s}) - \kappa F^{calc}(\mathbf{s})|}{\sum_{\mathbf{s} \in S} F^{obs}(\mathbf{s})}. \quad (39)$$

Здесь κ - масштабирующий коэффициент, подобранный так, чтобы минимизировать расхождение; суммы вычисляются по всем структурным факторам разрешения $d \geq d_{min}$.

Величина R-фактора, вычисленного по всем использованным при уточнении рефлексам, играет роль интегрального показателя качества модели и приводится в публикациях, посвященных определению структуры того или иного объекта методами рентгеновской кристаллографии. Величина R-фактора коррелирует с разрешением экспериментального набора: чем меньше величина d_{min} (т. е. чем больше данных в наборе, чем выше качество кристалла), тем лучшего соответствия модели эксперименту (меньшего R-фактора) удастся достичь. На рис. 2 показаны средние значения величин R-факторов для структур, депонированных в банк белковых данных [14], в зависимости от разрешения экспериментального набора данных, использованного для работы. Эти значения отражают современный уровень точности соответствия эксперименту, достигаемый в практических исследованиях. Эти значения будут далее использоваться как реперные: мы будем полагать, что та или иная аппроксимация структурных факторов приемлема для данного разрешения, если расхождение между структурными

факторами, рассчитанными по точной и приближенной формулам, оценивается величиной R -фактора, не превышающей среднее по PDB значение для структур, уточненных при аналогичном разрешении. Расчет критерия соответствия $R(d) = R(d_{\min}; \{F^1, F^2\})$ для двух наборов модулей структурных факторов как функции параметра d_{\min} позволяет оценить, до какого предельного разрешения наборы F^1 и F^2 могут считаться близкими. На рис. 2 показана зависимость $R(d_{\min}; \{F^{obs}, F^{calc}\})$ для структуры триклинной формы лизоцима белка куриного яйца ([37], PDB код 2VB1). Эта структура была уточнена при разрешении 0.65 Å и принадлежит к числу структур, определенных с наилучшим качеством. Мы будем использовать ее далее в статье для тестовых сравнений. Из графика видно, что эта структура отвечает как стандартам качества, принятым для структур, уточненных при разрешении 0.65 Å, так и стандартам для структур, уточненных при более низком разрешении.

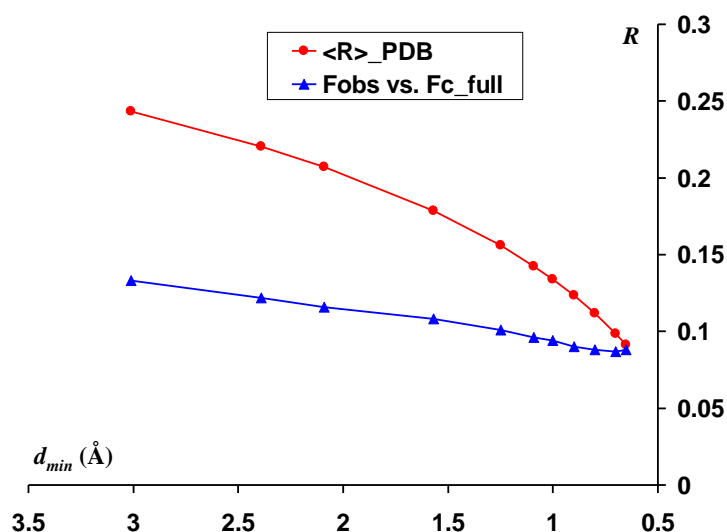


Рис. 2. Сравнение модулей структурных факторов, рассчитанных по модели 2VB1 лизоцима (F_{c_full}), с экспериментально определенными величинами (F_{obs}). Показаны (синяя кривая, треугольные маркеры) значения интегрального R -фактора, рассчитанного по наборам рефлексов $s < 1/d_{\min}$, ограниченных разным разрешением d_{\min} . Для сравнения приведены (красная кривая, круглые маркеры) средние значения R -фактора для депонированных в PDB структур, уточненных при соответствующих разрешениях d_{\min} .

Более детальную картину соответствия двух наборов данных дает вычисление значений R -фактора (39) по тонким оболочкам в обратном пространстве, содержащим векторы рассеяния \mathbf{s} примерно одинакового разрешения $d = 1/|\mathbf{s}|$. Мы будем обозначать такого рода зависимости $R^{shell}(d)$. На рис. 3 показана такая зависимость для структуры лизоцима 2VB1.

Естественно, можно рассматривать и другие критерии сравнения двух наборов структурных факторов. Например, сравнивать интенсивности рефлексов при помощи формулы, аналогичной (39). Однако, поскольку для всех расшифрованных структур в качестве обязательной контрольной величины рассчитываются именно R -факторы (39), мы тоже будем пользоваться ею.

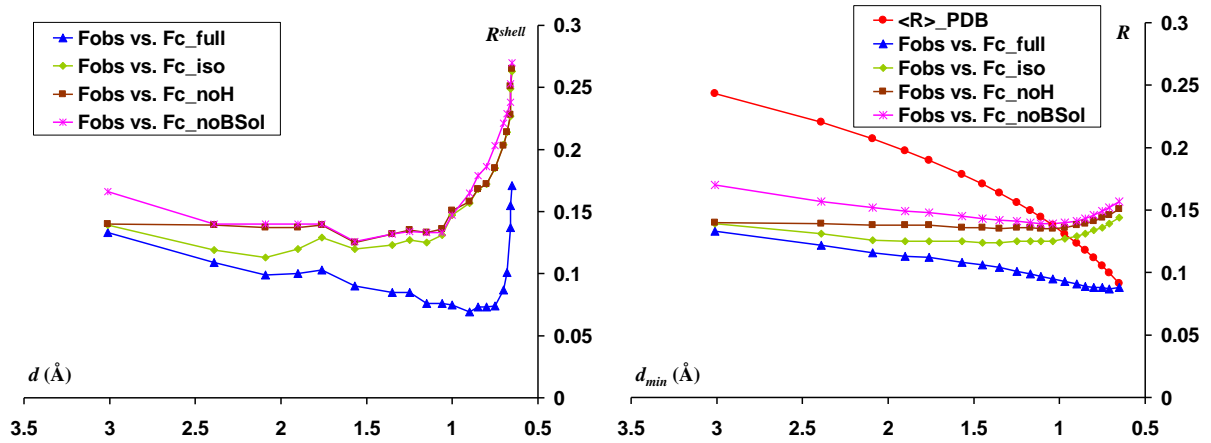


Рис. 3. Сравнение с экспериментальными значениями (F_{obs}) величин модулей структурных факторов, вычисленными по моделям лизоцима 2VB1, с последовательным уменьшением степени детализации. F_{c_full} - исходная модель, депонированная в PDB, поправка на неупорядоченный растворитель включена. F_{c_iso} - параметры атомных смещений (ADP) заменены их изотропными аналогами. F_{c_noH} - из модели исключены атомы водорода. F_{c_noBSol} - исключена поправка на неупорядоченный растворитель. Показаны значения R -факторов, рассчитанных по тонким оболочкам $s \sim 1/d$ (слева), и интегральные значения, рассчитанные по наборам рефлексов $s < 1/d_{min}$, ограниченных разрешением d_{min} (справа). Для сравнения приведены (справа, красная кривая, круглые маркеры) средние значения R -фактора для депонированных в PDB структур, уточненных при соответствующих разрешениях d_{min} .

1.8. Влияние детальности модели на точность воспроизведения экспериментальных данных

В зависимости от количества экспериментальных данных, использованных при уточнении структуры, атомная модель может иметь разную детализацию. Так, она может:

- включать или не включать информацию об альтернативных положениях отдельных атомов;
- использовать анизотропные или изотропные параметры смещений атомов (ADP);
- включать или не включать атомы водорода
- и т. д.

Выбор той или иной детализации связан, как правило, с соотношением количества имеющихся экспериментальных данных и числа свободных параметров модели, подлежащих определению. Упрощение модели понижает, как правило, точность соответствия модели эксперименту. Это ухудшение может приводить к тому, что по принятым критериям качества (средние значения R -факторов для депонированных моделей) модель должна быть отнесена к классу моделей, уточненных при более низком разрешении, нежели формальное разрешение имеющегося набора данных.

На рис. 3 проиллюстрировано влияние степени детализации модели на точность воспроизведения моделью экспериментальных данных. В качестве базового набора для сравнения использовались депонированные модули экспериментальных структурных факторов $F^{obs}(\mathbf{s})$ для лизоцима 2VB1, взятые из PDB. Далее был проведен расчет модулей структурных факторов по полной депонированной модели ($F^{full}(\mathbf{s})$) и серии последовательно упрощенных моделей:

- анизотропные параметры смещений атомов были заменены на изотропные ($F^{iso}(\mathbf{s})$);

- из модели были удалены атомы водорода ($F^{noH}(\mathbf{s})$);
- из расчета была удалена поправка на неупорядоченный растворитель ($F^{noBSol}(\mathbf{s})$).

Для данной серии расчетов была использована программа phenix.refine [38].

Анализ приведенных графиков показывает, что все упомянутые аппроксимации являются более или менее приемлемыми при работе с разрешением ниже, чем примерно 1.2 Å, но становятся излишне грубыми при переходе через этот предел. Предел разрешения 1.2 Å (предел Шелдрика) играет особую роль в биологической кристаллографии [39–41], поскольку он часто определяет порог применимости автоматических методов определения и анализа структуры (методы начинают работать только при наличии набора данных более высокого разрешения, нежели этот предел). Следует отметить также, что хотя введение в модель атомов водорода и анизотропных параметров атомных смещений становится возможным (исходя из отношения числа экспериментальных измерений к числу параметров модели) только при разрешении выше 1.2 Å, отказ от их использования ощущается во всем диапазоне разрешений. Отдельно стоит упомянуть зону низкого разрешения $d > 3$ Å. В этой зоне уже не ощущается влияние атомов водорода и анизотропии атомных смещений, но зато в максимальной степени ощущается влияние неупорядоченного растворителя.

2. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УНИТАРНЫХ ФОРМФАКТОРОВ ПРИ РАСЧЕТЕ СТРУКТУРНЫХ ФАКТОРОВ

На рис. 4 представлены графики формфакторов для наиболее часто встречающихся в биологических макромолекулах атомов. Сходность их формы позволила предположить еще на заре рентгеновской кристаллографии (см., например, [12]), что с разумной для ряда задач точностью эти формфакторы могут быть аппроксимированы как

$$f_j(s) = Z_j f_{unit}(s), \quad (40)$$

где Z_j - число рассеивающих электронов в j -ом атоме, а $f_{unit}(s)$ - унитарный формфактор - некоторая универсальная функция, задающая общую форму кривой, в пересчете на один рассеивающий электрон. Унитарный формфактор (the unitary atomic structure factor) может быть определен таким образом, чтобы обеспечивать наилучшее общее соответствие по группе аппроксимируемых типов атомов. Однако в нашей работе мы рассмотрим еще более грубую модель, когда формфакторы всех атомов получаются простым нормированием формфактора атома углерода

$$f_j(s) = \frac{Z_j}{6} f_C(s), \quad (41)$$

где Z_j - по-прежнему число рассеивающих электронов в j -ом атоме, $f_C(s)$ - формфактор атома углерода.

Сравнение формфакторов, нормализованных на число электронов в атоме, приведенных на рис. 4, показывает, что унитарная аппроксимация, возможно, приемлема для основных атомов белка - C, N, O, но становится неадекватной для атомов водорода и серы. Однако в силу того, что число атомов серы в молекуле белка невелико, а атомы водорода имеют низкую рассеивающую способность, унитарная аппроксимация является приемлемой и для молекулы белка в целом при работе в зоне среднего разрешения.

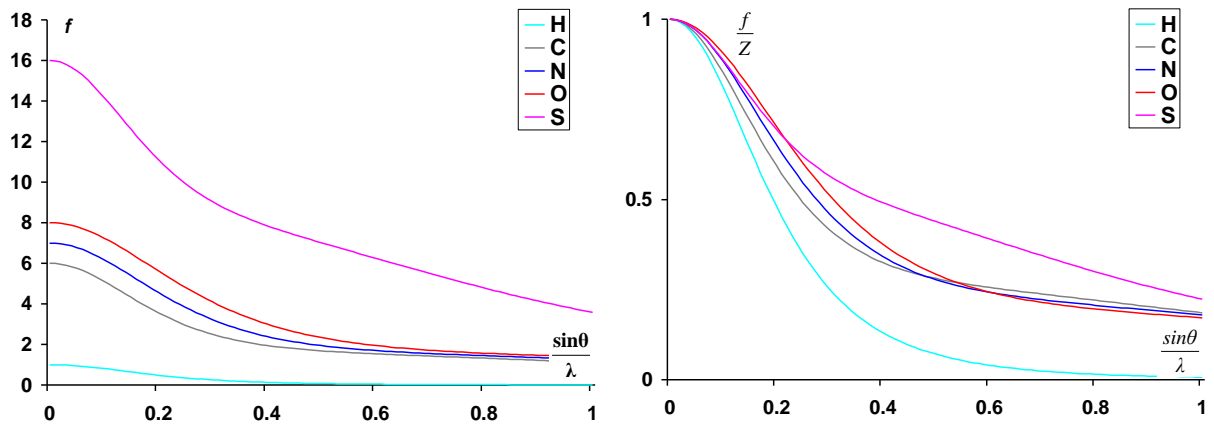


Рис. 4. Формфакторы основных атомов, входящих в состав белковых молекул (слева), и те же формфакторы, нормализованные на число электронов в нейтральном атоме $Z = f(0)$.

На рис. 5 приведены результаты сравнения модулей структурных факторов, рассчитанных с использованием модели, использующей стандартные (табличные) значения формфакторов, и модели, использующей упрощенные значения (41). Из графиков видно, что существенное влияние деталей формфактора начинает сказываться при разрешении рефлексов выше 1 \AA . До этого предела различия в структурных факторах, рассчитанных с разными аппроксимациями формфакторов, не выходят за пределы точности воспроизведения экспериментальных данных, достигаемой в лучших исследованиях. Предел 1 \AA представляется вполне закономерным, поскольку именно при таком разрешении на картах распределения электронной плотности становится виден отдельный электрон и тонкие детали распределения плотности в атоме становятся существенными. При более низком разрешении важным является общее количество электронов в атоме. Тонкие же детали распределения электронов внутри атома не "чувствуются" рефлексами низкого разрешения.

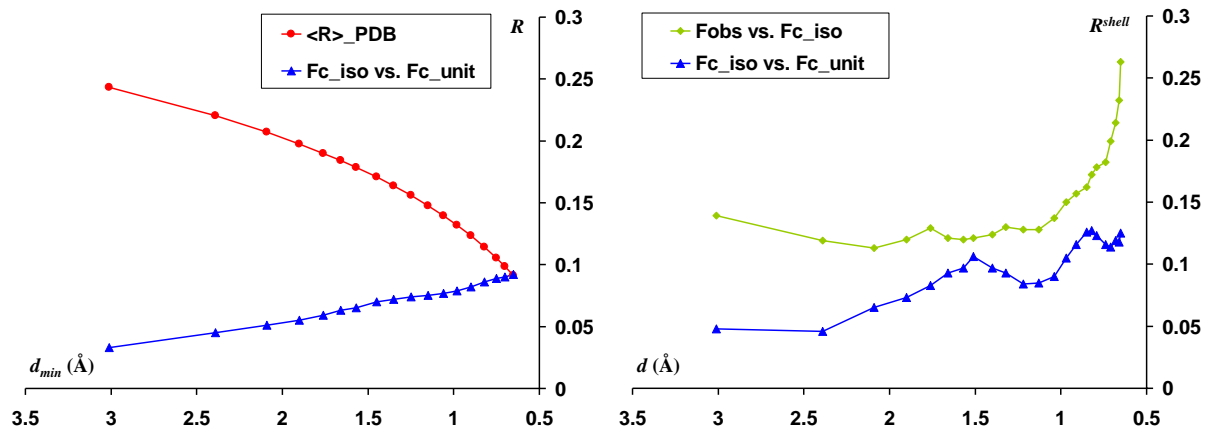


Рис. 5. Сравнение величин модулей структурных факторов, рассчитанных с использованием стандартных формфакторов (Fc_{iso}), и унитарных аппроксимаций формфакторов (Fc_{unit}). Использованы изотропные аналоги параметров атомных смещений (ADP). Слева: показаны интегральные значения R -факторов, рассчитанные по наборам рефлексов $s < 1/d_{min}$. Для сравнения приведены (красная кривая, круглые маркеры) средние значения R -фактора для депонированных в PDB структур, уточненных при соответствующих разрешениях d_{min} . Справа: значения R -факторов, рассчитанных по тонким оболочкам $s \sim 1/d$. Для сопоставления показаны аналогичные величины, полученные при сравнении величин Fc_{iso} с экспериментально определенными модулями структурных факторов $Fobs$.

3. НЕСТАЦИОНАРНЫЕ ФОРМФАКТОРЫ

3.1. Нестационарность формфакторов как следствие фотоэффекта

Как было отмечено во введении, при использовании в рентгеновском эксперименте сверхмощных фемтосекундных импульсов распределение электронной плотности в атоме может существенно изменяться во время облучения. Мы рассмотрим далее вопрос, как это изменение может быть промоделировано, и в какой мере оно в состоянии влиять на значения регистрируемых интенсивностей рассеянных лучей. В данном исследовании мы будем предполагать, что изменение положения атомов в процессе эксперимента может быть адекватно промоделировано введением в модель факторов Дебая (26). Степень обоснованности этого предположения является предметом отдельного исследования.

Электромагнитная волна, описываемая амплитудой E_0 и длиной волны λ , может рассматриваться как поток фотонов с плотностью потока j (фотонов/(\(\text{\AA}^2 \text{сек}\)) и энергией фотона E_{photon} . Параметры волны связаны с параметрами потока фотонов соотношениями

$$E_{\text{photon}} = \frac{hc}{\lambda}, \quad j = \frac{\lambda}{8\pi h} E_0^2 \quad (42)$$

(h - постоянная Планка). В данной работе изучается изменение формфакторов во времени, вызванное фотоэффектом и сопутствующими процессами. Первичный фотоэффект, т. е. наиболее вероятное выбивание рентгеновским квантом электрона из внутренней атомной оболочки, сразу приводит к изменению электронной плотности атома за счет потери электрона. Далее может происходить серия событий, влияющих на распределение электронной плотности в атоме: переход атомов с внешних орбит на внутренние, испускание атомом еще одного электрона (электрона Оже), захват атомом свободного электрона и т. п. Характерные времена оже-распада составляют несколько фемтосекунд, что сопоставимо или даже меньше длительности рентгеновского импульса. Поэтому за время импульса может происходить каскад «фотоионизация – процесс Оже – фотоионизация – процесс Оже ...», который уже реально наблюдался в экспериментах с лазером на свободных электронах LCLS [42]. Таким образом, распределение электронной плотности атома изменяется во времени, что сопровождается соответствующим изменением во времени формфактора атома $f(s;t)$.

Следует отметить, что испускание атомом электронов является вероятностным процессом: невозможно предсказать заранее, из какого атома и в какой момент времени будет выбит электрон. Поэтому для конкретного атома и конкретного вектора рассеяния s и момента времени t значение формфактора является случайной величиной. Мы будем обозначать его $f^v(s;t)$, где v означает номер реализации случайной величины. В нашем случае реализацией является один из серии однотипных экспериментов с идентичными объектами. В связи с этим вопрос может ставиться только о вычислении ожидаемых (средних) значений формфакторов

$$f(s;t) = \langle f^v(s;t) \rangle_v \quad (43)$$

или каких-то других их статистических характеристик. В этой работе мы ограничимся рассмотрением математических ожиданий (42).

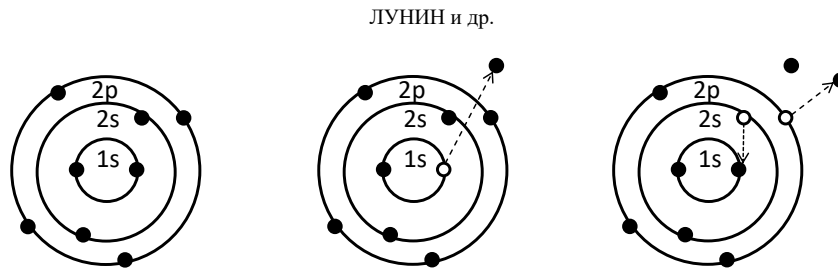


Рис. 6. Различные электронные конфигурации атома кислорода. *Слева:* нейтральный атом. В *середине:* электрон с внутренней оболочки потерян как следствие фотоэффекта. *Справа:* переход электрона на внутреннюю оболочку и эмиссия вторичного электрона (электрона Оже).

В процессе превращений, инициированных фотоионизацией, мишень может иметь различные электронные конфигурации, описываемые распределениями электронной плотности $\rho_l(\mathbf{r})$, где l - номер конфигурации. Эти конфигурации принадлежат нейтральному атому и его ионным состояниям (рис. 6). Так, для углерода число рассматриваемых конфигураций с участием электронов 1s, 2s и 2p оболочек составляет 27, включая нейтральный атом и голое ядро. Процесс смены конфигурации носит вероятностный характер и может быть описан вероятностями $P_1(t), P_2(t), \dots, P_l(t), \dots$ нахождения атома в той или иной конфигурации в момент времени t . Ожидаемое (среднее) значение электронной плотности такого атома в момент времени t дается суммой

$$\langle \rho^v(\mathbf{r}; t) \rangle_v = \rho(\mathbf{r}; t) = \sum_l P_l(t) \rho_l(\mathbf{r}), \quad (44)$$

а соответствующий нестационарный формфактор $f(\mathbf{s}; t)$ вычисляется как преобразование Фурье этой функции. В наших расчетах предполагалось, что распределения электронной плотности для отдельных конфигураций являются сферически симметричными, что соответствует усреднению по всевозможным ориентациям атома в пространстве. Сферическая симметрия распределений электронной плотности $\rho_l(\mathbf{r})$ влечет за собой сферическую симметрию соответствующего формфактора, поэтому получаемые нестационарные формфакторы $f(\mathbf{s}; t)$ зависят только от модуля вектора рассеяния (или, что то же, от угла рассеяния). Сферически симметричные распределения электронной плотности в различных конфигурациях $\rho_l(\mathbf{r})$ были рассчитаны методом Хартри-Фока-Слэтера [17, 43].

Вероятности $P_l(t)$ были найдены решением скоростных уравнений

$$\frac{d}{dt} P_l(t) = \sum_{l' \neq l} [\Gamma_{l' \rightarrow l} P_{l'}(t) - \Gamma_{l \rightarrow l'} P_l(t)], \quad (45)$$

где $\Gamma_{l \rightarrow l'}$ - скорость перехода из конфигурации l в конфигурацию l' . Учитывались переходы Оже и радиационные переходы с не зависящими от времени скоростями, а также зависящие от времени скорости фотоионизации [44], определяемые характеристиками падающего потока рентгеновского излучения. Расчеты проводились для разных характеристик рентгеновского импульса. Основными варьируемыми характеристиками являлись: интегральный поток фотонов (*Fluence*) (задаваемый числом фотонов на квадратный ангстрем за время импульса), временной профиль плотности потока $j(t)$ (число фотонов на квадратный ангстрем в секунду), связанный с интегральным потоком условием нормировки

$$Fluence = \int j(t) dt, \quad (46)$$

а также энергия фотонов (или эквивалентная длина волны). Профиль плотности потока в наших расчетах предполагался гауссовым

$$j(t) = j_0 \exp\left[-t^2/t_p^2\right], \quad (47)$$

где параметр t_p определяет длительность импульса и связан с его полной шириной на половине высоты ($FWHM$) соотношением $t_p = FWHM/2\sqrt{\ln 2}$. Амплитуда j_0 плотности потока определяется условием нормировки (46). Расчеты проводились при значении энергии фотонов 8 кэВ, что соответствует длине волны 1.55 Å.

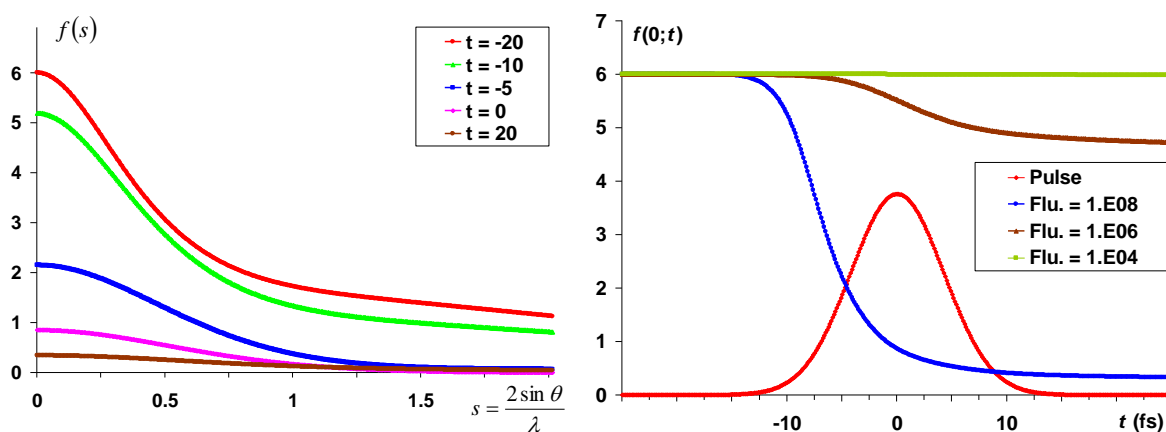


Рис. 7. Слева: нестационарный формфактор атома углерода в различные моменты времени импульса с длительностью $FWHM = 10$ фс. Соответствующее время в фемтосекундах, отсчитанное от центра импульса, указано на врезке. Расчет проведен при величине интегрального потока фотонов 10^8 [фотонов/Å²] за импульс. Справа: изменение во времени среднего числа электронов в атоме для разных величин интегрального потока фотонов ($Flu.$). Красная кривая показывает профиль импульса (в произвольных единицах).

На рис. 7 (слева) показан вид нестационарного формфактора атома углерода в разные моменты импульса. Расчет был проведен для импульса длительностью $FWHM = 10$ фс при величине интегрального потока фотонов, равной 10^8 фотонов на Å² за импульс. Эта величина на два порядка превышает достижимую на данный момент интенсивность пучка, но планируется, что она будет достигнута в ближайшем будущем. Как и следовало ожидать, общей тенденцией является уменьшение значений формфакторов со временем, вызванное потерей части рассеивающих электронов. На рис. 7 (справа) представлено изменение во времени числа электронов в атоме при различных значениях величины интегрального потока фотонов. Следует заметить, что потеря электронов атомом происходит неравномерно по времени. Из графика видно, что под влиянием мощного импульса сравнительно быстро происходит потеря первых 5 электронов из 6, но выбивание последнего электрона требует, в среднем, существенно большего времени.

3.2. Учет нестационарных формфакторов при расчете структурных факторов

В случае, когда распределение электронной плотности в изучаемом объекте не зависит от времени, регистрируемая в эксперименте интенсивность рассеянной волны (количество фотонов, зарегистрированных детектором) пропорциональна квадрату модуля соответствующего структурного фактора и времени эксперимента. В случае, когда интенсивность падающей волны меняется во времени, регистрируемая накопленная интенсивность приобретает вид

$$I^{cum}(\mathbf{s}) = F(\mathbf{s})^2 \int j(t) dt . \quad (48)$$

В этом случае по-прежнему накопленная интенсивность пропорциональна квадрату модуля структурного фактора.

В случае вероятностного характера эволюции формфакторов со временем структурный фактор тоже становится нестационарным и случайным:

$$\mathbf{F}^v(\mathbf{s}; t) = \sum_{j=1}^N f_j^v(s; t) T_j(\mathbf{s}) \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}_j] . \quad (49)$$

Формула для расчета интенсивности рассеянного излучения, накопленной за время импульса, приобретает в этом случае вид

$$I^{v,cum}(\mathbf{s}) = \int j(t) F^v(\mathbf{s}; t)^2 dt . \quad (50)$$

В ситуации, когда рентгеновский эксперимент повторяется многократно с разными копиями исследуемого объекта, имеющими одну и ту же ориентацию в пространстве, мы можем осуществить усреднение в последней формуле и определить накопленную за время импульса интенсивность как

$$I^{cum}(\mathbf{s}) = \left\langle \int j(t) F^v(\mathbf{s}; t)^2 dt \right\rangle_v = \int j(t) \left\langle F^v(\mathbf{s}; t)^2 \right\rangle_v dt , \quad (51)$$

где усреднение в левой части было проведено по результатам множественных экспериментов [45].

Для сравнения результатов, получаемых при учете нестационарности объекта, с результатами стандартных рентгеновских экспериментов посредством вычисления R -факторов, мы определим интегральные значения модулей структурных факторов как

$$F^{cum}(\mathbf{s}) = \sqrt{I^{cum}(\mathbf{s})} = \sqrt{\int j(t) \left\langle F^v(\mathbf{s}; t)^2 \right\rangle_v dt} . \quad (52)$$

Предполагая, что в каждый момент времени переходы в разных атомах некоррелированы, можно видеть, что

$$\left\langle F^v(\mathbf{s}; t)^2 \right\rangle_v = \sum_{j,k=1}^N T_j(\mathbf{s}) T_k(\mathbf{s}) f_j(s; t) f_k(s; t) \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot (\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_k)] , \quad (53)$$

где $f_j(s; t)$ нестационарные формфакторы, определенные усреднением (42).

3.3. Модель нестационарных унитарных формфакторов. Эффективные формфакторы

Расчет аккумулированных значений (52) требует численного интегрирования и может быть достаточно трудоемким при большом размере структуры. В то же время такой расчет повторяется многократно при решении обратной задачи - определении структуры по данным рентгеновского эксперимента. Поэтому для практических целей существенно получение аппроксимаций формулы (52), позволяющей значительно снизить время расчета. Ниже мы предлагаем аппроксимацию, основанную на развитии идеи унитарных формфакторов, позволяющую осуществлять расчет аккумулированных формфакторов за то же время, что и расчет структурных факторов стационарной структуры. При использовании этого подхода расчет структурных факторов осуществляется по тем же формулам (22), но с использованием специальным образом определенных эффективных формфакторов $f_j^{eff}(\mathbf{s})$ вместо стандартных.

Следуя идее унитарных формфакторов, можно предположить, что, с некоторой точностью, нестационарные формфакторы всех атомов пропорциональны некоторому

унитарному нестационарному формфактору $f_{ns_unit}(s;t)$ с коэффициентом пропорциональности, равным числу электронов Z в неповрежденном атоме:

$$f_j(s;t) = Z_j f_{ns_unit}(s;t). \quad (54)$$

Тогда, с учетом (53), формула (51) приобретает вид

$$\begin{aligned} I^{cum}(\mathbf{s}) &= \sum_{j,k=1}^N Z_j Z_k f_{unit}^{eff}(s)^2 T_j(\mathbf{s}) T_k(\mathbf{s}) \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot (\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_k)] \\ &= \left| \sum_j Z_j f_{unit}^{eff}(s) T_j(\mathbf{s}) \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}_j] \right|^2, \end{aligned} \quad (55)$$

где эффективный унитарный формфактор $f_{unit}^{eff}(s)$ определен формулой

$$f_{unit}^{eff}(s) = \sqrt{\int j(t) f_{ns_unit}(s;t)^2 dt}. \quad (56)$$

Таким образом, в случае использования модели нестационарных унитарных формфакторов, накопленная интенсивность по-прежнему пропорциональна квадрату модуля структурного фактора, рассчитанного согласно (22) с использованием модифицированных формфакторов $Z_j f_{unit}^{eff}(s)$.

Аналогично разделу 2, мы будем использовать далее в тестах эффективный унитарный структурный фактор, определенный на базе нестационарного формфактора углерода:

$$f_{unit}^{eff}(s) = \frac{1}{6} \sqrt{\int j(t) f_c(s;t)^2 dt}. \quad (57)$$

Следует подчеркнуть, что в отличие от стационарного случая, эффективный унитарный формфактор зависит от параметров рентгеновского импульса и определяется через решение уравнений (45).

3.4. Унитарная временная зависимость

Дальнейшее упрощение расчетных формул может быть получено в предположении разделенности временной и пространственной компонент в нестационарных формфакторах с универсальной (при фиксированных параметрах импульса) временной зависимостью

$$f_j(s;t) = \gamma_{unit}(t) f_j(s;0). \quad (58)$$

Здесь $f_j(s;0) = f_j(s)$ - стационарный формфактор атома, а $\gamma_{unit}(t)$ - одинаковая для всех типов атомов временная зависимость, определяемая параметрами рентгеновского импульса. Рис. 8 демонстрирует обоснованность такой гипотезы на примере нестационарного формфактора атома углерода.

В предположении (57) формула (51) приобретает вид

$$I^{cum}(\mathbf{s}) = C_\gamma \left| \sum_j f_j(s) T_j(\mathbf{s}) \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}_j] \right|^2 = C_\gamma |\mathbf{F}(\mathbf{s})|^2, \quad (59)$$

$$C_\gamma = \int j(t) \gamma(t)^2 dt, \quad (60)$$

т. е. отличается от случая стационарных структурных факторов лишь множителем C_γ . Множитель C_γ зависит от условий эксперимента (параметров импульса) и уменьшается

с ростом потока фотонов. Однако для конкретного эксперимента уменьшение величин накопленных интенсивностей происходит синхронно для всех рефлексов, что позволяет использовать для расчета модулей структурных факторов стандартные стационарные формулы (22) с дальнейшим подбором оптимального масштабирующего коэффициента. Заметим, что при таком подходе нам не требуется знание параметров пучка или константы C_γ . Достаточно предположения о существовании зависимости (58).

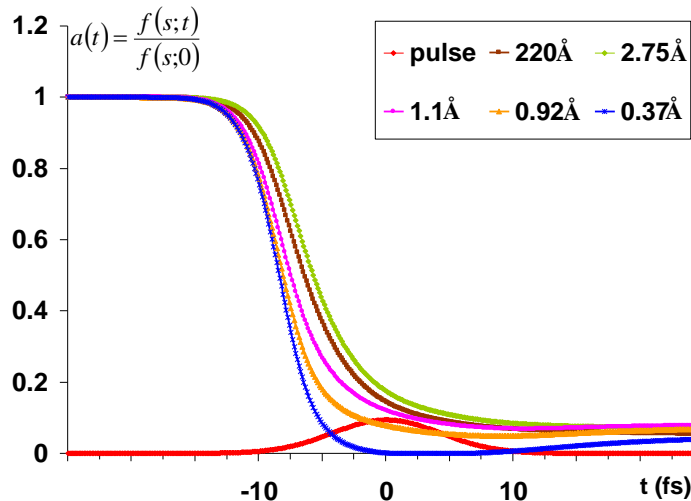


Рис. 8. Относительное изменение во времени значения нестационарного формфактора атома углерода для рефлексов разного разрешения. Расчет проведен при величине интегрального потока фотонов 10^8 [фотонов/Å²] за импульс.

Пригодность аппроксимации (58) может быть протестирована посредством сравнения обычных структурных факторов с их более точными значениями, рассчитанными с использованием нестационарных формфакторов. Поскольку вычисление R -факторов подразумевает подбор оптимального масштабирующего коэффициента, то в зоне пригодности аппроксимации (58) величины R -факторов для двух способов расчета должны быть малы. Наоборот, значительное отличие R -факторов от нуля означает непригодность этой аппроксимации.

На рис. 9 (слева) представлены результаты сравнения структурных факторов, рассчитанных с использованием нестационарных унитарных формфакторов, со структурными факторами, рассчитанными обычным образом. В качестве унитарного нестационарного формфактора использовался нестационарный формфактор для атома углерода (рассчитанный, как описано в разделе 3.1), нормированный на число электронов ($Z_C = 6$). На рис. 9 (справа) показаны результаты сравнения структурных факторов, рассчитанных с использованием нестационарных и стационарных унитарных формфакторов. Унитарные стационарные формфакторы рассчитывались согласно (41). Приведены значения R -факторов для двух различных плотностей потока фотонов. Эти графики показывают, что для более слабого потока фотонов (являющегося, тем не менее, максимально возможным на сегодняшний день) уменьшение величин модулей структурных факторов происходит пропорционально для всех рефлексов. При оптимальном выборе масштабирующего коэффициента к расхождению величин $F^{calc}(s)$ и $kF(s)$ находятся в пределах точности соответствия эксперименту, достигаемой на сегодняшний день в рентгеноструктурных исследованиях. Таким образом, для относительно слабых импульсов модель унитарной временной

зависимости формфакторов может использоваться для расчета картины рассеяния практически во всем диапазоне углов рассеяния, встречающихся в задачах биологической кристаллографии. Ситуация изменяется при использовании очень мощных рентгеновских импульсов. В этом случае пропорциональность ослабления интенсивности рассеянных лучей сохраняется в приемлемой степени только для ограниченной зоны разрешения. Для рассмотренного примера эта зона разрешения ограничена разрешением около 1.2 Å, а далее расхождение с линейной моделью ослабления структурных факторов резко нарастает. Это означает, что использование в расчетах модели унитарной временной зависимости формфакторов оправдано только в ограниченной зоне разрешения. За пределами этой зоны для расчета должны использоваться эффективные формфакторы либо еще более сложные методы расчета дифракционной картины, вплоть до прямого интегрирования (51).

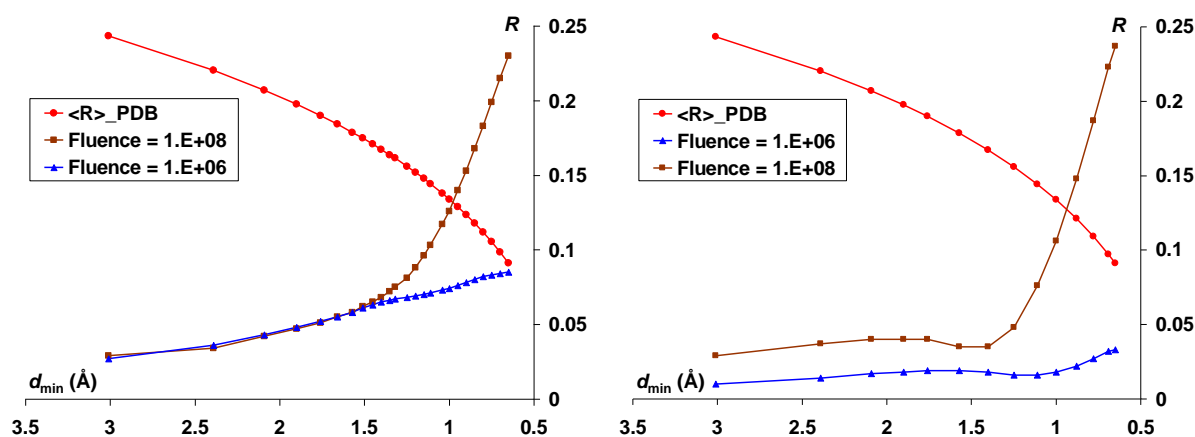


Рис. 9. Сравнение модулей структурных факторов, рассчитанных с использованием нестационарных унитарных формфакторов, с величинами, рассчитанными по формулам (22) для стационарного случая (слева), и с величинами, рассчитанными по формулам (22) с использованием стационарных унитарных формфакторов (41) (справа). Для разных величин интегрального потока фотонов показаны интегральные значения R -факторов, рассчитанные по наборам рефлексов $s < 1/d_{min}$. Для сравнения приведены (красная кривая, круглые маркеры) средние значения R -фактора для депонированных в PDB структур, уточненных при соответствующих разрешениях d_{min} .

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование в рентгеновском дифракционном эксперименте мощных импульсных источников излучения открывает новые перспективы для определения структур методом РСА. Однако тот факт, что объект может изменяться в процессе эксперимента, значительно осложняет решение прямой задачи рентгеновского рассеяния - расчета дифракционной картины по известной модели исследуемого объекта - и может приводить к неприемлемым на практике временам расчета. В то же время в ряде случаев замена сложных расчетных моделей более простыми эмпирическими формулами может приводить к погрешностям в рассчитываемых характеристиках, не выходящих за рамки отклонений, обычно наблюдаемых в биологической кристаллографии при сравнении рассчитанной по атомной модели картины рассеяния с результатами рентгеновского эксперимента.

В данной работе предложены две модели, упрощающие расчет структурных факторов и при этом позволяющие учесть эволюцию во времени факторов атомного рассеяния. Во-первых, показано, что при умеренных значениях потока фотонов и среднем уровне разрешения набора регистрируемых рефлексов уменьшение величин структурных факторов происходит приблизительно синхронно для всех брэгговских

рефлексов. Это позволяет использовать для расчета структурных факторов обычные формулы биологической кристаллографии с надлежащей корректировкой масштабирующего коэффициента. В более сложной ситуации (сверхмощные рентгеновские импульсы, высокое разрешение) такой способ расчета перестает обеспечивать желаемую точность. Нами предложен подход к повышению этой точности без изменения вычислительных затрат, за счет использования при расчете по стандартным формулам модифицированных (эффективных) формфакторов вместо стандартных. Эффективные формфакторы зависят от характеристик используемого рентгеновского импульса и должны быть рассчитаны заранее. Однако вычислительные затраты на их расчет при известных сечениях фотоионизации, вероятностях оже- и излучательных переходов в атомах и ионах мишени пренебрежимо малы по сравнению с расчетом набора структурных факторов.

Авторы выражают свою признательность Министерству образования и науки Российской Федерации, предоставившему финансовую помощь для проведения данного исследования (Госконтракт № 07.514.11.4126).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barletta W.A., Bisognano J., Corlett J.N., Emma P., Huang Z., Kim K.Z., Lindberg R., Murphy J.B., Neil G.R., Nguyen D.C. *et al.* Free electron lasers: Present status and future challenges. *Nucl. Instrum. Methods. Sec. A.* 2010. V. 618. P. 69–96.
2. 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. *et al.* Femtosecond X-ray protein nanocrystallography. *Nature.* 2011. V. 470. P. 73–78.
3. Boutet S., Lomb L., Williams G.J., Barends T.R.M., Aquila A., Doak R.B., Weierstall U., DePonte D.P., Steinbrener J., Shoeman R.L. *et al.* High resolution protein structure determination by serial femtosecond crystallography. *Science.* 2012. V. 337. P. 362–364.
4. Крупянский Ю.Ф., Балабаев Н.К., Грум-Гржимайло А.Н., Лунин В.Ю., Петрова Т.Е., Сеницын Д.О., Грызлова Е.В., Терешкина К.Б., Абдулнасыров Э.Г., Степанов А.С. Фемтосекундные рентгеновские лазеры на свободных электронах: новый метод изучения нанокристаллов и одиночных макромолекул. *Химическая физика.* 2013. Т. 32. № 4 (в печати).
5. Kern J., Alonso-Mori R., Hellmich J., Tran R., Hattne J., Laksmono H., Glöckner C., Echols N., Sierra R.G., Sellberg J. *et al.* Room temperature femtosecond X-ray diffraction of photosystem II microcrystals. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 9721–9726.
6. 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. *et al.* Lipidic phase membrane protein serial femtosecond crystallography. *Nature Methods.* 2012. V. 9. P. 263–265.
7. Redecke L., Nass K., DePonte D.P., White T.A., Rehders D., Barty A., Stellato F., Liang M., Barends T.R.M., Boutet S. *et al.* Natively Inhibited *Trypanosoma brucei* Cathepsin B Structure Determined by Using an X-ray Laser. *Science.* 2013. V. 339. P. 227–230.
8. Shapiro D., Thibault P., Beetz T., Elser V., Howells M., Jacobsen C., Kirz J., Lima E., Miao H., Neiman A.M., Sayre D. Biological imaging by soft x-ray diffraction microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 15343–15346.
9. Seibert M.M., Ekeberg T., Maia F.R.N.C., Svenda M., Andreasson J., Jönsson O., Odic D., Iwan B., Rocker A., Westphal D. *et al.* Single mimivirus particles intercepted and imaged with an x-ray laser. *Nature.* 2011. V. 470. P. 79–81.
10. Martin A.V., Andreasson J., Aquila A., Bajt S., Barends T.R.M., Barthelmeß M., Barty A., Benner W.H., Bostedt C., Bozek J.D. *et al.* Single particle imaging with soft

- X-rays at the Linac Coherent Light source. *Proc. SPIE*. 2011. V. 8078. P. 807809(1)-807809(9).
11. Neutze R., Wouts R., van der Spoel D., Weckert E., Hajdu J. Potential for biomolecular imaging with femtosecond X-ray pulses. *Nature*. 2000. V. 406. P. 752–757.
 12. Harker D., Kasper J.S. Phases of Fourier coefficients directly from crystal diffraction data. *Acta Crystallographica*. 1948. V. 1. P. 70–75.
 13. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 235–242.
 14. Urzhumtsev A.G., Afonine P.V., Adams P.D. On the use of logarithmic scales for analysis of diffraction data. *Acta Crystallographica. Sec. D*. 2009. V. 65. P. 1283–1291.
 15. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. *Механика*. М.: Наука, 1973. 208 с. (Теоретическая физика, Т. I).
 16. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. *Теория поля*. М.: Наука, 1973. 504 с. (Теоретическая физика, Т. II).
 17. Slater J.C. A Simplification of the Hartree-Fock Method. *Phys. Rev.* 1951. V. 81. P. 385–390.
 18. Brown P.J., Fox A.G., Maslen E.N., O'Keefe M.A., Willis B.T.M. Intensity of diffracted intensities. In: *International Tables for Crystallography Volume C*. Ed. Prince E. 2006. P. 554–595. URL: <http://it.iucr.org/C/> (дата обращения: 07.03.2013).
 19. Coppens P. *X-ray Charge Densities Chemical Bonding*. New York: Oxford University Press, 1997.
 20. Coppens P., Su Z., Becker P.G. Analysis of charge and spin densities. In: *International Tables for Crystallography Volume C*. Ed. Prince E. 2006. P. 713–734. URL: <http://it.iucr.org/C/> (дата обращения: 07.03.2013).
 21. Housset D., Benabicha F., Pichon-Pesme V., Jelsch C., Maierhofer A., David S., Fontecilla-Camps J.C., Lecomte C. Towards the charge-density study of proteins: a room-temperature scorpion-toxin structure at 0.96 Å resolution as a first test case. *Acta Crystallographica. Sec. D*. 2000. V. 56. P. 151–160.
 22. Grosse-Kunstleve R.W., Sauter N.K., Adams P.D. Cctbx news. *Newsletter of the IUCr Commission on Crystallographic Computing*. 2004. V. 3. P. 22–31. URL: <http://www.iucr.org/iucr-top/comm/ccom/newsletters/> (дата обращения: 18.02.2013).
 23. Trueblood K.N., Bürgi H.-B., Burzlaff H., Dunitz J.D., Gramaccioni C.M., Schulz H.H., Schmueli U., Abrahams S.C. Atomic Displacement Parameter Nomenclature. Report of a Subcommittee on Atomic Displacement Parameter Nomenclature. *Acta Crystallographica*. 1996. V. A52. P. 770–781.
 24. Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D. On the handling of atomic anisotropic displacement parameters. *J. of Applied Crystallography*. 2002. V. 35. P. 477–480.
 25. Afonine P.V., Urzhumtsev A., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D. Atomic Displacement Parameters (ADPs), their parameterization and refinement in PHENIX. *Computational Crystallography Newsletter*. 2010. V. 1. P. 24–31. URL: http://www.phenix-online.org/newsletter/CCN_2010_07.pdf (дата обращения: 18.02.2013).
 26. Phillips S.E.V. Structure and refinement of oxymyoglobin at 1.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1980. V. 142. P. 531–554.
 27. Jiang J.-S., Brünger A.T. Protein Hydration Observed by X-ray Diffraction: Solvation Properties of Penicillopepsin and Neuraminidase Crystal Structures. *J. Mol. Biol.* 1994. V. 243. P. 100–115.
 28. Fokine A., Urzhumtsev A. Flat bulk-solvent model: obtaining optimal parameters. *Acta Crystallographica Sec. D*. 2002. V. 58. P. 1387–1392.
 29. Fenn T.D., Schnieders M.J., Brunger A.T. A smooth and differentiable bulk-solvent model for macromolecular diffraction. *Acta Crystallographica Sec.D*. 2010. V. 66. P. 1024–1031.

30. Бландел Т., Джонсон Л. *Кристаллография белка*. М: Мир, 1979. 620 с.
31. Lunin V.Y., Urzhumtsev A.G. Improvement of protein phases by coarse model modification. *Acta Crystallographica Sec. A*. 1984. V. 40. P. 269–277.
32. Read R.J. Improved Fourier Coefficients for Maps Using Phases from partial Structures with Errors. *Acta Crystallographica Sec. A*. 1986. V. 42. P. 140–149.
33. Pannu N. S., Read R. J. Improved Structure Refinement Through Maximum Likelihood. *Acta Crystallographica Sec. A*. 1996. V. 52. P. 659–668.
34. Bricogne G., Irwin J. Maximum-Likelihood Refinement of incomplete models with BUSTER + TNT. In: *Proceedings of the CCP4 Study Weekend. Macromolecular Refinement*. Warrington: Daresbury Laboratory, 1996. P. 85–92.
35. Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Crystallographica Sec. D*. 1997. V. 53. P. 240–255.
36. Lunin V.Y., Afonine P.V., Urzhumtsev A.G. Likelihood-based refinement. I. Irremovable model errors. *Acta Crystallographica Sec. A*. 2002. V. 58. P. 270–282.
37. Wang J., Dauter M., Alkire R., Joachimiak A., Dauter Z. Triclinic lysozyme at 0.65 Å resolution. *Acta Crystallographica Sec. D*. 2007. V. 63. P. 1254–1268.
38. Afonine P.V., Grosse-Kunstleve R.W., Echols N., Headd J.J., Moriarty N.W., Mustyakimov M., Terwilliger T.C., Urzhumtsev A., Zwart P.H., Adams P.D. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallographica Sec. D*. 2012. V. 68. P. 352–367.
39. Sheldrick G.M. Phase annealing in SHELX-90: direct methods for larger structures. *Acta Crystallographica Sec. A*. 1990. V. 46. P. 467–473.
40. Morris R.J., Bricogne G. Sheldrick's 1.2 Å rule and beyond. *Acta Crystallographica Sec. D*. 2003. V. 59. P. 615–617.
41. Sobolev O.V., Lunin V.Y. Detection of alternative conformations by unrestrained refinement. *Acta Crystallographica Sec. D*. 2012. V. 68. P. 1118–1127.
42. Young L., Kanter E.P., Krässig B., Li Y., March A.M., Pratt S.T., Santra R., Southworth S.H., Rohringer N., DiMauro L.F. *et al.* Femtosecond electronic response of atoms to ultra-intense X-rays. *Nature*. 2010. V. 466. P. 56–62.
43. Herman F., Skillman S. *Atomic Structure Calculations*. Englewood Cliffs: Prentice-Hall Inc., 1963.
44. Son S.-K., Young L., Santra R. Impact of hollow-atom formation on coherent x-ray scattering at high intensity. *Phys. Rev. A*. 2011. V. 83. P. 033402(1)–033402(11).
45. Lorenz U., Kabachnik N.M., Weckert E., Vartanyants I.A. Impact of ultrafast electronic damage in single-particle x-ray imaging experiments. *Phys. Rev. E*. 2012. V. 86. P. 051911(1)–051911(7).

Материал поступил в редакцию 11.03.2012, опубликован 19.03.2013.