

Определение структуры биологических макромолекулярных частиц с использованием рентгеновских лазеров. Достижения и перспективы

Петрова Т.Е., Лунин В.Ю.

*Институт математических проблем биологии РАН – филиал ИПМ
имени М.В. Келдыша РАН, Пушкино, Россия*

Аннотация. Рентгеноструктурный анализ является основным экспериментальным подходом к определению атомной структуры биологических макромолекул и их комплексов. Наиболее серьезным ограничением его применимости, на сегодняшний день, является необходимость приготовления образца исследуемого объекта в виде монокристалла, которая вызвана чрезвычайно низкой интенсивностью рассеянных одиночной молекулой лучей. Ввод в эксплуатацию рентгеновских лазеров на свободных электронах с их сверхмощным (на много порядков превышающим по яркости современные синхротроны) и сверхкоротким (меньше 100 фс) импульсом является экспериментальным прорывом, который позволяет рассчитывать на получение дифракционных картин от отдельных биологических частиц и последующее определение их структуры. Первые экспериментальные результаты демонстрируют принципиальную возможность такого подхода и сопровождаются публикацией значительного количества статей, посвященных различным аспектам развития метода. Целью данной статьи является обсуждение текущего состояния дел в этой области, оценка достигнутых результатов и обсуждение перспектив дальнейшего развития метода на основе анализа публикаций в мировой научной литературе последних лет и опыта работ, проводимых авторами обзора и их коллегами.

Ключевые слова: биологические макромолекулы, изолированные частицы, рентгеновское рассеяние, рентгеновские лазеры на свободных электронах, фазовая проблема, биологическая кристаллография.

1. РЕНТГЕНОВСКИЙ ДИФРАКЦИОННЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ

1.1. Организация стандартного дифракционного эксперимента в биологической кристаллографии

Рентгеновский дифракционный эксперимент (рентгеноструктурный анализ) является основным источником получения информации о структуре биологических макромолекул при атомном разрешении. Стандартная схема организации рентгеновского дифракционного эксперимента выглядит следующим образом (рис. 1, 2). Исследуемый объект фиксируется на специальном устройстве (гонометрической головке), позволяющем осуществлять управляемое вращение объекта. Объект облучается монохроматическим пучком рентгеновских лучей (первичным пучком). Результатом облучения является возникновения новых (вторичных) рентгеновских лучей (называемых также рефлексами или отражениями), распространяющихся от объекта во всех направлениях. Часть из этих вторичных лучей попадает на расположенную за объектом двумерную матрицу детекторов. В литературе словом "детектор" обычно называют физическое устройство целиком – всю матрицу и сопутствующую электронику. Мы используем слово "матрица", чтобы подчеркнуть, что

это устройство состоит из огромного, до нескольких миллионов, количества независимых регистрирующих излучение элементов. Каждый из этих элементов измеряет интенсивность попадающего на него луча или, более точно, энергию, пришедшую на него за время экспозиции объекта. Совокупность интенсивностей, зафиксированных различными детекторами матрицы, называется рентгенограммой, фреймом, кадром или "имиджем", напоминая о ранних годах развития биологической кристаллографии, когда в роли матрицы детекторов выступала кассета с фотопленкой. Полный эксперимент состоит в получении набора рентгенограмм, отвечающих различным ориентациям объекта относительно первичного пучка, что достигается поворотами объекта между экспозицией отдельных рентгенограмм.

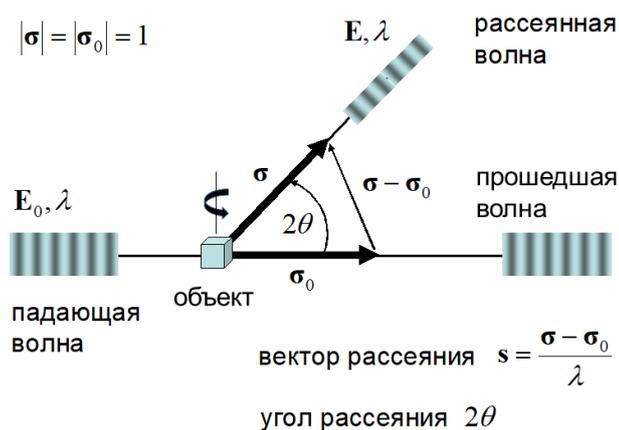


Рис. 1. Схема рентгеновского дифракционного эксперимента. (Источник: [1]).

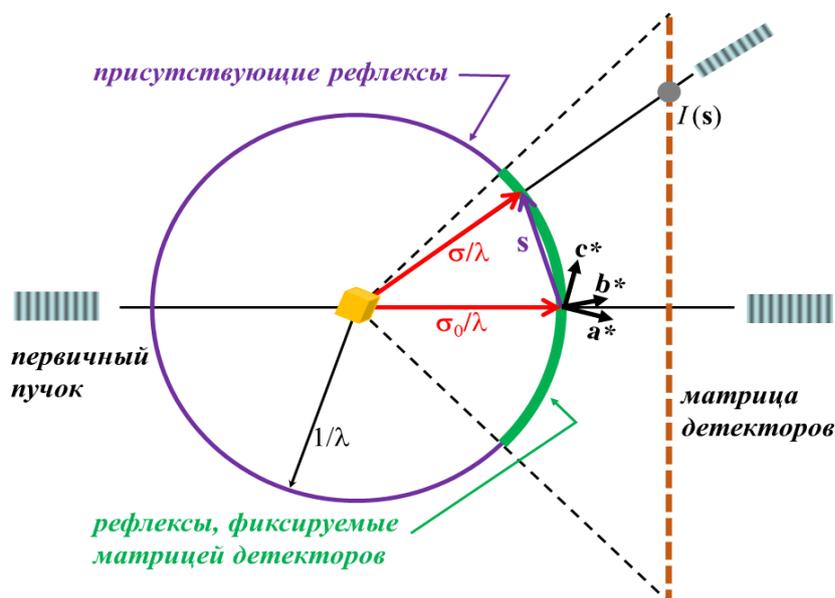


Рис. 2. Схема Эвальда дифракционного эксперимента. Векторы рассеяния s , отвечающие существующим в данный момент времени рефлексам, образуют поверхность сферы (сферы Эвальда) в обратном пространстве (показаны фиолетовым). Рефлексы, фиксируемые детектором, соответствуют части этой сферы (показана зеленым), определяемой физическими размерами матрицы детекторов. Вращение объекта сопровождается вращением базиса обратного пространства $\{a^*, b^*, c^*\}$, т.е. изменением положения в обратном пространстве сферы Эвальда и векторов рассеяния регистрируемых рефлексов (Источник: [1]).

В рамках кинематической теории рассеяния происходящие процессы могут быть описаны следующим образом [2, 3]. Периодически меняющееся электрическое поле падающей волны вынуждает колебаться электроны исследуемого объекта. Колеблющиеся электроны становятся источниками сферических электромагнитных волн, которые суммируются на детекторе. При этом суммировании ключевую роль играют разницы фаз приходящих от различных электронов волн, которые, в свою очередь, определяются взаимным расположением электронов в объекте. Взаимное расположение электронов в объекте описывается распределением электронной плотности $\rho(\mathbf{r})$ так, что количество электронов в элементарном объеме dV с центром в точке \mathbf{r} есть $\rho(\mathbf{r})dV$. Вычислительная задача рентгеноструктурного анализа состоит в нахождении распределения $\rho(\mathbf{r})$ на основе набора рентгенограмм, полученных в эксперименте. Найденное распределение электронной плотности может быть далее проинтерпретировано в терминах совокупности атомов, координаты которых далее уточняются [4].

В зависимости от решаемой задачи, рентгеновский пучок рассматривается либо как плоская синусоидальная электромагнитная волна, характеризуемая длиной волны λ и амплитудой первичной электромагнитной волны E_0 , либо как поток фотонов, характеризуемый энергией фотона E_{photon} и плотностью потока фотонов j (количеством фотонов, пролетающих через площадку единичной площади за единицу времени). Длина и амплитуда волны связаны с энергией и плотностью потока фотонов соотношениями

$$E_{photon} = \frac{hc}{\lambda}, j = \frac{\lambda}{8\pi h} E_0^2, \quad (1)$$

где c – скорость света и h – постоянная Планка. Эти соотношения позволяют переходить по мере надобности от одного типа описания к другому. При решении структуры, т.е. определении положений атомов исходя из результата рентгеновского эксперимента, используется волновое описание. Когда же речь идет о параметрах устройств, генерирующих рентгеновские лучи, или о процессах радиационного разрушения объекта, более удобным оказывается корпускулярное описание.

1.2. Математическое описание результатов дифракционного эксперимента. Структурные факторы

Пусть вектор σ_0 (единичной длины) показывает направление первичного рентгеновского луча, а единичной длины вектор σ направление от объекта в точку регистрации энергии вторичного луча (пиксел матрицы детекторов). В рамках кинематической теории рассеяния энергия $E(\sigma_0, \sigma)$ вторичного луча, рассеянного объектом, имеющим распределение электронной плотности $\rho(\mathbf{r})$, может быть представлена в виде

$$E(\sigma_0, \sigma) = \varepsilon E_0 |\mathbf{F}(\mathbf{s})|^2. \quad (2)$$

Здесь E_0 – энергия первичной волны, а константа ε является комбинацией физических констант и параметров эксперимента (например, расстояния от образца до детектора и времени экспозиции рентгенограммы) и не зависит от структуры исследуемого образца. Вектор \mathbf{s} является нормированной к длине волны комбинацией векторов, определяющих направления первичного и вторичных лучей

$$\mathbf{s} = \frac{\sigma - \sigma_0}{\lambda}. \quad (3)$$

Этот вектор играет важную роль в теории рассеяния и именуется в кристаллографии вектором рассеяния (альтернативное название в других разделах физики – вектор переданного импульса). Комплексные величины $\mathbf{F}(\mathbf{s})$ именуются в кристаллографии структурными факторами и вычисляются как

$$\mathbf{F}(\mathbf{s}) = \int_{\mathbf{R}^3} \rho(\mathbf{r}) \exp[i2\pi\mathbf{s} \cdot \mathbf{r}] dV_{\mathbf{r}}, \quad \mathbf{s} \in \mathbf{R}^3, \quad (4)$$

где $\mathbf{s} \cdot \mathbf{r}$ обозначает скалярное произведение векторов \mathbf{s} и \mathbf{r} . Квадраты модулей этих величин $I(\mathbf{s}) = |\mathbf{F}(\mathbf{s})|^2$ называются интенсивностями рефлексов.

1.3. Восстановление распределения электронной плотности. Фазовая проблема. Разрешение

Интеграл (4) есть не что иное, как преобразование Фурье распределения электронной плотности $\rho(\mathbf{r})$. Поэтому, распределение электронной плотности может быть вычислено как обратное преобразование Фурье:

$$\rho(\mathbf{r}) = \int_{\mathbf{R}^3} \mathbf{F}(\mathbf{s}) \exp[-i2\pi\mathbf{s} \cdot \mathbf{r}] dV_{\mathbf{r}}, \quad \mathbf{r} \in \mathbf{R}^3, \quad (5)$$

при условии, что комплексные величины $\mathbf{F}(\mathbf{s})$ известны для всех векторов \mathbf{s} в трехмерном пространстве. (В кристаллографии пространство векторов рассеяния называется обратным пространством). Практическая реализация этой возможности сталкивается с двумя принципиальными проблемами.

Первая, так называемая "фазовая" проблема заключается в том, что для расчета по формуле (5) необходимы значения как модулей, так и фаз комплексных структурных факторов. В то же время, как следует из формулы (2), стандартный дифракционный эксперимент позволяет определить (в некоторой относительной шкале) лишь значения модулей $|\mathbf{F}(\mathbf{s})|$ структурных факторов. Восстановление значений фаз $\varphi(\mathbf{s})$ представляет собой центральную вычислительную проблему биологической кристаллографии. Для решения этой проблемы используется ряд подходов, ни один из которых не является универсальным [5–7].

Вторая проблема связана с тем, что расчет по формуле (5) требует знания всех структурных факторов, в то время как на практике даже модули удается определить лишь для части из них. Полноту набора S векторов рассеяния, включенных в расчёт интеграла (5), принято характеризовать величиной "разрешения". Понятие "разрешения" имеет в кристаллографии различные трактовки и обсуждается в ряде работ [8–10]. Мы ограничимся здесь основной концепцией – концепцией "формального разрешения". Формула (5) представляет распределение электронной плотности как взвешенную значениями структурных факторов сумму гармоник Фурье $\exp[-i2\pi\mathbf{s} \cdot \mathbf{r}]$. Вещественная и мнимая части этой комплексной функции являются функциями, которые синусоидально изменяются вдоль направления \mathbf{s} и не меняются в плоскостях, перпендикулярных этому направлению. (Такие функции могут быть названы "стоячими плоскими волнами"). Период функции вдоль направления \mathbf{s} равен

$$d = \frac{1}{|\mathbf{s}|} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta}, \quad (6)$$

и называется разрешением, соответствующим рефлексу \mathbf{s} и структурному фактору $\mathbf{F}(\mathbf{s})$. Здесь θ – половина угла между направлениями $\boldsymbol{\sigma}$ и $\boldsymbol{\sigma}_0$, λ – длина волны используемого излучения. Говорят, что набор рефлексов S отвечает разрешению d_{\min} , если в него включены все (или "почти все") рефлексы с $|\mathbf{s}| \leq d_{\min}^{-1}$. Интеграл (5), рассчитанный по такому набору рефлексов, называется синтезом Фурье электронной плотности

разрешения d_{\min} . Величина d_{\min} определяет минимальный размер деталей, различимых на "топографических картах", отвечающих такому синтезу Фурье.

1.4. Возможность экспериментального измерения интенсивностей рефлексов. Кристаллы

Главной проблемой при попытке практического осуществления описанного выше эксперимента является чрезвычайная слабость рассеянных рентгеновских лучей. Величина константы ϵ в равенстве (2) может быть оценена как 10^{-24} , что делает крайне сложной регистрацию рассеянных лучей. Вся история развития метода рентгеноструктурного анализа связана с поисками путей преодоления этой проблемы. Наиболее очевидными путями решения этой проблемы являются:

- **Повышение мощности источника рентгеновского излучения** (увеличение величины E_0 в формуле (2)). До недавнего времени наиболее мощным источником рентгеновского излучения являлись синхротроны. Недавно созданные рентгеновские лазеры являются существенно более мощными источниками излучения.

- **Повышение чувствительности детектора.** Наиболее современные детекторы позволяют регистрировать отдельные рентгеновские фотоны [11].

- **Увеличение времени экспозиции рентгенограммы.** Применимость этого подхода ограничивается разрушением биологических макромолекул под воздействием рентгеновского излучения. Мы остановимся на этом вопросе более подробно в разделе 3 ниже.

- **Сбор дифракционной картины с нескольких образцов.** Говоря о радиационном разрушении образца, следует учитывать, что в процессе эксперимента необходимо получить набор рентгенограмм. При съемке данных с одного объекта он получает некоторую дозу облучения во время съемки каждой рентгенограммы. Суммарная доза, а следовательно, и доза, соответствующая каждой рентгенограмме, не могут превысить некоторую величину, специфическую для этого объекта и характеризующую его устойчивость к облучению. Соответственно, и допустимая интенсивность первичного пучка и время облучения объекта для получения одной рентгенограммы ограничены. Эта проблема может быть частично смягчена последовательным сбором данных с нескольких идентичных экземпляров объекта. Дальнейшим развитием этой идеи является "проточная" (serial) схема организации эксперимента, когда каждая рентгенограмма получается с отдельного экземпляра объекта. Мы остановимся на этом более подробно в разделе 2.1.1.

Несмотря на постоянный прогресс в развитии техники эксперимента на всех его этапах, до недавнего времени получение дифракционной картины от отдельной биологической макромолекулы оставалось невозможным.

Единственным способом, позволяющим обойти проблему регистрации слабых лучей, до настоящего времени остается приготовление экспериментального образца в виде монокристалла. В кристалле множество идентичных одинаково ориентированных макромолекул расположены регулярным образом так, что эквивалентные точки разных молекул заполняют трехмерную периодическую решетку. Пусть $\{\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}\}$ минимальные линейно-независимые периоды (базис) этой решетки. Вторичные волны, приходящие на детектор от разных экземпляров молекулы, имеют сдвиги фаз, кратные величинам $2\pi\mathbf{s} \cdot \mathbf{a}$, $2\pi\mathbf{s} \cdot \mathbf{b}$, $2\pi\mathbf{s} \cdot \mathbf{c}$. В случае, когда выполнены условия Брэгга – Вульфа

$$\mathbf{s} \cdot \mathbf{a} = h, \mathbf{s} \cdot \mathbf{b} = k, \mathbf{s} \cdot \mathbf{c} = l, \quad h, k, l - \text{целые}, \quad (7)$$

все волны приходят с одинаковыми фазами. В этом случае интенсивность суммарной волны на детекторе возрастает в N^2 раз, где N – число молекул в кристаллическом образце. Такое радикальное увеличение интенсивности делает регистрацию волны

детектором возможной, а такие рефлексы именуются брэгговскими. Если же условия (7) не выполняются, волны приходят с разными фазами и взаимно гасят друг друга. Таким образом, кристалл играет двоякую роль. С одной стороны, он кардинально усиливает сигнал для дискретной системы рефлексов, определяемой уравнениями (7), а с другой стороны, подавляет информацию для остальной части рефлексов.

В случае использования кристалла распределение электронной плотности в нем является периодическим по трем независимым направлениям, и интегралы (4) и (5) приобретают вид ряда Фурье:

$$\mathbf{F}(\mathbf{s}) = \int_V \rho(\mathbf{r}) \exp[i2\pi\mathbf{s} \cdot \mathbf{r}] dV_r \quad (8)$$

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{|V|} \sum_{hkl-\text{целые}} \mathbf{F}(\mathbf{s}_{hkl}) \exp[-i2\pi\mathbf{s}_{hkl} \cdot \mathbf{r}], \quad (9)$$

где V – элементарная ячейка (параллелепипед, построенный на векторах $\{\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}\}$), $|V|$ – ее объем, \mathbf{s}_{hkl} – вектор, определяемый уравнениями (7) при заданных значениях индексов hkl .

Изготовление кристалла исследуемого объекта является наиболее сложной частью рентгеноструктурного исследования, далеко не всегда реализуемой на практике.

2. РЕНТГЕНОВСКИЕ ЛАЗЕРЫ НА СВОБОДНЫХ ЭЛЕКТРОНАХ – НОВЫЙ ИНСТРУМЕНТ СТРУКТУРНОЙ БИОЛОГИИ

Изобретение и ввод в строй рентгеновских лазеров на свободных электронах (X-ray Free-Electron Laser, XFEL) открывает новые перспективы для структурной биологии. Прежде всего, это возможность сбора дифракционных данных высокого разрешения для микрокристаллов, возможность изучать динамические процессы в кристаллах и возможность получать интерпретируемую дифракционную картину для некристаллических образцов (single particles). Первый рентгеновский лазер с коротковолновым излучением FLASH (Free eLectron lAser in Hamburg) вступил в строй в 2005 году. Первый лазер с жестким рентгеновским излучением, на котором можно проводить эксперименты, представляющие интерес для биологов, Linac Coherent Light Source (LCLS) начал работать в национальной лаборатории SLAC (Стендорд, США) в 2009. В 2011 году был открыт для пользователей рентгеновский лазер Spring-8 Angstrom Compact free electron LAser (SACLA) в ускорительном центре Spring-8 (Япония). Осенью 2017 года был официально запущен Европейский лазер EuXFEL, который является совместным проектом группы европейских стран (Шенефельд, Германия). В 2017 начал работать рентгеновский лазер PAL-XFEL в лаборатории Pohang Accelerator Laboratory (Пхохан, Южная Корея). На настоящий момент на нем работают 3 линии. В 2019 году открылась для пользователей первая линия рентгеновского лазера SwissFEL в институте Пауля Шеррера (Швейцария). Планируется, что в 2021 и 2025 годах начнут работать с пользователями LCLS-II (Стендорд, США) и Shanghai High Repetition Rate XFEL SHINE (Шанхай, Китай), соответственно [12].

Обсуждение принципов работы рентгеновских лазеров можно найти, например, в работе [13], а историю их изобретения в работе [14].

Принципиальными отличиями рентгеновских лазеров от других источников рентгеновского излучения являются:

- яркость рентгеновского импульса, на порядки превосходящая яркость синхротронных источников излучения (например, излучение EuXFEL превосходит синхротронное излучение по пиковой яркости в 10^8 раз);
- чрезвычайно малая продолжительность импульса (несколько десятков фемтосекунд; $1 \text{ фс} = 10^{-15} \text{ с}$);

- высокая частота повторения импульсов (до мегагерц).

2.1. Основные направления исследований в структурной биологии с использованием рентгеновских лазеров

2.1.1. Проточная кристаллография (serial crystallography)

Существенным преимуществом рентгеновских лазеров перед синхротронами является высокая концентрация энергии излучения в области пересечения рентгеновского пучка с образцом, что делает возможным получение дифракционных картин для очень мелких кристаллов, имеющих размеры порядка нескольких микрон. Это открывает перспективы, в частности, для определения структуры мембранных белков. Из-за низкого уровня экспрессии, сложностями с очисткой и нестабильности мембранных белков трудно получить необходимое их количество хорошего качества для выращивания достаточно крупных кристаллов для рентгеновской кристаллографии.

В традиционном кристаллографическом эксперименте на синхротроне единичный кристалл, укрепленный на гониометрической головке, поворачивается между экспозициями, что позволяет измерить (в идеальном случае) полный набор дифракционных интенсивностей. Во время каждой экспозиции кристалл вращается на небольшой угол, чтобы были измерены полные интенсивности отдельных брэгговских рефлексов. В проточных экспериментах в рентгеновские импульсы подается поток кристаллов. Попавший в рентгеновский импульс кристалл дает только одну рентгенограмму, содержащую частично экспонированные брэгговские рефлексы. Для получения полного набора экспериментальных данных требуется снять, обработать и свести в единый набор огромное количество рентгенограмм [15].

Первые проточные эксперименты были проведены на LCLS с микрокристаллами большого мембранного белкового комплекса фотосистемы I [16]. Размер кристаллов в этих экспериментах колебался от 200 нм до 2 микрон. Структура фотосистемы I в этих экспериментах была определена на разрешении 8 Å, которое было лимитировано длиной волны падающего пучка 6.9 Å. Вскоре, были проведены первые эксперименты с белковыми кристаллами с размерами порядка нескольких микрон, в которых были получены данные атомного разрешения до 1.9 Å [17]. В течение последующих лет с помощью фемтосекундной проточной кристаллографии проводились эксперименты как для крупных комплексов, например, фотосистемы II и рибосомы [18–20], так и для рецепторов, сопряженные с G-белком [21, 22] и для ряда растворимых и мембранных белков [23–25]. На настоящий момент самые маленькие кристаллы, с которыми был проведен дифракционный эксперимент на LCLS (и на всех рентгеновских лазерах) и собраны дифракционные данные относительно высокого разрешения 1.9 Å, это нативные кристаллы капсул (occlusion bodies) вируса яблоневого плодорозетки [26]. Объем кристаллов, подаваемых в рентгеновский импульс, в среднем равнялся 0.016 мкм³, что составляло приблизительно 9000 элементарных кристаллических ячеек.

С вводом в строй EuXFEL появляется термин мегагерцевая кристаллография, имеющий то же значение, что и проточная фемтосекундная кристаллография, но подразумевающий более высокую частоту повторения импульсов. Первые проточные эксперименты на EuXFEL были проведены с кристаллами небольших белков конкавалин А, конкавалин В и бета-лактамазой [27, 28]. В этих экспериментах были собраны данные до разрешения 1.7 Å и 2.1 Å и была показана возможность определения кристаллических белковых структур по данным EuXFEL. В недавних экспериментах с микрокристаллами фотосистемы I цианобактерий (размер кристаллов оценивался 5 × 5 × 15 мкм³) была определена кристаллическая структура фотосистемы I при разрешении 2.9 Å [29].

2.1.2. Изучение быстропротекающих процессов (time-resolved crystallography)

В настоящий момент в этой области достигнуты значительные успехи с помощью экспериментов, которые в англоязычной литературе получили название pump-probe experiments, в которых оптический лазер (“pump”) возбуждает изучаемый объект (переводит ее в другое состояние), а рентгеновский лазер ее исследует (“probe”). Объектами изучения являются биологические молекулы, которые под действием света переходят в короткоживущие переходные состояния, сопровождающиеся изменениями в их структуре [30–36]. Эксперимент состоит в том, что за фиксированное время до того, как образцы попадают в пучок рентгеновского лазера и записываются дифракционные данные, образцы облучают источником света (оптическим лазером), тем самым инициируя в образце изучаемую реакцию и соответствующие структурные изменения. Эксперимент проводят при разных временах запаздывания между действием оптического лазера и попаданием образцов в рентгеновский импульс, а также для образцов, не подвергшихся облучению оптическим лазером (в так называемом темном состоянии, dark probe). После обработки дифракционных данных и построения моделей структур, исследователи получают набор пространственных структур, соответствующих разным временам, прошедшим от начала реакции, и, следовательно, имеют возможность изучать произошедшие структурные изменения во времени. Причина, по которой такие изменения сложно изучать на синхротронах, состоит в том, что минимальная длительность рентгеновского импульса на синхротроне имеет порядок 100 пс. Структурные изменения, вызванные разрывом связей, происходят на временах, значительно меньших (на фемтосекундной шкале), и для их изучения рентгеновские лазеры являются в перспективе мощным инструментом. Примерами таких исследований являются работы по миоглобину и фотоактивному желтому белку (PYP).

Миоглобин – белок, ответственный за запасание кислорода в мышцах, придающий им красный цвет. Молекула миоглобина, кроме белковой полипептидной цепи, имеет в составе гем, содержащий ион Fe^{2+} , с которым легко связываются лиганды, такие как CO. Ковалентная связь между Fe^{2+} и CO разрывается под действием света в течение 50 фс. В эксперименте, проведенном на LCLS, дифракционные данные для кристаллов миоглобина были получены при десяти временах задержки между вспышкой оптического лазера и попаданием кристалла в лазерный импульс (от 0.1 до 150 пс) [33]. По полученным данным были исследованы структурные изменения гема и окружающей его части белка.

Фотоактивный желтый белок (PYP) – небольшой водорастворимый белок, в состав которого входит связанный с ним ковалентно хромофор (пара-кумаровая кислота). Поглощение фотона из голубой части спектра запускает полный фотоцикл, последовательность реакций и структурных изменений, первое из которых – изомеризация хромофора из trans- в cis-форму относительно двойной связи. В экспериментах, проведенных на LCLS и на синхротроне, были получены дифракционные данные с задержкой между оптическим лазером и рентгеновским импульсом, соответственно, 3 и 100 пс [34]. В недавних экспериментах на EuXFEL удалось снять данные еще для трех промежуточных точек на временной шкале, с задержкой между оптическим и рентгеновским лазером 10, 30 и 80 пс и, таким образом, получить динамические структурные данные в диапазоне, который ранее не был исследован [36]. Таким образом, детальные структурные изменения процесса изомеризации хромофора удастся изучать на все меньшем временном шаге.

2.1.3. Исследование изолированных частиц (single particle studies)

Под единичной частицей в структурной биологии понимается отдельный, не находящийся в кристаллическом состоянии, исследуемый биологический объект, например, отдельная клетка, отдельная вирусная частица, отдельная молекула белка. На

современных синхротронах интенсивность рентгеновской дифракции от таких объектов является слишком слабой, чтобы ее измерить. Поэтому, введение в эксплуатацию таких источников высокоинтенсивного излучения, как лазеры на свободных электронах, создает надежду на возможность распространения методов рентгеноструктурного анализа на отдельные макромолекулярные частицы [37]. Дальнейшая часть статьи будет посвящена, в основном, проблемам, связанным с попыткой реализации такого подхода на практике.

3. РАДИАЦИОННОЕ РАЗРУШЕНИЕ ОБЪЕКТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ С РЕНТГЕНОВСКИМИ ЛАЗЕРАМИ

3.1. Дифракция до разрушения

Идея использовать сверхинтенсивные и сверхкороткие импульсы лазеров на свободных электронах для получения дифракционных данных для единичных некристаллических биологических образцов была высказана еще до того, как рентгеновские лазеры были введены в действие, и являлась одной из мотивирующих идей для их постройки. Импульс рентгеновских лазеров имеет настолько высокую интенсивность, на порядки превышающую интенсивность рентгеновского излучения на современных синхротронах, что дифракционный сигнал от некристаллического образца будет достаточно высок для того, чтобы ее зарегистрировать. Однако, лазерный импульс такой высокой мощности может вызвать разрушение и взрыв образца. Была выдвинута идея, что при очень коротких длительностях импульса, в идеале, меньше 10 фс, удастся зарегистрировать дифракционную картину до того, как образец разрушится [38]. Эта идея получила название дифракции до разрушения (*diffraction before destruction*).

3.2. Разрушения образца под действием рентгеновского импульса

При прохождении рентгеновского луча через образец происходит как упругое рассеяние луча (Томпсоновское рассеяние), дающее вклад в дифракционную картину, так и процессы неупругого рассеяния (фотоэффект и эффект Комптона), в ходе которых вся или часть энергии фотонов передаются атомам образца. Эта энергия идет на выбивание электронов из атомов и ионизацию атомов, на энергию электронов, вылетающих из атомов, на разрыв ковалентных связей, флуоресцентное излучение, нагревание образца.

Радиационное разрушение образца начинается с поглощения атомом налетающего фотона, которое сопровождается испусканием из К-оболочки атома фотоэлектрона с энергией от нескольких сотен до тысяч электрон вольт [39, 40]. За этим следует переход электрона в атоме с внешней оболочки на вакантное место на внутренней оболочке (Оже-переход) и либо испускание электрона Оже [41, 42], либо флуоресцентное излучение (для легких атомов испускание электрона Оже более вероятно). Время Оже-перехода в биомолекулах составляет от 4.9 фс для кислорода до 10.7 для углерода [43]. Фотоэлектроны и электроны Оже имеют значительно отличающиеся значения энергии и скорости. Например, если энергия поглощенного фотона 6 кэВ то для атома углерода начальная скорость фотоэлектрона 450 Å/фс, а для электрона Оже 100 Å/фс [40]. Фотоэлектроны и электроны Оже распространяются по образцу, взаимодействуют с атомами образца и вызывают каскады вторичных ионизаций в диапазоне времени от 10 до 100 фс [44]. Электрон с начальной энергией 5.7 кэВ вызывает 240 вторичных ионизаций в течение 10 фс [40]. Ионизация атомов вызывает изменение атомных формфакторов и кулоновское отталкивание ионизированных атомов, которое приводит к их сдвигу, точнее, отталкиванию друг от друга [41, 45]. Одновременно с кулоновским расширением будет наблюдаться явление электронного захвата, когда отрицательные заряды уже не смогут вылететь из системы, вызывая, с одной стороны, нейтрализацию

положительного заряда системы, а с другой – дальнейшее увеличение скорости ионизации [38, 41, 46]. Все эти процессы вызовут ослабление и зашумление дифракционной картины. Высокая степень ионизации образца ведет к кулоновскому взрыву и его полному разрушению [38, 47, 48].

На современных лазерах на свободных электронах энергия импульса достигает 4 мДж, а количество фотонов на импульс 10^{12} . Длительность импульса составляет от нескольких фс до нескольких десятков фс. Например, если луч сконцентрирован на области площадью 1 квадратный микрон, то оценка для плотности потока фотонов будет порядка 10^4 фот/Å² за импульс. Для исследования единичных частиц для получения дифракционных картин, содержащих как можно больше количество фотонов, используется так называемая нано-фокусировка пучков (когда диаметр сфокусированного пучка меньше 1 микрона). Это приводит к еще более высоким значениям плотности падающего на образец потока фотонов и усилению дифракционного сигнала, но, в то же время, это будет приводить к усилению радиационного разрушения.

Для организации конкретного эксперимента одними из важнейших вопросов являются:

- При каких условиях начинается кулоновский взрыв т.е. как планировать эксперимент, чтобы получить дифракционную картину до кулоновского взрыва?
- При каких условиях эксперимента уровень дифракционного сигнала будет значительно превышать уровень шума, вызываемого разрушением образца во время импульса?

3.3. Радиационная доза как характеристика степени разрушения образца

Для количественной характеристики передачи энергии образцу и, соответственно, его степени разрушения используется физическая величина, называемая радиационной дозой (или просто дозой). Доза – это энергия, поглощенная образцом в процессе взаимодействия налетающего рентгеновского излучения с образцом, на единицу массы образца. Доза измеряется в Грехах (gray, Gy): $Gy = \frac{Дж}{кг}$. Дозу можно оценить по формулам:

$$Dose = I_{incident} (1 - \exp(-(\mu/\rho)\rho x)) / m$$

$$\mu/\rho = (n_C \sigma_C + n_N \sigma_N + n_O \sigma_O + \dots) / \rho \quad , \quad (10)$$

$$I_{incident} = Flux E_{ph}$$

где $I_{incident}$ – полная энергия луча, падающего на образец, m – масса облученной части образца, $Flux$ – величина падающего на образец потока фотонов, E_{ph} – энергия одного фотона, $\mu/\rho = \sigma n/\rho$ – массовый коэффициент поглощения, n – количество атомов указанного типа для единицы объема (C, N, O – химические элементы), σ – сечение взаимодействия для указанного типа атомов, ρ – плотность образца, x – толщина образца. Для конкретных образцов массовый коэффициент поглощения либо рассчитывается, используя табуированные значения сечений поперечного рассеяния для разных химических элементов (например, с помощью International Tables for Crystallography или с помощью сервера <https://physics.nist.gov/PhysRefData/Xcom/html/xcom1.html>), либо измеряется в эксперименте [49]. Для расчёта радиационной дозы можно также воспользоваться программой RADDPOSE-3D [50, 51] или недавно усовершенствованным вариантом этой программы для экспериментов на лазерах на свободных электронах RADDPOSE-XFEL [52].

В макромолекулярной кристаллографии широко используется оценка для предельного значения дозы, так называемый предел Хендерсона, равный $30 \cdot 10^6$ Гр

(иногда в литературе пределом Хендерсона называют $20 \cdot 10^6$ Гр). Изначально эта оценка была получена как значение дозы для кристаллов среднего размера, при которой радиационное разрушение приводит к ослаблению дифракционной интенсивности приблизительно в 2 раза. Позднее, значение предела Хендерсона на основании обобщения экспериментальных данных было предложено как рекомендуемое предельное значение дозы в экспериментах на синхротронах с кристаллами среднего размера при 100 К [53]. Для экспериментов при комнатной температуре на синхротронах была недавно получена оценка для рекомендуемого предельного значения дозы $0.38 \cdot 10^6$ Гр [54].

Однако в экспериментах с единичными частицами эти оценки для предельных значений доз, похоже, не применимы. Уже в первых экспериментах с единичными частицами на синхротронах при значениях доз, значительно превышающих предел Хендерсона, на дифракционных картинах не было обнаружено признаков разрушения образца [55, 57]. Например, в экспериментах с единичной клеткой полная доза, поглощенная образцом во время эксперимента, была оценена $455 \cdot 10^6$ Гр, что на порядок превышает предел Хендерсона [56]. В экспериментах на лазере SACLA, в которых были получены дифракционные картины и по ним сделана двумерная реконструкция единичной клетки, доза за импульс была оценена $100 \cdot 10^6$ Гр [58]. Таким образом, как в экспериментах на синхротронах, так и на лазерах на свободных электронах дифракционные данные были собраны при дозах, значительно превосходящих ранее определенные максимально возможные значения.

3.4. Достоверность оценки максимально возможной дозы

Остановимся на возможных причинах расхождения теоретических оценок максимально возможной дозы с экспериментальными наблюдениями.

Анализируя причины, почему в экспериментах с единичными частицами неприменимы общепринятые оценки для максимально возможной дозы, надо, в первую очередь, принимать во внимание, что дифракционные данные, которые были получены для единичных частиц, почти все имеют очень низкое разрешение, порядка десятков нанометров. А рекомендуемые предельные значения дозы (предел Хендерсона и др.) получены при работе с кристаллами на среднем разрешении порядка 2 Å. Чем выше разрешение данных, тем они более чувствительны к радиационному разрушению [57, 59, 60]. Тот факт, что в экспериментах Родригеса с соавторами клетка выдерживала высокую дозу, и дифракционная картина при этом не изменялась (рисунок S2, [56]), объясняется, наиболее вероятно, тем фактом, что разрешение дифракционных картин в этих экспериментах не превышало 50 нм. Суммарная доза $4.55 \cdot 10^8$ Гр, которую получила клетка в экспериментах, хотя и превышала на порядок предел Хендерсона, но, видимо, этой величины недостаточно для значительных разрушений в клетке, которые бы вызвали искажения дифракционной картины на разрешении 50 нм. Например, для случая, когда максимальное значение разрешения лежит в диапазоне 0.1–10 нм, в работе [57] была предложена эмпирическая формула, связывающая значение разрешения дифракционной картины в нанометрах и максимальное значение дозы в Гр, которую может выдержать образец: $Dose = 10^8 \cdot Resolution$.

По-видимому, в экспериментах на синхротронах низкое разрешение данных является основной причиной того, что радиационные разрушения не влияют значительно на дифракционную картину.

Второй момент, который надо принимать во внимание – это отличия в параметрах падающего пучка на синхротроне и на лазере на свободных электронах. На лазерах на свободных электронах плотность потока фотонов достигает 10^4 фот/Å² за импульс (т.е. за десятки фемтосекунд). В то время как, например, в экспериментах с единичной клеткой на синхротроне поток фотонов на одну дифракционную картинку был оценен

как $0.5 \text{ фот}/\text{Å}^2$ за секунду [57]. Интенсивность падающего пучка на современном лазере на много порядков превышает интенсивность на синхротронах. Соответственно, значения полученных доз на лазере тоже очень велико по сравнению с синхротроном. Уже в первых экспериментах на лазерах с кристаллами были получены оценки для значений доз от $700 \cdot 10^6 \text{ Гр}$ до 3 ГГр за импульс [16, 61]. В то же время решенные структуры не содержали признаков радиационных разрушений, которые наблюдаются в кристаллических структурах на синхротронах. Эти экспериментальные результаты на лазерах были интерпретированы как подтверждение возможности “дифракции до разрушения”.

Доза, полученная образцом на лазерах, на порядки превосходит дозу, полученную в экспериментах на синхротроне. И эта доза получена за гораздо более короткое время, за десятки фемтосекунд, в то время как на синхротронах съемка только одного кадра может длиться секунды. При съемке данных на синхротронах радиационные разрушения накапливаются за гораздо больший интервал времени, чем длительность лазерного импульса. По-видимому, с накоплением экспериментальных результатов будет получены более точные оценки для максимальных доз в экспериментах на лазерах.

В случае с единичной частицей получение аккуратной оценки для значения дозы является достаточно сложной задачей. Единичная биологическая частица (клетка, вирус, органелла) имеют гораздо меньший размер, чем самые маленькие кристаллы. При оценке дозы необходимо аккуратно оценить количество фотоэлектронов и электронов Оже, которые покинут образец вместо того, чтобы распространиться по образцу и вызвать каскад новых реакций и дальнейшее разрушение образца. Учет этого факта может значительно уменьшить оценку для величины поглощенной дозы (рисунок 8 в статье [51]).

Число экспериментальных работ по исследованию химических и структурных процессов, вызванных рентгеновским импульсом и происходящих в образцах за время порядка десятков фемтосекунд, пока не велико, что обусловлено тем, что лазеры еще только вступают в действие, идет процесс их отладки, а также сложностью эксперимента. Первые экспериментальные исследования эффектов ионизации и перераспределения заряда, вызванные лазерным импульсом, проводились с небольшими молекулами, содержащими тяжелый атом [62–66]. Фрагментация молекул, вызванная кулоновским взрывом, исследовалась для малых молекул, содержащих атом йода [67–69], и для относительно большой молекулы C_{60} [70, 71].

В то же время, стали появляться отдельные работы с экспериментальными свидетельствами, что при высоких значениях плотности потока фотонов, которые достигаются за счет нано-фокусировки пучка, или при относительно долгих импульсах за время действия лазерного импульса наблюдаются глобальные и локальные разрушения белковых кристаллах, аналогичные тем, которые наблюдаются в кристаллических структурах на синхротронах. Первоначально эти явления наблюдались только при относительно долгих импульсах. Например, наблюдалось уменьшение интенсивности дифракции на высоком разрешении при длине импульса 70 фс [61]. Локальные разрушения наблюдались при длине импульса 40 фс [72]. Наблюдалось изменения электронной плотности для атомов или ионов металлов, атомов серы, структурные изменения в области, окружающей кластер с тяжелыми атомами [72–74], удлинение дисульфидных связей и структурные изменения боковых групп ароматических остатков [75].

Во многих недавних исследованиях в этой области применяется используемая на современных лазерах схема *pump-probe* эксперимента, при которой на образец подается два лазерных импульса через фиксированный интервал времени. Первый импульс инициирует процессы разрушения в образце, а второй импульс предназначен для получения дифракционной картины для образца, в котором эти разрушения уже начали

происходить между двумя импульсами [75, 76]. Заметим, что в недавнем исследовании локальные эффекты радиационного разрушения в кристаллах наблюдались уже при интервалах времени между импульсами, приблизительно равными 20–30 фс [75].

С единичными биологическими молекулами таких исследований пока еще не проводилось. Уже сам факт получения рентгенограмм от единичных частиц и то, что по этим данным удалось построить двух- или трехмерные модели исследуемой частицы, многими исследователями рассматривается как подтверждение возможности получения дифракции до разрушения. Однако, еще раз подчеркнем, что на очень низком разрешении мы можем только утверждать, что дифракция была получена до кулоновского взрыва, но не можем судить о степени разрушения образца. Почти все дифракционные данные, которые были получены для единичных частиц, были получены на разрешении порядка десятков нанометров, за исключением данных для вируса табачной мозаики, которые были сняты на разрешении 5.9 Å [77]. Однако, заметим, что структуру вируса удалось решить только с гораздо более низким разрешением 69–72 Å [78].

Первые результаты моделирования ионизация и кулоновского взрыва единичной белковой молекулы на будущем лазере на свободных электронах были представлены в той же работе, в которой была изложена идея дифракции до разрушения [38]. В качестве образца была взята молекула лизоцима в окружении 118 молекул воды. Моделировались импульсы разной продолжительности, от 2-х до 50-ти фс. Кулоновский взрыв, иногда уже после импульса, всегда происходил (рисунок 2 из работы [38]). Подчеркнем, что при моделировании процессов разрушения, наряду с количеством фотонов за импульс, одним из ключевых параметров является плотность потока фотонов за импульс, равная потоку фотонов через единицу площади. Значение потока фотонов за импульс было взято 10^{12} , что соответствует значению, достигаемому на современных лазерах, а значение плотности потока фотонов $3.8 \cdot 10^6$ фот/Å², при которых проводились эти расчёты, превышает максимально достигнутое значение на настоящий момент в экспериментах с единичными биологическими частицами. В последующих работах кулоновский взрыв воспроизводился многократно в компьютерных симуляциях [79–80].

Параметрами падающего пучка, которые непосредственно определяют степень радиационного разрушения образца, являются плотность потока фотонов в падающем пучке и длительность импульса. В экспериментах с единичными молекулами желательнее, чтобы плотность потока фотонов в падающем пучке была как можно выше. Однако тогда и радиационное разрушение тоже будет значительным. Уменьшения радиационного разрушения можно было бы достигнуть, если бы длительность импульса была меньше времени перехода Оже [38, 46, 81]. Тогда уровень ионизации образца будет существенно ниже, и дифракция произойдет до распространения каскадов вторичных ионизаций. Для атома углерода время Оже составляет 10 фс, для атома серы 1.3 фс [82]. Fortmann-Grote с сотрудниками пришли к выводу, что в экспериментах с единичными частицами оптимальная длительность импульсов должна быть между 3 и 9 фс, причем 9 фс – более предпочтительное время, так как в этом случае дифракционный сигнал будет содержать существенно больше фотонов, что важно на следующем шаге для определения ориентации частицы [39]. Ранее была высказана идея, что для того, чтобы избежать радиационного разрушения, надо использовать импульс, длящийся несколько сотен аттосекунд [83]. На данный момент такая продолжительность импульса не достижима.

Однако, есть и более оптимистичные результаты. В работе [80] численное моделирование взаимодействия рентгеновского импульса и единичной молекулы лизоцима проводилось для двух значений потока фотонов на импульс 10^{12} и 10^{13} . Диаметр сфокусированного пучка предполагался равным 100 нм, что дает значения для плотности потока фотонов порядка 10^6 и 10^7 фот/Å². Заметим, что такие высокие

значения плотности потока фотонов пока еще не достигнуты на современных лазерах. Основываясь на численных экспериментах, авторы пришли к выводу, что для импульсов длительностью, не превышающей 50 фс, влияние радиационного разрушения незначительно и не превышает того влияния на дифракционную картину, которое обусловлено неоднородностью образцов. В работе [84] было изучено методами компьютерного моделирования влияние нестационарности атомных факторов рассеяния в мощном рентгеновском пучке на величины интенсивностей лучей, рассеиваемых биологическими макромолекулами. Было установлено, что изменения в дифракционной картине, вызванные временной зависимостью факторов рассеяния, пренебрежимо малы, если плотность потока фотонов в первичном пучке не превосходит 10^4 фотонов на квадратный ангстрем за время импульса, что отвечает мощности современных рентгеновских лазеров. Однако, расхождения становятся существенными и требуют внесения корректирующих поправок в схемы теоретического расчета картины дифракции, если плотность потока фотонов возрастает до 10^6 или 10^8 фотонов на квадратный ангстрем за импульс.

4. ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ОБЪЕКТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛАЗЕРОВ

4.1. Подача образцов в рентгеновский пучок

Не на всех станциях рентгеновских лазеров есть условия для проведения эксперимента с единичными частицами. (Соответствующая информация имеется на сайте каждого лазера). Например, на лазере LCLS на двух станциях, Coherent X-ray Imaging (CXI) и Atomic, Molecular & Optical Science (AMO), возможно проведение экспериментов с единичными частицами. На лазере EuXFEL эксперименты с единичными частицами в настоящий момент проводятся на станции SPB/SFX. Первый эксперимент, в которых была продемонстрирована возможность получения дифракционных картин от единичного некристаллического твердого образца на лазерах на свободных электронах и определения его структуры, были проведены на FLASH [85]. Первый эксперимент с биологическим образцом (мимивирусом) был проведен на лазере LCLS, на станции AMO [86]. В дальнейшем, эксперименты с единичными биологическими образцами (отдельными клетками, клеточными органеллами, бактериями и вирусами) проводились на лазерах LCLS, SACLA и EuXFEL. Ключевыми моментами для организации эксперимента с единичными частицами, наряду с поддержкой источника излучения и сложнейшего оборудования на станциях, являются наличие достаточного количества приблизительно одинаковых образцов единичных частиц и эффективная организация подачи образцов в рентгеновский пучок. Требование идентичности образцов вызвано тем, что для каждого образца регистрируется одна двумерная дифракционная картина (рентгенограмма, фрейм, кадр). Наличие большого количества двумерных дифракционных картин от приблизительно одинаковых объектов, отвечающих различным ориентациям объекта относительно рентгеновского пучка, позволяет надеяться, что, объединив все эти данные, удастся определить трехмерную структуру объекта. Методы подачи образцов в рентгеновский пучок в настоящее время тестируются и совершенствуются.

4.1.1. Подача образцов в виде аэрозоля

В настоящее время подача образцов в экспериментах с единичными частицами на лазерах на свободных электронах осуществляется двумя способами: подача в виде аэрозоля (в момент пересечения с импульсом лазера образцы находятся в газообразной фазе) и подача на закрепленных мишенях (при этом сами образцы могут быть как в

жидком субстрате, так и в твердом состоянии). В большей части проведенных экспериментов образцы подавались в виде аэрозоля [86–92]. При таком способе подачи целью является изолировать исследуемую частицу от окружающего ее жидкого раствора. Интенсивность дифракционного сигнала является суммой сигнала от исследуемой частицы и сигнала от окружающей частицы среды, в которой она поставляется в рентгеновский пучок. Сигнал от единичной некристаллической частицы даже при такой высокой интенсивности импульсов, как на лазерах на свободных электронах, является относительно слабым. Он значительно более слабый по сравнению с сигналом от кристаллов, и может быть более слабым, чем сигнал от растворителя. При аэрозольном способе подачи растворитель испаряется до того, как частица попадает в рентгеновский пучок. Таким образом, у частицы отсутствует жидкое окружение, оказывающее вклад в рассеяние и затрудняющее определение дифракционного сигнала, собственно, от исследуемой частицы.

Общая схема подачи образцов в этом случае включает перевод образцов из буферного раствора в состояние капель аэрозоля, подачу капель в вакуумную камеру, где капли испаряются, а исследуемые единичные частицы затем фокусируются аэродинамическими линзами на месте пересечения с рентгеновским импульсом.

Формирование капель аэрозоля осуществляется либо с помощью аэродинамического сопла (*gas-dynamic virtual nozzle, GDVN*), [93]) с использованием гелия, либо с помощью альтернативного метода – электроспрея [94, 95]. Сопло GDVN позволяет сжать жидкую струю, содержащую образцы, с помощью газового потока до нескольких микрометров. При использовании электроспрея поток частиц из раствора формируется под воздействием только электростатических сил без использования давления газа. Инжектор, созданный в Университете Упсалы, позволяют поставлять в пучок единичные частицы размером от 30 до 3000 нм. Скорость поступающих частиц зависит от их размера и скорости потока газа. Например, частицы размером меньше 100 нм имеют скорость до 200 м/с, а частицы, имеющие размер порядка микрометра, имеют скорость не больше 20 м/с [96].

В большей части проведенных экспериментов для подачи образцов использовались сопла GDVN. Использовать в качестве альтернативы соплам GDVN для формирования аэрозольных капель электроспрей было предложено относительно недавно [97]. Авторами были проведены эксперименты на лазере LCLS с несколькими разными биологическими образцами (карбоксисомы, вирус томатов TBSV и белок Rubisco). Авторы показали, что с помощью электроспрея удастся увеличить скорость подачи капель приблизительно в 15 раз по сравнению с использованием сопел GDVN, а также получить аэрозольные капли меньшего размера и с меньшим разбросом по размерам как для цукрозы, так и для биологических образцов. Большая скорость подачи может обеспечить в экспериментах более высокую частоту попадания рентгеновского пучка по частицам, а меньший размер аэрозольных капель обеспечивает меньшее количество загрязнений на поверхности аэрозольных капель. Капли аэрозоля имеют размер порядка микрометра и меньше и содержат разное число исследуемых частиц (каждая капля может содержать от нуля до нескольких частиц).

При подаче образцов в виде аэрозоля возникает целый ряд принципиальных сложностей, которые необходимо учитывать на следующих этапах при определении структуры:

- После испарения капель, в которых содержалось несколько частиц, возможно формирование несколько слипшихся частиц, т.е. может происходить агрегация исследуемых образцов, и в рентгеновский пучок, соответственно, может попасть как одна, так и несколько слипшихся частиц.

- Нелетучие химические соединения из раствора оседают на поверхности аэрозольных капель, и это приводит к дополнительному шуму и искажению дифракционных данных.

- Число попаданий лазерного импульса по исследуемым частицам является относительно низким, что вызывает необходимость готовить очень большое количество образцов. Например, подготовка образцов для одной ночной смены съемки данных на лазере EuXFEL заняла 10 месяцев.

В настоящее время конструкция аэрозольных инжекторов продолжает совершенствоваться. Основные направления совершенствования аэрозольных инжекторов на данный момент включают увеличение числа попаданий лазерного пучка по частицам, уменьшение остатков газа (например, гелия или диоксида углерода) в вакуумной камере, которые приводит к шуму в дифракционных данных, и уменьшение поломок инжекторов.

4.1.2. Подача образцов на твердых мишенях

В нескольких экспериментах, проведенных с единичными частицами на синхротронах, образцы закреплялись и подавались в луч на твердых мишенях [56, 98, 99]. Эксперимент в этом случае являлся модификацией стандартного рентгеновского кристаллографического эксперимента. Образец либо крепился на гониометрической головке и поворачивался во время эксперимента [56], либо для каждого образца снималась только одна дифракционная картина [98].

На лазерах на свободных электронах интенсивность пучка так высока, что образец, скорее всего, разрушается за один импульс. Поэтому, проведенные эксперименты с твердыми мишенями были организованы так, что в каждый лазерный импульс подавались новые образцы. Специально подготовленный чип с образцами закрепляют на механической установке в вакуумной камере. В качестве твердой основы для чипов используются, как правило, кремниевые мембраны или углеродные пленки. Во время эксперимента чип сдвигают перпендикулярно лазерному импульсу по растровой схеме так, чтобы каждое отделение чипа попало в новый импульс один раз. Необходимость проводить эксперимент в вакуумной камере диктуется необходимостью уменьшения шума в дифракционном сигнале, связанного с рассеянием на молекулах воздуха. Сам чип сконструирован по-разному в зависимости от того, в каком виде находятся исследуемые образцы. Использовались следующие варианты подачи образцов на твердых мишенях:

- Подача образцов в растворе. Этот вариант применяется с целью сохранить образцы (например, клетки) во время эксперимента в живом состоянии в окружении подобном тому, в котором они пребывают в природе. Тонкий слой образцов в окружении тонкого слоя растворителя помещается между двумя слоями Si_3N_4 мембраны в отделения специального чипа, которые образуют решетку. На лазере SACLA создана механическая установка для подачи образцов в лазерный пучок на твердых мишенях [100]. Чип закрепляется на этой механической установке в вакуумной камере. Во время эксперимента его сдвигают перпендикулярно лазерному импульсу по растровой схеме так, чтобы каждое отделение чипа попало один раз в новый импульс. Такой способ подачи образцов был применен для сбора данных на лазере SACLA для клеток из *Microbacterium lacticum* [58].

- Подача образцов в высушенном виде. Этот способ был применен в экспериментах с человеческими хромосомами [101]. Раствор хромосом помещался на специальную мембрану, промывался, а затем хромосомы высушивались либо на открытом воздухе, либо с использованием химических реактивов. Аналогичным образом был организован эксперимент на лазере LCLS, в котором высушенные образцы некристаллических амилоидных фибрилл подавались в рентгеновский импульс на графеновой подложке [102].

- Подача замороженных образцов при криогенных температурах на твердой мишени. Такой способ применяется с целью исследовать в эксперименте структуру неподвижных замороженных неразрушенных образцов. В этом варианте подачи используется та же растровая механическая установка в вакуумной камере. Однако, на установке закрепляется не чип со специальными отделениями, в которых находится жидкий раствор образцов, а мембрана с замороженными образцами после специальной процедуры быстрой заморозки. Мембрана крепится на металлический диск с окошечками. Во время эксперимента диск с образцами сдвигается каждый раз с шагом 25–50 микрон, чтобы обеспечить попадание в импульс новых свежих образцов. Такой способ подачи образцов был применен, например, на лазере SACLA в серии экспериментов с образцами хлоропластов из *Cyanidioschyzon melorae* и клеток из *Escherichia coli* [103].

4.2. Детекторы

Появление лазеров на свободных электронах, обладающих высокой частотой импульсов (например, до 4.5 МГц на EuXFEL) и высокой интенсивностью каждого импульса (например, каждый импульс на EuXFEL содержит до 10^{12} фотонов [104]) потребовало и создание новых детекторов, обладающих широким диапазоном чувствительности от 1 фотона до 10^4 фотонов на импульс на один пиксель и выше и высокой скоростью записи и считывания данных. Чувствительность детектора к отдельным фотонам особенно важна для экспериментов с единичными частицами, в которых интенсивность дифракции может составлять несколько фотонов на дифракционную картину [105].

Детектором, отвечающим этим требованиям, является, например, Adaptive Gain Integrating Pixel Detector (AGIPD) [106–108], разработанный к 2017 году и установленный на SPB/SFX станции EuXFEL. Отметим, что это не единственный детектор, использующийся на EuXFEL и на других лазерах на свободных электронах. Например, на LCLS используются pnCCD, CSPAD [109] и ePIX [110], на лазере SACLA используется MPCCD, а на SwissFEL установлен детектор adJUstiNg Gain detector FoR the Aramis User station (JUNGFRAU) [111, 112]. Детектор AGIPD относится к гибридным детекторам, что означает, что фотодиод и микроэлектроника принадлежат к разным блокам и могут быть улучшены независимо друг от друга. Детектор состоит из четырех одинаковых частей, каждая из которых может двигаться независимо от других и состоит из четырех панелей. Каждая панель представляет собой монолитный кремниевый сенсор и является отдельным устройством. Смещение частей детектора друг относительно друга позволяет создать горизонтальную щель между частями, а также пространство в центре для прохождения центральной части пучка сквозь детектор. Общее число пикселей (независимых регистрирующих элементов) составляет 1024×1024 , т.е. приблизительно около одного миллиона. Размер одного пикселя 200×200 мк. Каждый пиксель имеет аналоговую память и может хранить до 352 изображений. Детальное описание сенсорной части каждой панели и электронной аппаратуры можно найти в работах [108, 113]. Изображения накапливаются в памяти детектора в течение одной последовательности импульсов (“train”) и считываются во время промежутка между последовательностями импульсов, который на EuXFEL длится 99.4 мс. Детектор обладает низким уровнем шума, что позволяет регистрировать слабые сигналы всего от нескольких фотонов [108]. Детектор установлен на специальной платформе. Вакуумная камера, в которой происходит пересечение рентгеновского импульса с образцом, а также все устройства, расположенные далее по ходу рентгеновского луча, включая детектор, смонтированы на общей рельсовой системе, которая позволяет передвигать оборудование вдоль нее. В частности, это позволяе, двигая платформу с детектором,

изменять расстояние между областью пересечения импульса с образцом и детектором на EuXFEL от 120 мм до 6 метров [114].

4.3. Хранение рентгенограмм

Рентгеновский лазер генерирует импульсы пачками (или “поездами”, trains). На EuXFEL в одной пачке может быть до 2700 импульсов. За секунду генерируется 10 пачек. Каждый импульс дает одну необработанную дифракционную картину, которая содержит показания со всех пикселей детектора. Во время эксперимента на EuXFEL, в котором используется 1-мегапиксельный детектор, объем записываемых данных на один импульс лазера составляет 2 Мб, а за секунду объем данных может составить до 10 Гб [115]. Заметим, что строящийся в настоящий момент LCLS-II будет излучать до 1 миллиона импульсов в секунду. Такое большое количество необработанных данных, а также необходимых калибровочных параметров, потребовало на каждом лазере создания специальных систем контроля, обработки и хранения данных. Например, на EuXFEL во время эксперимента осуществляется автоматический контроль и непрерывное отображение основных параметров эксперимента с помощью системы Karabo [116], которая также позднее предоставляет для пользователя откалиброванные данные [117]. Все необработанные данные сохраняются для пользователей для последующего анализа на кластере Maxwell. От пользователя, в свою очередь, требуется знание спецификации формата HDF5, в котором хранятся данные, и умение работать с библиотеками, работающими с файлами в этом формате (например, с Python-библиотеками pandas и хатгау), а также знание современных инструментов для интерактивной работы с данными, например, Jupyter Notebooks.

4.4. Обработка рентгенограмм

После того, как дифракционный эксперимент проведен, т.е. собрано большое количество дифракционных картин, проводятся следующие основные этапы анализа и обработки данных:

- Оценка шума с целью вычитания его из полезного сигнала. Этот этап не всегда проводится первым. Часто осуществляется и после второго, и после третьего этапов.
- Отбор дифракционных картин, содержащих полезный сигнал, и их классификация. Отбор и классификацию проводят в разной последовательности, иногда в несколько этапов [118].
- Определение взаимной ориентации двумерных дифракционных картин. Построение трехмерной функции интенсивности дифракции $I(\mathbf{s}) = |\mathbf{F}(\mathbf{s})|^2$. Рассмотрим подробно каждый из этапов и возникающие проблемы.

В эксперименте собирается огромный набор рентгенограмм (“кадров”). Однако не все из них можно использовать на последующих этапах определения структуры. В подавляющем большинстве случаев не происходит пересечения рентгеновского импульса с образцом, и, соответственно, полученные кадры являются пустыми, т.е. содержат только шум (background noise), основной вклад в который дает фон с инжектора и рассеяние на молекулах газа в вакуумной трубе. Такие кадры необходимо отсортировать, в дальнейшем они могут быть использованы наравне с “темными прогонами” для оценки шума, который необходимо будет вычесть из рентгенограмм, содержащих полезный сигнал. Процедура отбора непустых кадров, содержащих сигнал рассеяния, в англоязычной литературе носит название hit finding. Ее можно выполнить с помощью программ Redflamingo, Hummingbird [119], Cheetah [120], CASS [121, 122], Psana [123]. Подчеркнем, что задача распознавания полезного сигнала и вычитания шума является весьма нетривиальной. Во-первых, во многих случаях интенсивность полезного сигнала очень мала. Во-вторых, экспериментальный шум не подчиняется Гауссовому распределению и меняется от кадра к кадру, что сильно усложняет задачу разделения

рассеянных частицей и "шумовых" фотонов, и, в конечном счете, сильно усложняет решение структуры (вплоть до того, что делает это решение невозможным).

После того, как непустые кадры отобраны, возникает задача их дальнейшей классификации. Среди непустых кадров есть рентгенограммы, полученные от пересечения луча с единичной частицей, от пересечения луча с одной и более единичными частицами, от пересечения с образовавшимися в эксперименте комплексами нескольких слившихся частиц, от пересечения с кластерами молекул газа или каплями воды. Для определения ориентации единичной частицы необходимо отобрать из всех дифракционных картин только те, которые соответствуют дифракции от одной единичной частицы. Для решения этой задачи были опробованы разные подходы. В работе Rose с соавторами [118] дано сравнение результатов применения двух разных подходов для отбора кадров, соответствующих единичной частице, к изначально одному и тому же экспериментальному набору непустых кадров. В первом подходе использовался метод диффузионных карт [124, 125], а во втором подходе использовалась многоступенчатая процедура отбора кадров в сочетании с методом главных компонент. Экспериментальные данные были получены на LCLS в экспериментах с единичными частицами бактериофага PR772. С помощью метода диффузионных карт из 44039 непустых кадров были отобраны 14772 [90]. Во втором подходе, авторы решили использовать не все 44039 кадров, а только достаточно сильные. Исходные 44039 кадры были сначала отсортированы в соответствии с величиной интегральной интенсивности, и для дальнейшего анализа сравнивались данные, отобранные при различных уровнях срезки. Необходимость подбирать разные уровни диктовалась тем, что, с одной стороны, авторы хотели отобрать как можно больше кадров с сильным сигналом, а с другой стороны, среди кадров с сильным сигналом имелись кадры с рассеянием от нескольких частиц. Хотелось бы, чтобы относительное количество таких кадров было невелико. Дальнейшие процедуры авторы проводили для трех различных значений уровня срезки. Перед тем, как применить метод главных компонент, было произведено сжатие данных. В недавней работе [127] было показано, что размытость (слабость) сигнала сама по себе не является проблемой. Видимо, основной проблемой является все же наличие изменяющегося шума.

В работе [128] авторы модифицировали экспериментальные данные, снятые ранее на LCLS. Авторы попытались симулировать либо дифракцию от меньшей частицы, либо более слабую интенсивность дифракции. Ослабление экспериментальных данных авторы имитировали в двух вариантах: уменьшение количества фотонов и уменьшение количество дифракционных картин. Вместо 14772 рентгенограмм авторы случайным образом отбирали 8192, 4096, 20148, 1024 и 512. Было показано, что даже когда реальные экспериментальные данные были ослаблены, удавалось определить структуру объекта.

Существенной проблемой при обработке данных, полученных в рамках проточной схемы организации эксперимента, является то, что исследуемые частицы попадают в рентгеновский пучок в произвольных, заранее неизвестных ориентациях. "Пост-экспериментальное" определение взаимной ориентации экспонированных частиц необходимо для правильного индицирования рентгенограмм, т.е. для определения для каждой точки двумерной рентгенограммы соответствующего ей трехмерного вектора рассеяния (3). Для решения этой задачи был предложен ряд подходов.

Наиболее известным подходом к решению задачи определения ориентации единичной частицы является метод общих дуг (Common arc) – метод, в основе которого лежит та же идея, что и в методе Common lines, который применяется в задачах в электронной микроскопии. В основе метода лежит следующая идея. Все вектора рассеяния, отвечающие пикселям матрицы детектора, лежат на сферической поверхности радиуса $1/\lambda$, проходящей через начало координат обратного пространства (рис. 2). При повороте объекта происходит вращение этой сферической поверхности.

Поверхности, отвечающие двум разным ориентациям объекта, имеют общую линию пересечения, которой отвечают кривые с совпадающими значениями интенсивности на двух рентгенограммах. Нахождение на двух рентгенограммах таких совпадающих по интенсивностям кривых дает возможность определить взаимную ориентацию частиц в моменты экспонирования. Однако применение такого подхода затруднено при работе со сложными объектами в условиях эксперимента с высоким уровнем шума.

Среди алгоритмов, которые разрабатываются для решения данной задачи, наиболее продвинутым на данный момент является так называемый Expand-Maximize-Compress (EMC) алгоритм [129], реализованный в программе Dragonfly [130]. Подчеркнем, что этот алгоритм был применен не только к модельным данным, а также к реальным экспериментальным дифракционным данным, снятым на LCLS. Впервые он был успешно применен при решении структуры мимивируса [89], а затем при решении структуры бактериофага PR772 [118] и Мельбурн-вируса [92]. Этот алгоритм представляет собой итерационную процедуру. На каждом шаге этой процедуры для некоторой пробной модели рассчитывается набор дифракционных картин, соответствующих ее разным ориентациям (Expansion step). Затем для каждой из полученных в эксперименте дифракционных картин и каждой из рассчитанных картин рассчитывается некоторая функция, которая характеризует их степень похожести. Новая пробная модель собирается из экспериментальных дифракционных картин. При этом происходит не прямая замена рассчитанных на предыдущем этапе дифракционных картин на экспериментальные дифракционные картины, а каждая новая “пробная” дифракционная картина является суммой всех дифракционных картин с весами, определенными на предыдущем шаге Maximization.

Для планирования эксперимента с единичными частицами на рентгеновских лазерах могут быть полезны программы численного моделирования такого эксперимента. Пользователь может воспользоваться, например, программными комплексами S2Esim [131], созданным на EuXFEL, и Condor [132], созданным в Университете Уппсалы (Швеция).

5. ТРЕХМЕРНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЧАСТИЦ ПО ДАННЫМ РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЙНИЯ

5.1. Виртуальный кристалл

Теоретически, рентгеновский дифракционный эксперимент с изолированной частицей позволяет определить интенсивности рассеянных волн $I(\mathbf{s}) = |\mathbf{F}(\mathbf{s})|^2$ для всех векторов рассеяния \mathbf{s} , отвечающих условию $|\mathbf{s}| \leq d_{\text{lim}}^{-1}$ с $d_{\text{lim}} = \lambda/2$, где λ – длина волны используемого излучения. Аналитические свойства преобразования Фурье функции с финитным носителем, теоретически, позволяют экстраполировать эти значения на все вектора обратного пространства $\mathbf{s} \in \mathbf{R}^3$, однако практического алгоритма для осуществления такой экстраполяции на сегодняшний день не существует [1, 133]. На практике, результатом эксперимента является дискретный набор рентгенограмм, отвечающих разным ориентациям объекта относительно первичного пучка, каждая из которых содержит информацию для дискретного набора пикселей матрицы детектора. Вектора рассеяния \mathbf{s} , отвечающие пикселям отдельной рентгенограммы, располагаются на поверхности одной из сфер (радиуса $1/\lambda$) в обратном пространстве, проходящей через начало координат. Дискретизация экспериментального набора данных заключается в интерполяции измеренных значений на регулярную решетку $\mathfrak{R}' = \{\mathbf{s}_{hkl}\}$ в обратном пространстве:

$$\mathbf{s}_{hkl} = h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^*, \quad h, k, l - \text{целые.} \quad (11)$$

Здесь $\mathbf{a}^*, \mathbf{b}^*, \mathbf{c}^*$ – выбранные вектора, задающие базис решетки. В случае работы с кристаллическим объектом, выбор базиса $\mathbf{a}^*, \mathbf{b}^*, \mathbf{c}^*$ предопределен: это вектора, сопряженные векторам $\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}$, задающим элементарную ячейку кристалла. Узлы решетки \mathcal{R}' в этом случае – это брэгговские рефлексы, т.е. именно те рефлексы, для которых эксперимент позволяет измерить интенсивности, и которые необходимы для расчета электронной плотности в виде ряда Фурье (9). При работе с изолированной частицей, вектора $\mathbf{a}^*, \mathbf{b}^*, \mathbf{c}^*$ могут выбираться достаточно произвольно [1, 133]. Как правило, они выбираются ортогональными и равной длины. Параллелепипед V , построенный на сопряженных им векторах $\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}$, может быть назван виртуальной кристаллической ячейкой. Ряд Фурье (9), рассчитанный по набору рефлексов \mathcal{R}' , является периодической функцией, каждая элементарная ячейка которой содержит изображение одной частицы, окруженной областью с нулевой электронной плотностью ("областью растворителя"). Выбор периодов $\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}$ виртуального кристалла, существенно превышающих (по крайней мере, вдвое) предел Найквиста, или, что то же, выбор достаточно малых шагов дискретизации $\mathbf{a}^*, \mathbf{b}^*, \mathbf{c}^*$, позволяет сформулировать задачу расшифровки структуры, как стандартную задачу рентгеноструктурного анализа: зная набор модулей структурных факторов для (виртуальной) кристаллической структуры, восстановить распределение электронной плотности в ней [1].

5.2. Проекционные методы для восстановления электронной плотности

Свобода в выборе размеров элементарной ячейки виртуального кристалла при исследовании изолированных частиц позволяет иметь дело с ячейками, значительная часть которых занята растворителем. Такая ситуация особенно благоприятна для использования при решении фазовой проблемы предложенных в 70-х годах XX века методов "модификации электронной плотности" [134–138], в частности, "сглаживания растворителя" (solvent flattening) [134, 139, 140]. В общих чертах, метод, в предположении, что проведено разделение элементарной ячейки на область молекулы и область растворителя, состоит из циклического применения двух шагов:

- А. Сглаживание растворителя. Рассчитанное каким-либо образом распределение электронной плотности модифицируется: его значения в области, занятой растворителем, принудительно обнуляются.
- Б. Подмена модулей. По модифицированному распределению плотности рассчитываются по формуле (8) структурные факторы $F^{calc}(\mathbf{s})\exp i\varphi^{calc}(\mathbf{s})$, и их фазы используются вместе с экспериментальными значениями модулей $F^{obs}(\mathbf{s})$ для расчета нового распределения плотности по формуле (9).

Математически, операция обнуления плотности в области растворителя и операция подмены модулей в синтезе Фурье могут быть названы проекторами. Цель применения процедуры – найти распределение электронной плотности, которое одновременно имеет правильные (экспериментальные) значения модулей структурных факторов и равно (или близко к) нулю в области растворителя.

Скорость сходимости итерационной процедуры может быть увеличена путем использования так называемых рефлекторов. Для проектора P рефлектор R определяется равенством $R = 2P - I$, где I – тождественный оператор. Рефлектор усиливает тенденцию изменения объекта, вносимую проектором. Так, если действие проектора зануления плотности в области растворителя заключается в замене значения ρ на 0, то действие рефлектора заключается в замене его на $-\rho$. Действие рефлектора, соответствующего

операции подмены модулей, заключается в расчете синтеза Фурье (9) с коэффициентами $(2F^{obs}(\mathbf{s}) - F^{calc}(\mathbf{s})) \exp i\phi^{calc}(\mathbf{s})$. Использование рефлекторов может существенно ускорять сходимость, но может при этом делать процедуру менее устойчивой. Поэтому предложены многочисленные подходы, основанные на различном чередовании указанных двух пар проекторов и рефлекторов [135, 139, 141–145]. Все описанные в разделе 6 примеры определения структур изолированных частиц были получены с использованием тех или иных модификаций этих методов.

5.3. Связные маски области молекулы как инструмент для решения фазовой проблемы

Описанные выше методы, использующие сглаживание растворителя, предполагают, что известна маска области молекулы, т.е. указано, какие точки виртуальной элементарной ячейки принадлежат области молекулы, а какие нет. На начальной стадии исследования эта информация отсутствует, и неправильное задание области молекулы может привести к неправильным результатам. Предложен ряд подходов к определению (уточнению) границ области молекулы на основе фильтрации сильно зашумленных синтезов Фурье [140, 146–148]. Следует также отметить, что итерационные процедуры могут оказываться расходящимися, сходятся к ложным решениям или застревать в некоторых критических точках. Предложенная ранее процедура решения фазовой проблемы на основе случайного поиска связной маски молекулы [149–153] может служить предваряющей итерационные процедуры стадией решения фазовой проблемы. Основой подхода является генерация случайным образом большого количества (миллионов) гипотетических связных масок области молекулы. Сгенерированная маска считается допустимой, если рассчитанные по ней модули структурных факторов достаточно точно воспроизводят их экспериментальные значения. Допустимые маски запоминаются для дальнейшего использования. Процесс генерации продолжается до тех пор, пока не набрано оговоренное количество (например, 100) допустимых масок. Наборы структурных факторов, отвечающих отобранным маскам, выравниваются и усредняются. Найденные значения фаз могут быть использованы для расчета синтеза Фурье или в качестве входных данных для программ уточнения значений фаз.

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЧАСТИЦ. ПРИМЕРЫ.

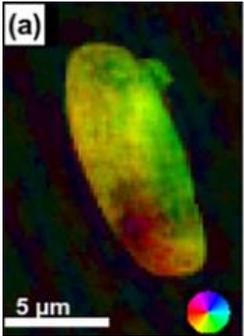
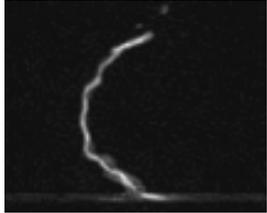
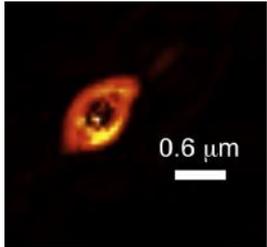
В течение последнего десятилетия на лазерах на свободных электронах был проведен ряд экспериментов, в которых была получена дифракция от единичных биологических частиц [11, 58, 86, 88–90, 92, 118, 154–158]. Само проведение таких экспериментов сопряжено с преодолением многочисленных экспериментальных трудностей и является большим достижением биологической кристаллографии.

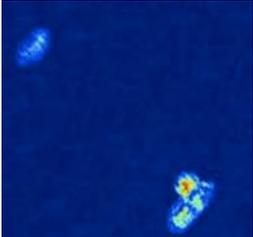
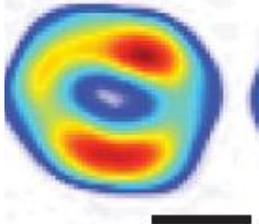
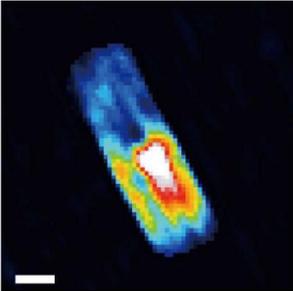
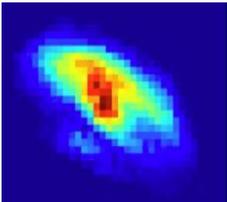
В численных экспериментах, используя смоделированные данные, было показано, что при современных параметрах лазеров на свободных электронах решение структур изолированных частиц является осуществимой задачей [159]. Кроме того, имеются и экспериментальные работы, проведенные на синхротронах, в которых была воссоздана геометрия эксперимента, соответствующая лазерам на свободных электронах, и было продемонстрировано, что даже несмотря на слабость и размазанность сигнала на детекторе, реконструкция трехмерного объекта вполне возможна [127]. Однако, в условиях реального эксперимента с единичными биологическими частицами появляется целый ряд факторов, сильно усложняющих эту задачу. К таким факторам относятся, в первую очередь, неоднородность частиц, которые подаются в пучок (все частицы не точно одинакового размера, возможно также наличие примесей, возможно образование комплексов исследуемых частиц с примесями, а также образование комплексов частиц

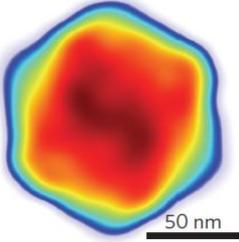
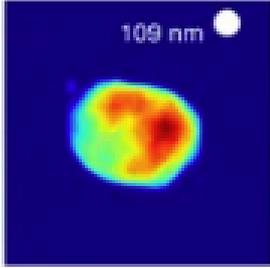
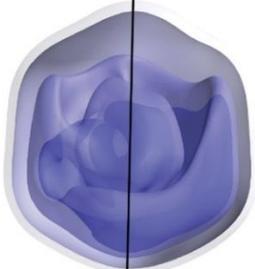
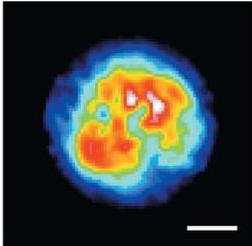
друг с другом), и наличие шума, который не удастся адекватно смоделировать и который, возможно, меняется в ходе эксперимента.

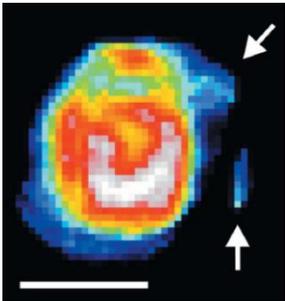
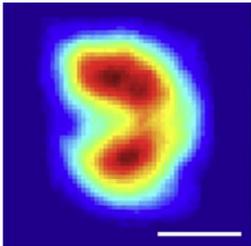
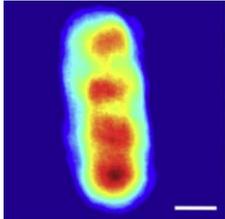
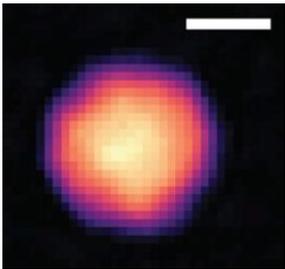
На настоящий момент лишь для небольшого числа единичных частиц сделана реконструкция, и лишь для нескольких из них эта реконструкция является трехмерной (см. таблицу 1). Однако приходится признать, что эти результаты пока не выглядят достаточным доказательством того, что методика определения трехмерной структуры отработана. Полученное разрешение является весьма низким. Вследствие этого финальные реконструкции дают достаточно грубое представление о форме объекта, реконструированные частицы похожи одна на другую.

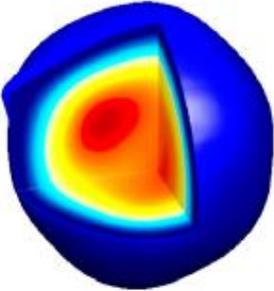
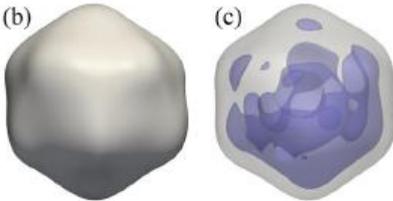
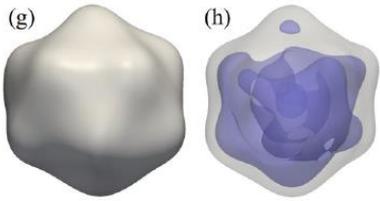
Таблица 1. Изолированные (некристаллические) биологические объекты, структура которых была определена по экспериментальным данным, собранным на лазерах на свободных электронах

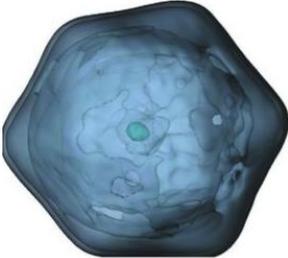
<p>Биологический объект. Место сбора данных, длина волны. Способ подачи объекта. Публикация. Код в банке CXIDB [160].</p>	<p>Размер объекта. Полученное изображение объекта. Авторская оценка разрешения полученного изображения.</p>	<p>Комментарии</p>
<p>Клетки из диатомовых водорослей <i>Navicula perminuta</i>. FLASH, 8 нм Si₃N₄ мембрана [154]</p>	 <p>Разрешение: 380 нм (Источник: [154])</p>	<p>Разрешение ограничено размерами детектора. Двумерная реконструкция. Проекционные методы [143].</p>
<p>Бактериальные клетки: <i>Spiroplasma melliferum</i>, <i>Prochlorococcus marinus</i>, <i>Synechococcus elongatus</i> FLASH, 13.5 нм Si₃N₄ мембрана [155]</p>	<p><i>S. melliferum</i>, размер 5 мкм × 0.15 мкм</p>  <p>Разрешение: 31 нм</p> <p><i>P. marinus</i>, размер 0.5</p>  <p>Разрешение: 83 нм</p>	<p>Двумерная реконструкция. Проекционные методы [143].</p>

<p>Биологический объект. Место сбора данных, длина волны. Способ подачи объекта. Публикация. Код в банке CXIDB [160].</p>	<p>Размер объекта. Полученное изображение объекта. Авторская оценка разрешения полученного изображения.</p>	<p>Комментарии</p>
	<p><i>S. elongatus</i>, размер 1.5 мкм × 0.8 мкм</p>  <p>Разрешение: 38 нм (Источник: [155])</p>	
<p><i>Acanthamoeba polyphaga</i> mimivirus LCLS, 6.9Å Аэрозоль [86] CXIDB ID 1</p>	<p>Размер: 450 нм</p>  <p>200 нм</p> <p>Разрешение: 32 нм (Источник: [155])</p>	<p>Двумерная реконструкция. Проекционные методы [143].</p>
<p>Клетки из <i>Microbacterium lacticum</i> cells SACLA, 2.25Å Кассеты с резервуарами [58]</p>	<p>Размер: 194нм × 570нм</p>  <p>Разрешение: 37 нм (Источник: [58])</p>	<p>Двумерная реконструкция. Проекционные методы [143].</p>
<p>РНК-интерферирующие микрогубки (RNAi microsponges) SACLA, 2.48Å Многооконные Si₃N₄ мембраны [156]</p>	<p>Размер: 650нм × 820нм</p>  <p>Разрешение: 70 нм (Источник: [156])</p>	<p>Двумерная реконструкция. Проекционные методы [143].</p>

<p>Биологический объект. Место сбора данных, длина волны. Способ подачи объекта. Публикация. Код в банке CXIDB [160].</p>	<p>Размер объекта. Полученное изображение объекта. Авторская оценка разрешения полученного изображения.</p>	<p>Комментарии</p>
<p>Карбоксисомы из <i>Halothiobacillus neapolitanus</i> LCLS Аэрозоль [87] CXIDB ID 25</p>	<p>Размер: 115нм</p>  <p>Разрешение: 18.1 нм (Источник: [87])</p>	<p>Трехмерная реконструкция. Проекционные методы [143].</p>
<p>Клетки цианобактерий <i>Cyanobium gracile</i>, <i>Synechococcus elongatus</i> LCLS Аэрозоль [88] CXIDB ID 26</p>	<p>Размер клеток: 0.25–0.4 мкм – ширина 0.4–4.0 микрон – длина</p>  <p>Разрешение: 109 нм. (Источник: [88])</p>	<p>Двумерная реконструкция. Проекционные методы [143].</p>
<p><i>Acanthamoeba polyphaga</i> mimivirus LCLS Аэрозоль [89] CXIDB ID 30</p>	<p>Размер частицы 450 нм</p>  <p>Разрешение: 125 нм (Воспроизводится с разрешения от [89] ©American Physical Society, 2015).</p>	<p>Трехмерная реконструкция. Проекционные методы [143].</p>
<p>Хлоропласты из красных водорослей <i>Cyanidioschyzon</i> <i>terolae</i> мини клетки из <i>E. coli</i> strain ME8077 SACLA Фиксация на углеродной мембране [103]</p>	<p>Хлоропласт, размер частицы 1.7 мкм</p>  <p>500нм</p>	<p>Двумерная реконструкция. Проекционные методы [143].</p>

<p>Биологический объект. Место сбора данных, длина волны. Способ подачи объекта. Публикация. Код в банке CXIDB [160].</p>	<p>Размер объекта. Полученное изображение объекта. Авторская оценка разрешения полученного изображения.</p>	<p>Комментарии</p>
	<p>Мини-клетка, размер 800нм</p>  <p>500нм Разрешение 52 нм (Источник: [103])</p>	
<p>Клетки бактерий <i>Staphylococcus aureus</i> SACLА Si₃N₄ мембрана [161]</p>	<p>Две связанные дочерние клетки</p>  <p>300нм Разрешение 143.5нм</p> <p>4 связанные дочерние клетки.</p>  <p>300нм Разрешение 54нм (Источник: [161])</p>	<p>Двумерная реконструкция. Проекционные методы [143].</p>
<p>Вирус Omono river LCLS Аэрозоль [91] CXIDB ID 56</p>	<p>Размеры частиц 35 – 300 нм 20 нм</p>  <p>Разрешение 13.5нм. (Источник: [91])</p>	<p>Двумерная реконструкция. Проекционные методы [143].</p>

<p>Биологический объект. Место сбора данных, длина волны. Способ подачи объекта. Публикация. Код в банке CXIDB [160].</p>	<p>Размер объекта. Полученное изображение объекта. Авторская оценка разрешения полученного изображения.</p>	<p>Комментарии</p>
<p>Бактериофаг PR772 LCLS Аэрозоль [162] Сбор данных [90] CXIDB ID 58</p>	<p>Размер 70нм</p>  <p>Разрешение 9 нм (Источник: [90])</p>	<p>Трехмерная реконструкция. Проекционные методы [143].</p>
<p>Вирус карликовости риса LCLS Аэрозоль [78] Сбор данных [77] CXIDB ID 36</p>	<p>Размер 69–72 нм</p>  <p>Разрешение 17.7 нм (Источник: [78])</p>	<p>Трехмерная реконструкция. Проекционные методы [143].</p>
<p>Бактериофаг PR772 LCLS [78] Сбор данных [90]</p>	<p>Размер частицы 67.5–70.5 нм</p>  <p>Разрешение 17.7 нм (Источник: [78])</p>	<p>Трехмерная реконструкция. Проекционные методы [143].</p>
<p>Бактериофаг PR772 LCLS [118] Сбор данных [90]</p>	<p>Размер частицы 68.5 нм</p>  <p>Разрешение 9 нм. (Источник: [118])</p>	<p>Трехмерная реконструкция. Проекционные методы [143].</p>

<p>Биологический объект. Место сбора данных, длина волны. Способ подачи объекта. Публикация. Код в банке CXIDB [160].</p>	<p>Размер объекта. Полученное изображение объекта. Авторская оценка разрешения полученного изображения.</p>	<p>Комментарии</p>
<p>Вирус Melbourne (MelV) LCLS Аэрозоль [92]</p>	<p>Размер частицы 230 нм</p>  <p>Разрешение 28 нм (Источник: [92])</p>	<p>Трехмерная реконструкция. Проекционные методы [143].</p>

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы во многих научных областях, в том числе, и в исследованиях дифракции от единичной частицы, все большее распространение получает подход открытых научных исследований и создание больших научных консорциумов, объединяющих специалистов в разных областях. Осенью 2014 на конференции в SLAC более чем 100 ученых объявили о создании международного консорциума, известного под названием Single Particle Imaging Initiative (SPI). Была принята программа, так называемая “дорожная карта” [163]. Целью было объявлено определение структуры изолированных биологических частиц на атомном разрешении. Через два года участники консорциума опубликовали данные, собранные для вируса рисовой мозаики до разрешения 5.9 Å [77]. (Лучшее разрешение для решенных некристаллических биологических структур на данный момент оценивается 9 нм [162]). Данные для этого эксперимента с вирусом рисовой мозаики, как и для ряда других дифракционных экспериментов с изолированными биологическими частицами, находятся в открытом доступе в банке Coherent X-ray Imaging Data Bank CXIDB [160]. Там же находятся протоколы обработки для многих экспериментов. Исходные коды программ можно загрузить из Github, а также можно принять участие в их создании, т.е. тексты программных комплексов создаются исследователями из разных групп. С началом работы европейского лазера в этой области продолжается такой стиль работы большими научными объединениями [134]. Усилия ученых из многих стран направлены на совершенствование методики эксперимента на всех его этапах и решение многих принципиальных проблем, описанных в данном обзоре.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-14-50165. Авторы выражают благодарность Н.Л. Луниной за помощь в подготовке рукописи.

Funding: The reported study was funded by RFBR, project number 19-14-50165.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лунин В.Ю., Лунина Н.Л., Петрова Т.Е. Исследование одиночных частиц дифракционными методами. Кристаллографический подход. *Математическая биология и биоинформатика*. 2019. Т. 14. № 5. С. 44–60. doi: [10.17537/2019.14.t44](https://doi.org/10.17537/2019.14.t44).
2. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. *Механика*. М.: Наука, 1973. 208 с.
3. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. *Теория поля*. М.: Наука, 1973. 504 с.
4. Urzhumtsev A.G., Lunin V.Y. Introduction to crystallographic refinement of macromolecular atomic models. *Crystallography Reviews*. 2019. V. 25. P. 164–262. doi: [10.1080/0889311X.2019.1631817](https://doi.org/10.1080/0889311X.2019.1631817).
5. Бландел Т., Джонсон Л. *Кристаллография белка*. М.: МИР, 1979. 620 с.
6. Сердюк И., Закаи Н., Закаи Дж. *Методы в молекулярной биофизике. Структура. Функция. Динамика*. Т. 2. М: КДУ, 2010. 733 с.
7. Rupp B. *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Applications to Structural Biology*. New York: Garland Science, Taylor and Francis Group, 2010. P. xxi + 809.
8. Urzhumtseva L., Klaholz B., Urzhumtsev A. On effective and optical resolutions of diffraction data sets. *Acta Crystallographica D*. 2013. V. 69. P. 1921–1934. doi: [10.1107/S0907444913016673](https://doi.org/10.1107/S0907444913016673).
9. Van Heel M., Schatz M. Fourier shell correlation threshold criteria. *J. Struct. Biol.* 2005. V. 151. P. 250–262. doi: [10.1016/j.jsb.2005.05.009](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.05.009).
10. Van Heel M., Schatz M. Reassessing the Revolution’s Resolutions. *bioRxiv*. 2017. Article No. 224402. doi: [10.1101/224402](https://doi.org/10.1101/224402).
11. Sobolev E., Zolotarev S., Giewekemeyer K., Bielecki J., Okamoto K., Reddy H.K.N., Andreasson J., Ayer K., Barak I., Bari S. et al. Megahertz single-particle imaging at the European XFEL. *Communications Physics*. 2020. V. 3. Article No. 97. doi: [10.1038/s42005-020-0362-y](https://doi.org/10.1038/s42005-020-0362-y).
12. Georgescu I. The first decade of XFELs. *Nature Reviews Physics*. 2020. V. 2. Article No. 345. doi: [10.1038/s42254-020-0204-6](https://doi.org/10.1038/s42254-020-0204-6).
13. Margaritondo G., Ribič P.R. A simplified description of X-ray free-electron lasers. *J. Synchrotron Radiation*. 2011. V. 18. P. 101–108. doi: [10.1107/S090904951004896X](https://doi.org/10.1107/S090904951004896X).
14. Pellegrini C. The history of X-ray free-electron lasers. *Eur. Phys. J. H*. 2012. V. 37. P. 659–708. doi: [10.1140/epjh/e2012-20064-5](https://doi.org/10.1140/epjh/e2012-20064-5).
15. White T.A., Mariani V., Brehm W., Yefanov O., Barty A., Beyerlein K.R., Chervinskii F., Galli L., Gati C., Nakane T. et al. Recent developments in CrystFEL. *J. Appl. Cryst.* 2016. V. 49. P. 680–689. doi: [10.1107/S1600576716004751](https://doi.org/10.1107/S1600576716004751).
16. 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. 73–77. doi: [10.1038/nature09750](https://doi.org/10.1038/nature09750).
17. Boutet S., Lomb L., Williams G.J., Barends T.R., 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. doi: [10.1126/science.1217737](https://doi.org/10.1126/science.1217737).
18. 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. doi: [10.1073/pnas.1204598109](https://doi.org/10.1073/pnas.1204598109).
19. Kupitz C., Basu S., Grotjohann I., Fromme R., Zatsepin N.A., Rendek K.N., Hunter M.S., Shoeman R.L., White T.A., Wang D. et al. Serial time-resolved crystallography of photosystem II using a femtosecond X-ray laser. *Nature*. 2014. V. 513. P. 261–265. doi: [10.1038/nature13453](https://doi.org/10.1038/nature13453).

20. Sierra R.G., Gati C., Laksmono H., Dao E.H., Gul S., Fuller F., Kern J., Chatterjee R., Ibrahim M., Brewster A.S. et al. Concentric-flow electrokinetic injector enables serial crystallography of ribosome and photosystem II. *Nat. Methods*. 2016. V. 13. P. 59–62. doi: [10.1038/nmeth.3667](https://doi.org/10.1038/nmeth.3667).
21. Liu W., Wacker D., Gati C., Han G.W., James D., Wang D., Nelson G., Weierstall U., Katritch V., Barty A. et al. Serial femtosecond crystallography of G protein-coupled receptors. *Science*. 2013. V. 342. P. 1521–1524. doi: [10.1126/science.1244142](https://doi.org/10.1126/science.1244142).
22. Kang Y., Zhou X.E., Gao X., He Y., Liu W., Ishchenko A., Barty A., White T.A., Yefanov O., Han G.W. et al. Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature*. 2015. V. 523. P. 561–567. doi: [10.1038/nature14656](https://doi.org/10.1038/nature14656).
23. 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. *Nat Methods*. 2012. V. 9. P. 263–265. doi: [10.1038/nmeth.1867](https://doi.org/10.1038/nmeth.1867).
24. Johansson L.C., Arnlund D., Katona G., White T.A., Barty A., DePonte D.P., Shoeman R.L., Cecilia Wickstrand C., Sharma A., Williams G.J. et al. Structure of a photosynthetic reaction centre determined by serial femtosecond crystallography. *Nat. Commun*. 2013. V. 4. Article No. 2911. doi: [10.1038/ncomms3911](https://doi.org/10.1038/ncomms3911).
25. Weierstall U., James D., Wang C., White T.A., Wang D., Liu W., Spence J.C.H., Doak R.B., Nelson G., Fromme P. et al. Lipidic cubic phase injector facilitates membrane protein serial femtosecond crystallography. *Nat. Commun*. 2014. V. 5 Article No. 3309. doi: [10.1038/ncomms4309](https://doi.org/10.1038/ncomms4309).
26. Gati C., Oberthuer D., Yefanov O., Bunker R.D., Stellato F., Chiu E., Yeh S.M., Aquila A., Basu S., Bean R. et al. Atomic structure of granulins determined from native nanocrystalline granulovirus using an X-ray free-electron laser. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. P. 2247–2252. doi: [10.1073/pnas.1609243114](https://doi.org/10.1073/pnas.1609243114).
27. Grünbein M.L., Bielecki J., Gorel A., Stricker M., Bean R., Cammarata M., Dörner K., Fröhlich L., Hartmann E., Hauf S. et al. Megahertz data collection from protein microcrystals at an X-ray free-electron laser. *Nat. Commun*. 2018. V. 9. Article No. 3487. doi: [10.1038/s41467-018-05953-4](https://doi.org/10.1038/s41467-018-05953-4).
28. Wiedorn M.O., Oberthür D., Bean R., Schubert R., Werner N., Abbey B., Aepfelbacher M., Adriano L., Allahgholi A., Al-Qudami N. et al. Megahertz serial crystallography. *Nat. Commun*. 2018. V. 9. Article No. 4025. doi: [10.1038/s41467-018-06156-7](https://doi.org/10.1038/s41467-018-06156-7).
29. Gisriel C., Coe J., Letrun R., Yefanov O.M., Luna-Chavez C., Stander N.E., Lisova S., Mariani V., Kuhn M., Aplin S. et al. Membrane protein megahertz crystallography at the European XFEL. *Nat. Commun*. 2019. V. 10. Article No. 5021. doi: [10.1038/s41467-019-12955-3](https://doi.org/10.1038/s41467-019-12955-3).
30. Glowacka J.M., Cryan J., Andreasson J., Belkacem A., Berrah N., Blaga C., Bostedt C., Bozek J., DiMauro L., Fang L. et al. Time-resolved pump-probe experiments at the LCLS. *Opt. Express*. 2010. V. 18. P. 17620–17630. doi: [10.1364/OE.18.017620](https://doi.org/10.1364/OE.18.017620).
31. 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. et al. Time-resolved protein nanocrystallography using an X-ray free-electron laser. *Opt. Express*. 2012. V. 20. P. 2706–2716. doi: [10.1364/OE.20.002706](https://doi.org/10.1364/OE.20.002706).
32. Tenboer J., Basu S., Nadia Zatsepin N., Pande K., Milathianaki D., Frank M., Hunter M., Boutet S., Williams G.J., Koglin J.E. et al. Time-resolved serial crystallography captures high-resolution intermediates of photoactive yellow protein. *Science*. 2014. V. 346. P. 1242–1246. doi: [10.1126/science.1259357](https://doi.org/10.1126/science.1259357).
33. Barends T.R., Foucar L., Ardevol A., Nass K., Aquila A., Botha S., Doak R.B., Falahati K., Hartmann E., Hilpert M. et al. Direct observation of ultrafast collective

- motions in CO myoglobin upon ligand dissociation. *Science*. 2015. V. 350. P. 445–450. doi: [10.1126/science.aac5492](https://doi.org/10.1126/science.aac5492).
34. Pande K., Hutchison C.D.M., Groenhof G., Aquila A., Robinson J.S., Tenboer J., Basu S., Boutet S., DePonte D.P., Liang M. et al. Femtosecond structural dynamics drives the trans/cis isomerization in photoactive yellow protein. *Science*. 2016. V. 352. P. 725–729. doi: [10.1126/science.aad5081](https://doi.org/10.1126/science.aad5081).
 35. Kubo M., Nango E., Tono K., Kimura T., Owada S., Song C., Mafuné F., Miyajima K., Takeda Y., Kohno J.Y. et al. Nanosecond pump–probe device for time-resolved serial femtosecond crystallography developed at SACLA. *J. Synchrotron Radiat.* 2017. V. 24. P. 1086–1091. doi: [10.1107/S160057751701030X](https://doi.org/10.1107/S160057751701030X).
 36. Pandey S., Bean R., Sato T., Poudyal I., Bielecki J., Villarreal J.C., Yefanov O., Mariani V., White T.A., Kupitz C. et al. Time-resolved serial femtosecond crystallography at the European XFEL. *Nat. Methods*. 2020. V. 17. P. 73–78. doi: [10.1126/science.aad5081](https://doi.org/10.1126/science.aad5081).
 37. Лунин В.Ю., Лунина Н.Л., Петрова Т.Е. Биологическая кристаллография без кристаллов. *Математическая биология и биоинформатика*. 2017. 12. P. 55–72. doi: [10.17537/2017.12.55](https://doi.org/10.17537/2017.12.55).
 38. 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. doi: [10.1038/35021099](https://doi.org/10.1038/35021099).
 39. Cryan J.P., Glowonia J.M., Andreasson J., Belkacem A., Berrah N., Blaga C.I., Bostedt C., Bozek J., Buth C., DiMauro L.F. et al. Auger electron angular distribution of double core-hole states in the molecular reference frame. *Phys. Rev. Lett.* 2010. V. 105. Article No. 083004. doi: [10.1103/PhysRevLett.105.083004](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.105.083004).
 40. Chapman H.N., Yefanov O.M., Ayyer K., White T.A., Barty A., Morgan A., Mariani V., Oberthuer D., Pande K. Continuous diffraction of molecules and disordered molecular crystals. *J. Appl. Crystallogr.* 2017. V. 50. P. 1084–1103. doi: [10.1107/S160057671700749X](https://doi.org/10.1107/S160057671700749X).
 41. Hau-Riege S.P., London R.A., Szoke A. Dynamics of biological molecules irradiated by short x-ray pulses. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 2004. V. 69. Article No. 051906. doi: [10.1103/PhysRevE.69.051906](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.69.051906).
 42. 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. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 2012. V. 86. Article No. 051911. doi: [10.1103/PhysRevE.86.051911](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.86.051911).
 43. Ziaja B., Jurek Z., Medvedev N., Saxena V., Son S.-K., Santra R. Towards Realistic Simulations of Macromolecules Irradiated under the Conditions of Coherent Diffraction Imaging with an X-ray Free-Electron Laser. *Photonics*. 2015. V. 2. P. 256–269. doi: [10.3390/photonics2010256](https://doi.org/10.3390/photonics2010256).
 44. Kai T., Moribayashi K. Effects of electron-impact ionization on the damage to biomolecules irradiated by XFEL. *Journal of Physics: Conference Series*. 2009. V. 163. Article No. 012035. doi: [10.1088/1742-6596/163/1/012035](https://doi.org/10.1088/1742-6596/163/1/012035).
 45. Ziaja B., de Castro Antonio R.B., Weckert E., Moeller T. Modelling dynamics of samples exposed to free-electron-laser radiation with Boltzmann equations. *Eur.Phys.J.* 2006. V. 40. P. 465–480. doi: [10.1140/epjd/e2006-00240-x](https://doi.org/10.1140/epjd/e2006-00240-x).
 46. Fortmann-Grote C., Buzmakov A., Jurek Z., Loh N.D., Samoylova L., Santra R., Schneidmiller E.A., Tschentscher T., Yakubov S., Yoon C.H. et al. Start-to-end simulation of single-particle imaging using ultra-short pulses at the European X-ray Free-Electron Laser. *IUCrJ*. 2017. V. 4. P. 560–568. doi: [10.1107/S2052252517009496](https://doi.org/10.1107/S2052252517009496).
 47. Coleman C., Bergh M., Scott H.A., Spence J.C., Chapman H.N., Timneanu N. Simulations of radiation damage in biomolecular nanocrystals induced by femtosecond

- X-ray pulses. *J. Mod. Opt.* 2011. V. 58. P. 1486–1497. doi: [10.1080/09500340.2011.597519](https://doi.org/10.1080/09500340.2011.597519).
48. Hau-Riege S.P. Nonequilibrium electron dynamics in materials driven by high-intensity x-ray pulses. *Phys. Rev. E*. 2013. V. 87. P. 053102. doi: [10.1103/PhysRevE.87.053102](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.87.053102).
 49. Akça B., Erzeneoğlu S. The Mass Attenuation Coefficients, Electronic, Atomic, and Molecular Cross-Sections, Effective Atomic Numbers, and Electron Densities for Compounds of Some Biomedically Important Elements at 59.5 keV. *Science and Technology of Nuclear Installations*. 2014. Article No. 901465. doi: [10.1155/2014/901465](https://doi.org/10.1155/2014/901465).
 50. Zeldin O.B., Gerstel M., Garman E.F. RADDOSE-3D: time- and space-resolved modelling of dose in macromolecular crystallography. *J. Appl. Cryst.* 2013. V. 46. P. 1225–1230. doi: [10.1107/S0021889813011461](https://doi.org/10.1107/S0021889813011461).
 51. Bury C.S., Brooks-Bartlett C., Walsh S.P., Garman E.F. Estimate your dose: RADDOSE-3D. *Protein Sci.* 2018. V. 27. P. 217–228. doi: [10.1002/pro.3302](https://doi.org/10.1002/pro.3302).
 52. Dickerson J.L., McCubbin P.T.N., Garman E.F. RADDOSE-XFEL: femtosecond time-resolved dose estimates for macromolecular X-ray free-electron laser experiments. *J. Appl. Cryst.* 2020. V. 53. P. 549–560. doi: [10.1107/S1600576720000643](https://doi.org/10.1107/S1600576720000643).
 53. Owen R.L., Rudino-Pinera E., Garman E.F. Experimental determination of the radiation dose limit for cryocooled protein crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 4912–4917. doi: [10.1073/pnas.0600973103](https://doi.org/10.1073/pnas.0600973103).
 54. de la Mora E., Coquelle N., Bury C.S., Rosenthal M., Holton J.M., Carmichael I., Garman E.F., Burghammer M., Colletier J.P., Weik M. Radiation damage and dose limits in serial synchrotron crystallography at cryo- and room temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. V. 117. P. 4142–4151. doi: [10.1073/pnas.1821522117](https://doi.org/10.1073/pnas.1821522117).
 55. Huang B., Bates M., Zhuang, X. Super-resolution fluorescence microscopy. *Annu. Rev. Biochem.* 2009. V. 78. P. 993–1016. doi: [10.1146/annurev.biochem.77.061906.092014](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061906.092014).
 56. Rodriguez J.A., Xu R., Chen C.-C., Huang Z., Jiang H., Chen A.L., Raines K.S., Pryor A. Jr, Nam D., Wiegart L. et al. Three-dimensional coherent X-ray diffractive imaging of whole frozen-hydrated cells. *IUCrJ*. 2015. V. 2. P. 575–583. doi: [10.1107/S205225251501235X](https://doi.org/10.1107/S205225251501235X).
 57. Howells M.R., Beetz T., Chapman H.N., Cui C., Holton J.M., Jacobsen C.J., Kirz J., Lima E., Marchesini S., Miao H. et al. An assessment of the resolution limitation due to radiation-damage in x-ray diffraction microscopy. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* 2009. V. 170. P. 4–12. doi: [10.1016/j.elspec.2008.10.008](https://doi.org/10.1016/j.elspec.2008.10.008).
 58. Kimura T., Joti Y., Shibuya A., Song C., Kim S., Tono K., Yabashi M., Tamakoshi M., Moriya T., Oshima T. et al. Imaging live cell in micro-liquid enclosure by X-ray laser diffraction. *Nat. Commun.* 2014. V. 5. Article No. 3052. doi: [10.1038/ncomms4052](https://doi.org/10.1038/ncomms4052).
 59. Borek D., Cymborowski M., Machius M., Minor W., Otwinowski Z. Diffraction data analysis in the presence of radiation damage. *Acta Crystallogr D*. 2010. V. 66. P. 426–436. doi: [10.1107/S0907444909040177](https://doi.org/10.1107/S0907444909040177).
 60. Warkentin M.A., Atakisi H., Hopkins J.B., Walko D., Thorn R.E. Lifetimes and spatio-temporal response of protein crystals in intense X-ray microbeams. *IUCrJ*. 2017. V. 4. P. 785–794. doi: [10.1107/S2052252517013495](https://doi.org/10.1107/S2052252517013495).
 61. Lomb L., Barends T.R.M., Kassemeyer S., Aquila A., Epp S.W., Erk B., Foucar L., Hartmann R., Rudek B., Rolles D. et al. Radiation damage in protein serial femtosecond crystallography using an x-ray free-electron laser. *Phys. Rev. B. Condens. Matter Mater. Phys.* 2011. V. 84. Article No. 214111. doi: [10.1103/PhysRevB.84.214111](https://doi.org/10.1103/PhysRevB.84.214111).
 62. 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. 56–61. doi: [10.1038/nature09177](https://doi.org/10.1038/nature09177).

63. Erk B., Rolles D., Foucar L., Rudek B., Epp S.W., Cryle M., Bostedt C., Schorb S., Bozek J., Rouzee A. et al. Ultrafast charge rearrangement and nuclear dynamics upon inner-shell multiple ionization of small polyatomic molecules. *Phys. Rev. Lett.* 2013. V. 110. Article No. 053003. doi: [10.1103/PhysRevLett.110.053003](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.110.053003).
64. Fukuzawa H., Son S.K., Motomura K., Mondal S., Nagaya K., Wada S., Liu X.J., Feifel R., Tachibana T., Ito Y. et al. Deep inner-shell multiphoton ionization by intense X-ray free-electron laser pulses. *Phys. Rev. Lett.* 2013. V. 110. Article No. 173005. doi: [10.1103/PhysRevLett.110.173005](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.110.173005).
65. Rudenko A., Inhester L., Hanasaki K., Li X., Robatjazi S.J., Erk B., Boll R., Toyota K., Hao Y., Vendrell O. et al. Femtosecond response of polyatomic molecules to ultra-intense hard X-rays. *Nature*. 2017. V. 546. P. 129–132. doi: [10.1038/nature22373](https://doi.org/10.1038/nature22373).
66. Takanashi T., Nakamura K., Kukk E., Motomura K., Fukuzawa H., Nagaya K., Wada S.-I., Kumagai Y., Iablonskyi D., Ito Y. et al. Ultrafast Coulomb explosion of a diiodomethane molecule induced by an X-ray free-electron laser pulse. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2017. V. 19. P. 19707–19721. doi: [10.1039/C7CP01669G](https://doi.org/10.1039/C7CP01669G).
67. Motomura K., Fukuzawa H., Son S.-K., Mondal S., Tachibana T., Ito Y., Kimura M., Nagaya K., Sakai T., Matsunami K. Sequential multiphoton multiple ionization of atomic argon and xenon irradiated by x-ray free-electron laser pulses from SACLA. *J. Phys. B.* 2013. V. 46. Article No. 164024. doi: [10.1088/0953-4075/46/16/164024](https://doi.org/10.1088/0953-4075/46/16/164024).
68. Fukuzawa H., Takanashi T., Kukk E., Motomura K., Wada S.I., Nagaya K., Ito Y., Nishiyama T., Nicolas C., Kumagai Y. et al. Real-time observation of X-ray-induced intramolecular and interatomic electronic decay in CH₂I₂. *Nat. Commun.* 2019. V. 10. Article No. 2186. doi: [10.1038/s41467-019-10060-z](https://doi.org/10.1038/s41467-019-10060-z).
69. Wallner M., Eland J.H.D., Squibb R.J., Andersson J., Roos A.H., Singh R., Talaei O., Kouliantanos D., Piancastelli M.N., Simon M. et al. Coulomb explosion of CD₃I induced by single photon deep inner-shell ionization. *Sci. Rep.* 2020. V. 1. Article No. 1246.
70. Murphy B.F., Osipov T., Jurek Z., Fang L., Son S.K., Mucke M., Eland J.H., Zhaunerchyk V., Feifel R., Avaldi L. et al. Femtosecond X-ray-induced explosion of C₆₀ at extreme intensity. *Nat. Commun.* 2014. V. 5. Article No. 4281. doi: [10.1038/ncomms5281](https://doi.org/10.1038/ncomms5281).
71. Berrah N., Sanchez-Gonzalez A., Jurek Z., Obaid R., Xiong H., Squibb R.J., Osipov T., Lutman A., Fang L., Barillot T. et al. Author Correction: Femtosecond-resolved observation of the fragmentation of buckminsterfullerene following X-ray multiphoton ionization. *Nat. Phys.* 2019. V. 15. Article No. 1301. doi: [10.1038/s41567-019-0706-2](https://doi.org/10.1038/s41567-019-0706-2).
72. Nass K., Foucar L., Barends T.R.M., Hartmann E., Botha S., Shoeman R.L., Doak R.B., Alonso-Mori R., Aquila A., Bajt, S. et al. Indications of radiation damage in ferredoxin microcrystals using high-intensity X-FEL beams. *J. Synchrotron Rad.* 2015. V. 22. P. 225–238. doi: [10.1107/S1600577515002349](https://doi.org/10.1107/S1600577515002349).
73. Wang J. Destruction-and-diffraction by X-ray free-electron laser. *Protein Sci.* 2016. V. 25. P. 1585–1592. doi: [10.1002/pro.2959](https://doi.org/10.1002/pro.2959).
74. Inoue I., Inubushi Y., Sato T., Tono K., Katayama T., Kameshima T., Ogawa K., Togashi T., Owada S., Amemiya Y. et al. Observation of femtosecond X-ray interactions with matter using an X-ray-X-ray pump-probe scheme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. 1492–1497. doi: [10.1073/pnas](https://doi.org/10.1073/pnas).
75. Nass K., Gorel A., Abdullah M.M., Martin A.V., Kloos M., Marinelli A., Aquila A., Barends T.R.M., Decker F.J., Doak B. et al. Structural dynamics in proteins induced by and probed with X-ray free-electron laser pulses. *Nat. Commun.* 2020. V. 11. Article No. 1814. doi: [10.1038/s41467-020-15610-4](https://doi.org/10.1038/s41467-020-15610-4).
76. Opara N.L., Mohacsi I., Makita M., Castano-Diez D., Diaz A., Juranić P., Marsh M., Meents A., Milne C.J., Mozzanica A. et al. Demonstration of femtosecond X-ray pump X-ray probe diffraction on protein crystals. *Struct. Dyn.* 2018. V. 5. Article No. 054303. doi: [10.1063/1.5050618](https://doi.org/10.1063/1.5050618).

77. Munke A., Andreasson J., Aquila A., Awel S., Ayyer K., Barty A., Bean R.J., Berntsen P., Bielecki J., Boutet S. et al. Coherent diffraction of single Rice Dwarf virus particles using hard X-rays at the Linac Coherent Light Source. *Sci. Data*. 2016. V. 3. Article No. 160064. doi: [10.1038/sdata.2016.64](https://doi.org/10.1038/sdata.2016.64).
78. Kurta R.P., Donatelli J.J., Yoon C.H., Berntsen P., Bielecki J., Daurer B.J., DeMirci H., Fromme P., Hantke M.F., Maia F.R.N.C. et al. Correlations in Scattered X-Ray Laser Pulses Reveal Nanoscale Structural Features of Viruses. *Phys. Rev. Lett.* 2017. V. 119. Article No. 158102. doi: [10.1103/PhysRevLett.119.158102](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.119.158102).
79. Östlin C., Timneanu N., Jönsson H.O., Ekeberg T., Martin A.V., Caleman C. Reproducibility of single protein explosions induced by X-ray lasers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2018. V. 20. P. 12381–12389. doi: [10.1039/c7cp07267h](https://doi.org/10.1039/c7cp07267h).
80. Östlin C., Timneanu N., Caleman C., Martin A.V. Is radiation damage the limiting factor in high-resolution single particle imaging with X-ray free-electron lasers? *Struct. Dyn.* 2019. V. 6. Article No. 044103. doi: [10.1063/1.509830](https://doi.org/10.1063/1.509830).
81. Nass K. Radiation damage in protein crystallography at X-ray free-electron lasers. *Acta Crystallogr. D. Struct. Biol.* 2019. V. 75. P. 211–218. doi: [10.1107/S2059798319000317](https://doi.org/10.1107/S2059798319000317).
82. Campbell J.L., Papp T. Widths of the atomic K-N7 levels. *At. Data Nucl. Data Tables*. 2001. V. 77. P. 1–56. doi: [10.1006/adnd.2000.0848](https://doi.org/10.1006/adnd.2000.0848).
83. 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. Article No. 033402. doi: [10.1103/PhysRevA.83.033402](https://doi.org/10.1103/PhysRevA.83.033402).
84. Lunin V.Y., Grum-Grzhimailo A.N., Gryzlova E.V., Sinitzyn D.O., Petrova T.E., Lunina N.L., Balabaev N.K., Tereshkina K.B., Stepanov A.S., Krupyanskii Y.F. Efficient calculation of diffracted intensities in the case of non-stationary scattering by biological macromolecules under XFEL pulse. *Acta Crystallographica D*. 2015. V. 71. P. 293–303. doi: [10.1107/S1399004714025450](https://doi.org/10.1107/S1399004714025450).
85. Chapman H.N., Barty A., Bogan M., Boutet S., Frank M., Hau-Riege S.P., Marchesini S. et al. Femtosecond diffractive imaging with a soft-X-ray free-electron laser. *Nat. Phys.* 2006. V. 2. P. 839–843. doi: [10.1038/nphys461](https://doi.org/10.1038/nphys461).
86. Seibert M.M., Ekeberg T., Maia F.R., Svenda M., Andreasson J., Jönsson O., Odić D., Iwan B., Rucker A., Westphal D. et al. Single mimivirus particles intercepted and imaged with an X-ray laser. *Nature*. 2011. V. 470 P. 78–81. doi: [10.1038/nature09748](https://doi.org/10.1038/nature09748).
87. Hantke M.F., Hasse D., Maia F.R.N.C., Ekeberg T., John K., Svenda M., Loh N.D., Martin A.V., Timneanu N., Larsson D.S.D. et al. High-throughput imaging of heterogeneous cell organelles with an x-ray laser. *Nat. Photonics*. 2014. V. 8. P. 943–949. doi: [10.1038/nphoton.2014.27](https://doi.org/10.1038/nphoton.2014.27).
88. van der Schot G., Svenda M., Maia F.R.N.C., Hantke M., DePonte D.P., Seibert M.M., Aquila A., Schulz J., Kirian R., Liang M., Stellato F. et al. Imaging single cells in a beam of live cyanobacteria with an x-ray laser. *Nat. Commun.* 2015 V. 6. Article No. 5704. doi: [10.1038/ncomms6704](https://doi.org/10.1038/ncomms6704).
89. Ekeberg T., Svenda M., Abergel C., Maia F.R.N.C., Seltzer V., Claverie J.M., Hantke M., Jönsson O., Nettelblad C., van der Schot G. et al. Three-Dimensional Reconstruction of the Giant Mimivirus Particle with an X-Ray Free-Electron Laser. *Phys. Rev. Lett.* 2015. V. 114. Article No. 098102. doi: [10.1103/PhysRevLett.114.098102](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.114.098102).
90. Reddy H.K.N., Yoon C.H., Aquila A., Awel S., Ayyer K., Barty A., Berntsen P., Bielecki J., Bobkov S., Bucher M. Coherent soft X-ray diffraction imaging of coliphage PR772 at the Linac coherent light source. *Sci. Data*. 2017. V.4. Article No. 170079. doi: [10.1038/sdata.2017.79](https://doi.org/10.1038/sdata.2017.79).
91. Daurer B.J., Okamoto K., Bielecki J., Maia F.R.N.C., Muhlig K., Seibert M.M., Hantke M.F., Nettelblad C., Benner W.H., Svenda M. et al. Experimental strategies for

- imaging bioparticles with femtosecond hard X-ray pulses. *IUCrJ*. 2017. V. 4. P. 251–262. doi: [10.1107/S2052252517003591](https://doi.org/10.1107/S2052252517003591).
92. Lundholm I.V., Sellberg J.A., Ekeberg T., Hantke M.F., Okamoto K., van der Schot G., Andreasson J., Barty A., Bielecki J., Bruza P. et al. Considerations for three-dimensional image reconstruction from experimental data in coherent diffractive imaging. *IUCrJ*. 2018. V. 5. P. 531–541. doi: [10.1107/S2052252518010047](https://doi.org/10.1107/S2052252518010047).
 93. DePonte D.P., Weierstall U., Schmidt K., Warner J., Starodub D., Spence J.C.H., Doak R.B. Gas dynamic virtual nozzle for generation of microscopic droplet streams. *J. Phys. D Appl. Phys.* 2008. V. 41. Article No. 195505. doi: [10.1088/0022-3727/41/19/195505](https://doi.org/10.1088/0022-3727/41/19/195505).
 94. Yamashita M., Fenn J.B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* 1984. V. 88. P. 4451–4459. doi: [10.1021/j150664a002](https://doi.org/10.1021/j150664a002).
 95. Gañán-Calvo A.M., Montanero J.M. Revision of capillary cone-jet physics: Electrospray and flow focusing. *Phys. Rev. E*. 2009. V. 79. Article No. 066305. doi: [10.1103/PhysRevE.79.066305](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.79.066305).
 96. Hantke M.F., Bielecki J., Kulyk O., Westphal D., Larsson D.S.D., Svenda M., Reddy H.K.N., Kirian R.A., Andreasson J., Hajdu J. et al. Rayleigh-scattering microscopy for tracking and sizing nanoparticles in focused aerosol beams. *IUCrJ*. 2018. V. 5. P. 673–680. doi: [10.1107/S2052252518010837](https://doi.org/10.1107/S2052252518010837).
 97. Bielecki J., Hantke M.F., Daurer B.J., Reddy H.K.N., Hasse D., Larsson D.S.D., Gunn L.H., Svenda M., Munke A., Sellberg J.A. et al. Electrospray sample injection for single-particle imaging with x-ray lasers. *Sci. Adv.* 2019. V. 5. Article No. eaav8801. doi: [10.1126/sciadv.aav8801](https://doi.org/10.1126/sciadv.aav8801).
 98. Miao J., Hodgson K.O., Ishikawa T., Larabell C.A., LeGros M.A., Nishino Y. Imaging whole Escherichia coli bacteria by using single-particle x-ray diffraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. P. 110–112. doi: [10.1073/pnas.232691299](https://doi.org/10.1073/pnas.232691299).
 99. Shapiro D., Thibault P., Beetz T., Elser V., Howells M., Jacobsen C., Kirz J., Lima E., Miao H., Neiman A.M. et al. Biological imaging by soft x-ray diffraction microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 15343–15346. doi: [10.1073/pnas.0503305102](https://doi.org/10.1073/pnas.0503305102).
 100. Song C., Tono K., Park J., Ebisu T., Kim S., Shimada H., Kim S., Gallagher-Jones M., Nam D., Sato T. et al. Multiple application X-ray imaging chamber for single-shot diffraction experiments with femtosecond X-ray laser pulses. *J. Appl. Cryst.* 2014. V. 47. P. 188–197. doi: [10.1107/S1600576713029944](https://doi.org/10.1107/S1600576713029944).
 101. Robinson I., Schwenke J., Yusuf M., Estandarte A., Zhang F., Chen B., Clark J., Song Ch., Nam D., Joti Y. et al. Towards single particle imaging of human chromosomes at SACLA. *J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys.* 2015. V. 48. Article No. 244007. doi: [10.1088/0953-4075/48/24/244007](https://doi.org/10.1088/0953-4075/48/24/244007).
 102. Seuring C., Ayyer K., Filippaki E., Barthelmeß M., Longchamp J.N., Ringler P., Pardini T., Wojtas D.H., Coleman M.A., Dörner K. et al. Femtosecond X-ray coherent diffraction of aligned amyloid fibrils on low background graphene. *Nat. Commun.* 2018. V. 9. Article No. 1836. doi: [10.1038/s41467-018-04116-9](https://doi.org/10.1038/s41467-018-04116-9).
 103. Takayama Y., Yonekura K. Cryogenic coherent X-ray diffraction imaging of biological samples at SACLA: a correlative approach with cryo-electron and light microscopy. *Acta Crystallogr. A*. 2016. V. 72. P. 179–189. doi: [10.1107/S2053273315023980](https://doi.org/10.1107/S2053273315023980).
 104. Altarelli M. The European X-ray free-electron laser facility in Hamburg. *Nucl. Instrum. Methods. Phys. Res. B*. 2011. V. 269. P. 2845–2849. doi: [10.1016/j.nimb.2011.04.034](https://doi.org/10.1016/j.nimb.2011.04.034).
 105. von Ardenne B., Mechelke M., Grubmüller H. Structure determination from single molecule X-ray scattering with three photons per image. *Nat. Commun.* 2018. V. 9. Article No. 2375. doi: [10.1038/s41467-018-04830-4](https://doi.org/10.1038/s41467-018-04830-4).

106. Allahgholi A., Becker J., Bianco L., Bradford R., Delfs A., Dinapoli R., Goettlicher P., Gronewald M., Graafsma H., Greiffenberg D. et al. The adaptive gain integrating pixel detector. *J. Instrum.* 2016. V. 11. Article No. C02066. doi: [10.1088/1748-0221/11/02/C02066](https://doi.org/10.1088/1748-0221/11/02/C02066).
107. Mezza D., Allahgholi A., Arino-Estrada G., Bianco L., Delfs A., Dinapoli R., Goettlicher P., Graafsma H., Greiffenberg D., Hirsemann H. et al. Characterization of AGIPD1.0: the full scale chip. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A.* 2016. V. 838. P. 39–46. doi: [10.1016/j.nima.2016.09.007](https://doi.org/10.1016/j.nima.2016.09.007).
108. Allahgholi A., Becker J., Delfs A., Dinapoli R., Goettlicher P., Greiffenberg D., Henrich B., Hirsemann H., Kuhn M., Klanner R. et al. The Adaptive Gain Integrating Pixel Detector at the European XFEL. *J. Synchrotron Radiat.* 2019. V. 26. P. 74–82. doi: [10.1107/S1600577518016077](https://doi.org/10.1107/S1600577518016077).
109. Philipp H.T., Hromalik M., Tate M., Koerner L., Gruner S.M. Pixel array detector for X-ray free electron laser experiments. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A.* 2011. V. 649. P. 67–69. doi: [10.1016/j.nima.2010.11.189](https://doi.org/10.1016/j.nima.2010.11.189).
110. Blaj G., Caragiulo P., Carini G., Dragone A., Haller G., Hart P., Hasi J., Herbst R., Kenney C., Markovic B. et al. Future of ePix detectors for high repetition rate FELs. *AIP Conference Proceedings.* 2016. V. 1741. Article No. 040012. doi: [10.1063/1.495288](https://doi.org/10.1063/1.495288).
111. Leonarski F., Redford S., Mozzanica A., Lopez-Cuenca C., Panepucci E., Nass K., Ozerov D., Vera L., Olieric V., Buntschu D. et al. Fast and accurate data collection for macromolecular crystallography using the JUNGFRU detector. *Nat. Methods.* 2018. V. 15. P. 799–804. doi: [10.1038/s41592-018-0143-7](https://doi.org/10.1038/s41592-018-0143-7).
112. Redford S., Bergamaschi A., Brückner M., Cartier S., Dinapoli R., Ekinci Y., Fröjdh E., Greiffenberg D., Mayilyan D., Mezza D. et al. Calibration status and plans for the charge integrating JUNGFRU pixel detector for SwissFEL. *J. Instrum.* 2016. V. 11. Article No. C11013.
113. Goettlicher P., Allahgholi A., Becker J., Bianco L., Delfs A., Dinapoli R., Fretwurst E., Fretwurst E., Graafsma H., Greiffenberg D. et al. AGIPD, the electronics for a high speed X-ray imager at the Eu-XFEL. In: *Proceedings of TIPP2014 – Technology and Instrumentation in Particle Physic.* 2014. P. 253.
114. Mancuso A.P., Aquila A., Batchelor L., Bean R.J., Bielecki J., Borchers G., Doerner K., Giewekemeyer K., Graceffa R., Kelsey O.D. et al. The Single Particles, Clusters and Biomolecules and Serial Femtosecond Crystallography instrument of the European XFEL: initial installation. *J. Synchrotron Radiat.* 2019. V. 26. P. 660–676. doi: [10.1107/S1600577519003308](https://doi.org/10.1107/S1600577519003308).
115. Gasthuber M., Dietrich S., Malka J., Kuhn M., Ensslin U., Wrona K., Szuba J. Online & Offline data storage and data processing at the European XFEL facility. *J. Phys.: Conf. Ser.* 2017. V. 898. Article No. 062049. doi: [10.1088/1742-6596/898/6/062049](https://doi.org/10.1088/1742-6596/898/6/062049).
116. Hauf S., Heisen B., Aplin S., Beg M., Bergemann M., Bondar V., Boukhelef D., Danilevsky C., Ehsan W., Essenov S. et al. The Karabo distributed control system. *J. Synchrotron Radiat.* 2019. V. 26. P. 1448–1461. doi: [10.1107/S1600577519006696](https://doi.org/10.1107/S1600577519006696).
117. Fangohr H., Beg M., Bondar V., Boukhelef D., Brockhauser S., Danilevski C., Ehsan W., Essenov S.G., Flucke G., Giovanetti G. et al. Data Analysis Support in Karabo at European XFEL. In: *Proc. 16th Int. Conf. on Accelerator and Large Experimental Control Systems (ICALEPCS'17) (Barcelona, Spain, Oct. 2017).* 2018. P. 245–252. doi: [10.18429/JACoW-ICALEPCS2017-TUCPA01](https://doi.org/10.18429/JACoW-ICALEPCS2017-TUCPA01).
118. Rose M., Bobkov S., Ayyer K., Kurta R.P., Dzhigaev D., Kim Y.Y., Morgan A.J., Yoon C.H., Westphal D., Bielecki J. et al. Single-particle imaging without symmetry constraints at an X-ray free-electron laser. *IUCrJ.* 2018. V. 5. P. 727–736. doi: [10.1107/S205225251801120X](https://doi.org/10.1107/S205225251801120X).

119. Daurer B.J., Hantke M.F., Nettelblad C, Maia F.R.N.C. Hummingbird: monitoring and analyzing flash X-ray imaging experiments in real time. *J. Appl. Cryst.* 2016. V. 49. P. 1042–1047. doi: [10.1107/S1600576716005926](https://doi.org/10.1107/S1600576716005926).
120. Barty A., Kirian R.A., Maia F.R.N.C., Hantke M., Yoon C.H., White T.A., Chapman H. Cheetah: software for high-throughput reduction and analysis of serial femtosecond X-ray diffraction data. *J. Appl. Cryst.* 2014. V. 47. P. 1118–1131. doi: [10.1107/S1600576714007626](https://doi.org/10.1107/S1600576714007626).
121. Foucar L., Barty A., Coppola N., Hartmann R., Holl P., Hoppe U., Kassemeyer S., Kimmel N., Küpper J., Scholz et al. CASS–CFEL–ASG software suite. *Comput. Phys. Commun.* 2012. V. 183. P. 2207–2213. doi: [10.1016/j.cpc.2012.04.023](https://doi.org/10.1016/j.cpc.2012.04.023).
122. Foucar L. CFEL–ASG Software Suite (CASS): usage for free-electron laser experiments with biological focus. *J. Appl. Crystallogr.* 2016. V. 49. P. 1336–1346. doi: [10.1107/S1600576716009201](https://doi.org/10.1107/S1600576716009201).
123. Damiani D., Dubrovin M., Gaponenko I., Kroeger W., Lane T.J., Mitra A., O'Grady C.P., Salnikov A., Sanchez-Gonzalez A., Schneider D., Yoon C.H. Linac Coherent Light Source data analysis using psana. *J. Appl. Cryst.* 2016. V. 49. P. 672–679. doi: [10.1107/S1600576716004349](https://doi.org/10.1107/S1600576716004349).
124. Coifman R.R., Lafon S. Diffusion maps. *Appl. Comput. Harmon. Anal.* 2006. V. 21. P. 5–30. doi: [10.1016/j.acha.2006.04.006](https://doi.org/10.1016/j.acha.2006.04.006).
125. Giannakis D., Schwander P., Ourmazd A. The symmetries of image formation by scattering. I. Theoretical framework. *Opt. Express.* 2012. V. 20. P. 12799–12826. doi: [10.1364/OE.20.012799](https://doi.org/10.1364/OE.20.012799).
126. Yoon C.H., Schwander P., Abergel C., Andersson I., Andreasson J., Aquila A., Bajt S., Barthelmess M., Barty A., Bogan M.J., Bostedt C., Bozek J. et al. Unsupervised classification of single-particle X-ray diffraction snapshots by spectral clustering. *Opt. Express.* 2011. V. 19. P. 16542–16549. doi: [10.1364/OE.19.016542](https://doi.org/10.1364/OE.19.016542).
127. Giewekemeyer K., Aquila A., Loh N.D., Chushkin Y., Shanks K.S., Weiss J.T., Tate M.W., Philipp H.T., Stern S., Vagovic P. et al. Experimental 3D coherent diffractive imaging from photon-sparse random projections. *IUCrJ.* 2019. V. 20. P. 357–365. doi: [10.1107/S2052252519002781](https://doi.org/10.1107/S2052252519002781).
128. Ayyer K., Morgan A.J., Aquila A., DeMirici H., Hogue B.G., Kirian R.A., Xavier P.L., Yoon C.H., Chapman H.N., Barty A. Low-signal limit of X-ray single particle diffractive imaging. *Opt Express.* 2019. V. 27. P. 37816–37833. doi: [10.1364/OE.27.037816](https://doi.org/10.1364/OE.27.037816).
129. Loh N.D., Elser V. Reconstruction algorithm for single-particle diffraction imaging experiments. *Phys. Rev. E.* 2009. V. 80. Article No. 026705. doi: [10.1103/PhysRevE.80.026705](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.80.026705).
130. Ayyer K., Lan Ti-Yen, Elser V., Loh N.D. Dragonfly: an implementation of the expand–maximize–compress algorithm for single-particle imaging. *J. Appl. Crystallogr.* 2016. V. 49. P. 1320–1335. doi: [10.1107/S1600576716008165](https://doi.org/10.1107/S1600576716008165).
131. Yoon C.H., Yurkov M.V., Schneidmiller E.A., Samoylova L., Buzmakov A., Jurek Z., Ziaja B., Santra R., Loh N.D., Tschentscher T. et al. A comprehensive simulation framework for imaging single particles and biomolecules at the European X-ray Free-Electron Laser. *Sci. Rep.* 2016. V. 6. Article No. 24791. doi: [10.1038/srep24791](https://doi.org/10.1038/srep24791).
132. Hantke M.F., Ekeberg T., Maia F.R.H.C. A simulation tool for flash X-ray imaging. *J. Appl. Cryst.* 2016. V. 49. P. 1356–1362. doi: [10.1107/S1600576716009213](https://doi.org/10.1107/S1600576716009213).
133. Лунин В.Ю., Лунина Н.Л., Петрова Т.Е. Восстановление модулей и расчет фаз для дифракционной картины изолированной частицы с использованием бинарных масок объекта. *Математическая биология и биоинформатика.* 2020. Т. 15. № S. С. t1–t20. doi: [10.17537/2020.15.t1](https://doi.org/10.17537/2020.15.t1).

134. Bricogne G. Geometric sources of redundancy in intensity data and their use for phase determination. *Acta Crystallographica A*. 1974. V. 30. P. 395–405. doi: [10.1107/S0567739474010722](https://doi.org/10.1107/S0567739474010722).
135. Bricogne G. Methods and programs for direct-space exploitation of geometric redundancies. *Acta Crystallographica A*. 1976. V. 32. P. 832–847. doi: [10.1107/S0567739476001691](https://doi.org/10.1107/S0567739476001691).
136. Lunin V.Y. Use of the fast differentiation algorithm for phase refinement in protein crystallography. *Acta Crystallographica A*. 1985. V. 41. P. 551–556. doi: [10.1107/S0108767385001209](https://doi.org/10.1107/S0108767385001209).
137. Podjarny A.D., Rees B., Urzhumtsev A.G. Density modification in X-ray crystallography. In: *Methods in Molecular Biology, Crystallographic Methods and Protocols*. Eds. Jones C., Milloy B., Sanderson M.R. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1996. P. 205–226. (Methods in Molecular Biology, Vol. 56). doi: [10.1385/0-89603-259-0:205](https://doi.org/10.1385/0-89603-259-0:205).
138. Zhang K.Y.J., Cowtan K.D., Main P. Phase improvement by iterative density modification. In: *International Tables for Crystallography. Vol. F*. Eds. Arnold E., Himmel D.M., Rossmann M.G. Chichester: John Wiley and Sons, 2012. P. 385–400. doi: [10.1107/97809553602060000847](https://doi.org/10.1107/97809553602060000847).
139. Fienup J.R. Reconstruction of an object from the modulus of its Fourier transform. *Optics Letters*. 1978. V. 3. N. 1. P. 27–29. doi: [10.1364/OL.3.000027](https://doi.org/10.1364/OL.3.000027).
140. Wang B.C. Resolution of phase ambiguity in macromolecular crystallography. *Methods in Enzymology*. 1985. V. 115. P. 90–111. doi: [10.1016/0076-6879\(85\)15009-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(85)15009-3).
141. Abrahams J.P. Bias reduction in phase refinement by modified interference functions: introducing the γ -correction. *Acta Crystallographica D*. 1997. V. 53. P. 371–376. doi: [10.1107/S0907444996015272](https://doi.org/10.1107/S0907444996015272).
142. Oslányi G., Sütő A. Ab initio structure solution by charge flipping. *Acta Crystallographica A*. 2004. V. 60. P. 134–141. doi: [10.1107/S0108767303027569](https://doi.org/10.1107/S0108767303027569).
143. Marchesini S. A unified evaluation of iterative projection algorithms for phase retrieval. *Rev. Sci. Instrum.* 2007. V. 78. Article No. 011301. doi: [10.1063/1.2403783](https://doi.org/10.1063/1.2403783).
144. Maia F.R.N.C., Ekeberg T., Spoel D., Hajdu J. Hawk: the image reconstruction package for coherent X-ray diffractive imaging. *J. Applied Crystallography*. 2010. V. 43. P. 1535–1539. doi: [10.1107/S0021889810036083](https://doi.org/10.1107/S0021889810036083).
145. Millane R., Lo V.L. Iterative projection algorithms in protein crystallography. I. Theory. *Acta Crystallographica A*. 2013. V. 69. P. 517–527. doi: [10.1107/S0108767313015249](https://doi.org/10.1107/S0108767313015249).
146. Urzhumtsev A.G. *The use of local averaging in analysis of macromolecule images at electron density distribution maps*: Preprint. Pushchino, 1985 (in Russ.).
147. Urzhumtsev A.G., Lunin V.Y., Luzyanina T.B. Bounding a Molecule in a Noisy Synthesis. *Acta Crystallographica A*. 1989. V. 45. P. 34–39. doi: [10.1107/s0108767388008955](https://doi.org/10.1107/s0108767388008955).
148. Marchesini S., He H., Chapman H.N., Hau-Riege S.P., Noy A., Howells M.R., Weierstall U., Spence J.H.C. X-ray image reconstruction from a diffraction pattern alone. *Phys. Rev. B*. 2003. V. 68. Article No. 140101(R). doi: [10.1103/PhysRevB.68.140101](https://doi.org/10.1103/PhysRevB.68.140101).
149. Лунин В.Ю., Лунина Н.Л., Петрова Т.Е. Использование связанных масок в задаче восстановления изображения изолированной частицы по данным рентгеновского рассеяния. *Математическая биология и биоинформатика*. 2014. Т. 9. С. 543–562. doi: [10.17537/2014.9.543](https://doi.org/10.17537/2014.9.543).
150. Lunin V.Y., Lunina N.L., Petrova T.E., Baumstark M.W., Urzhumtsev A.G. Mask-based approach to phasing of single-particle diffraction data. *Acta Crystallographica D*. 2016. V. 72. P. 147–157. doi: [10.1107/S2059798315022652](https://doi.org/10.1107/S2059798315022652).
151. Lunin V.Y., Lunina N.L., Petrova T.E., Baumstark M.W., Urzhumtsev A.G. Mask-based approach to phasing of single-particle diffraction data. II. Likelihood-based selection

- criteria. *Acta Crystallographica D*. 2019. V. 75. P. 79–89. doi: [10.1107/S2059798318016959](https://doi.org/10.1107/S2059798318016959).
152. Лунина Н.Л., Петрова Т.Е., Уржумцев А.Г., Лунин В.Ю. Использование связанных масок в задаче восстановления изображения изолированной частицы по данным рентгеновского рассеяния. II. Зависимость точности решения от шага дискретизации экспериментальных данных. *Математическая биология и биоинформатика*. 2015. Т. 10. С. 508–525. doi: [10.17537/2015.10.508](https://doi.org/10.17537/2015.10.508).
153. Лунина Н.Л., Петрова Т.Е., Уржумцев А.Г., Лунин В.Ю. Использование связанных масок в задаче восстановления изображения изолированной частицы по данным рентгеновского рассеяния. III. Стратегии отбора решений по результатам максимизации правдоподобия. *Математическая биология и биоинформатика*. 2017. Т. 12. С. 521–535. doi: [10.17537/2017.12.521](https://doi.org/10.17537/2017.12.521).
154. Mancuso A.P., Gorniak Th., Staier F., Yefanov O.M., Barth R., Christophis C., Reime B., Gulden J., Singer A., Pettit M.E. et al. Coherent imaging of biological samples with femtosecond pulses at the free electron laser FLASH. *New J. Phys.* 2010. V. 12. Article No. 035003. doi: [10.1088/1367-2630/12/3/035003](https://doi.org/10.1088/1367-2630/12/3/035003).
155. Seibert M.M., Boutet S., Svenda M., Ekeberg T., Maia F.R.N.C., Bogan M.J., Nicusor Tîmneanu N., Anton Barty A., Stefan Hau-Riege S., Caleman C. Femtosecond diffractive imaging of biological cells. *J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys.* 2010. V. 43. Article No. 194015. doi: [10.1088/0953-4075/43/19/194015](https://doi.org/10.1088/0953-4075/43/19/194015).
156. Gallagher-Jones M., Bessho Y., Kim S., Park J., Kim S., Nam D., Kim C., Kim Y., Noh do Y., Miyashita O. et al. Macromolecular structures probed by combining single-shot free-electron laser diffraction with synchrotron coherent X-ray imaging. *Nat. Commun.* 2014. V. 5. Article No. 3798. doi: [10.1038/ncomms4798](https://doi.org/10.1038/ncomms4798).
157. Xu R., Jiang H., Song C., Rodriguez J.A., Huang Z., Chen C.-C., Nam D., Park J., Gallagher-Jones M., Kim S. et al. Single-shot three-dimensional structure determination of nanocrystals with femtosecond X-ray free-electron laser pulses. *Nat. Commun.* 2014. V. 5. Article No. 4061. doi: [10.1038/ncomms5061](https://doi.org/10.1038/ncomms5061).
158. Takayama Y., Inui Y., Sekiguchi Y., Kobayashi A., Oroguchi T., Yamamoto M., Matsunaga S., Nakasako M. Coherent X-Ray Diffraction Imaging of Chloroplasts from *Cyanidioschyzon merolae* by Using X-Ray Free Electron Laser. *Plant Cell Physiol.* 2015. V. 56. P. 1272–1286. doi: [10.1093/pcp/pcv032](https://doi.org/10.1093/pcp/pcv032).
159. Nakano M., Osamu Miyashita O., Jonic S., Tokuhisa A., Tama F. Single-particle XFEL 3D reconstruction of ribosome-size particles based on Fourier slice matching: requirements to reach subnanometer resolution. *J. Synchrotron Radiat.* 2018. V. 25. P. 1010–1021. doi: [10.1107/S1600577518005568](https://doi.org/10.1107/S1600577518005568).
160. Maia F.R.N.C. The Coherent X-ray Imaging Data Bank. *Nat. methods.* 2012. V. 9. P. 854–855. doi: [10.1038/nmeth.2110](https://doi.org/10.1038/nmeth.2110).
161. Fan J., Sun Z., Wang Y., Park J., Kim S., Gallagher-Jones M., Kim Y., Song C., Yao S., Zhang J. et al. Single-pulse enhanced coherent diffraction imaging of bacteria with an X-ray free-electron laser. *Sci. Rep.* 2016. V. 6. Article No. 34008. doi: [10.1038/srep34008](https://doi.org/10.1038/srep34008).
162. Hosseinizadeh A., Mashayekhi G., Copperman J., Schwander P., Dashti A., Sepehr R., Fung R., Schmidt M., Yoon C.H., Hogue B.G. et al. Conformational landscape of a virus by single-particle X-ray scattering. *Nat. Methods.* 2017. V. 4. P. 877–881. doi: [10.1038/nmeth.4395](https://doi.org/10.1038/nmeth.4395).
163. Aquila A., Barty A., Bostedt C., Boutet S., Carini G., dePonte D., Drell P., Doniach S., Downing K.H., Earnest T. The linac coherent light source single particle imaging road map. *Structural Dynamics.* 2015. V. 2. Article No. 041701. doi: [10.1063/1.4918726](https://doi.org/10.1063/1.4918726).

Рукопись поступила в редакцию 24.08.2020, переработанный вариант поступил 10.10.2020.

Дата опубликования 21.10.2020.

Determination of the Structure of Biological Macromolecular Particles Using X-Ray Lasers. Achievements and Prospects

Petrova T.E., Lunin V.Y.

Institute of Mathematical Problems of Biology RAS, Keldysh Institute of Applied Mathematics of Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

Abstract. X-ray diffraction analysis is the main experimental approach to determining the atomic structure of biological macromolecules and their complexes. The most serious limitation of its applicability, to date, is the need to prepare a sample of the object under study in the form of a single crystal, which is caused by the extremely low intensity of rays scattered by a single molecule. The commissioning of X-ray Free-Electron Lasers with their super-powerful (by many orders of magnitude exceeding the brightness of modern synchrotrons) and ultra-short (less than 100 fs) pulse is an experimental breakthrough that allows us to expect to obtain diffraction patterns from individual biological particles and then determine their structure. The first experimental results demonstrate the fundamental possibility of such an approach and are accompanied by the publication of a significant number of articles on various aspects of the development of the method. The purpose of this article is to discuss the current state of art in this area, evaluate the results achieved and discuss the prospects for further development of the method based on the analysis of publications in the world scientific literature of recent years and the experience of work carried out by the review authors and their colleagues.

Key words: *biological macromolecules, single particle, X-ray diffraction, X-ray Free-electrons Lasers, the phase problem, biological crystallography.*

The reported study was funded by RFBR, project number 19-14-50165.