



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek



Tin Takač

# Krio-elektronska mikroskopija i rendgenska difrakcijska analiza u dizajnu lijekova

Mayer, C. X-Ray diffraction in biology: How can we see DNA and proteins in three dimensions? Ch. 9, u X-ray scattering, Ares A. E. (Ed.). London: IntechOpen, 2017, 207–218.

Ceska, T.; Chun-Wa, C.; Cooke, R.; Phillips, C.; Williams, P.A. Cryo-EM in drug discovery. *Biochem. Soc. Trans.* **2019**, 47: 487–493.

## Kemijski seminar 1

Poslijediplomski sveučilišni studij Kemija

Zagreb, 2022.

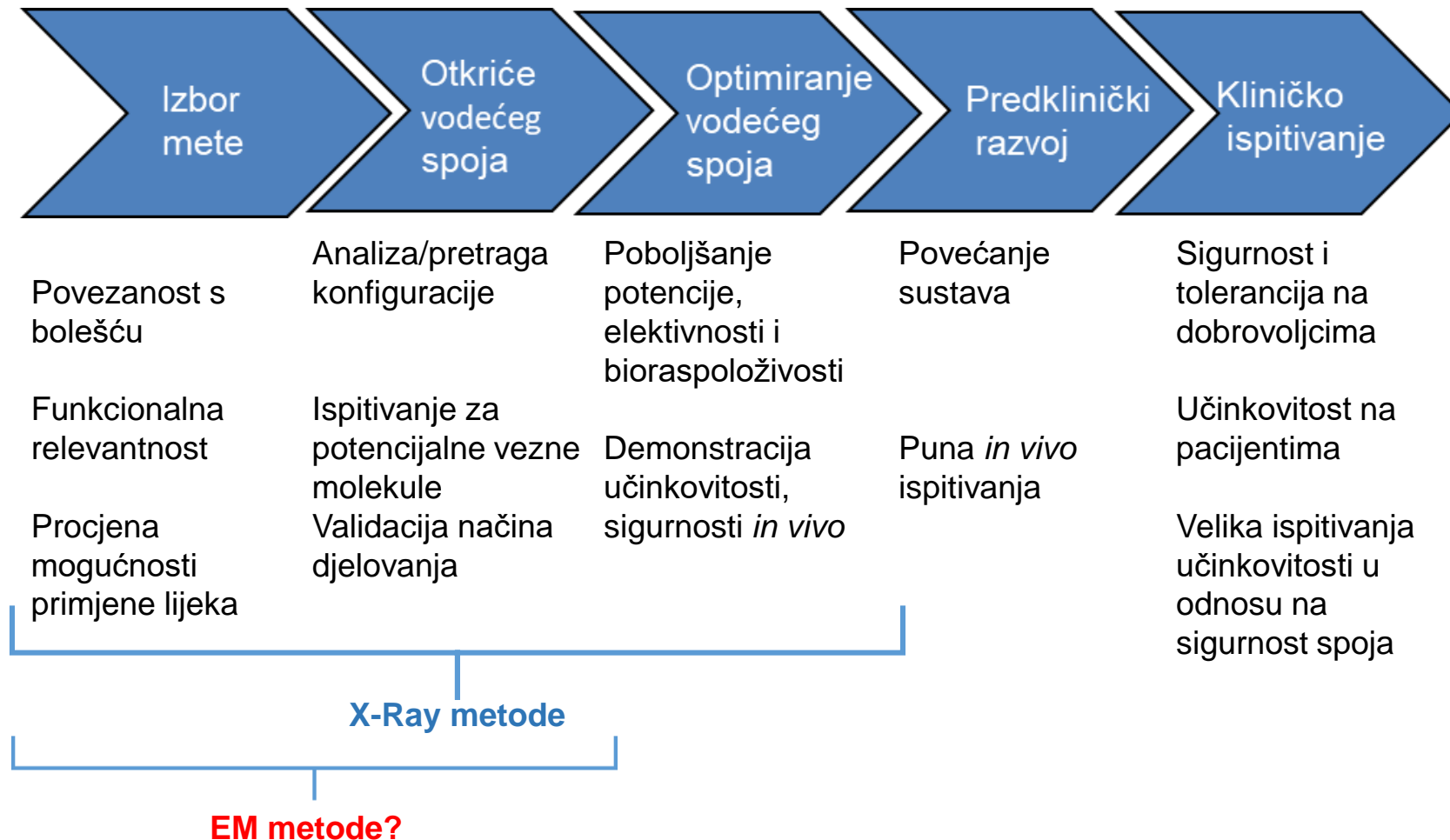
# Sadržaj izlaganja

- Uvod
- Metode strukturne analize u dizajnu lijekova
- Rendgenska difrakcijska analiza (XRD)
- Krio-elektronska mikroskopija (krio-EM)
  - Prednosti i izazovi krio-EM u otkriću lijekova
  - Novije krio-EM strukture proteina relevantne za dizajn lijekova
  - Usporedba tehnika krio-EM i XRD
  - Prednosti krio-EM
  - Predviđena tehnološka poboljšanja krio-EM u dizajnu lijekova
- Zaključak
- Literaturni izvori
- Prilog 1 - Makromolekule i ligandi određeni uporabom krio-EM

# Dizajn lijekova

- Pristup pronalaženja novih lijekova na temelju njihovih bioloških meta
- Meta - ključna molekula uključena u određeni metabolički ili patološki proces
- Dizajn lijeka na temelju strukture – engl. *Structure Based Drug Design* (SBDD)
- SBDD se često naziva racionalnim dizajnom.
- Napredak dodirnih područja utječe na uspješnost u dizajna lijekova.

# Slika 1. Paradigma otkrića lijekova - Konceptualni put Faze



Ceska, T., Chung, C.-W., Cooke, R., Phillips, C., & Williams, P. A  
*Cryo-EM in drug discovery.*  
*Biochem Soci Trans* 2019, 47:  
281-293,

- Rendgenska kristalografija se uvelike koristi u fazama otkrića i optimiranja vodećeg spoja u projektu.
- Krio-EM sve više služi kao dopuna strukturnoj analizi u izboru mete i otkriću vodećeg spoja

# Metode koje se koriste u dizajnu lijekova na temelju strukture

(*Structure Based Drug Design, SBDD*)

- **rendgenska kristalografija (*X-Ray Crystallography*)**
- **krio-elektronska mikroskopija (*Cryogenic-Electronic Microscopy, cryo-EM*)**
- **nuklearna magnetna rezonancija (*Nuclear Magnetic Resonance, NMR*)**

# Rendgenska difrakcija (XRD)

- Metoda određivanja kristalne strukture čvrstih tvari
- Identifikacija kristalnih tvari ili faza u višefaznim uzorcima
- Određivanje faznog sastava čvrstih uzoraka
- Valna duljina ( $\lambda$ ) rendgenskog zračenja - reda veličine 1 Å
- Najčešće se koristi monokromatsko zračenje i to  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ )
- Difrakcija na monokristalu ili polikristalnom uzorku (prahu)

## Bragg-ov zakon

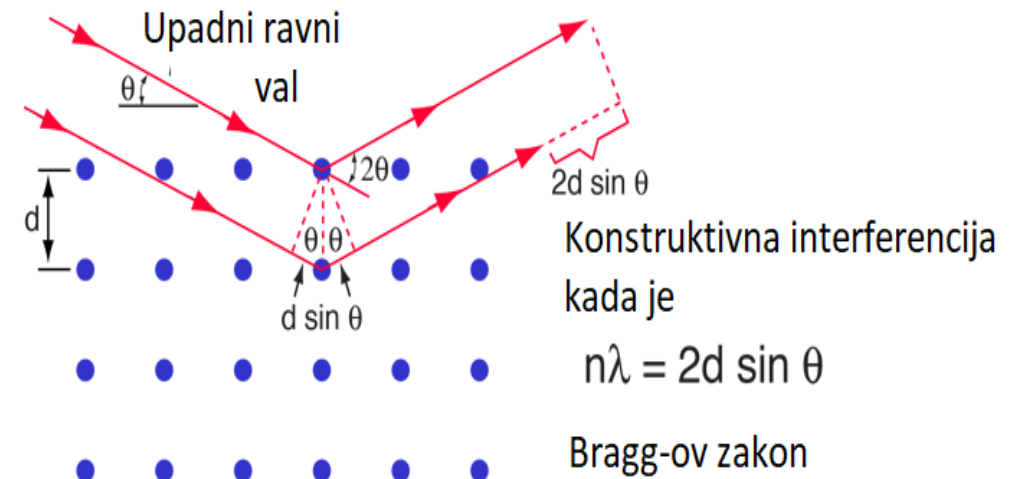
$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

$\lambda$  - valna duljina upotrijebljenog X-zračenja

$d$  - je razmak između posebnog seta ravnina

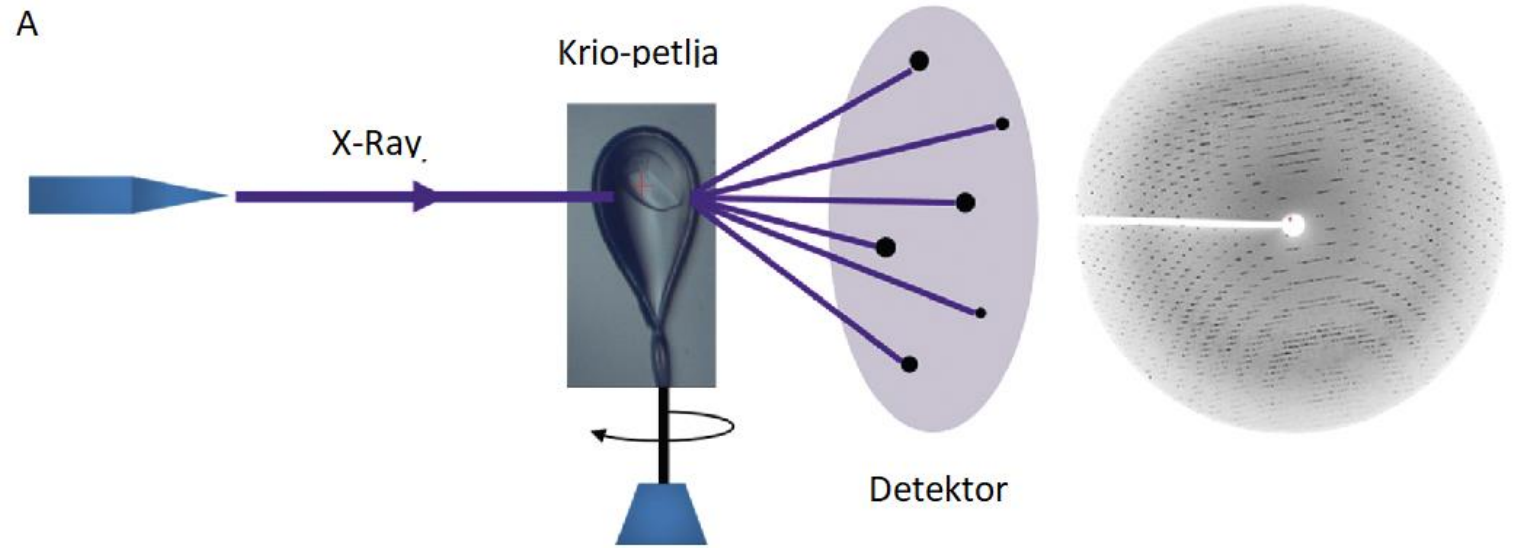
$\theta$  - kut incidencije na kojem je pik difrakcije mjeren

$n$  - cijeli broj koji predstavlja "harmonijski red" difrakcije



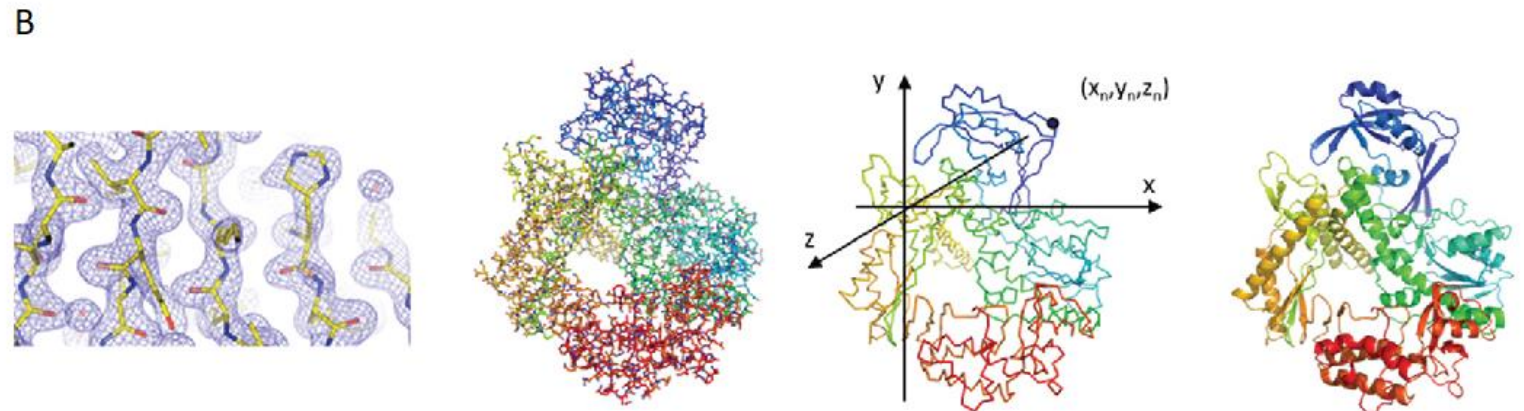
# Princip rendgenske kristalografije makromolekula

A. Monokromatska rendgenska zraka ozračuje kristal zamrznut u krio-petlji koja se rotira oko osi, a opažene difrakcijske mrlje su rezultat vala koji dopijeva na detektor zbog difrakcije na elektronima u kristalu.



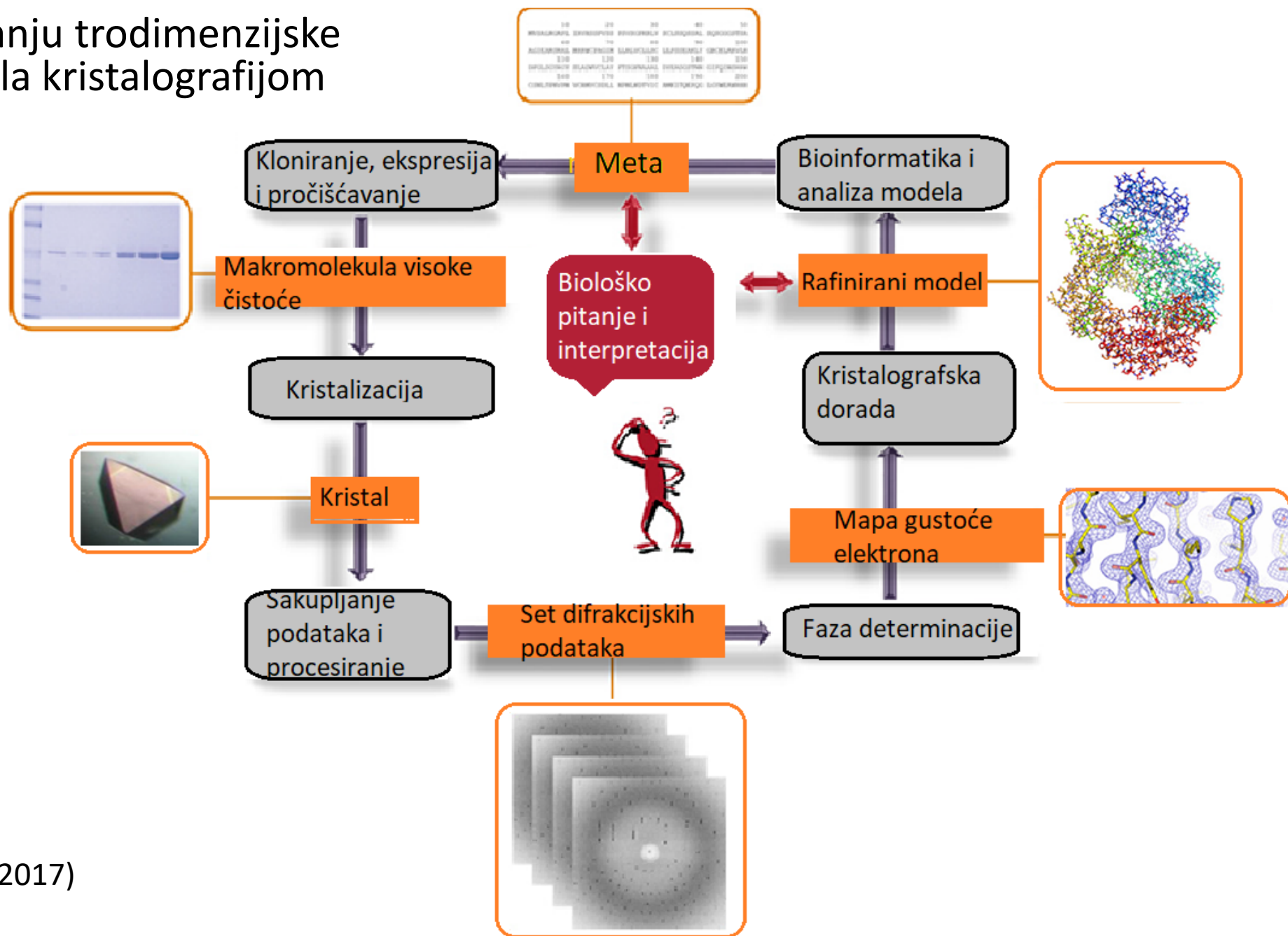
B. Prikaz karte elektronske gustoće fragmenta makromolekule (lijevo).

Trodimenzijska struktura makromolekule (u ovom slučaju proteina) predstavljena je na tri načina: prikaz svih atoma, okosnica i crtani prikaz.



(prilagođeno prema Mayer, 2017)

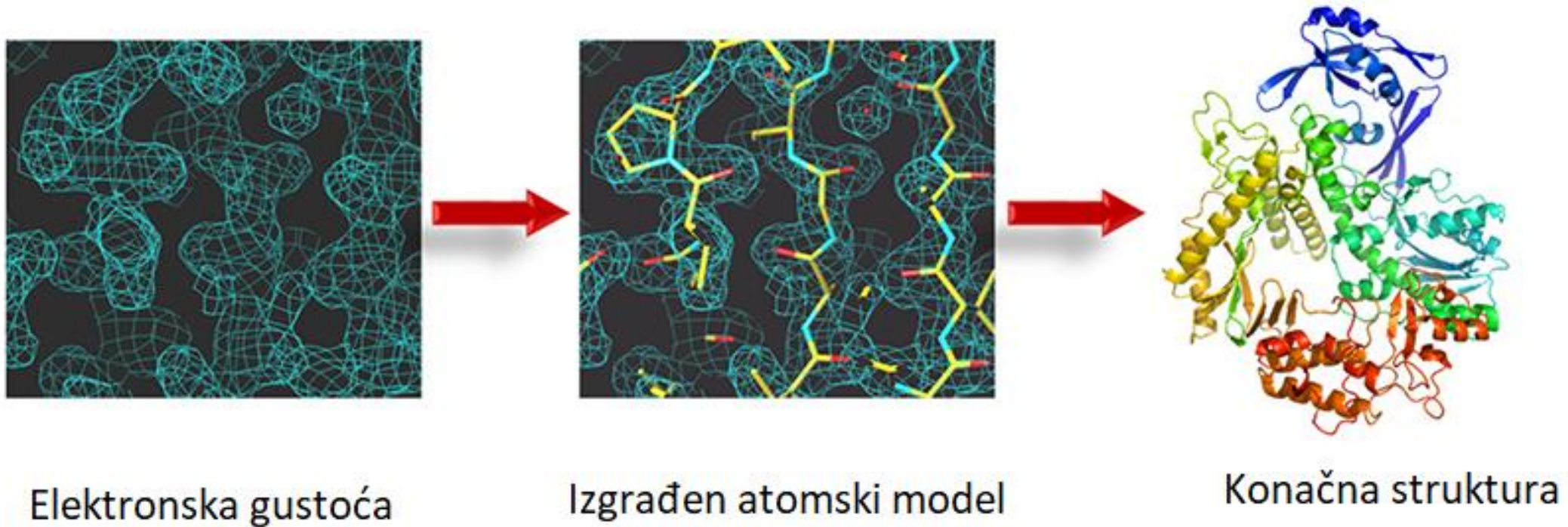
# Glavni koraci u određivanju trodimenzijske strukture makromolekula kristalografijom



(prilagođeno prema Mayer, 2017)



# Od elektronske gustoće do konačne strukture u XRD



Karta elektronske gustoće (lijevo) omogućuje postupnu izgradnju atomskog modela (sredina) koja vodi do trodimenzijskog modela strukture (desno).

# XRD metoda

Prednosti	Nedostaci/ograničenja
<ul style="list-style-type: none"><li>• brza identifikacije</li><li>• minimalna količina uzorka</li><li>• jednostavnost tumačenja dobivenih podataka</li><li>• dostupnost XRD mjernih instrumenata</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• priprema uzorka biomolekula u kristalnom obliku</li><li>• problem homogenosti praškastih uzorka</li><li>• potreban pristup standardnim referentnim podacima</li></ul>

# Kriogena elektronska mikroskopija (krio-EM)

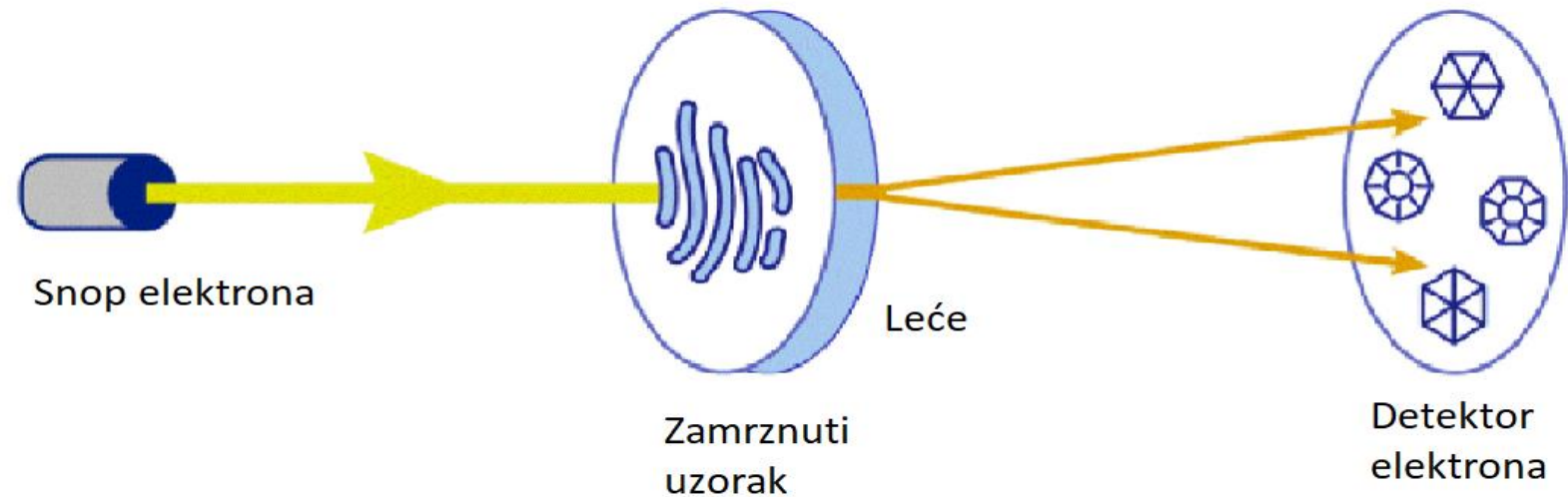
- tehnika elektronske mikroskopije
- primjena na uzorcima ohlađenim na kriogene temperature ( $< -160^{\circ}\text{C}$ ).
- vodena otopina uzorka nanosi se na rešetku i zamrzava
- formiranjem staklaste vode očuvana je struktura bioloških uzoraka
- dopuna XRD ili NMR u određivanju strukture makromolekula



<https://www.news-medical.net/life-sciences/Cryo-electron-Microscopy-Techniques.aspx>

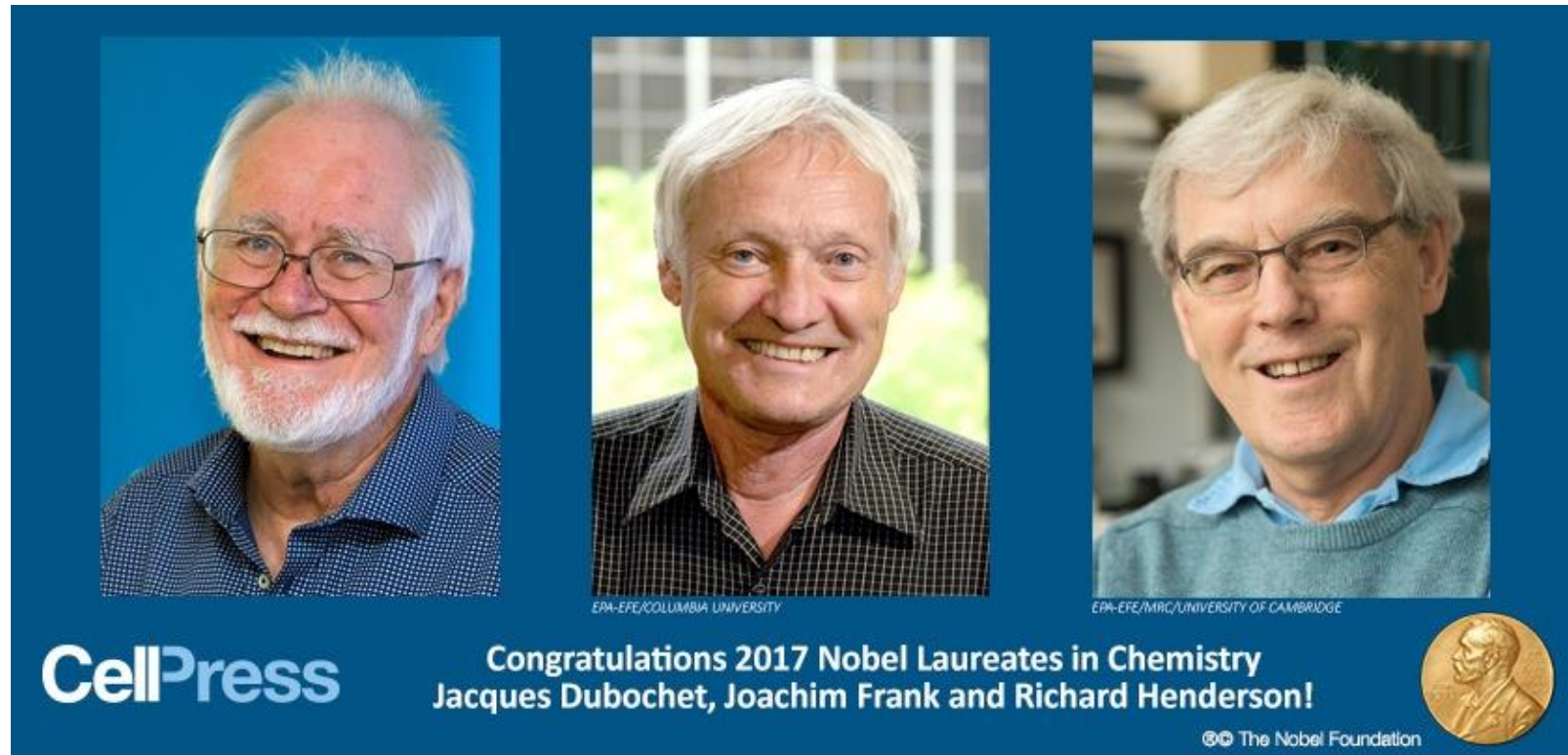
## Osnovni princip krio-EM

(prilagođeno prema Jednačak, Mikulandra i Novak, Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 7799)



## 2017. Nobelova nagrada za kemiju

“za razvoj krio-EM za određivanje strukture visokog razlučenja biomolekula u otopini”  
Lureati: Jacques Dubochet , Joachim Frank i Richard Henderson



<http://crosstalk.cell.com/blog/editors-reflect-on-the-2017-nobel-prize-in-chemistry>

- Nature Methods je 2016. također proglasio krio-EM za "Metodu godine".

# Podjela krio-EM metoda na dvije skupine temeljem prikupljanja podataka

## 1. Analiza jedne čestice (SPA, engl. *Single Particle Analysis*)

- strukturne informacije iz višestrukih kopija iste strukture
  - poravnanje i usrednjavanje tisuća slika izoliranih makromolekula i kompleksa *in vitro*, potom rekonstrukcija trodimenzijskih karata

## 2. Kriogena elektronska tomografija (krio-ET, engl. *Cryogenic Tomography*)

- snimanje na jednom području uzorka, ali iz različitih kutova
  - omogućeno je strukturno razjašnjenje heterogenih i složenih entiteta (npr. prokariotskih stanica.)

Slični problemi u pripremi uzorka uključuju

- agregaciju,
- denaturaciju i
- neadekvatnu gustoću ili debljina biološkog materijala.

# Razvoj krio-EM i postignuća

- pristupi u poboljšanju razlučivanja slike biomolekule unutar staničnih uvjeta.
- visoko razlučenje u potpuno hidratiziranom stanju bez smetnji kristalnim pakiranjem.
- izravni detektori elektrona omogućili su
  - strukturno određivanje dinamičkih makromolekulskih sklopova
  - vizualizaciju konformacijskih promjena nakon vezanja liganda.

# Razlozi porasta značaja krio-EM u strukturnoj biologiji

- eksponencijalni rast broja struktura gotovo atomskog razlučenja
- određivanje meta lijekova, nedostupnih kristalografskim metodama
- prevladavanjem ograničenja dobivene su strukture proteina veličine od 52 kDa i razlučivosti do 1,2 Å

\* Tipično razlučivanje je od 2,5 do 7 Å, većina EM deponiranih u Kartama banke podataka (EMDB) (<http://www.rcsb.org>) ima razlučenje veće od 4 Å.

# Krio-EM u farmaceutskoj industriji

- brz razvoj
- precizna i brza vizualizacija interakcija lijeka s receptorom
- informirano, ubrzano otkrivanje i dizajn lijekova



# Krio-EM perspektive u SBDD

- dovoljno dobro razlučivanje
- pristup novim strukturama (npr. transmembranski proteini)
- razumijevanje interakcija ligand-protein
- ravnotežnih stanja kompleksa liganada i proteina
- poboljšanje automatizacije, hardwera i softwera, omjera signal/šum, te brzine

# Krio-EM metoda

Prednosti	Nedostaci/ograničenja
<ul style="list-style-type: none"><li>• manje količine uzorka potrebne za analizu u odnosu na kristalografiju</li><li>• nije potrebno formirati kristal</li><li>• <i>in silico</i> pročišćavanje sastavnih i/ili konformacijskih stanja uzorka</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• razlučenje i osrednja propusnost</li><li>• postizanje slika dobre kvalitete</li><li>• dugotrajan i skup proces</li><li>• brojne prepreke redovitoj primjeni SBDD</li></ul>

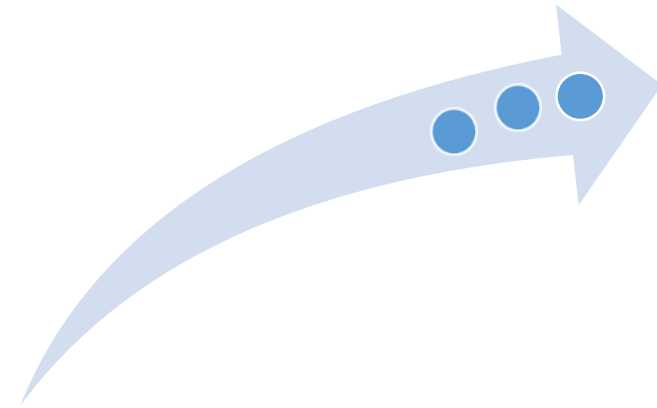
# Za lakše prihvaćanje krio-EM u industriji treba poboljšati

- jednostavnost izrade i praćenje uzoraka
  - vrijeme potrebno za prikupljanje i obradu seta podataka
  - trošak opreme i održavanja
- \*vrijeme i cijena su povezani

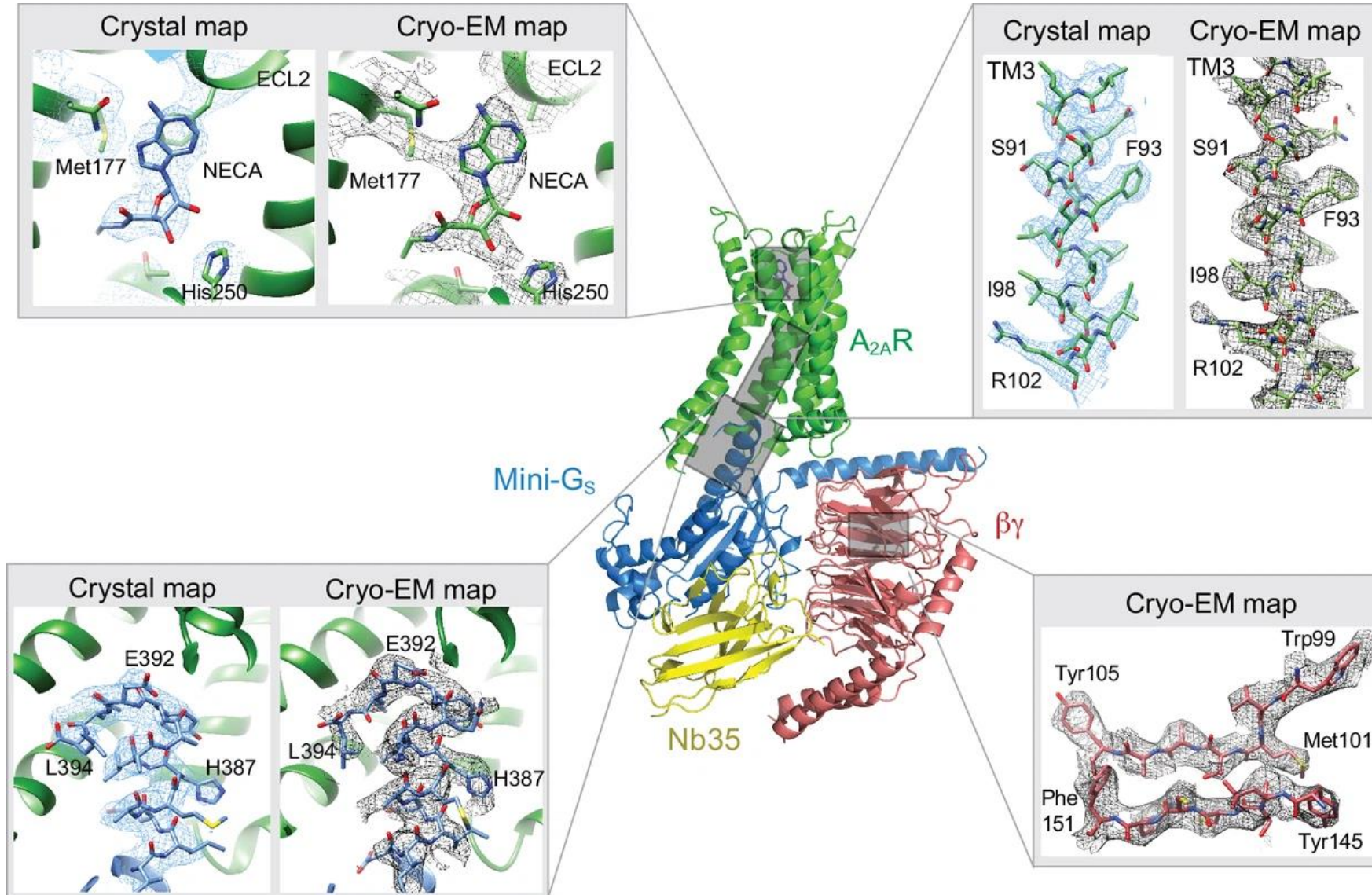
# Aktivna područja istraživanja u krio-EM instrumentaciji provode se s ciljem postizanja

- boljeg strukturnog razlučivanja i primjene u razvoju lijekova
  - bolji nosači uzoraka
  - poboljšane alternativne metode za izradu mreža
  - bolji direktni detektori elektrona
- povećanja propusnosti i smanjenje vremena prikupljanja podataka
  - brojanje elektrona i brzina očitavanja
- povećanja kontrasta za biomolekule do 80 kDa
  - rutinska primjena i korištenje fazne ploče
- boljih računalnih programi za obradu slika
  - procjena u stvarnom vremenu i
  - kvaliteta podataka

# Primjeri znanstvenih istraživanja uporabe krio-EM u određivanju struktura makromolekula



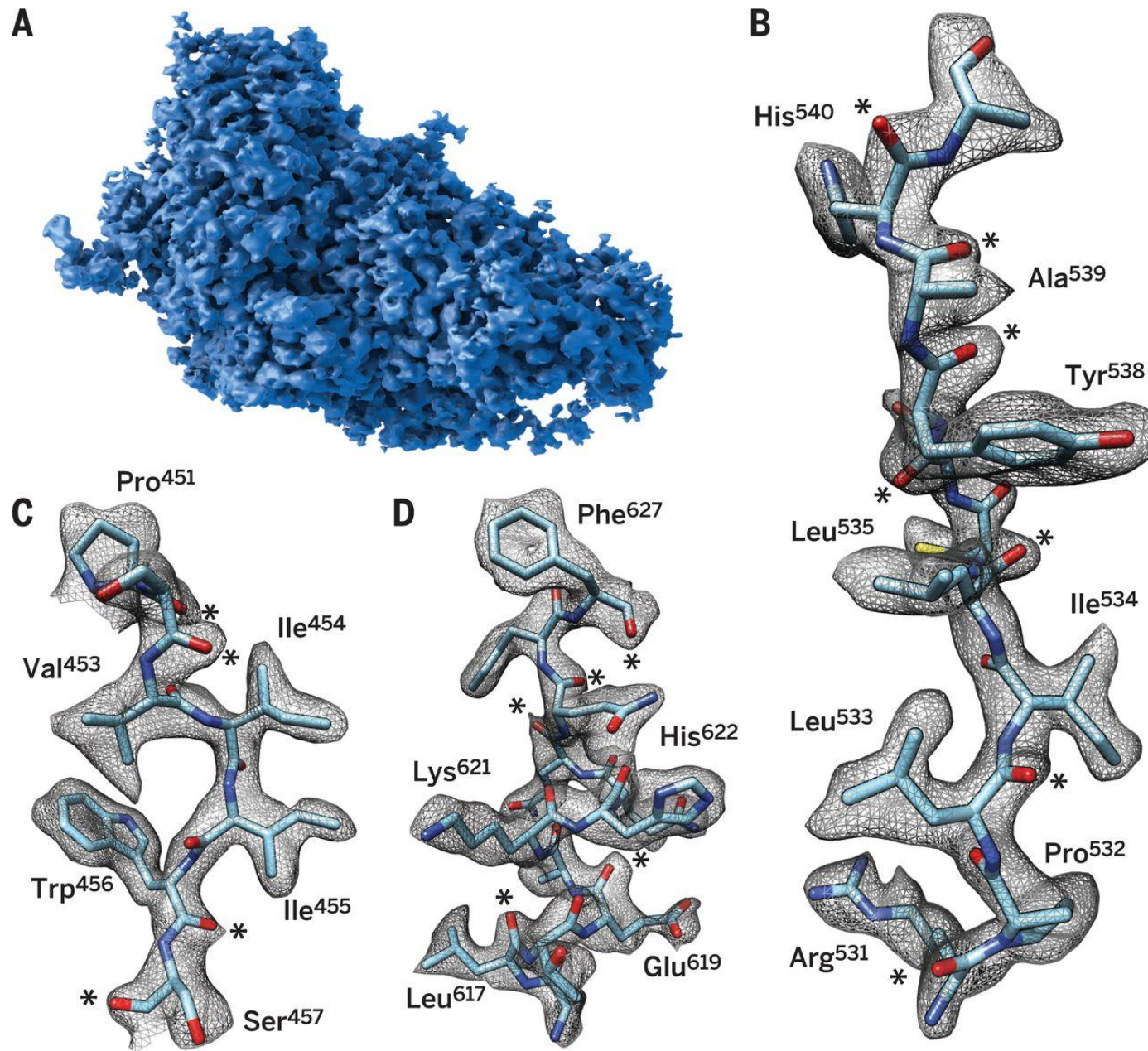
# Primjer 1. Usporedba mapa gustoće dobivenih iz XRD i krio-EM podataka



Struktura kompleksa A<sub>2A</sub>R-heterotrimernog G proteina određena krio-EM prikazana je kao crtani film. Četiri panela prikazuju regije strukture i povezane karte gustoće iz cryo-EM podataka i, gdje je prisutna, elektronsku gustoću (2Fo-Fc) iz rendgenske strukture A<sub>2A</sub>R-mini-GS (PDB kod 5g53). Gustoće za karte prikazane na pločama izoštrene su korištenjem sljedećih β faktora (razlučivost filtriranja u zagradama): β podjedinica i A<sub>2A</sub>R, -170 Å<sup>2</sup> (3,7 Å); mini-GS-A<sub>2A</sub>R sučelje, -130 Å<sup>2</sup> (3,7 Å); NECA, -130 Å<sup>2</sup> (4,1 Å). (preuzeto iz Garcia-Nafria i sur. 2018)

# Primjer 2: Krio-EM mapa gustoće $\beta$ -Gal-PETG kompleksa (razlučenje 2,2 Å)

- rezultati krio-EM  $\beta$ -Gal-PETG (465-Kd) približavaju metodu rutinskoj upotrebi u racionalnom dizajnu lijekova
- $\beta$ -Gal-PETG kompleks - ligand-proteinski kompleks  $\beta$ -galaktozidaze *E. coli* i inhibitora stanične permeacije feniletil  $\beta$ -d-tiogalaktopiranozida (PETG)



(A) Površinski prikaz karte gustoće jednog od četiri protomera u tetramernom kompleksu.

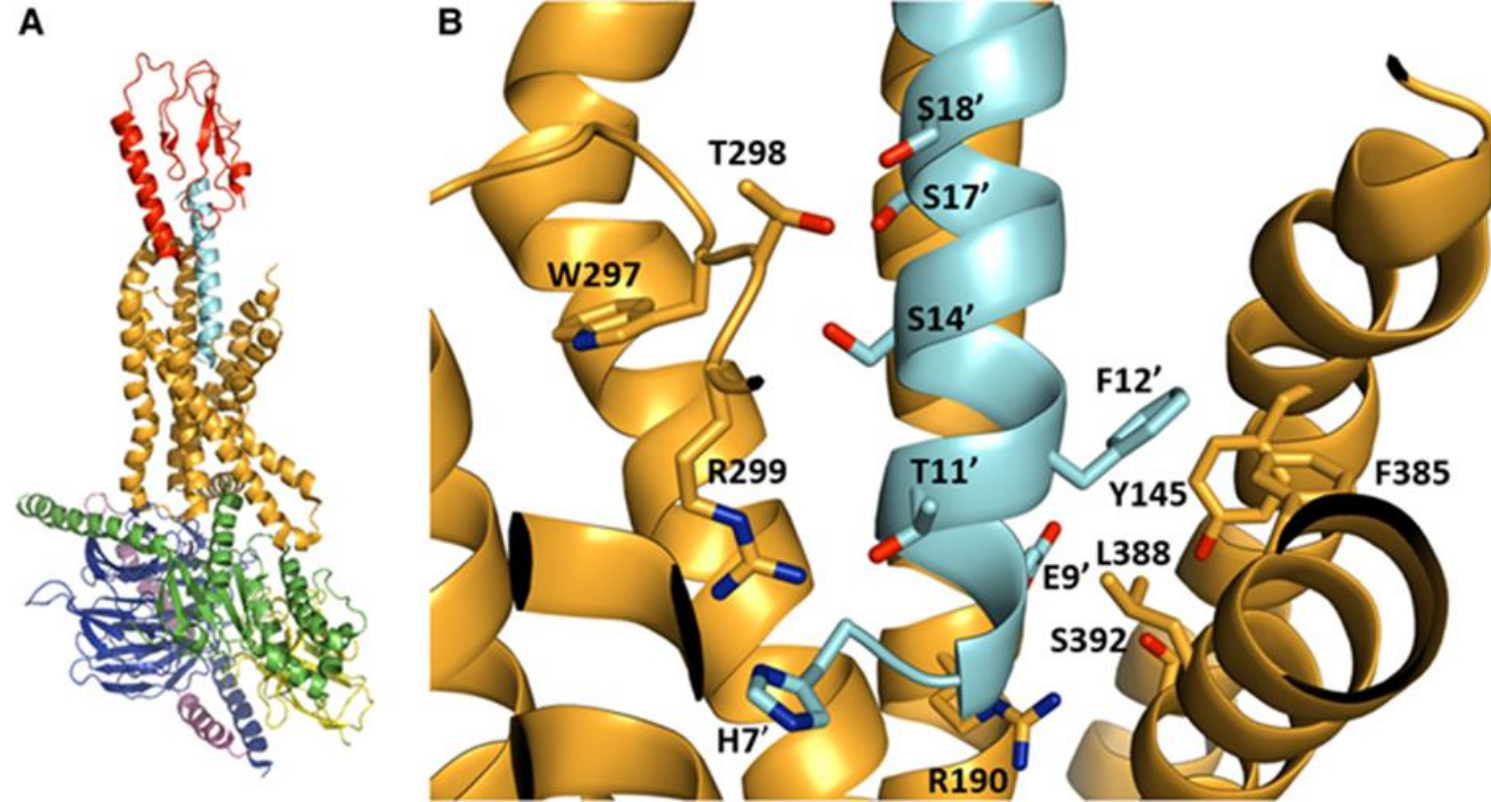
(B) (B do D) Vizualizacija odabranih područja karte koja prikazuje razgraničenje sekundarnih strukturnih elemenata, gustoće aminokiselina i karbonilnih dijelova (označeno zvjezdicama). Gustoća za Phe<sup>627</sup> je razrijeđena u središtu aromatskog prstena, otkrivajući prisutnost "rupe" u prstenu, značajku koja se tipično opaža u strukturama određenim rendgenskom kristalografijom pri rezolucijama od ~2 Å. (preuzeto iz Bartesaghi i sur. 2015.)

### Primjer 3. Krio-EM struktura Glp-1 receptora (GLP1R), također u kompleksu s G proteinom i agonistom pri razlučenju od 4,1 Å

GLP1R – glukagonu nalik peptidni receptor 1

- engl. *Glucagon like peptide 1 receptor*
- gen enkodira za 7-transmembranski protein koji djeluje kao receptor za GLP-1 hormon

GLP-1 hormon – stimulira izlučivanje inzulina izazvano glukozom

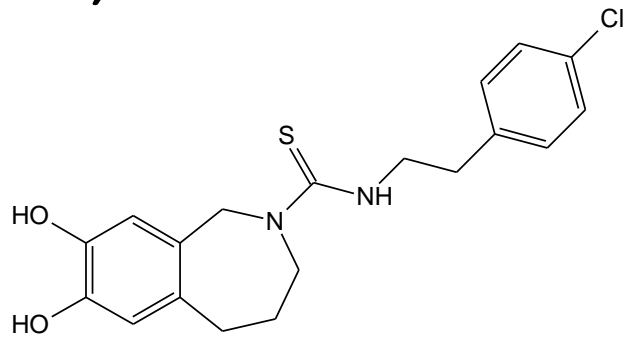


A. Crtani zaplet sklopa s Gp1 (plavo), ECD Glp1R (crveno), TM domena Glp1R (zlatnožuto), Gαs podjedinica (zeleno), Gβ podjedinica (tamnoplavo), Gγ podjedinica (ljubičasto) i stabilizirajućim nanotijelom (žuto).

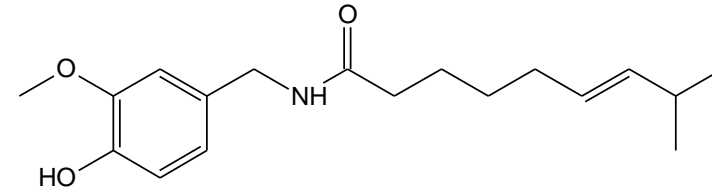
B. Dio strukture s nekim od ostataka Glp1R i Gp1 koje su istaknuli Zhang i sur. kao važan za vezivanje i aktivaciju.



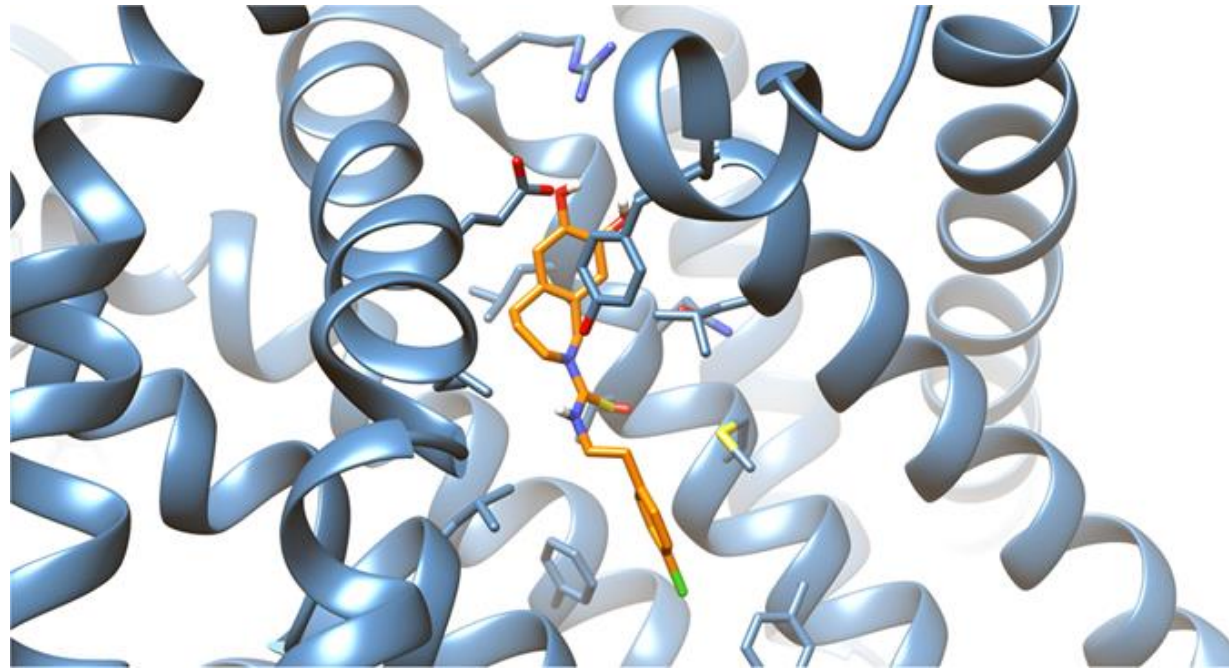
# Primjer 4: krio-EM vaniloidnog antagonista kapsazepina i TRPV1 kanala pri razlučenju od 3,8 Å



Kapsazepin



Kapsaicin



- kapsazepin
  - kompetitivni antagonist kapsaicina
  - služi za eksperimentalnu uporabu
- kapsaicin
  - aktivira TRPV1 kanale - reguliraju tjelesnu temperaturu
- TRPV1
  - podfamilija receptora vaniloidnog prolaznog potencijala 1
  - pruža osjećaj vrućine i boli (nocicepcija)
  - engl. *Transient receptor potential vaniloid 1 T*
  - molekularni integrator
    - štetnih podražaja u rasponu od
      - oštih prirodnih proizvoda (npr. kapsaicina i resiniferatoksina) do
      - navodnih 'endovaniloida' (endogeni agonisti TRPV1).

**Prilog 6.**  
Makromolekule  
i ligandi  
određeni  
pomoću krio-  
EM

**Tablica 1. Proteinska meta, molekulska masa, primjer molekulske mase male molekule liganda, indikacija bolesti (prilagođeno prema lit.<sup>7)</sup>)**

Protein	Mol. masa	Mala molekula	Bolest	Literaturni izvor
Leishmania ribosom	1.6 MDa	616	Parazit/infekcija	Shalev-Benami, M.; Zhang, Y.; Rozenberg, H.; Nobe, Y.; Taoka, M.; Matzov, D.; Zimmerman, E.; Bashan, A.; Isobe, T.; Jffe, L.C.; Yonath, A.; Skiniotis, G. Atomic resolution snapshot of Leishmania ribosome inhibition by the aminoglycoside paromomycin. <i>Nat. Commun.</i> <b>2017</b> , <i>8</i> : 1589.
Glp1R kompleks	161 kDa	GLP1; 3.3 K	Tip 2 dijabetes, debljina	Zhang, Y.; Sun, B.; Feng, D.; Hu, H.; Chu, M.; Qu, Q.; Tarrasch, J.T., Li S, Kobilka, T.S.; Kobilka, B.K.; Skiniotis, G. Cryo-EM structure of the activated GLP-1 receptor in complex with a G protein. <i>Nature</i> <b>2017</b> , <i>546</i> : 248–253.
Adenozin 2A receptor	144 kDa	Karboksamido adenozin; 308	Kardio i immune bolesti	García-Nafria, J.; Tate, C.G. Cryo-Electron Microscopy: Moving Beyond X-Ray Crystal Structures for Drug Receptors and Drug Development. <i>Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.</i> <b>2019</b> , <i>60</i> : 51–71.
Adenozine 1 receptor	130 kDa	Adenozin; 267	Ishemija–reperfuzija ozljeda, Neuropatska bol	Draper-Joyce, C.J., Khoshouei, M., Thal, D.M., Liang, Y.-L., Nguyen, A.T.N., Furness, S.G.B. et al. Structure of the adenosine-bound human adenosine A1 receptor-Gi complex. <i>Nature</i> <b>2018</b> , <i>558</i> : 559–563.
5HT1B	112 kDa	Donitriptan; 404	Ponašanje, migrena	García-Nafria, J.; Tate, C.G. Cryo-Electron Microscopy: Moving Beyond X-Ray Crystal Structures for Drug Receptors and Drug Development. <i>Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.</i> <b>2019</b> , <i>60</i> : 51–71.
Mu-opiodni receptor	154 kDa	DAMGO; 514	Analgezija	Koehl, A.; Hu, H.; Maeda, S.; Zhang, Y.; Qu, Q.; Paggi, J.M.; Lettoraca, R.N.; Hilger, D.; Dawson, R.; Matile, H.; Schertler, F.X.G.; Grainer, S.; Weis, I.W.; Dror, O.R.; Manglik, A.; Skiniotis, G.; Kobilka, B. Structure of the m-opioid receptor–Gi protein complex. <i>Nature</i> <b>2018</b> , <i>558</i> : 547–552.
TRPV1 kanal	318 kDa	Resiniferatoksin; 628 Kapsazepin; 377	Analgezija	Gao, Y.; Cao, E.; Julius, D.; Cheng, Y. TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action. <i>Nature</i> <b>2016</b> , <i>534</i> : 347–351.
TRPC6 kanal	293 kDa	Inhibitor BTDM; 340	Bubrežna bolest, regulacija Ca	Tang, Q.; Guo, W.; Zheng, L.; Wu, J.-X., Liu, M.; Zhou, X.; Zhang, X.; Chen, L. Structure of the receptor-activated human TRPC6 ion channels. <i>Cell. Res.</i> <b>2018</b> , <i>28</i> : 746–755.
DNA-PK	610 kDa	–	Onkologija	Sharif, H., Li, Y., Dong, Y., Dong, L., Wang, L. W., Mao, Y.; Wu, H. Cryo-EM structure of the DNA-PK holoenzyme. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> <b>2017</b> , <i>114</i> : 7367–7372.
p97	650 kDa]	UPCD30245; 464	Onkologija	Banerjee, S.; Bartesaghi, A.; Merk, A.; Rao, P.; Bulfer, S.L.; Yan, Y.; Green, N.; Mroczkowski, B.; Neitzzz, R.J.; Wipf, P.; Falconieri, V.; Deshaies, J. R.; Milne, L.S.J.; Huryn, D. 2.3 Å resolution cryo-EM structure of human p97 and mechanism of allosteric inhibition. <i>Science</i> <b>2016</b> , <i>351</i> : 871–875.
EIF2B transkripcijski faktor	545 kDa	Inhibitor; 451	Spoznaja	Zyryanova, A.F.; Weis, F.; Faille, A.; Alard, A.A.; Crespillo-Casado, A.; Sekine, Y.; Sekine, Y.; Harding, H.P.; Allen, F.; Parts, L.; Fromont, C.; Fischer, P.M.; Warren, A.J.; Ron, D. Binding of ISRIB reveals a regulatory site in the nucleotide exchange factor eIF2B. <i>Science</i> <b>2018</b> , <i>359</i> : 1533–1536.
Inzulinski receptor	221 kDa	–	Dijabetes	Ward, C.W.; Menting, J.G.; Lawrence, M.C. The insulin receptor changes conformation in unforeseen ways on ligand binding: sharpening the picture of insulin receptor activation. <i>BioEssays</i> <b>2013</b> , <i>35</i> : 945–954.
Tau	79 kDa monomer	–	Neurodegenerativna bolest	Fitzpatrick, A.W.P.; Falcon, B.; He, S.; Murzin, A.G.; Murshudov, G.; Garringer, H.J.; Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer’s disease. <i>Nature</i> <b>2017</b> , <i>547</i> : 185–190.

# ZAKLJUČCI

- XRD i krio-EM su dvije glavne metode za dobivanje trodimenzijskih struktura makromolekula potrebnih za razumijevanje bioloških procesa i razvoj novih lijekova.
- XRD se temelji na interakciji X-zraka s elektronskim oblakom atoma u kristalu.
- Krio-EM se oslanja na interakciju elektrona s elektrostatskim poljem atoma u uzorku.
- XRD metoda - glavna metoda strukturne analize uzoraka u kristalnom obliku, ali uzorci mogu biti i drugi čvrsti oblici kao npr. prah.
- Krio-EM metoda - određivanja strukture biomolekula i njihovih kompleksa u smrznutoj otopini.

	Prednosti	Nedostaci
<b>XRD</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• brzina identifikacije</li> <li>• minimalna količina uzorka</li> <li>• jednostavnost tumačenja dobivenih podataka</li> <li>• dostupnost XRD instrumentacije</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• priprema uzoraka u kristalnom obliku tvari koje teško kristaliziraju</li> <li>• homogenost praškstih uzoraka</li> <li>• analiza zahtijeva pristup referentnim podacima</li> </ul>
<b>Krio-EM</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• niži zahtjevi za uzorkom</li> <li>• priprava kristala nije preduvjet za analizu</li> <li>• dovoljno je nekoliko mikrolitara uzorka</li> <li>• <i>in silico</i> pročišćavanje sastavnih i/ili konformacijskih stanja uzorka.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nisko razlučivanje</li> <li>• elektroni mogu prouzrokovati oštećenja uzorka</li> <li>• dugotrajnost procesa određivanja</li> <li>• skupoća instrumentacije</li> </ul>

Daljnja poboljšanja u pripremi uzorka zajedno s brзом identifikacijom promaknuti će krio-EM u često korišteni alat u početnim fazama otkrića lijeka, kao dopunu podacima dobivenim rendgenskom kristalografijom i metodama NMR.

# Literaturni izvori

Mayer, C. X-Ray diffraction in biology: How can we see DNA and proteins in three dimensions? Ch. 9, u X-ray scattering, Ares A. E. (Ed.). London: IntechOpen; 2017, str. 207-218.	Ceska, T.; Chun-Wa, C.; Cooke, R.; Phillips, C.; Williams, P.A. Cryo-EM in drug discovery. <i>Biochem. Soc. Trans.</i> <b>2019</b> , <i>47</i> : 487–493.
Rodríguez, I.; Gautam, R.; Tinoco, A.D. <i>Biomimetics</i> <b>2021</b> , <i>6</i> : 1–23.	Deschamps, J.R. <i>AAPS J.</i> <b>2005</b> ; <i>7</i> : Article 78.
Anderson, C.A. <i>Chem. Biol.</i> <b>2003</b> , <i>10</i> : 787–797.	Carroni, M.; Saibil, H.R. <i>Methods</i> <b>2016</b> , <i>95</i> :78–85.
Bacchi, A. <i>Rend. Fis. Acc. Lincei</i> <b>2013</b> , <i>24</i> : 109–114.	Jednačak, T.; Mikulandra, I.; Novak, P. <i>Int. J. Mol. Sci.</i> <b>2020</b> , <i>21</i> : 7799.
Sugiki, T.; Furuita, K.; Fujiwara, T.; Kojima, C. <i>Molecules</i> <b>2018</b> , <i>23</i> : 148.	Renaud, J.-P.; Chari, A.; Ciferri, C.; Liu, W.-t., Rémy, H.W.; Stark, H.; Wiesmann, C. <i>Nat. Rev. Drug Discov.</i> <b>2018</b> , <i>17</i> : 471–492.
Meier, A.; Söding, J. <i>PLoS Comput. Biol.</i> <b>2015</b> , <i>11</i> : e1004343.	. Wigge, C.; Stefanovic, A.; Radjainia, M. <i>Drug Discov. Today Technol.</i> <b>2020</b> , <i>38</i> : 91–102.
Berman, H.M., Westbrook, J., Feng Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E., <i>Nucl. Acids Res.</i> <b>2000</b> , <i>28</i> : 235–242.	García-Nafría, J.; Tate, C.G. <i>Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.</i> <b>2019</b> , <i>60</i> : 51–71.
<a href="http://www.rcsb.org">http://www.rcsb.org</a> , pristupljeno 3.05.2022.	Bartesaghi, A.; Aguerrebere, C.; Falconieri, V.; Banerjee, S.; Earl, L.A.; Zhu, X.; Grigorieff, N.; Milne, L.S.J.; Sapiro, G.; Wu, X.; Subramanian, S. <i>Structure</i> <b>2018</b> , <i>26</i> : 848–856.e3
Maveyraud, L.; Mourey, L. <i>Molecules</i> <b>2020</b> , <i>25</i> : 1030–1048.	Shalev-Benami, M.; Zhang, Y.; Rozenberg, H.; Nobe, Y.; Taoka, M.; Matzov, D.; Zimmerman, E.; Bashan, A.; Isobe, T.; Jffe, L.C.; Yonath, A.; Skiniotis, G. <i>Nat. Commun.</i> <b>2017</b> , <i>8</i> : 1589.
Kendrew, J.C.; Dickerson, R.E.; Strandberg, B.E.; Hart, R.G.; Davies, D.R.; Phillips, D.C.; Shore, V.C. <i>Nature</i> <b>1960</b> , <i>185</i> : 422–427.	Banerjee, S.; Bartesaghi, A.; Merk, A.; Rao, P.; Bulfer, S.L.; Yan, Y.; Green, N.; Mroczkowski, B.; Neitz R.J.; Wipf, P.; Falconieri, V.; Deshaies, J.R.; Milne, L.S.J.; Huryn, D.; Arkin, M.; Subramaniam, S. <i>Science</i> <b>2016</b> , <i>351</i> : 871–875.
Watson, J.D.; Crick, F.H.C. <i>Nature</i> <b>1953</b> , <i>171</i> : 737–738.	Tsai, J.C.; Miller-Vedam, L.E.; Anand, A.A.; Jaishankar, P.; Nguyen, H.C.; Renslo, A.R.; Frost, A.; Walter, P. <i>Science</i> <b>2018</b> , <i>359</i> : eaaq0939.
Hodgkin, D.C. <i>Adv. Sci.</i> <b>1949</b> , <i>6</i> : 85–89.	

Hvala na pažnji!!!