

AUTOMATYZACJA POMIARÓW SYNCHROTRONOWYCH

Mirosław Gilski

Wydział Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza i Centrum Badań Biokrytalograficznych
Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

e-mail: mirek@amu.edu.pl

Współczesna krystalografia, w szczególności krystalografia białek, swój szybki rozwój zawdzięcza w dużej mierze dostępności do promieniowania synchrotronowego. Promieniowanie to ma wiele cech i parametrów, które w znaczący sposób pozwalają zwiększyć precyzję wykonywanych pomiarów jak również skrócić czas potrzebny na wykonanie eksperymentu. Natężenie promieniowania synchrotronowego jest kilka tysięcy razy większe od natężenia promieniowania rentgenowskiego uzyskiwanego przy pomocy tradycyjnych lamp rentgenowskich. O podobny rząd wielkości można również skrócić czas przebywania kryształu w wiązce rentgenowskiej, co jest bardzo istotne ze względu na delikatną naturę kryształów białkowych wrażliwych na uszkodzenia radiacyjne. Inną cechą synchrotronowego promieniowania rentgenowskiego jest możliwość otrzymania promieniowania o różnych długościach fali. Pozwala to na wykorzystanie nowych metod biokrytalograficznych opartych na zjawisku anomalnego rozpraszania (MAD – Multi-wavelength Anomalous Diffraction).

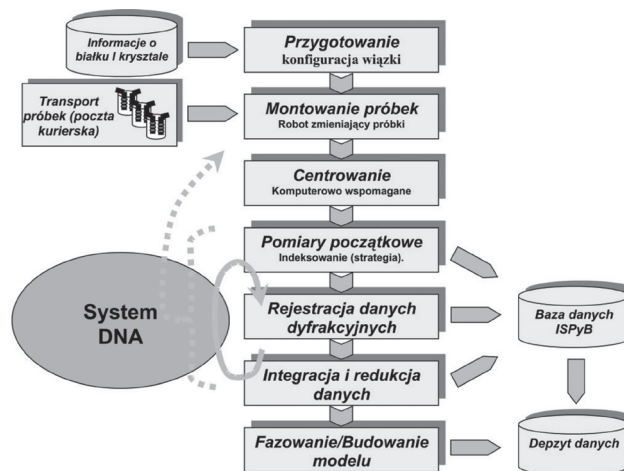
Obecnie na świecie pracuje około 60 synchrotronów, a około 10 jest w różnych fazach budowy. Zdecydowana większość z nich posiada dedykowane linie przeznaczone do badań biokrytalograficznych (Rys. 1). W Europie znajduje się kilkanaście ośrodków synchrotronowych, które oferują kilkadziesiąt dostępnych linii synchrotronowych zaprojektowanych do badań strukturalnych białek.

Typowy synchrotronowy eksperyment rentgenowski (Rys. 2) oprócz problemów naukowych związany jest z dużym przedsięwzięciem logistycznym. Na pomiary do ośrodka synchrotronowego, oddalonego o kilkaset lub nawet kilka tysięcy kilometrów, na kilka dni musi pojechać z reguły trzy- lub czteroosobowa grupa. Delegowanie takiej grupy wiąże się z dużymi nakładami pracy administracyjnej związanej z organizacją takiego wyjazdu. Są to rezerwacje biletów, wynajęcie hotelu i mnóstwo różnych formalności takich jak np. diety i polisy ubezpieczeniowe. Oprócz tego należy przygotować do transportu próbki przeznaczone do badań synchrotronowych. Ponieważ kryształy białek są często delikatne i nietrwałe przechowuje się je i transportuje w temperaturze ciekłego azotu. Zgodnie z przepisami ruchu lotniczego, przesyłkę taką musimy wysłać pocztą kurierską używając specjalnych pojemników transportowych (Dry Shipper). Pojemniki takie zaprojektowane są do transportu lotniczego próbek biologicznych w temperaturach kriogenicznych. Wykonane one są z wytrzymałego i lekkiego aluminium i wypełnione są hydrofobowym absorbentem, który wchłania ciekły azot, zapobiegając rozlewaniu podczas transportu.

W czasie pobytu w ośrodku synchrotronowym członko-



Rysunek 1. Stacja badawcza ID14 (ESRF, Grenoble) do pomiarów dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na kryształach białkowych. Na pierwszym planie widać robot zmieniający próbki wraz z dewarem mieszczącym 50 próbek.



Rysunek 2. Schemat typowego eksperymentu w krystalografii białek. System DNA kontroluje wszystkie etapy związane bezpośrednio z pomiarami synchrotronowymi.

wie grupy pracują w systemie trzyzmianowym, przez całą dobę dozorując przebieg eksperymentu. Montują i centrują nowe kryształy w wiązce rentgenowskiej, kontrolują i korygują w razie potrzeby parametry wiązki oraz rejestrują a następnie procesują obrazy dyfrakcyjne.

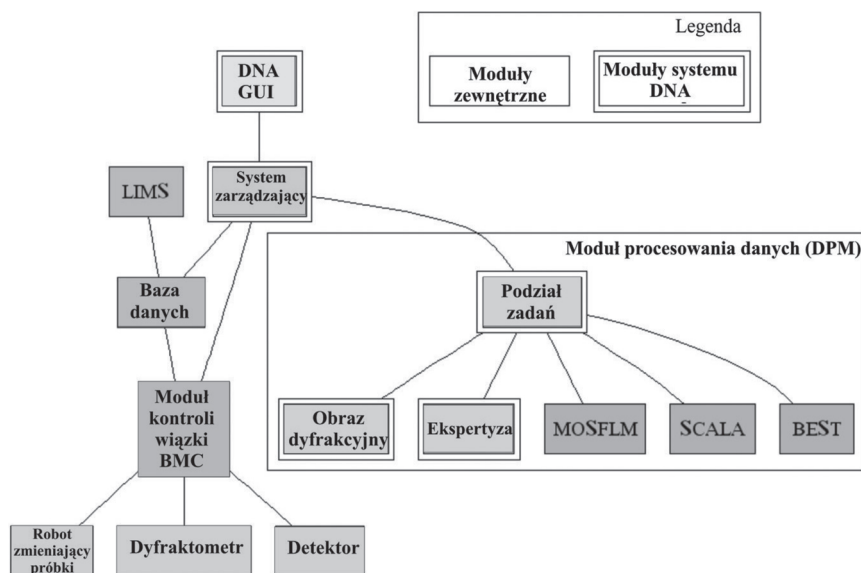
Praktycznie we wszystkich ośrodkach synchrotronowych, które oferują linie synchrotronowe dedykowane dla krystalografii białek, trwają intensywne i mocno już zaawansowane prace mające na celu automatyzację poszcze-

gólnych kroków eksperymentu.

Możemy tu wyróżnić dwie główne grupy procesów, na których skupiają się obecnie inżynierowie.

1. Automatyzacja pozycjonowania i stabilności wiązki promieniowania. Głównym zadaniem tego modułu jest dostarczenie skupionej wiązki promieniowania rentgenowskiego o stabilnym natężeniu i długości fali. Auto-

Technology Platform for European Structural Genomics) związanych z dostępem do linii synchrotronowych. Celem tych projektów jest stworzenie jednolitego systemu i procedur służących do rozwiązywania struktur białek poprzez udostępnienie użytkownikowi interfejsu, z którego mógłby on zaplanować i przeprowadzić swój eksperyment zarówno lokalnie i zdalnie ze swojego komputera osobistego.



Rysunek 3. Moduły systemu DNA. Podwójną linią zaznaczone są kluczowe moduły programu. Pozostałe moduły niezależnie wykonują różnego rodzaju zadania zlecone przez DNA.

matyczny system śledzenia wiązki rentgenowskiej monitoruje i koryguje pozycję oraz intensywność wiązki [1].

2. Automatyzacja rejestracji i procesowania danych dyfrakcyjnych. Zadaniem tej grupy jest umożliwienie zdalnego precyzyjnego umieszczenia i wycentrowania kryształów w wiązce rentgenowskiej, dostęp do procedur szybkiego testowania jakości kryształów, rejestracja danych dyfrakcyjnych oraz wstępne procesowanie otrzymanych danych.

Jednocześnie rozwijane jest oprogramowanie, które pozwala w inteligentny sposób integrować i sterować wszystkimi modułami linii synchrotronowej [2]. Problemy logistyczne i wysoki stopień skomplikowania pomiarów synchrotronowych skłaniają do poszukiwania nowych rozwiązań i sposobów jeszcze bardziej efektywnego wykorzystania istniejących zasobów. Jedną z propozycji polega na wysłaniu pocztą kurierską zamrożonych w ciekłym azocie kryształów białkowych do ośrodka synchrotronowego i przeprowadzeniu pomiarów za pośrednictwem łączności internetowej. Zaoszczędzi nam to wiele czasu i problemów logistycznych.

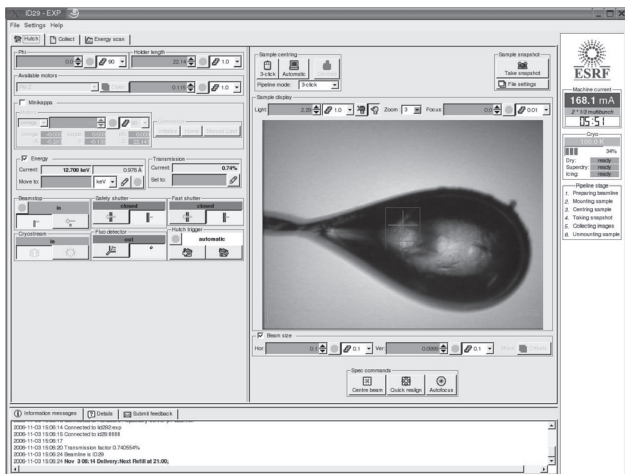
W największym europejskim ośrodku synchrotronowym The European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) w Grenoble, od kilku lat wdrażanych jest kilka finansowanych przez Unię Europejską projektów takich jak e-HTPX (High Throughput Protein Crystallography) i BioXHIT (Biocrystallography (X) on a Highly Integrated

Jednym z kluczowych elementów systemu e-HTPX jest program komputerowy o nazwie DNA (automateD collection of data) (Rys. 3) [3]. Jest to zestaw programów komputerowych zaliczany do grupy tzw. systemów ekspertrych, wspomagających podejmowanie rozsądnych decyzji w czasie rejestracji danych dyfrakcyjnych. Dodatkowo umożliwia on zdalny dostęp do eksperymentu poprzez prosty interfejs. System DNA komunikuje się i zarządza wieloma niezależnymi modułami. Do najważniejszych należą:

- Moduł kontroli linii synchrotronowej (BMC)
- Moduł procesowania danych (DPM)
- Baza danych (ISPyB)

Moduł BMC (Rys. 4) ma pełną kontrolę i wszystkie informacje związane z aktualnym stanem stacji pomiarowej. Steruje on robotem ASC (Automatic Sample Changer) [4], który potrafi zidentyfikować nasz kryształ a następnie wyjąć go z dewara z ciekłym azotem i zamontować go w wiązce. Kryształy montowane są na specjalnie zaprojektowanych magnetycznych półgłówkach, które znajdują się w magazynkach po 10 sztuk w każdym (Rys. 5). Dewar robota może pomieścić 5 takich magazynków. Każda próbka oraz każdy magazynek oznakowane są specjalnym kodem. Ponadto moduł BMC ma pełną kontrolę nad wszystkimi parametrami dyfraktometru i detektora (Rys. 6).

Moduł procesowania danych [5],[6] odpowiada za analizę danych dyfrakcyjnych, testowanie jakości kryształów

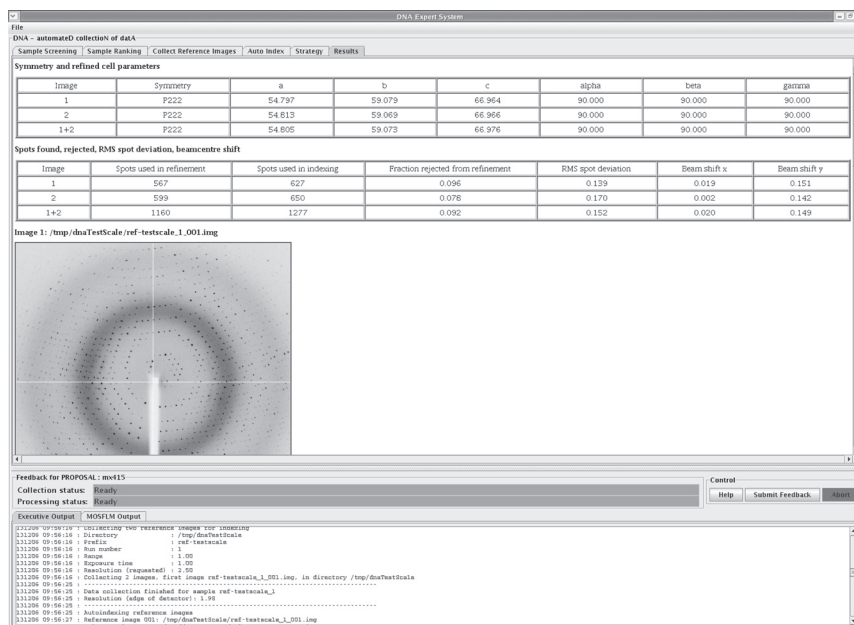


Rysunek 4. Obraz programu MxCube modułu BMC zarządzającego przebiegiem pomiarów dyfrakcyjnych w ośrodku synchrotronowym ESRF w Grenoble.



Rysunek 5. Magazynek mieszczący 10 kryształów przeznaczonych do badań używany przez robota ASC. Można załadować 5 takich magazynków.

Rysunek 6. Główny interfejs systemu DNA pozwalający na bieżąco kontrolować poszczególne etapy eksperymentu.



oraz procesowanie danych przy pomocy zewnętrznego programu MOSFLM [7]. Z kolei program BEST [8] wspomaga wybór najlepszej strategii rejestracji obrazów dyfrakcyjnych.

Wszystkie dane uzyskane z poszczególnych modułów są analizowane przez system DNA a następnie zapisywane w bazie danych ISPyB (Information System for Protein Crystallography Beamlines). Baza ta zawiera wszystkie informacje dotyczące aktualnego eksperymentu i naszej próbki.

Wszystkie opisane powyżej elementy zarówno sprzętu jak i oprogramowania rozwijane są zgodnie ze standardami opracowanymi na potrzeby programu SPINE (Structural Proteomics in Europe) [9]. Dzięki temu istnieje łatwa możliwość przenoszenia całych systemów do innych ośrodków synchrotronowych lub integracja poszczególnych elemen-

tów z istniejącymi rozwiązaniami [10]. Komunikacja pomiędzy niezależnymi modułami i programami zewnętrznymi odbywa się poprzez pliki zapisane w formacie XML. Zarówno wszystkie polecenia przekazywane do modułu jak również wyniki jego działania zapisywane i przekazywane są w tym formacie. Pozwala to w prosty sposób dołączyć do systemu dowolny program.

Obecny stopień zaawansowania europejskich projektów mających na celu bardziej efektywne wykorzystanie zasobów synchrotronowych, umożliwia zdalne przeprowadzanie pomiarów dyfrakcyjnych w czasie kilku minut [11 - 13]. Nie musimy przy tym organizować wyjazdu do ośrodka synchrotronowego – wszystkie czynności związane z przeprowadzeniem eksperymentu możemy wykonać korzystając ze swojego, podłączonego do sieci komputerowej, komputera osobistego. Wcześniej musimy jedynie wysłać pocztą kurierską nasze kryształy.

W trakcie takiej sesji pomiarowej istnieje możliwość sprawdzenia jakości wielu kryształów, monitorowania i zmieniania parametrów linii pomiarowej oraz zarejestrowania danych dyfrakcyjnych, zgodnie z naszymi preferencjami. Efekty takiego w pełni kontrolowanego pomiaru, w postaci obrazów dyfrakcyjnych i wyników procesowania danych, można kilka minut później zobaczyć na ekranie komputera.

W listopadzie ubiegłego roku z siedziby Centrum Badań Biokrytalograficznych (CBB) w Poznaniu przeprowadzono po raz pierwszy całkowicie zdalny pomiar dyfrakcyjny w największym europejskim ośrodku synchrotronowym ESRF w Grenoble [14] (Rys. 7). Łączność pomiędzy CBB i ESRF nawiązano za pośrednictwem Internetu, a oprogramowanie DNA umożliwiło operowanie linią synchrotronową i kryształami białkowymi w Grenoble za pośrednictwem klawiatury i myszy komputera osobistego.

Ten udany eksperyment otwiera perspektywy dla prowadzenia synchrotronowych pomiarów krystalograficznych praktycznie z dowolnego miejsca, dając przy tym możliwość pełnej kontroli nad prowadzonym eksperymentem.

Literatura

- [1] S. Arzt *et al.*, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **89** (2005) 124-152.
- [2] A. Beteva *et al.*, *Acta Crystallogr. D* **62** (2006) 1162-1169.
- [3] A.G.W. Leslie, H.R. Powell, G. Winter, O. Svensson, D. Spruce, S. McSweeney, D. Love, S. Kinder, E. Duke, C. Nave, *Acta Crystallogr. D* **58** (2002) 1924-1928.
- [4] G. Snell, C. Cork, R. Nordmeyer, E. Cornell, G. Meigs, D. Yegian, J. Jaklevic, J. Jin, R. Stevens, T. Earnest, *Structure* **12** (2004) 537-545.
- [5] J. L. Ferrer, *Acta Crystallogr. D* **57** (2001) 1752-1753.
- [6] M. Roth, P. Carpentier, O. Kaikati, J. Joly, P. Charrault, M. Pirocchi, R. Kahn, E. Fanchon, L. Jacquamet, F. Borel, A. Bertoni, P. Israel-Gouy, J.-L. Ferrer, *Acta Crystallogr. D* **58** (2002) 805-814.
- [7] A.G.W. Leslie, *Acta Crystallogr. D.* **62** (2006) 48-57.



Rysunek 7. Zdalna sesja pomiarowa w ośrodku synchrotronowym ESRF przeprowadzona z CBB IBCh PAN w Poznaniu.

- [8] Bourenkov, G. P. & Popov, A. N., *Acta Crystallogr. D* **62** (2006) 58-64.
- [9] F. Cipriani, F. Felisaz, L. Launer, J.-S. Aksoy, H. Caserotto, S. Cusack, M. Dallery, F. di-Chiaro, M. Guijarro, J. Huet, S. Larsen, M. Lentini, J. McCarthy, S. McSweeney, R. Ravelli, M. Renier, C. Taffut, A. Thompson, G.A. Leonard, M.A. Walsh, *Acta Crystallogr. D* **62** (2006) 1251-1259.
- [10] A. Beteva, F. Cipriani, S. Cusack, S. Delageniere, J. Gabbadinho, E.J. Gordon, M. Guijarro, D.R. Hall, S. Larsen, L. Launer, C.B. Lavault, G.A. Leonard, T. Mairs, A. McCarthy, J. McCarthy, J. Meyer, E. Mitchell, S. Monaco, D. Nurizzo, P. Pernot, R. Pieritz, R.G.B. Ravelli, V. Rey, W. Shepard, D. Spruce, D.I. Stuart, O. Svensson, P. Theveneau, X. Thibault, J. Turkenburg, M. Walsh, S.M. McSweeney, *Acta Crystallogr. D* **62** (2006) 1162-1169.
- [11] W.A. Hendrickson, *Trends Biochem. Sci.* **25** (2000) 637-643.
- [12] A. Cassetta, A.M. Deacon, S.E. Ealick, J.R. Helliwell, A.W. Thompson, *J. Synchrotr. Radiat.* **6** (1999) 822-833.
- [13] M.A. Walsh, I. Dementieva, G. Evans, R. Sanishvili, A. Joachimiak, *Acta Crystallogr. D* **55** (1999) 1168-1173.
- [14] M. Jaskolski, M. Gilski, *Academia* **2**(10), (2007) 8-11.