

# **PROMIENIOWANIE RENTGENOWSKIE ZE ŹRÓDEŁ SYNCHROTRONOWYCH JAKO KATALIZATOR ROZWOJU KRYSZTALOGRAFII BIAŁEK**

**Zbigniew Dauter<sup>1\*</sup>, Alexander Wlodawer<sup>2#</sup> i Mariusz Jaskolski<sup>3,4\$</sup>**

<sup>1</sup>*Synchrotron Radiation Research Section, Macromolecular Crystallography Laboratory, NCI,  
Argonne National Laboratory, Argonne, IL 60439, USA*

<sup>2</sup>*Protein Structure Section, Macromolecular Crystallography Laboratory, National Cancer Institute,  
Frederick, MD 21702, USA*

<sup>3</sup>*Zakład Krystalografii, Wydział Chemii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań*

<sup>4</sup>*Centrum Badań Biokrystalograficznych, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań*

**Streszczenie:** Promieniowanie rentgenowskie ze źródeł synchrotronowych stało się dostępne dla badań biostrukturalnych na początku lat 70. XX wieku. Jego wprowadzenie całkowicie zrewolucjonizowało dyfrakcyjny eksperyment rentgenowski w krystalografii białek. W artykule omówione są najważniejsze fakty związane z początkami wykorzystania promieniowania synchrotronowego w krystalografii makromolekuł, kluczowe aspekty rewolucji naukowej, jaka się dzięki temu dokonała, oraz perspektywy dalszego rozwoju biologii strukturalnej opartej o promieniowanie synchrotronowe jako podstawowe narzędzie badawcze.

*Keywords: synchrotron radiation; protein crystallography; structural biology*  
*Słowa kluczowe: promieniowanie synchrotronowe; krystalografia białek; biologia strukturalna;*

*e-mail: (\*) zdauter@anl.gov, (#) wlodawer@nih.gov, (\$) mariuszj@amu.edu.pl*

## **Wstęp**

Narodziny krystalografii rentgenowskiej niemal dokładnie 100 lat temu oraz jej wielki tryumf pod koniec lat 50. XX wieku polegający na rozszyfrowaniu pierwszych struktur białkowych – to kamienie milowe na drodze do zrozumienia funkcjonowania cząsteczek życia na poziomie atomowym. Oczywiście jest, że sukces krystalografii białek byłby niemożliwy bez odpowiednio silnych źródeł promieniowania rentgenowskiego umożliwiających pomiar dyfrakcji od kryształów makromolekuł. Stosowane początkowo klasyczne źródła promieni X – różnego rodzaju lampy rentgenowskie emitujące promieniowanie elektromagnetyczne w wyniku bombardowania elektronami termicznymi anody wykonanej z miedzi lub molibdenu, wymagały zazwyczaj wielotygodniowego naświetlania kryształów białek. Sytuacja zmieniła się radykalnie z początkiem lat 1970. na skutek zastosowanie znacznie silniejszych źródeł synchrotronowych promieniowania rentgenowskiego. W następnych rozdziałach nakreślimy, na tle osobistych doświadczeń i wspomnień, historię

badań kryształów makromolekularnych z użyciem promieniowania synchrotronowego oraz podamy zarys rozwoju metodologii tej dyscypliny, którego katalizatorem były synchrotrony, jako potężne narzędzie badawcze biologii strukturalnej.

## **Początki krystalografii białek**

Krystalografia białek pojawia się w annałach nauki w roku 1840, kiedy to Hünefeld opisał powstałe na drodze przypadku kryształy hemoglobiny dżdżownicy, które nazwał "kryształami krwi" [1]. Warto odnotować, że na początku XX wieku Reichert i Brown opublikowali imponującą monografię o krystalizacji hemoglobiny, udokumentowaną około 600 zdjęciami mikroskopowymi kryształów [2]. W roku 1946 Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii przyznaną w istocie za krystalizację białek, podzielili się Sumner, Northrop i Stanley.

Krystalografia białek rozumiana jako nauka strukturalna jest jednak znacznie młodsza i datuje swoje powstanie na koniec lat 50. XX wieku, kiedy to John

Kendrew opublikował pierwszą w dziejach strukturę białka, mioglobiny wieloryba [3]. Choć był to początkowo model o bardzo niskiej rozdzielczości 6 Å, został on stosunkowo szybko ulepszony do bardzo przyzwoitej rozdzielczości 2 Å [4]. Mniej więcej w tym samym czasie strukturę hemoglobiny opublikował Max Perutz [5]. Perutz, który jest niekwestionowanym ojcem krystalografii białek, rozpoczął swoje pionierskie badania struktury hemoglobiny w roku 1937. Jednak pierwsze badania rentgenowskie miały miejsce jeszcze wcześniej, na początku lat 30. XX wieku, kiedy to w laboratorium Williama Astbury'ego wykonano zdjęcia dyfrakcji na włóknach białek [6], a w laboratorium Desmonda Bernala na monokryształach. Pierwsze zdjęcie dyfrakcji rentgenowskiej na kryształach pepsyny przyniosło rozczarowanie, ale Bernal szybko zorientował się, że jeśli kryształy zabezpieczy się przed wysychaniem, dyfrakcja będzie doskonała [7]. Warto przytoczyć wnikliwą uwagę Bernala, zainspirowaną pierwszymi zdjęciami rentgenowskimi pepsyny, które "ukazały bardzo duże komórki elementarne i bogactwo refleksów, obserwowanych również przy wysokich kątach rozproszenia odpowiadających odległościom  $d=2$  Å [w prawie Bragga], co z kolei dowodzi, że cząsteczki białek mają nie tylko z grubsza taki sam kształt i rozmiary, ale że posiadają one identyczną strukturę z dokładnością do wymiarów atomowych" [8]. Jednak mimo tak obiecującego początku, pierwsze kroki, a nawet dekady, krystalografii białek były bardzo trudne, a postęp niezwykle wolny, o czym świadczy okres 22 lat jakich potrzebował Perutz na rozwiązanie struktury hemoglobiny. Z następnymi strukturami sytuacja była nieco lepsza, lecz mimo to w roku 1971, kiedy utworzono Bank Struktur Białkowych (Protein Data Bank, PDB) znalazła się w nim "zawrotna" liczba zaledwie 7 struktur [9]. W 1973 roku znano już strukturę ponad 10 białek, choć w PDB zdeponowano tylko 9 struktur. Wszystkie rozwiązano stosując rentgenografię monokryształów. Poza mioglobina i hemoglobina, początkową zawartość PDB stanowił również cytochrom  $b_5$ , trzustkowy inhibitor tripsyny BPTI, subtylizyna,  $\alpha$ -chymotrypsyna, karboksypeptydaza  $A\alpha$ , dehydrogenaza mleczanowa oraz rubredoksyna [10]. Należy podkreślić, że w początkowym okresie biologii strukturalnej oprócz krystalografii ważną rolę odegrała również dyfrakcja rentgenowska na włóknach. Ikoniczne odkrycie biologii strukturalnej XX wieku – struktury podwójnej helisy DNA [11], oparte było między innymi na zdjęciach rentgenowskich włókien DNA rejestrowanych przez Rosalind Franklin i innych [12].

Trudne początki krystalografii białek miały niewątpliwie swoją przyczynę w jaskrawej dysproporcji pomiędzy "niebotycznymi" celami i mniej niż skromnymi możliwościami ich realizacji. Wśród głównych niedomagań eksperymentalnych najważniejszy był chyba brak wystarczająco silnych źródeł promieniowania rentgenowskiego, wydłużający astronomicznie czas potrzebny do wykonania pomiarów dyfrakcyjnych, a najczęściej po prostu takie pomiary uniemożliwiający. Z początku postęp był stopniowy i wiązał się z udoskonaleniem lamp rentgenowskich, a

potem z wprowadzeniem generatorów z wirującą anodą. W latach 1970. nastąpił jednak dramatyczny skok jakościowy, który całkowicie zmienił oblicze krystalografii białek. Opóźnione w czasie, bo widoczne od lat 1980. konsekwencje tej zmiany odzwierciedla na przykład wykres ilustrujący tempo przyrostu zawartości PDB (Rys. 1) [13]. Ten "skok kwantowy" wiązał się w pierwszym rzędzie z zastosowaniem synchrotronów jako źródeł promieniowania rentgenowskiego. W tym samym czasie nałożyły się też inne czynniki, które pomogły krystalografii białek nabrać tempa, takie jak wprowadzenie programowalnych maszyn cyfrowych oraz rozwój inżynierii genetycznej i biotechnologii, jednak zdecydowanie dostęp do nowych źródeł promieniowania rentgenowskiego należy uznać za czynnik najważniejszy.

### **Synchrotron jako narzędzie biologii strukturalnej**

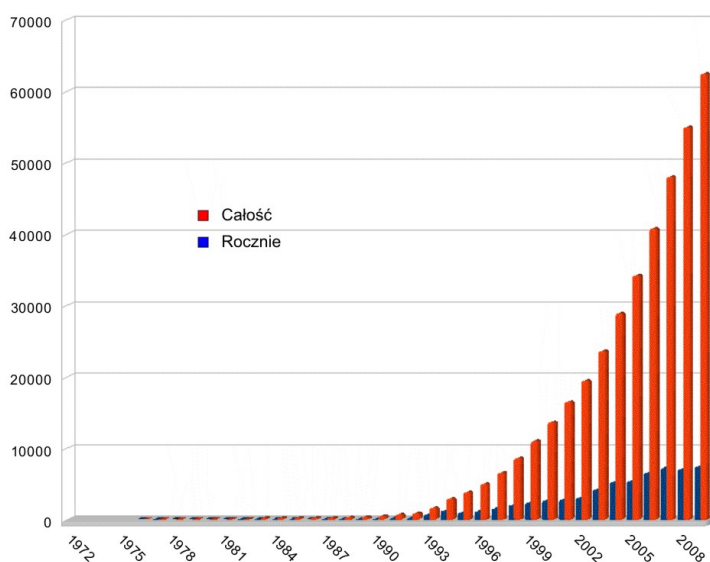
Synchrotrony, tj. przyspieszacze cyklotronowe cząstek elementarnych zostały początkowo zbudowane jako narzędzie dla fizyków wysokich energii badających subatomową strukturę materii. W instalacjach takich naładowanym cząstkom elementarnym (np. elektronom) nadawano ogromne energie, przyspieszając je do prędkości podświetlnych (relatywistycznych) i zmuszając do poruszania się po torze zamkniętym w płaszczyźnie horyzontalnej. Doprowadzając tak wysokoenergetyczne elektrony i jony do kolizji, fizycy mieli nadzieję odkryć nowe cząstki elementarne, które w wyniku takich zderzeń powstają. Z praw Maxwella wynika jednak, że poddane przyspieszeniu cząstki obdarzone ładunkiem będą emitować promieniowanie elektromagnetyczne. Z punktu widzenia fizyków wysokich energii, ten efekt synchrotronowy był kłopotliwą uciążliwością, powodując straty energii i pociągając za sobą konieczność ciągłego pompowania energii i nowych elektronów do urządzenia. Każdy synchrotron składa się z próżniowego tunelu w kształcie pierścienia oraz z umieszczonych na jego obwodzie potężnych elektromagnesów, których pole magnetyczne zakrzywia tor elektronów, wprowadzając je na w przybliżeniu kołową orbitę. Mówiąc dokładniej, synchrotron ma kształt ogromnego wielokąta z prostoliniowymi odcinkami toru pomiędzy sąsiednimi magnesami zakrzywiającymi. Po wstrzyknięciu (z akceleratora liniowego) do pierścienia i początkowym przyspieszeniu krążące elektrony mają stałą energię (i prędkość liniową) lecz doznają przyspieszenia kąтового przelatując przez pole magnetyczne. Elektromagnesy zakrzywiające są więc źródłem promieniowania elektromagnetycznego o bardzo szerokim zakresie długości fali, od mikrofal do twardego promieniowania rentgenowskiego. W odcinkach prostoliniowych toru, pomiędzy magnesami zakrzywiającymi, można umieścić tzw. urządzenia wstawkowe, wiggler lub undulatory. Są to multipole magnetyczne, w których przelatujące elektrony doznają dodatkowych przyspieszeń kątowych, emitując w efekcie promieniowanie silniejsze niż w zwykłym magnesie zakrzywiającym. W undulatorze promieniowanie pochodzące od każdej pary biegunów

magnetycznych daje wzmocnienie interferencyjne, dzięki czemu uzyskujemy w efekcie silne piki promieniowania rentgenowskiego, których długość fali zależy od odległości (przerwy) pomiędzy biegunami. Szczegółowa teoria zjawiska emisji promieniowania synchrotronowego (SR, synchrotron radiation) została opracowana już w latach 1940. [14].

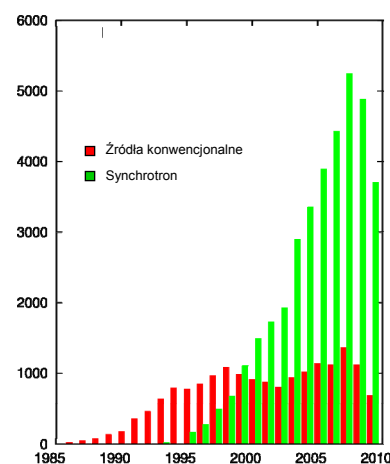
Fizycy wysokich energii, tj. główni użytkownicy instalacji synchrotronowych w początkowym okresie ich wdrażania do badań naukowych, traktowali badaczy starających się wykorzystać promieniowanie synchrotronowe na zasadzie pasożytów. W takiej właśnie roli funkcjonowali w ośrodkach synchrotronowych Hamburga, Stanford, czy Nowosybirsk krystalografowie białek. Wkrótce jednak, gdy zdano sobie sprawę z możliwości jakie oferuje promieniowanie synchrotronowe dla badania materii metodami rozproszeniowymi i dyfrakcyjnymi, zaczęły powstawać instalacje synchrotronowe nowej generacji, przeznaczone wyłącznie do wytwarzania promieniowania elektromagnetycznego. Te urządzenia drugiej generacji były nie tyle tradycyjnymi synchrotronami, co pierścieniami akumulacyjnymi o obwodzie rzędu 1 km, w których "przechowuje" się elektrony (lub pozytony) o energii rzędu 2-3 GeV. Prąd elektronowy w tych urządzeniach (rzędu kilkuset mA) z czasem zanika, konieczne są więc dodatkowe zastrzyki elektronów co kilka lub kilkanaście godzin. Urządzenia takie zbudowano w Daresbury w Anglii (SRS), w Hamburgu w Niemczech (DORIS), w Orsay we Francji

(LURE), w Tsukuba w Japonii (Photon Factory), oraz na Uniwersytetach Stanforda (SSRL) i Cornella (CHESS), w Brookhaven (NSLS) i w Berkeley (ALS) w USA. Od początku swojej działalności były one i są nadal wykorzystywane z bardzo pozytywnym skutkiem do zaawansowanych eksperymentów, w tym do eksperymentów krystalografii białek.

Zalety promieniowania synchrotronowego nie ograniczają się do wysokiej intensywności i możliwości wybrania z emitowanego spektrum pożądanej długości fali. Cząstki elementarne w pierścieniu akumulacyjnym zgrupowane są w pakiety, więc i promieniowanie synchrotronowe emitowane jest nano- lub pikosekundowymi impulsami, które rozdziela czas mikrosekund. Ta struktura czasowa wraz z opcją wykorzystania całego zakresu (polichromatycznego) widma rentgenowskiego, stwarzają unikalną możliwość, realizowaną w tzw. metodzie Lauego, przeprowadzenia pomiarów dyfrakcyjnych w niesłychanie krótkim czasie, a tym samym monitorowania w czasie rzeczywistym procesów kinetycznych zachodzących w kryształach białka, np. przebiegu reakcji enzymatycznych [15]. Co więcej, ponieważ cząstki elementarne krążą w płaszczyźnie poziomej, emitowane promieniowanie jest spolaryzowane, z wektorem elektrycznym drgającym w płaszczyźnie równikowej, co może być wykorzystane w badaniu efektów anizotropowych [16]. Wyczerpujący przegląd zastosowań promieniowania synchrotronowego w krystalografii białek podał Helliwell [17].



A



B

Rys. 1. Przyrost struktur zdeponowanych w Banku Danych Białkowych PDB. (A) Przyrost roczny (kolor niebieski) i całkowita zawartość bazy (czerwony). (B) Rocznie deponowane struktury z rozbięciem na uzyskane przy pomocy promieniowania synchrotronowego (zielony) i źródeł konwencjonalnych (czerwony). Dane dla roku 2009 są niepełne. Diagram (B) przygotował dr W. Minor.

## **Źródła promieniowania synchrotronowego dla badań biostrukturalnych we wczesnym okresie**

W Europie pomysł wykorzystania SR jako narzędzia badawczego zrodził się pierwotnie w środowisku biofizyków zajmujących się badaniem molekularnego mechanizmu skurczu mięśnia za pomocą metod dyfrakcyjnych. W doświadczeniach tych rejestrowano małąkątową dyfrakcję na cienkich pseudokrystalicznych włóknkach mięśni. W latach 1960. zajmowały się tym problemem dwie grupy, jedna kierowana przez Hugh Huxleya w Cambridge w Anglii (mięśnie żaby), druga przez Kena Holmesa w Heidelbergu w Niemczech (mięśnie owada). Oba zespoły stosowały promieniowanie  $Cu K\alpha$  z nowoczesnego jak na owe czasy urządzenia, generatora rentgenowskiego z wirującą anodą. Wyniki były jednak mizerne, gdyż próbki mięśni były bardzo małe i dawały nikłą dyfrakcję. W roku 1969 do zespołu Holmesa dołączył jako doktorant Gerd Rosenbaum, młody fizyk, który jako student-dyplomant w grupie spektroskopii UV zetknął się wcześniej z działającym już wtedy w ośrodku DESY (Deutsches Elektronen-Synchrotron) w Hamburgu synchrotronem. Uzyskawszy od swojego promotora zadanie zbudowania lepszego źródła rentgenowskiego do badania włókninek mięśniowych, Rosenbaum wpadł na pomysł wykorzystania promieniowania synchrotronowego [18]. Zespół wzmocniony przez Jeana Witza ze Strasburga zbudował stację pomiarową wyposażoną w ogniskujący monochromator kwarcowy pracujący w próżni, w regulowane szczeliny wiązki i w inne akcesoria. Maszyna ta była bardzo niewygodna w użyciu, m.in. z powodu skomplikowanego systemu zabezpieczeń. Jednym z jego elementów było telefoniczne zgłoszenie w centralnym punkcie kontroli otwarcia głównego okienka rentgenowskiego. Było to jednak możliwe tylko w czasie krótkich przerw pomiędzy eksperymentami fizyki cząstek elementarnych. Pierwsze obrazy dyfrakcji na włóknach mięśnia owada zarejestrowano w 1970 roku. Według szacunku Rosenbauma ówczesny wiązka promieniowania synchrotronowego była kilkaset razy bardziej intensywna niż z generatora z wirującą anodą [19]. Po tym sukcesie dyrekcja DESY zachęciła Holmesa i Rosenbauma do zbudowania w osobnym budynku linii pomiarowej do badań materiału biologicznego [20]. Konstrukcję tę zrealizowano w roku 1971.

Na początku lat 1970. John Kendrew, wówczas dyrektor nowej organizacji EMBO (European Molecular Biology Organization), zrozumiał, że promieniowanie synchrotronowe stanowi wyjątkową szansę dla biologii strukturalnej i molekularnej. Z jego osobistej inicjatywy utworzono EMBL (European Molecular Biology Laboratory), ponadnarodową instytucję powołaną do prowadzenia takich badań w dziedzinie biologii molekularnej, które wymagałyby współpracy i finansowania w skali międzynarodowej. Doświadczenia wymagające promieniowania synchrotronowego były wprost idealnym przykładem dla idei EMBL. W roku 1975 na mocy umowy pomiędzy DESY i EMBL powołano w Hamburgu Placówkę EMBL posadowioną

na jednym kwadrancie nowozbudowanego synchrotronu DORIS.

Mniej więcej w tym samym czasie równolegle prowadzone były prace nad biostrukturalnym zastosowaniem promieniowania synchrotronowego w instalacji synchrotronowej w Nowosybirsku należącej do Akademii Nauk Związku Radzieckiego. Zbudowano tam stosunkowo prostą linię pomiarową wyposażoną w monochromator grafitowy lecz bez żadnej możliwości ogniskowania wiązki. Na linii tej zarejestrowano dane dyfrakcyjne dla kilku kryształów małowielkościowych oraz dla włókien DNA. Podobno uzyskano również dyfrakcję na kryształach małego białka aktynoksantyny, lecz szczegóły tego eksperymentu nie zostały opublikowane [21].

## **Pierwsza synchrotronowa linia dla krystalografii białek w Stanford**

W USA możliwość zastosowania promieniowania synchrotronowego jako narzędzia badawczego pojawiła się po raz pierwszy w maju 1974 roku wraz z uruchomieniem projektu SSRP (Stanford Synchrotron Radiation Project), przemianowanego później na SSRL, który obejmował stację eksperymentalną zbudowaną przy niedawno ukończonym pierścieniu akumulacyjnym SPEAR. Pierwsza linia pomiarowa wykorzystywała wiązkę rentgenowską z magnesu zakrzywiającego o rozbieżności 11.5 miliradiana i służyła pomiarom w pięciu różnych obszarach badań. Podobnie jak w DESY, przy budowie linii BL1-4 nacisk położono na rozpraszanie rentgenowskie na włóknach. W Stanford jednak wysoki priorytet miała również krystalografia białek. Inną równolegle rozwijaną metodą badawczą była absorpcja EXAFS [22], możliwa w praktycznym zastosowaniu tylko dzięki promieniowaniu synchrotronowemu.

Adaptacja linii BL1-4 do pomiarów krystalograficznych była oczkiem w głowie Keitha Hodgsona, świeżo powołanego profesora na Wydziale Chemii Uniwersytetu Stanforda. Z początku grupa zapaleńców realizujących ten projekt była niewielka, wchodziło w jej skład dwoje doktorów, Margueritte Yevitz Bernheim i Alexander Włodawer, oraz doktorant James Phillips. Dr Julia Goodfellow dołączyła rok później.

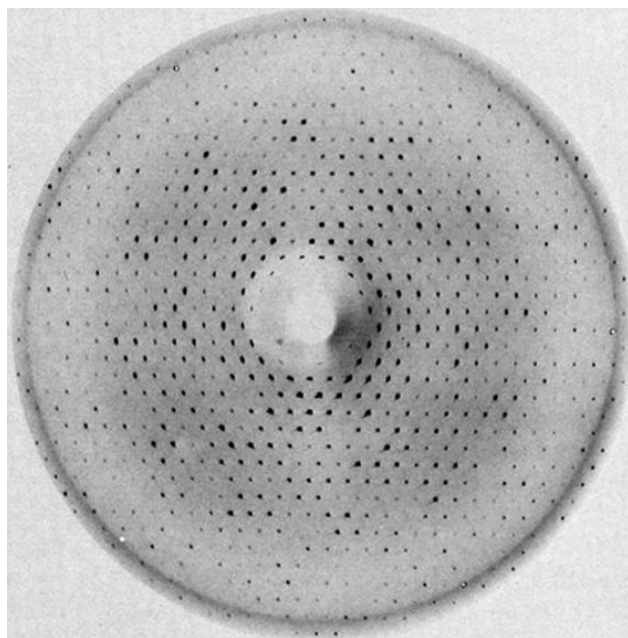
Wyposażenie tej stacji było dość prymitywne i sprowadzało się w zasadzie do kamery precesyjnej, na której rejestrowało się zdjęcia z wykorzystaniem błon do radiologii. Wiązało się to oczywiście z obróbką fotograficzną, a najbliższa ciemnia fotograficzna, na głównym kampusie Stanford, oddalona była o kilka mil. Wymagało to uciążliwych wycieczek w oficjalnym wehikule, jakim wtedy dysponował program SSRL. Był to odzyskany z "demobilu" po wojnie koreańskiej wojskowy pojazd opancerzony podarowany przez Marynarkę Wojenną USA. Humorystyczny aspekt był tym większy, że żadna z osób obsługujących ten wehikul nie posiadała w tym czasie paszportu USA!

Najbardziej uciążliwym aspektem pracy z promieniowaniem synchrotronowym w tamtym czasie była dla krystalografów, ale też dla innych badaczy wykorzystujących twarde promienie rentgena, "pasożytnicza" natura ich eksperymentów. To fizycy narzucali reguły gry i oni decydowali o parametrach operacyjnych synchrotronu. Gwoli sprawiedliwości trzeba odnotować, że te doświadczenia fizyków cząstek elementarnych zaowocowały Nagrodą Nobla przyznaną Burtonowi Richterowi dwa lata później. Na nieszczęście cząstka  $\psi$ , którą odkrył, pojawiała się, gdy synchrotron pracował przy energii 1.55 GeV – zbyt niskiej dla generowania użytecznego dla krystalografów promieniowania rentgenowskiego. Z drugą odkrytą cząstką elementarną,  $\psi'$ , było niewiele lepiej, gdyż wymagała energii 1.86 GeV, podczas gdy do wytwarzania użytecznego promieniowania rentgenowskiego potrzebna była energia co najmniej 2 GeV. Tak więc sukces fizyków opóźnił sukces krystalografów o dobre kilka miesięcy.

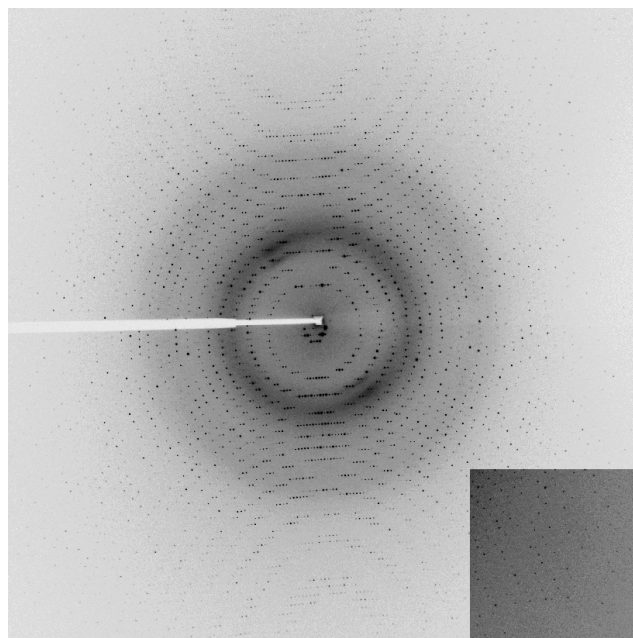
Pierwsze wyniki kosztowały wiele czasu i wysiłku i dostarczyły raczej dowodu na poparcie "strategii synchrotronowej" niż użytecznych danych doświadczalnych jako takich [23]. Dla azuryry udało się co prawda uzyskać trójwymiarowe dane dyfrakcyjne, ale dla pozostałych białek testowych, tj. rubredoksyny, czynnika wzrostu nerwów (NGF) i L-asparaginazy, zarejestrowano jedynie warstwie zerowe refleksów. Jako ciekawostkę można podać, że na rozwiązanie struktury kryształów NGF i asparaginazy przyszło

czekać ponad 15 lat! Czasy naświetlania dochodziły do 5 godz., ale ponieważ na standardowych źródłach promieniowania rentgenowskiego nie otrzymywano żadnej dyfrakcji, nawet taki wynik należało uznać za sukces. Już w początkowej fazie stosowania promieniowania synchrotronowego zwrócono uwagę na możliwość pomiarów przy różnych długościach fali, co pozwoliłoby ominąć problem pochodnych z atomami ciężkimi [24].

Dalszy postęp odnotowano rok później, gdy we współpracy z grupą Lyle'a Jensa wykazano możliwość uzyskania informacji fazowej na podstawie analizy danych dyfrakcyjnych dla rubredoksyny, białka wiążącego żelazo, którego próg absorpcji położony przy 1.75 Å pozwalał na zarejestrowanie stosunkowo silnego sygnału anomalnego. Dodatkowym atutem była grupa przestrzenna,  $R3$ , mająca niecentrosymetryczną projekcję osiową, a więc dająca różnice w parach Bijvoeta również na warstwie  $hk0$  (Rys. 2A). Można więc było ustalić położenie jonów żelaza, przynajmniej na projekcji, posługując się tylko jednym zdjęciem precesyjnym [25]. Doświadczenia te nie należały jednak do łatwych. Kryształ justowano przy pomocy zdjęć rentgenowskich, co wymagało wchodzenia do stacji pomiarowej poprzez cały system zabezpieczeń co kilka minut. Ponieważ zaś długość życia wiązki synchrotronowej nie przekraczała 2 godzin, był to najdłuższy czas, jaki można było poświęcić na sen. Najdłuższy z przeprowadzonych eksperymentów trwał 5 dni i 6 nocy i doprowadził do całkowitego wyczerpania... jego uczestników.



A



B

Rys. 2. Obrazy dyfrakcji rentgenowskiej dla kryształów białek zarejestrowane dawniej i dziś. (A) Zdjęcie precesyjne warstwy  $hk0$  kryształu rubredoksyny zarejestrowane w SSRL w Stanford w 1975 roku przy czasie ekspozycji 5 godzin. (B) Obraz dyfrakcyjny kryształu proteinazy K zarejestrowany na linii pomiarowej 19ID synchrotronu APS w Argonne pod Chicago. Na pokazanym z większym kontrastem fragmencie mozaikowego detektora CCD (prawy dolny narożnik) widać refleksy o rozdzielczości 1.07 Å. Ekspozycja trwała 2 sek. z wiązką rentgenowską atenuowaną do 10% intensywności.

### **Krystalografia białek w DESY**

Przez pierwsze dwie dekady swojej pracy pierścien DORIS działał w dwóch trybach. Albo służył eksperymentom fizyki wysokich energii, kiedy w pierścieniu krążyły w przeciwnych kierunkach wiązki elektronów i pozytonów, albo działał jako generator promieniowania synchrotronowego wyłącznie w oparciu o elektrony.

Po pewnym czasie Placówka EMBL dorobiła się pięciu linii pomiarowych: trzech w głównym budynku eksperymentalnym DORIS (HASYLAB) wykorzystujących prąd elektronowy i dwóch w swoim własnym budynku (zwanym "bunkier 4") wykorzystujących prąd pozytonowy. Linie pozytonowe mogły być używane tylko w trybie "pasożytniczym", ale były znacznie bardziej "prywatne", rzadko odwiedzane przez BHP-owców HASYLAB-u. Na liniach w HASYLAB-ie działały urządzenia do pomiarów SAXS (X33), EXAFS (X32) i krystalografii białek (X31), podczas gdy w "bunkrze 4" była linia krystalograficzna (X11) i SAXS-owska (X13). Linia X31 działała w oparciu o magnes zakrzywiający i była wyposażona w podwójny monochromator tunelowy umożliwiający wygodną zmianę długości fali. Inaczej było na linii X11, wyposażonej w pojedynczy monochromator trójkątny, przez co zmiana długości fali była w praktyce rzadko stosowana. Zaletą linii X11 była natomiast znacznie większa intensywność wiązki. Obie stacje były wyposażone w goniometr i kamerę rentgenowską, którymi można było sterować zdalnie. Do końca lat 1980. obrazy dyfrakcyjne rejestrowane były na błonach fotograficznych w kasetach z 8 ładunkami montowanymi na kamerach Arndta-Wonacotta produkcji firmy Enraf-Nonius. Ciemnie fotograficzne były w pobliżu stacji pomiarowych, co znacznie ułatwiało życie eksperymentatorom.

Grupą krystalografii białek EMBL w Hamburgu kierował początkowo Hans-Dieter Bartunik, który potem utworzył niezależną placówkę Instytutu Maxa Plancka w DESY posiadającą własną linię pomiarową BW6. W 1985 roku grupę EMBL w Hamburgu stanowili Christian Betzel, Zbigniew Dauter i Kyriacos Petratos, a jej szefem (do 1996) był Keith Wilson, zastąpiony później przez Victora Lamzina i Matthiasa Wilmannsa. Z upływem czasu grupa znacznie się powiększyła i liczy obecnie ponad 10 osób na stanowiskach naukowych.

Ładowanie kaset (zwykle trzema błonami przedzielonymi przekładkami) oraz skrupulatne oznaczanie i opisywanie filmów w 100% zajmowało jedną osobę. Do obróbki fotograficznej potrzebna była druga para rąk. Taka praca non-stop nierazko trwała ponad jedną dobę. W annałach nauki nie ma wzmianki ile ubrań zniszczyły odczynniki chemiczne w ciemni, gdy niecierpliwy eksperymentator chciał widzieć wynik podglądając na w pół wywołane błony. Czasami wiązało się to z humorystycznymi sytuacjami. Wysłany w pojedynkę przez renomowane laboratorium zielony jeszcze student bardzo skrupulatnie "wywoływał" w ciemni wszystkie papierki z przekładek, podczas gdy filmy wyrzucił do kosza na śmieci...

Nastrzyk cząstek elementarnych do pierścienia odbywał się co 2-3 godziny. Po każdej takiej operacji należało ręcznie otworzyć wszystkie grodzie bezpieczeństwa. Procedury te często kolidowały z przerwami na posiłek personelu EMBL. Pod czujnym okiem BHP-owców z HASYLAB-u wszystko musiało przebiegać stricte według przepisów. W bardziej "prywatnych" warunkach linii X11 duży czerwony przycisk otwierający okienka był często wciśnięty na stałe za pomocą przemysłowego urządzenia zbudowanego z długiej linijki i korka, podczas gdy personel delektował się wolnym czasem w pobliskiej "bibliotece" (restauracja lub pub w pobliżu DESY).

W życiu użytkowników linii krystalograficznych EMBL nastąpił dramatyczny przełom w roku 1989, gdy Jules Hendrix i Arno Lentfer (pracujący wówczas w EMBL) skonstruowali pierwszy automatyczny skaner płyty obrazowej (IP), który stał się prototypem dla późniejszych detektorów MAR IP. Koniec z pracą w ciemni, koniec walki z densytometrami! Nowy detektor był ubóstwiany. Pierwszym początkom towarzyszyły jednak niespodzianki. Pierwszy pomiar wykonał Alex Teplyakov dla kryształu termitazy. Po nocy spędzonej na linii X31 narzekał, że po każdej ekspozycji musiał ręcznie "wkłapywać" nazwę zbioru na klawiaturze, choć jedyna różnica dotyczyła kolejnego numeru. Następnego dnia Michael Böhm, autor programu sterującego zmodyfikował kod, dając wytchnienie palcom eksperymentatora. Jednak przy bliższej inspekcji obrazy dyfrakcyjne posiadały kłopotliwą cechę: sąsiednie piksele miały bardzo często identyczną intensywność. Krótka rozmowa z Michałem wyjaśniła zagadkę. Jako ekspert w technikach obrazowania, przeoczył fakt, że podczas transformacji spiralnego odczytu detektora do współrzędnych kartezjańskich bardzo często dany piksel miał dwóch "najbliższych sąsiadów". Następnego dnia algorytm działał już poprawnie nie tylko w odniesieniu do kształtu (ważnego w obrazowaniu) ale też co do wartości liczbowych. Potencjalnie znacznie poważniejszy problem wypłynął, gdy otrzymano pierwsze mapy gęstości elektronowej dla dUTPazy sfazowane za pomocą sygnału anomalnego pochodnej rてciowej. Otóż wszystkie atomy C $\beta$  modelu białka sterczały poza gęstością elektronową, podczas gdy sam łańcuch główny ułożony był w niej idealnie. I tu dyskusja z Michałem Böhmem wyjaśniła powód i odtąd już wszystkie zbiory danych zapisywane były w poprawnym, prawoskrętnym układzie współrzędnych.

Pierścien DORIS przeszedł poważną przebudowę w roku 1989. Zamknięto program eksperymentów fizyki wysokich energii, a synchrotron DORIS stał się dedykowanym źródłem promieniowania synchrotronowego generowanego przez prąd pozytonowy krążący w kierunku dawnego prądu elektronów. Wymagało to przebudowy linii X11 i X13 w odwrotnym kierunku. W tym samym czasie postawiono nowy budynek eksperymentalny HASYLAB-u, w którym znalazły się nie tylko linie X11 i X13, ale także nowe linie wigglerowe BW7A i BW7B. Kolejną linię wigglerową, BW6, zbudował dla Instytutu Maxa Plancka

Hans-Dieter Bartunik. Tak wygląda z grubsza sytuacja EMBL w DESY obecnie. Miały miejsce różnego rodzaju udoskonalenia, np. większość skanerów IP zastąpiły detektory CCD, ale najważniejsza zmiana nastąpi w najbliższym czasie, kiedy zostaną oddane do użytku nowe linie pomiarowe zbudowane przy ogromnym pierścieniu synchrotronowym PETRA III. Synchrotron ten, pracujący przy energii 6 GeV stanie się źródłem promieniowania synchrotronowego o ogromnej jasności.

### Selenometionina i dostrojona dyfrakcja anomalna (MAD) – metoda "jak ułai" dla promieniowania synchrotronowego

Możliwość dostrojenia długości fali  $\lambda$  promieniowania synchrotronowego do warunków konkretnego eksperymentu jest chyba najbardziej wyjątkową cechą tego promieniowania, która zrewolucjonizowała metodykę rozwiązywania struktur makromolekularnych. U sedna sprawy leży krystalograficzny problem fazowy, który uniemożliwia proste "wylczenie" struktury na podstawie zarejestrowanych intensywności refleksów i wymaga dodatkowej informacji o fazie każdej z fal rozproszonych. Jeśli nie ma adekwatnego modelu dla metody podstawienia cząsteczkowego – pozostaje eksperyment jako źródło informacji o brakujących fazach. Klasyczna metoda podstawienia izomorficznego (MIR) opracowana przez Perutza wymaga dodatkowych pomiarów dyfrakcyjnych dla kryształów pochodnych izomorficznych, w których cząsteczki białka zostały wyznakowane bardzo ciężkimi, bogatymi w elektrony atomami. (Klasyczne atomy ciężkie są kationami metali, lecz w pomysłowym wariantcie tej metody można użyć również anionów halogenkowych [26].) Jeszcze za czasów Perutza zdano sobie sprawę, że atomy z odpowiednimi właściwościami elektronowymi mogą odcisnąć swoje piętno na obrazie dyfrakcyjnym nie tylko poprzez wysoką liczbę elektronów, ale również przez rezonansową absorpcję kwantów rentgenowskich, co wiąże się ze zjawiskiem anomalnej dyspersji, tj. z zależnością atomowego czynnika rozpraszania  $f$  od długości fali  $\lambda$ :  $f = f^0 + f'(\lambda) + if''(\lambda)$ . Zjawisko anomalnej dyspersji było wykorzystywane w krystalografii białek jako pomocnicze źródło informacji fazowej, jednak jego systematyczne zastosowanie było niemożliwe z racji braku zgodności pomiędzy dostępną w doświadczeniu długością fali (np. Cu  $K\alpha$  1.54178 Å) a progami absorpcji typowych pierwiastków MIR.

Sytuację zmieniło diametralnie promieniowanie synchrotronowe i możliwość precyzyjnego dostrojenia długości fali. Dobranie konkretnej długości fali jest *de facto* stosowane na każdej monochromatycznej linii promieniowania synchrotronowego i polega na ustawieniu pod właściwym kątem urządzenia monochromatyzującego. Na nowoczesnych liniach synchrotronowych instaluje się monochromatory podwójne (lub jeden kryształ z wyciętym w środku tunelem), dzięki czemu wiązka opuszcza monochromator zawsze pod tym samym kątem. Inne wymogi eksperymentalne to wysoka precyzja i powtarzalność tak w odniesieniu do długości fali jak i parametrów

geometrycznych. Ponieważ efekty anomalne są zwykle małe, pomiary intensywności refleksów muszą być bardzo dokładne, ale ten wymóg obowiązuje w praktyce na każdej synchrotronowej linii pomiarowej. Istnieje obecnie bardzo dużo linii synchrotronowych umożliwiających pomiary przy dostrojonej długości fali.

W typowym doświadczeniu nastawionym na wykorzystanie sygnału anomalnego mierzy się kompletne dane dyfrakcyjne przy takich długościach fali, dla których efekty  $f''$  (maksimum absorpcji) i  $f'$  (próg absorpcji) są maksymalne, plus dodatkowo przy jeszcze jednej długości fali, z dala od progu absorpcji. Od pomiarów przy kilku długościach fali wzięła się angielska nazwa metody dostrojonej dyfrakcji anomalnej, Multiwavelength Anomalous Diffraction (MAD). Do praktyki krystalograficznej weszła dzięki przełomowym pracom z lat 1986-1991 [27-32], choć na możliwość pomiarów przy kilku długościach fali zwracano już uwagę wcześniej [24,33,34]. Podstawy teoretyczne metody MAD podał Jerome Karle [35], a ich przełożenia na praktyczne algorytmy laboratoryjne dokonał Wayne Hendrickson [36]. Według tego formalizmu wkłady do rozpraszania zależne i niezależne od długości fali zostają rozdzielone w układzie równań algebraicznych, których rozwiązanie daje poszukiwane fazy refleksów. Ponieważ w metodzie MAD to czynnik fizyczny (zmiana długości fali) a nie chemiczny (użycie ciężkiego atomu) jest źródłem informacji fazowej, wszystkie pomiary można przeprowadzić na tym samym kryształ, co znakomicie upraszcza pomiary i zwiększa ich dokładność.

Pierwsze testy metody MAD z zastosowaniem promieniowania synchrotronowego przeprowadzono dla kryształów białek o znanych strukturach, mianowicie dla derywatyzowanej terbem parwalbuminy [37], dla zawierających żelazo cytochromu c' [28] i hemoglobiny [38], oraz dla zawierającej miedź azuryny [29]. Prawdopodobnie pierwszą nową strukturę rozwiązano metodą MAD wykorzystując obecność miedzi w białku CBP, które przez ponad 20 lat nie dawało się złamać innymi metodami [27]. Atomy rozpraszające anomalnie w tych testach, choć naukowo interesujące, nie nadawały się do rutynowego zastosowania, gdyż wymagały uciążliwych eksperymentów derywatyzacyjnych (przykład z terbem) lub szczęśliwego zbiegu okoliczności (obecność żelaza lub miedzi). Ponieważ w metodzie MAD długość fali jest precyzyjnie dostrojona do rezonansu z atomem rozpraszającym anomalnie, można ją zastosować również dla pierwiastków o stosunkowo słabym sygnale anomalnym, jeśli tylko próg absorpcji leży w dostępnym zakresie długości fali. W praktyce są to pierwiastki cięższe od wanadu. Tak więc, atomy w metodzie MAD nie muszą być bardzo ciężkie, a szczególnie dobrym przykładem jest selen, którego efekty anomalne wynoszą  $f'' = 5$  i  $f' = -9$  elektronów. Efekty te obserwuje się przy wartościach  $\lambda$  różniących się zaledwie o 0.0002 Å (równoważne 2.5 eV) w pobliżu  $\lambda = 0.979$  Å, co ilustruje wysokie wymagania eksperymentalne odnośnie precyzji i powtarzalności ustawienia długości fali.

Atrakcyjność selenu polega na tym, że można go stosunkowo łatwo wprowadzić do białka zastępując selenometioniną (Se-Met) naturalny aminokwas metioniną (Met) [31]. Dzięki postępom inżynierii genetycznej takie podstawienie odbywa się dziś rutynowo i może być nawet przeprowadzone automatycznie. Jako bakterii-fabryki (zwykle *Escherichia coli*) produkującej pożądane białko używa się w tym celu szczepu auktroficznego uzależnionego od metioniny. Jeśli w pożywce zamiast Met będzie Se-Met, syntetyzowane białko będzie wyznakowane selenem we wszystkich pozycjach sekwencji zajętych przez metioninę. Można również użyć zwykłych bakterii, w których zablokowano szlak biosyntezy metioniny. Ponieważ Met pojawia się w sekwencjach białkowych z częstością 2.5%, zwykle w wyznakowanym białku jest dość atomów Se do zastosowania metody MAD. Metoda Se-Met MAD świadczy dziś tryumfy jako metoda z wyboru w badaniu białek o całkowicie nowej strukturze, choć początkowo przyjmowana była ostrożnie, raczej jako ciekawostka naukowa. Pierwszą strukturą białkową rozwiązana metodą Se-MAD była streptawidyna w kompleksie z biotyną [39], której pojedynczy atom siarki zastąpiono selenem. Pierwszym sukcesem klasycznego podejścia Se-Met MAD była struktura rybonukleazy H [30] rozwiązana w celu rozwikłania pełnego mechanizmu enzymatycznego odwrotnej transkryptyazy retrowirusa HIV.

Brom, którym można wygodnie modyfikować zasady nukleinowe, może spełnić w badaniach strukturalnych kwasów nukleinowych tę samą rolę co selen w krystalografii białek. Jeszcze bardziej atrakcyjny jest jon bromkowy, który można wprowadzać do kryształów makromolekuł w wyniku szybkiego nasączenia [26], dzięki czemu metoda Br-MAD ma potencjalne zastosowanie w "wysokoprzepustowej" krystalografii synchrotronowej.

W klasycznej metodzie MAD należy zarejestrować dane przy co najmniej dwóch długościach fali. Coraz popularniejsze staje się jednak podejście z jedną długością fali (SAD), gdyż wysoka dokładność pomiarów synchrotronowych pozwala na wyekstrahowanie słabego sygnału anomalnego nawet gdy jest on zagłuszany wysokim poziomem szumu.

W laboratorium NCI po raz pierwszy zastosowaliśmy metodę Se-Met MAD w 1994 roku do rozwiązania struktury domeny katalitycznej integrazy retrowirusowej [40]. Pomiary zostały wykonane na linii F1 synchrotronu CHESS (Uniwersytet Cornell). Była to jedna z pierwszych, jeśli nie pierwsza struktura rozwiązana metodą MAD przez zewnętrznych użytkowników tej linii.

### **Promieniowanie synchrotronowe jako motor postępu metodologicznego**

Promieniowanie synchrotronowe stało się siłą napędową dla szeregu nowoczesnych rozwiązań metodologicznych w krystalografii białek. Jedną z takich innowacji, która

walnie przyczyniła się do poprawy jakości danych synchrotronowych, było wprowadzenie rutynowego chłodzenia kryształów do temperatury ok. 100 K w celu zapobieżenia nagrzewaniu się próbki w czasie pomiaru i zredukowania rozkładu kryształu wywołanego efektami jonizacyjnymi. Choć kriokrystalografią interesowano się od samego początku badań białkowych, do praktyki wprowadził ją dopiero Håkon Hope pod koniec lat 1980 [41]. Początkowo chłodzenie obejmowało w zasadzie czas pomiaru, lecz praktyka wykazała, że jest to również idealny sposób przechowywania i transportu kryształów białek. Metody niskotemperaturowe znalazły jedno z pierwszych zastosowań przy badaniach dyfrakcyjnych kryształów rybosomów [42]. W rozwiązaniach technicznych niską temperaturę w miejscu kryształu uzyskuje się na dyfraktometrze dzięki strumieniowi gazowego azotu o temperaturze 100 K dostarczanego z odpowiedniej dyszy. Ten sposób chłodzenia wymusił zupełnie inny system montowania kryształów do pomiarów dyfrakcyjnych. Popularne dawniej zatopione kapilary zawierające kryształ w obecności kropelki roztworu macierzystego wyszły już całkowicie z użycia. Zamiast tego kryształ zawieszany się w błonce z roztworu macierzystego w miniaturowej pętelce wykonanej z włókienka nylonowego. Umieszczenie pętelki z kryształem w strumieniu zimnego azotu powoduje momentalne zeszklenie wody, co redukuje niepożądane rozpraszanie tła oraz znakomicie utrudnia penetrację kryształu przez wolne rodniki i tym samym przedłuża jego żywotność w intensywnej wiązce rentgenowskiej [43]. Specjalne dodatki zwane krioprotektantami (np. gliceryna) utrudniają krystalizację soli oraz wody zawartych w kryształach białkowych.

W laboratorium NCI wprowadziliśmy pomiary niskotemperaturowe bardzo wcześnie, choć nie wszystko szło gładko od samego początku. Na przykład z powodu braku standardów technicznych w tym czasie, sami zaprojektowaliśmy i wykonaliśmy specjalne precyzyjne podstawki magnetyczne do szybkiego montowania "kriopętelek" na goniometrze bezpośrednio w strumieniu chłodzącego azotu. Później bardzo podobne podstawki stały się standardem w całej kriobiokrystalografii za sprawą wdrożenia komercyjnego, m.in. przez firmę Hampton Research.

Ogromna intensywność promieniowania rentgenowskiego generowanego przez synchrotrony prowadzi zwykle do bardzo szybkiego zniszczenia porządku krystalicznego, co skutkuje gwałtownym spadkiem rozdzielczości obrazu dyfrakcyjnego. Z punktu widzenia chemicznego winne są wolne rodniki generowane w oddziaływaniu promieniowania jonizującego z materią, które w wypełnionym w połowie wodą kryształach białkowych mają fantastyczne możliwości błyskawicznego rozejścia się po całym kryształach i nieodwracalnej degradacji zawartego w nim delikatnego materiału białkowego. Warunki niskotemperaturowe, dzięki którym obszar wodny ulega zestaleniu, wprowadzono aby przeciwdziałać łatwej dyfuzji wolnych rodników, ale problem powrócił przy źródłach trzeciej generacji. Niska temperatura może spowodować wtórne efekty wolnorodnikowe, ale nie jest w stanie zapobiec

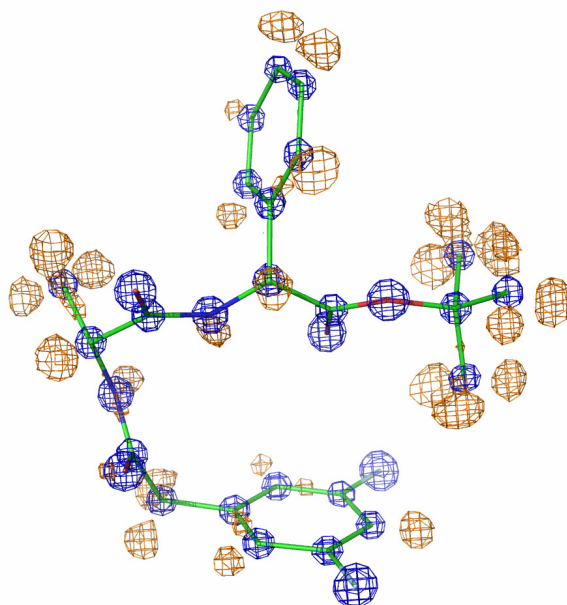


zjawiskom pierwotnym, tj. rozrywaniu wiązań kowalencyjnych na skutek absorpcji kwantów promieniowania X, widocznemu w rozpadzie mostków dwusiarczkowych i dekarboksylacji reszt kwasu asparaginowego i glutaminowego [44]. Okazuje się jednak, że "nie ma tego złego, co by na dobre nie wyszło", gdyż efekty uszkodzeń radiacyjnych mogą być wykorzystane do uzyskania informacji fazowej metodą RIP (Radiation-damage Induced Phasing) [45], w podobny sposób jak izomorficzna zmiana chemiczna wykorzystywana jest w metodzie MIR.

Tzw. krystalografia Lauego jest tym działem biokrystalografii, który stał się możliwy wyłącznie dzięki promieniowaniu synchrotronowemu. W metodzie tej nieruchomy kryształ naświetlany jest błyskiem białego (tj. polichromatycznego) promieniowania rentgenowskiego, dzięki czemu możliwe jest zarejestrowanie niemal kompletnego obrazu dyfrakcyjnego w czasie zaledwie nanosekundowym. Pionierami tej metody są Keith Moffat [46], John Helliwell [17] i Janos Hajdu [47]. Można ją wykorzystać do badania struktury indywidualów o krótkim czasie życia (np. produktów pośrednich reakcji enzymatycznych) lub to monitorowania kinetyki przemian w kryształach białek, np. wiązania lub dysocjacji ligandów w mioglobinie [48]. Jeśli uda się znaleźć sposób na uwolnienie reakcji wszystkich cząsteczek białka w kryształach w tym samym momencie (np. w wyniku błysku laserowego), wówczas wykonując nanosekundowe zdjęcia w odstępach mikrosekund można będzie zarejestrować przebieg przemiany trwającej np. jedną milisekundę.

Bez promieniowania synchrotronowego niemożliwe byłoby rutynowe osiąganie rozdzielczości atomowej (zdefiniowanej jako 1.2 Å), a tym bardziej subatomowej, dla kryształów białek (Rys. 2B). Obecnie w PDB jest ponad 1000 struktur o rozdzielczości lepszej niż 1.2 Å, w tym około 20 struktur, dla których zarejestrowano dane o rozdzielczości co najmniej 0.8 Å (wszystkie z użyciem SR). Te struktury o najwyższej rozdzielczości są jak klejnoty w skarbcu biologii strukturalnej. Pozwalają one zlokalizować precyzyjnie każdy atom cząsteczki dzięki dobrze zdefiniowanym maksimum na mapie gęstości elektronowej, a nawet ukazują elektrony wiązań i atomy wodoru (Rys. 3). Ten ostatni aspekt jest bardzo ważny, gdyż atomy wodoru, choć odgrywają kluczową rolę w mechanizmach reakcji enzymatycznych, nie mogą być zlokalizowane w strukturach o niższej rozdzielczości. Rekordową rozdzielczość 0.54 Å osiągnięto dla małego białka zwanego krambiną [49]. Jednak w grupie rekordzistów są też większe białka, np. lizozym czy reduktaza aldozy, których struktury wyznaczono z rozdzielczością 0.65 Å [50] i 0.66 Å [51]. Przy tym poziomie rozdzielczości struktury makromolekularne nie tylko osiągają ale przekraczają standardy typowe dla krystalografii małych cząsteczek. W dwóch pionierskich projektach dotyczących krambiny [49] i reduktazy aldozy [52], udało się udokładować parametry multipolowe makrocząsteczek, które ukazują rozkład elektronów na orbitalach wiążących i deformację ładunku atomów w odniesieniu do przybliżonego atomu sferycznego. Te

bezprecedensowe osiągnięcia umożliwiają opis makrocząsteczek na nieznanym dotąd poziomie dokładności.



Rys. 3. Fragment struktury inhibitora  $\gamma$ -sekreazy udokładowanej z rozdzielczością 0.7 Å na podstawie synchrotronowych danych dyfrakcyjnych. Niebieska mapa gęstości elektronowej pokazuje precyzyjną definicję atomów niewodorowych modelu. Różnicowa mapa pomarańczowa ujawnia położenia atomów wodoru, które nie zostały jeszcze ujęte w modelu. Rysunek przygotował A. Czerwiński.

Kolejnym obszarem nauki, gdzie postęp zależy krytycznie od dostępności promieniowania synchrotronowego dla pomiarów dyfrakcyjnych, jest genomika strukturalna, która stawia sobie za cel masowe rozwiązywanie maksymalnej liczby nowych struktur białkowych w jak najkrótszym czasie. Niektóre centra genomiki strukturalnej rozwiązują obecnie jedną strukturę białkową co drugi dzień [53]. Ilość danych jaka się za tym kryje nie mogłaby być nigdy osiągnięta przy pomocy konwencjonalnych źródeł promieniowania rentgenowskiego.

Dziedziną o szczególnym znaczeniu dla przemysłu farmaceutycznego, ale i dla zwykłego człowieka, jest poszukiwanie nowych molekuł-kandydatów, które dałyby w wyniku optymalizacji lek doskonały. Często molekułę "początkową" znajduje się prowadząc reakcję "celu farmakologicznego" (np. enzymu) z kockajlem możliwych molekuł [54]. Wyselekcjonowanie najlepszych spośród setek kandydatów odbywa się poprzez badanie struktury utworzonych kompleksów. Podejście to jest możliwe tylko w trybie "wysokoprzepustowym" przy użyciu promieniowania synchrotronowego.

### "Podróże w nieznane"

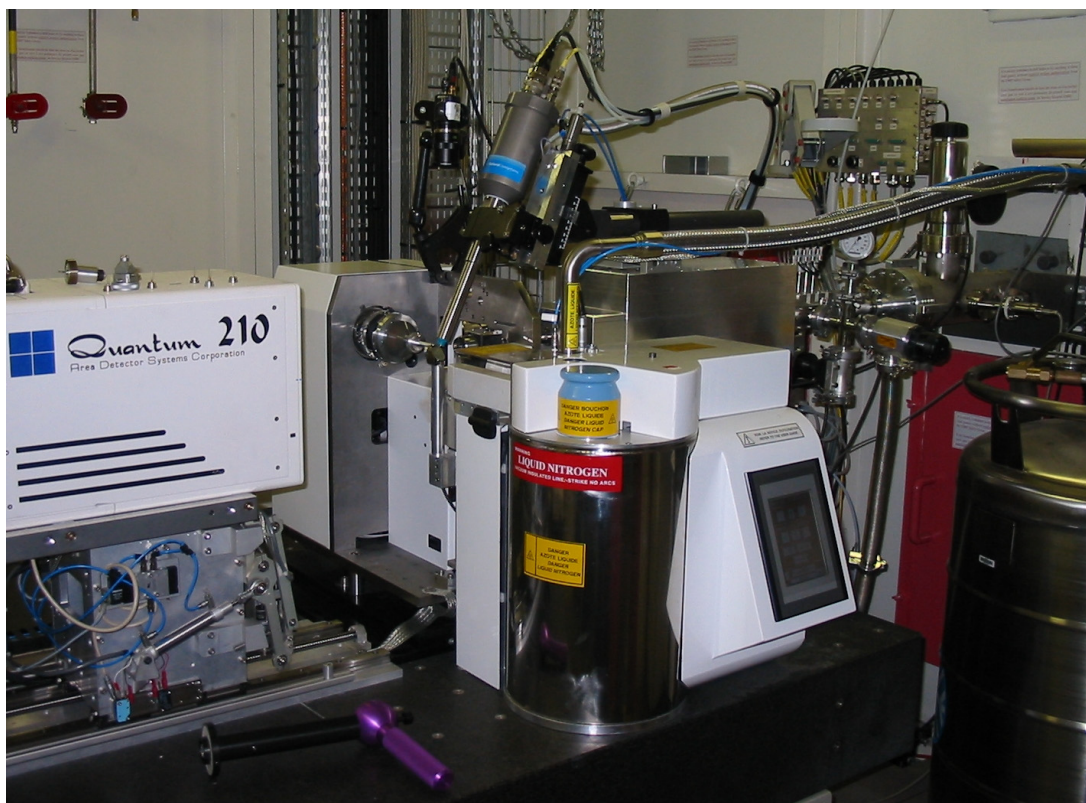
Na koniec warto wymienić kilka niezwykłych osiągnięć, możliwych jedynie dzięki wykorzystaniu promieniowania synchrotronowego. Przykładowo, możliwe było zarejestrowanie obrazu dyfrakcyjnego od kryształów o gigantycznych wymiarach komórki elementarnej, 1255 Å w przypadku rdzenia cząstki reowirusowej [55] i 1123 Å w przypadku adaptora klatryny [56]. Stosując mikrowiązkę synchrotronową zarejestrowano dane dyfrakcyjne o rozdzielczości 2 Å dla naturalnych krystalitów o wielkości 2 μm zawierających cypowirus, wydobytych z komórek owadzych [57].

I wreszcie badania z wykorzystaniem promieniowania synchrotronowego uwieńczone Nagrodą Nobla. W roku 2009 nagrodę w dziedzinie chemii uzyskali Venkatraman Ramakrishnan, Thomas Steitz i Ada Yonath za wyjaśnienie na podstawie badań krystalograficznych struktury atomowej i funkcji rybosomu [58-61]. Ada Yonath przez 30 lat, a dwie pozostałe grupy przez kilkanaście lat zmagaly się z kryształami rybosomów, wykorzystując w tym celu niemal każdą synchrotronową linię białkową na świecie. Również wcześniejsze Nagrody Nobla z chemii uhonorowały badania z użyciem promieniowania synchrotronowego, poczynając od Johna Walkera (1997), który wyjaśnił mechanizm syntezy ATP [62,63]. Dane dyfrakcyjne dla kryształów ATPazy F<sub>1</sub> zarejestrowano na

synchrotronie SRS w Daresbury używając płyty obrazowej podarowanej przez Hendrixa i Lentfera. Dane rejestrowano dla ogromnej liczby nietrwałych kryształów, montowanych w kapilarach i chłodzonych do 4°C. Kolejne związane z promieniowaniem synchrotronowym Nagrody Nobla otrzymali Roderick MacKinnon (2003) za określenie struktury i działania błonowego kanału potasowego [64] oraz Roger Kornberg (2006) za wyjaśnienie podstaw strukturalnych transkrypcji DNA [65].

### Perspektywy zastosowań promieniowania synchrotronowego w krystalografii białek

W latach 1990. postęp naukowy i techniczny doprowadził do powstania źródeł synchrotronowych trzeciej generacji charakteryzujących się większą średnicą pierścienia (~1 km) oraz znacznie wyższą jasnością i stabilnością promieniowania. Urządzenia takie zbudowano w Grenoble (ESRF), Chicago (APS) i w Japonii (Spring8), a nieco później w Szwajcarii (SLS), Wielkiej Brytanii (DIAMOND), Francji (SOLEIL) i Niemczech (PETRA III). W ten sposób liczba linii synchrotronowych do badań dyfrakcyjnych makromolekuł (Rys. 4) osiągnęła 100 (Tabela 1), przy czym dalsze są w budowie lub w stadium projektowym. Źródła synchrotronowe są dziś podstawowym źródłem danych dyfrakcyjnych dla krystalografii białek (Rys. 1B).



Rys. 4. Stacja pomiarowa ID14 do badań krystalograficznych makromolekuł synchrotronu ESRF w Grenoble. Zawieszony w małej pętli kryształ białka umieszczony jest jednocześnie w wiązce promieniowania rentgenowskiego i w strumieniu ochłodzonych par azotu. Obraz dyfrakcyjny rejestruje kamera CCD. Zdjęcie uzyskano dzięki uprzejmości dr D. Halla.

Tabela 1. Linie synchrotronowe służące krystalografii białek.

1	ALS (Advanced Light Source), Lawrence Berkeley National Laboratory	Berkeley, USA	4.2.2, 5.0.1, 5.0.2, 5.0.3, 8.2.1, 8.2.2, 8.3.1
2	APS (Advanced Photon Source), Argonne National Laboratory	Argonne, USA	14BM-C, 14BM-D, 14ID-B, 17BM, 17ID, 19BM, 19ID, 21ID-D, 21ID-E, 21ID-F, 21ID-G, 22BM, 22ID, 23BM-B, 23ID-B, 23ID-D, 24BM, 24ID-C, 24ID-E, 31ID
3	Australian Synchrotron	Melbourne, Australia	MX1, MX2
4	BESSY II	Berlin, Niemcy	14.1, 14.2, 14.3
5	BSRF	Beijing, Chiny	3W1A, 1W2B
6	CAMD (Center for Advanced Microstructures and Devices),	Baton Rouge, USA	GCPC
7	CHESS (Cornell High Energy Synchrotron Source), Cornell University	Ithaca, USA	A1, F1, F2
8	CSRF (Canadian Synchrotron Radiation Facility)	Saskatoon, Kanada	08ID-1
9	DIAMOND	Harwell Chilton Science Campus, Wlk. Brytania	I02, I03, I04, I04-1, I24
10	ELETTRA	Trieste, Włochy	5.2R
11	EMBL/MPG (European Molecular Biology Laboratory/Max-Planck Gesellschaft); DESY	Hamburg, Niemcy	BW7A, BW7B, X11, X12, X13, BW6
12	ESRF (European Synchrotron Radiation Facility)	Grenoble, Francja	ID14-1, ID14-2, ID14-4, ID23-1, ID23-2, ID29
13	LNLS (National Synchrotron Light Laboratory)	Campinas, Brazylia	D03, W01B
14	MAX, Lund University	Lund, Szwecja	I711, I911-2, I911-3, I911-4, I911-5,
15	NSLS (National Synchrotron Light Source), Brookhaven National Laboratory	Brookhaven, USA	X3A, X4A, X4C, X6A, X8C, X12B, X12C, X25, X26C, X29A
16	NSRRC (National Synchrotron Radiation Research Center)	Hsinchu, Tajwan	BL13B1, BL13C1, BL17B2
17	PAL,	Pohang, Korea	4A, 6B, 6C1
18	Photon Factory,	Tsukuba, Japonia	BL-5A, BL-6A, BL-17A, BL18-B, AR-NW12A
19	SLS (Synchrotron Light Source), Paul Scherrer Institute	Villigen, Szwajcaria	X06SA, X10SA, X06DA
20	SOLEIL	Saint-Aubin, Francja	PROXIMA1, PROXIMA2
21	Spring-8, Super Photon Ring 8	Japonia	BL12B2, BL24XU, BL26B1, BL26B 2, BL32B2, BL38B1, BL40B2, BL41XU, BL44XU, BL45XU
22	SSRL (Stanford Synchrotron Light Source), Stanford University	USA	BL1-5, BL7-1, BL9-1, BL9-2, BL11-1, BL12-2

Jeszcze bardziej zaawansowane są urządzenia czwartej generacji o charakterze akceleratorów liniowych typu laserowego, budowane w Hamburgu oraz działające już w Stanford. Jasność dostarczanego przez nie promieniowania rentgenowskiego jest o 10 rzędów wielkości większa, umożliwiając badanie ogromnych kompleksów makromolekularnych, całych komórek biologicznych, oraz nanomateriałów nieperiodycznych [66]. W laserze rentgenowskim na swobodnych elektronach (XFEL), strumień elektronów nie krąży w pierścieniu lecz jest przyspieszany do prędkości podświetlnych w akceleratorze liniowym o długości do kilku kilometrów, przechodząc przez szereg wnek rezonansowych lub przez bardzo długi undulator. Ponieważ dochodzi do rezonansu pomiędzy elektronami a polem elektromagnetycznym przez nie wywołanym, możliwa jest akcja laserowa czyli efekt amplifikacji światła. Poziom energii generowanego w tych

urządzeniach promieniowania rentgenowskiego jest tak ogromny, że nie wiemy jeszcze, czy umieszczone w nim makromolekuły biologiczne "przeżyją" wystarczająco długo, aby eksperymentator zdążył zarejestrować swoje dane. Podobne problemy biologia synchrotronowa skutecznie rozwiązała w przeszłości, więc i z tymi wyzwaniami na pewno sobie poradzi. Rewolucja, którą zapoczątkowało wprowadzenie promieniowania synchrotronowego jako narzędzia badawczego w biologii strukturalnej dopiero się zaczęła. Bez wątplenia czekają nas jeszcze odkrycia, o jakich nam się nawet nie śniło, prowadzące do lepszego zrozumienia struktur i mechanizmów atomowych, które określamy jako "życie". A lepsze zrozumienie to nie tylko satysfakcja intelektualna uczonych, ale również postęp cywilizacyjny, szczególnie w obszarach takich jak zdrowie, a więc dotyczących nas wszystkich.

## Literatura

- [1] F.L. Hünefeld, in *Chemismus in der Thierischen Organisation*, (Leipzig, 1840), p. 160.
- [2] E.T. Reichert, A.P. Brown, *The differentiation and specificity of corresponding proteins and their vital substances in relation to biological classification and organic evolution*. (Carnegie Institution of Washington, Washington DC, 1909).
- [3] J.C. Kendrew, G. Bodo, H.M. Dintzis, R.G. Parrish, H. Wyckoff, D.C. Phillips, "A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis", *Nature* **181** (1958) 662–666.
- [4] J.C. Kendrew, R.E. Dickerson, B.E. Strandberg, R.G. Hart, D.R. Davies, D.C. Phillips, V.C. Shore, "Structure of myoglobin. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution", *Nature* **185** (1960) 422–427.
- [5] M.F. Perutz, M.G. Rossmann, A.F. Cullis, H. Muirhead, G. Will, A.C.T. North, "Structure of haemoglobin. A three-dimensional fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis", *Nature* **185** (1960) 416–421.
- [6] W.T. Astbury, A. Street, "X-ray studies of the structure of hair, wool, and related fibres", *Phil. Trans. Roy. Soc. A* **230** (1932) 75–101.
- [7] J.D. Bernal, D. Crowfoot, "X-ray photographs of crystalline pepsin.", *Nature* **133** (1934) 794–795.
- [8] J.D. Bernal, "Structure of proteins", *Nature* **143** (1939) 663–667.
- [9] Protein Data Bank, *Nature New Biol.* **233** (1971) 223.
- [10] Protein Data Bank, *Acta Crystallogr. B* **29** (1973) 1746.
- [11] J.D. Watson, F.H.C. Crick, "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid", *Nature* **171** (1953) 737–738.
- [12] R.E. Franklin, R.G. Gosling, "Molecular configuration in sodium thymonucleate", *Nature* **171** (1953) 740–741.
- [13] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, "The Protein Data Bank", *Nucleic Acids Res.* **28** (2000) 235–242.
- [14] J. Schwinger, "On the classical radiation of accelerated electrons.", *Phys. Rev.* **12** (1949) 1912–1925.
- [15] D. Bourgeois, A. Royant, "Advances in kinetic protein crystallography", *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15** (2005) 538–547.
- [16] M. Schiltz, G. Bricogne, "Exploiting the anisotropy of anomalous scattering boosts the phasing power of SAD and MAD experiments", *Acta Crystallogr. D* **64** (2008) 711–729.
- [17] J.R. Helliwell, *Macromolecular Crystallography With Synchrotron Radiation*, (Cambridge University Press, 1992).
- [18] C. Abad-Zapatero, "Notes of a protein crystallographer; our unsung heroes", *Structure* **12** (2004) 523–527.
- [19] G. Rosenbaum, K.C. Holmes, J. Witz, "Synchrotron radiation as a source for x-ray diffraction", *Nature* **230** (1971) 434–437.
- [20] K.C. Holmes, G. Rosenbaum, "How X-ray diffraction with synchrotron radiation got started", *J. Synchrotron Rad.* **5** (1998) 147–153.
- [21] T.D. Mokulskaya, M.A. Mokulskii, A.A. Nikitin, V.V. Anashin, G.N. Kuplipanov, V.A. Lukashev, A.N. Skrinkii, "[Utilization of the storage ring VEPP-3 for X-ray studies]", *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **218** (1974) 824–827.
- [22] F.W. Lytle, "The EXAFS family tree: a personal history of the development of extended X-ray absorption fine structure", *J. Synchrotron Rad.* **6** (1999) 123–134.
- [23] J.C. Phillips, A. Wlodawer, M.M. Yevitz, K.O. Hodgson, "Applications of synchrotron radiation to protein crystallography: preliminary results", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73** (1976) 128–132.
- [24] A. Herzenberg, H.S.M. Lau, "Anomalous scattering and the phase problem", *Acta Crystallogr.* **22** (1967) 24–28.
- [25] J.C. Phillips, A. Wlodawer, J.M. Goodfellow, K.D. Watenpugh, L.C. Sieker, L.J. Jensen, K.O. Hodgson, "Applications of synchrotron radiation to protein crystallography II: Anomalous scattering, absolute intensity and polarization", *Acta Crystallogr.* **A33** (1977) 445–455.
- [26] Z. Dauter, M. Dauter, K.R. Rajashankar, "Novel approach to phasing proteins: derivatization by short cryo soaking with halides", *Acta Crystallogr.* **D56** (2000) 232–237.
- [27] J.M. Guss, E.A. Merritt, R.P. Phizackerley, B. Hedman, M. Murata, K.O. Hodgson, H.C. Freeman, "Phase determination by multiple-wavelength x-ray diffraction: crystal structure of a basic 'blue' copper protein from cucumbers", *Science* **241** (1988) 806–811.
- [28] S. Harada, M. Yasui, K. Murakawa, N. Kasai, Y. Satow, "Crystal-structure analysis of cytochrome-C' by the multiwavelength anomalous diffraction method using synchrotron radiation", *J. Appl. Crystallogr.* **19** (1986) 448–452.
- [29] Z.R. Korszun, "The tertiary structure of azurin from *Pseudomonas denitrificans* as determined by Cu resonant diffraction using synchrotron radiation", *J. Mol. Biol.* **196** (1987) 413–419.
- [30] W. Yang, W.A. Hendrickson, R.J. Crouch, Y. Satow, "Structure of ribonuclease H phased at 2 Å resolution by MAD analysis of the selenomethionyl protein", *Science* **249** (1990) 1398–1405.
- [31] W.A. Hendrickson, J.R. Horton, D.M. LeMaster, "Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three dimensional structure", *EMBO J.* **9** (1990) 1665–1672.
- [32] W.A. Hendrickson, "Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation", *Science* **254** (1991) 51–58.
- [33] Y. Okaya, R. Pepinsky, "New formulation and solution of the phase problem in X-ray analysis of noncentric crystals containing anomalous scatterers", *Phys. Rev.* **103** (1956) 1645–1647.
- [34] C.M. Mitchell, "Phase determination by the two-wavelength method of Okaya & Pepinsky", *Acta Crystallogr.* **10** (1957) 475–476.
- [35] J. Karle, "Some developments in anomalous dispersion for the structural investigation of macromolecular systems in biology.", *Int. J. Quant. Chem.* **S7** (1980) 357–367.
- [36] W.A. Hendrickson, "Analysis of protein structure from diffraction measurements at multiple wavelengths.", *Trans Am. Crystallogr. Assoc.* **21** (1985) 11–21.
- [37] R. Kahn, R. Fourme, R. Bosshard, M. Chiadmi, J.L. Risler, O. Dideberg, J.P. Wery, "Crystal structure study of Opsanus tau parvalbumin by multiwavelength anomalous diffraction", *FEBS Lett.* **179** (1985) 133–137.

- [38] W.A. Hendrickson, J.L. Smith, R.P. Phizackerley, E.A. Merritt, "Crystallographic structure analysis of lamprey hemoglobin from anomalous dispersion of synchrotron radiation", *Proteins* **4** (1988) 77–88.
- [39] W.A. Hendrickson, A. Pahler, J.L. Smith, Y. Satow, E.A. Merritt, R.P. Phizackerley, "Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (1989) 2190–2194.
- [40] G. Bujacz, M. Jaskólski, J. Alexandratos, A. Wlodawer, G. Merkel, R.A. Katz, A.M. Skalka, "High resolution structure of the catalytic domain of the avian sarcoma virus integrase", *J. Molec. Biol.* **253** (1995) 333–346.
- [41] H. Hope, "Cryocrystallography of biological macromolecules: a generally applicable method", *Acta Crystallogr. D* **44** (1988) 22–26.
- [42] H. Hope, F. Frolow, K. von Bohlen, I. Makowski, C. Kratky, Y. Halfon, H. Danz, P. Webster, K.S. Bartels, H.G. Wittmann, "Cryocrystallography of ribosomal particles", *Acta Crystallogr. B* **45** (1989) 190–199.
- [43] T.-Y. Teng, "Mounting of crystals for macromolecular crystallography in a free-standing thin film.", *J. Appl. Cryst.* **23** (1990) 387–391.
- [44] M. Weik, R.B. Ravelli, G. Kryger, S. McSweeney, M.L. Raves, M. Harel, P. Gros, I. Silman, J. Kroon, J.L. Sussman, "Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (2000) 623–628.
- [45] R.B. Ravelli, H.K. Leiros, B. Pan, M. Caffrey, S. McSweeney, "Specific radiation damage can be used to solve macromolecular crystal structures", *Structure* **11** (2003) 217–224.
- [46] K. Moffat, D. Szebenyi, D. Bilderback, "X-ray Laue Diffraction from Protein Crystals", *Science* **223** (1984) 1423–1425.
- [47] J. Hajdu, P.A. Machin, J.W. Campbell, T.J. Greenhough, I.J. Clifton, S. Zurek, S. Gover, L.N. Johnson, M. Elder, "Millisecond X-ray diffraction and the first electron density map from Laue photographs of a protein crystal", *Nature* **329** (1987) 178–181.
- [48] M. Milani, M. Nardini, A. Pesce, E. Mastrangelo, M. Bolognesi, "Hemoprotein time-resolved X-ray crystallography", *IUBMB Life* **60** (2008) 154–158.
- [49] C. Jelsch, M.M. Teeter, V. Lamzin, V. Pichon-Pesme, R.H. Blessing, C. Lecomte, "Accurate protein crystallography at ultra-high resolution: Valence electron distribution in crambin", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (2000) 3171–3176.
- [50] J. Wang, M. Dauter, R. Alkire, A. Joachimiak, Z. Dauter, "Triclinic lysozyme at 0.65 Å resolution", *Acta Crystallogr. D* **63** (2007) 1254–1268.
- [51] E.I. Howard, R. Sanishvili, R.E. Cachau, A. Mitschler, B. Chevrier, P. Barth, V. Lamour, M. Van Zandt, E. Sibley, C. Bon, D. Moras, T.R. Schneider, A. Joachimiak, A. Podjarny, "Ultra-high resolution drug design I: details of interactions in human aldose reductase-inhibitor complex at 0.66 Å", *Proteins* **55** (2004) 792–804.
- [52] B. Guillot, C. Jelsch, A. Podjarny, C. Lecomte, "Charge-density analysis of a protein structure at subatomic resolution: the human aldose reductase case", *Acta Crystallogr. D* **64** (2008) 567–588.
- [53] M. Grabowski, M. Chruszcz, M.D. Zimmerman, O. Kirillova, W. Minor, "Benefits of structural genomics for drug discovery research", *Infect. Disord. Drug Targets* **9** (2009) 459–474.
- [54] T.L. Blundell, B.L. Sibanda, R.W. Montalvo, S. Brewerton, V. Chelliah, C.L. Worth, N.J. Harmer, O. Davies, D. Burke, "Structural biology and bioinformatics in drug design: opportunities and challenges for target identification and lead discovery", *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **361** (2006) 413–423.
- [55] K.M. Reinisch, M.L. Nibert, S.C. Harrison, "Structure of the reovirus core at 3.6 Å resolution", *Nature* **404** (2000) 960–967.
- [56] E.E. Heldwein, E. Macia, J. Wang, H.L. Yin, T. Kirchhausen, S.C. Harrison, "Crystal structure of the clathrin adaptor protein 1 core", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101** (2004) 14108–14113.
- [57] F. Coulibaly, E. Chiu, K. Ikeda, S. Gutmann, P.W. Haeberl, C. Schulze-Briese, H. Mori, P. Metcalf, "The molecular organization of cypovirus polyhedra", *Nature* **446** (2007) 97–101.
- [58] B.T. Wimberly, D.E. Brodersen, W.M. Clemons, Jr., R.J. Morgan-Warren, A.P. Carter, C. Vonrhein, T. Hartsch, V. Ramakrishnan, "Structure of the 30S ribosomal subunit", *Nature* **407** (2000) 327–339.
- [59] F. Schluenzen, A. Tocilj, R. Zarivach, J. Harms, M. Gluehmann, D. Janell, A. Bashan, H. Bartels, I. Agmon, F. Franceschi, A. Yonath, "Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution", *Cell* **102** (2000) 615–623.
- [60] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P.B. Moore, T.A. Steitz, "The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution", *Science* **289** (2000) 905–920.
- [61] M. Selmer, C.M. Dunham, F.V. Murphy, A. Weixlbaumer, S. Petry, A.C. Kelley, J.R. Weir, V. Ramakrishnan, "Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA", *Science* **313** (2006) 1935–1942.
- [62] J.P. Abrahams, A.G.W. Leslie, R. Lutter, J.E. Walker, "Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria", *Nature* **370** (1994) 621–628.
- [63] J.P. Abrahams, A.G. Leslie, "Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F<sub>1</sub> ATPase", *Acta Crystallogr. D* **52** (1996) 30–42.
- [64] Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B.T. Chait, R. MacKinnon, "Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel", *Nature* **417** (2002) 515–522.
- [65] P. Cramer, D.A. Bushnell, R.D. Kornberg, "Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution", *Science* **292** (2001) 1863–1876.
- [66] M. Bergh, G. Huldt, N. Timneanu, F.R. Maia, J. Hajdu, "Feasibility of imaging living cells at subnanometer resolutions by ultrafast X-ray diffraction", *Q. Rev. Biophys.* **41** (2008) 181–204.