

## KONCEPCJA BUDOWY LINII POMIAROWEJ MX/SAXS/XRD W NCPS SOLARIS

M. Kozak<sup>1\*</sup>, W. Rypniewski<sup>2</sup>, and M. Jaskólski<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>*Wydział Fizyki, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Umultowska 85, 61-614 Poznań, Polska*

<sup>2</sup>*Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, Polska*

<sup>3</sup>*Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań, Polska*

*Keywords: synchrotron radiation, synchrotron, SOLARIS, beam line, protein crystallography, small-angle X-ray scattering, SAXS, structural biology, materials science, powder diffraction, tuneable synchrotron radiation*

\*e-mail: mkozak@amu.edu.pl

W grudniu 2011 zainicjowana została budowa pierwszego polskiego synchrotronu — Narodowego Centrum Promieniowania Synchrotronowego SOLARIS w Krakowie. Parametry energetyczne synchrotronu SOLARIS (1.5 GeV) pozwalają na zaprojektowanie linii pomiarowej wykorzystującej promieniowanie synchrotronowe z zakresu twardego promieniowania rentgenowskiego, która będzie mogła być wykorzystywana na potrzeby biokrytalografii oraz badań materiałowych. Planowana linia pomiarowa posiadać będzie trzy końcowe stacje pomiarowe — biokrytalograficzną (MX), małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (SAXS) i dyfrakcji promieniowania synchrotronowego na materiałach polikrystalicznych (XRD).

In December 2011 the construction of the first Polish synchrotron — The National Synchrotron Radiation Centre SOLARIS — was initiated in Kraków. The energy parameters of SOLARIS (1.5 GeV) allow planning of a beam line utilising the synchrotron radiation (hard X-rays range), that can be used in biocrystallography and material science. The planned beam line has three end-stations — for biocrystallography (MX), small-angle X-ray scattering (SAXS) and diffraction of synchrotron radiation on polycrystalline materials (XRD).

Rozwój niektórych dziedzin nauki stymulowany jest dostępem do źródeł promieniowania elektromagnetycznego. Należą do nich przede wszystkim te dziedziny badań, które wykorzystują zjawisko dyfrakcji czy rozpraszania promieniowania rentgenowskiego, między innymi jest to krytalografia. Jeżeli prześledzimy jej rozwój od początku ubiegłego wieku z łatwością zauważymy jak ściśle są te powiązania. Praktycznie na każdym etapie odkrycia naukowe stymulowane były rozwojem nowych źródeł promieniowania rentgenowskiego, a szczególnie spektakularne odkrycia ostatnich lat ściśle wiążą się z dostępem do promieniowania synchrotronowego [1, 2].

Od początku XX wieku Nagrodę Nobla za badania związane z krytalografią przyznano 33 razy <http://www.iucr.org/people/nobel-prize>). Szczególnie dynamiczny rozkwit biokrytalografii zapoczątkowały w latach 60-tych wiekopomne prace Watsona i Cricka [3, 4] oraz Perutza i Kendrew [5, 6]. Od tego czasu Nagrodę Nobla za badania krytalograficzne struktury biomolekuł przyznano szesnaście razy, ostatnio w 2009 roku za zbadanie struktury rybosomu — ogromnego kom-

pleksu łańcuchów RNA oraz białek, na którym w każdej żywej komórce na Ziemi zachodzi biosynteza białek [7]-[9]. Dzięki biokrytalografii uzyskiwane są modele strukturalne białek o rozdzielczości atomowej, które służą między innymi do projektowania leków. Najbardziej spektakularnym tego przykładem są leki stosowane w leczeniu AIDS, które powstały dzięki poznaniu struktury białek wirusa HIV [10]-[12]. Zaprojektowana w oparciu o wyniki badań krytalograficznych i stosowana obecnie zmodyfikowana insulina jest łatwiej przyswajalna i ma przedłużony czas działania [13]. Co więcej badania krytalograficzne pozwalają także na poznanie struktury nie tylko pojedynczych białek wirusa, ale nawet całych wirusów [14]. Trudno więc przecenić znaczenie tego typu badań w opracowywaniu nowych leków, szczepionek czy nowych terapii.

Od połowy lat 80-tych ubiegłego wieku biokrytalografia stymulowana jest dostępem do źródeł promieniowania synchrotronowego. Dobrym odzwierciedleniem tego trendu jest nie tylko wzrastająca liczba struktur białkowych deponowanych w bazie Protein Data Bank <http://www.pdb.org>) ale przede wszystkim relacja liczby struktur

rozwiązywanych z wykorzystaniem promieniowania synchrotronowego do całkowitej liczby zdeponowanych struktur. Porównując tylko ostatnie 15-lecie warto zauważyć, że w 1996 roku zdeponowano w PDB 1148 struktur białkowych rozwiązanych w oparciu o dane dyfrakcyjne z czego 275 stanowiły struktury zbadane z pomocą promieniowania synchrotronowego (co stanowi 24% ogólnej liczby struktur rentgenowskich). Z kolei w roku 2011 na 8359 zdeponowanych struktur makromolekuł uzyskanych z użyciem promieniowania rentgenowskiego przypada aż 7076 struktur rozwiązanych w oparciu o dane synchrotronowe (czyli około 85%).

Z upowszechnieniem się dostępu do źródeł synchrotronowych związany jest też intensywny rozwój metod badania struktury biomolekuł w roztworach w oparciu o małokątowe rozpraszanie promieniowania synchrotronowego. Technika ta stanowi komplementarne wobec krystalografii narzędzie badawcze pozwalające na badanie struktur makromolekuł w ich naturalnym środowisku i jest niezwykle atrakcyjną do badań tych układów, dla których nie można uzyskać kryształów (białka o strukturze dynamicznej, złożone kompleksy multimetryczne, czy niektóre peptydy) [15].

### Biokrystalografia w Polsce

Polscy naukowcy od początku brali aktywny udział w badaniach biokrystalograficznych. Należy tu wymienić przede wszystkim prof. Tadeusza Baranowskiego, który w 1939 roku jako pierwszy Polak przeprowadził krystalizację białek [16]-[18]. W latach powojennych polska szkoła krystalografii rozwijała się nadal, ale w wyniku pogłębiających się trudności z prowadzeniem nowoczesnych badań w Polsce, jak również z innych względów, większość polskich biokrystalografów wyemigrowała na Zachód.

Dopiero w okresie ostatnich kilkunastu lat ta sytuacja zaczęła się zmieniać. Powstało w kraju kilka nowoczesnych ośrodków i krystalografia makromolekuł w Polsce znów rozwija się dynamicznie. Ten rozwój nie byłby możliwy bez dostępu do promieniowania synchrotronowego. Dotychczas dość swobodnie można było korzystać z linii synchrotronowych za granicą. Jednak w najbliższym czasie w dużym stopniu ograniczone mają zostać programy międzynarodowe finansujące dostęp do tych ośrodków dla badaczy europejskich. Aby podtrzymać poziom i zapewnić dalszy rozwój badań biostrukturalnych w Polsce zaistniała pilna potrzeba zapewnienia polskim biokrystalografom warunków do pracy w kraju w oparciu o narodowe centrum synchrotronowe wyposażone we własne linie synchrotronowe. Już na etapie prac nad projektem koncepcyjnym polskiego synchrotronu pojawił się pomysł budowy w nim linii pomiarowej przeznaczonej do badań biokrystalograficznych. W grudniu 2011 rozpoczęła się budowa długo wyczekiwanego pierwszego polskiego synchrotronu — Narodowego Centrum Promieniowania Synchrotronowego SO-

LARIS w Krakowie. Znając uwarunkowania konstrukcyjne, możliwości badawcze tego urządzenia oraz uwarunkowania finansowe na obecnym etapie możliwe jest zaproponowanie linii pomiarowej opartej o promieniowanie synchrotronowe z zakresu twardego promieniowania rentgenowskiego, która będzie mogła być wykorzystywana na potrzeby biologii strukturalnej i badań materiałowych. W środowisku poznańskich naukowców z Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza oraz Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN powstał projekt takiej linii.

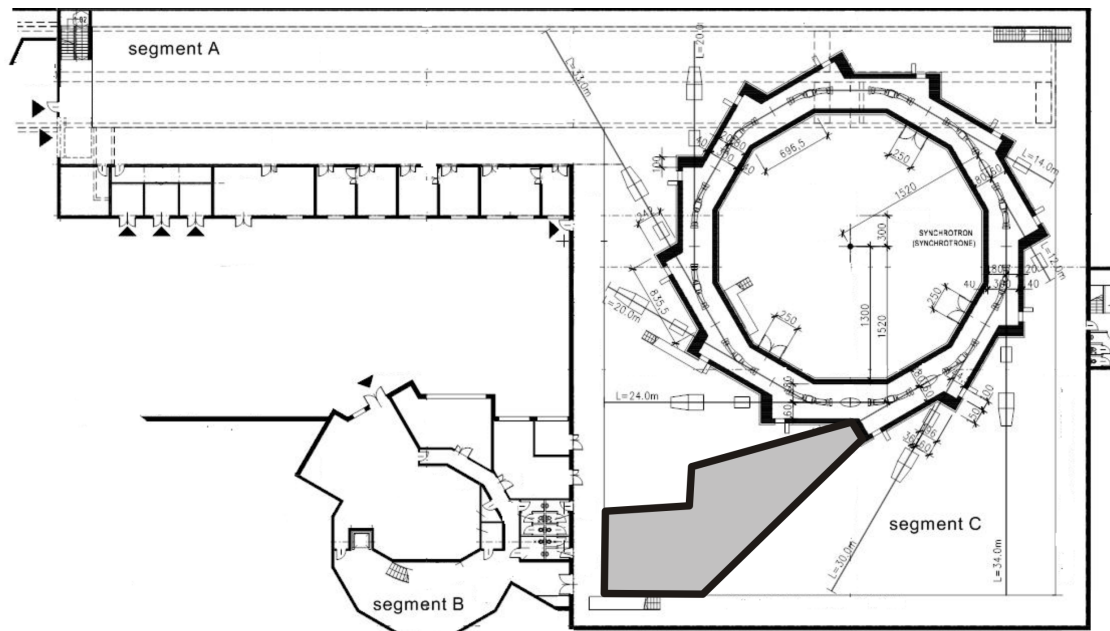
### Koncepcja linii

Biorąc pod uwagę parametry synchrotronu (obwód 96 m, energia 1.5 GeV), wielkość hali eksperymentalnej (50 m × 60 m) oraz możliwość lokalizacji na jego obwodzie 9 – 10 stacji pomiarowych należy w pierwszym rzędzie rozważyć budowę linii, która zapewniałaby dostęp do infrastruktury pomiarowej dla możliwie najszerszej grupy badaczy. Nie bez znaczenia obok badań krystalograficznych są także badania strukturalne układów niekryształicznych takich jak polimery i nanokompozyty polimerowe, szkła, błony biologiczne, nośniki leków czy szczepionek. Tego typu obiekty badane są również z wykorzystaniem promieniowania synchrotronowego i techniki rozpraszania małokątowego. Osobnym i niezwykle istotnym aspektem dla postępu technologicznego w kraju są także badania strukturalne nowych materiałów (nanokompozytów, polimerów, półprzewodników itp.), które również będą mogły rozwijać się przy udziale nowej linii pomiarowej. Warto nadmienić, że tego typu linie (złożone z kilku końcowych stacji pomiarowych) w synchrotronach za granicą, ze względu na swą specyfikę, są najbardziej produktywne w przeliczeniu na liczbę i wagę publikacji naukowych. Wyniki tych badań są publikowane w najlepszych czasopismach naukowych i mają zawsze najsilniejszy oddźwięk w środowisku naukowym.

Dlatego przedstawiona poniżej koncepcja obejmuje stworzenie obok końcowej stacji pomiarowej przeznaczonej do badań biokrystalograficznych budowę dwóch stacji końcowych do pomiarów małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (SAXS) i dyfrakcji na układach polikryształicznych. Potencjalna lokalizacja stacji, wstępnie uzgodniona z dyrekcją synchrotronu SOLARIS zaprezentowana została na rysunku 1.

Z uwagi na wymagania optyki rentgenowskiej oraz powierzchnię niezbędną do konstrukcji poszczególnych stacji pomiarowych konieczna jest lokalizacja stacji w możliwie najdłuższym (36 m) i przestronnym miejscu hali pomiarowej (segment C). Projekt przewiduje umieszczenie stacji w narożniku hali pomiarowej bezpośrednio sąsiadującym z segmentem B.

Przeprowadzone wcześniej konsultacje z zespołami zajmującymi się konstrukcją aparatury pomiarowej w ośrodkach synchrotronowych (między



Rysunek 1: Lokalizacja stacji MX/SAXS/XRD (jako szary wielobok) na planie synchrotronu SOLARIS. Plan sytuacyjny synchrotronu SOLARIS został udostępniony dzięki uprzejmości dyrekcji NCPS.

innymi w MAX-lab Lund czy DESY Hamburg) oraz z firmami zajmującymi się budową komponentów lub całych synchrotronowych linii pomiarowych pozwoliły stworzyć spójną koncepcję oraz realistycznie oszacować wymagane środki finansowe. Projekt tej linii przewiduje wyposażenie jej w urządzenia pomiarowe najnowszej generacji, co zapewni jej konkurencyjność wobec innych ośrodków na świecie.

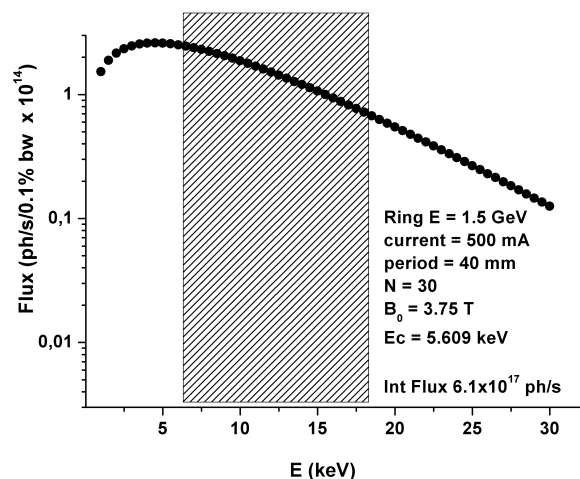
### Wiggler nadprzewodzący i optyka rentgenowska

Energia krytyczna na magnesach uginających dla synchrotronu SOLARIS wynosi 1.96 keV. Promieniowanie rentgenowskie w pożądanym zakresie energetycznym (6 – 18 keV) uzyskiwane będzie więc za pomocą wigglera nadprzewodzącego w polu  $B_0 = 3.5 - 4$  T (energia krytyczna 5.5 – 6 keV), który zapewni nie tylko odpowiedni zakres energetyczny ale też wysoką intensywność promieniowania. Przykładowy teoretyczny zakres widmowy dla tego typu wigglera zaprezentowany został na rysunku 2.

Elementy optyki stacji będą dostosowane do wymagań krystalografii białek. W szczególności konieczne są lustra kolimujące pozwalające na osiągnięcie wymaganej dla pomiarów z wykorzystaniem rozpraszania anomalnego wysokiej rozdzielczości energetycznej.

Koncepcja linii pomiarowej złożonej z kilku końcowych stacji pomiarowych jest najbardziej efektywnym wykorzystaniem miejsca oraz wiązki promieniowania rentgenowskiego emitowanej z jednego wigglera. W ostatnich latach podobna konstrukcja została zbudowana i z powodzeniem uruchomiona w ośrodku synchrotronowym MAX-lab w

Lund (Szwecja) [19]. Linia I911 zawiera aż pięć stacji końcowych (jedną pracującą w szerszym zakresie energii i dostosowaną do techniki dostrojonej dyfrakcji anomalnej (Multiwavelength Anomalous Diffraction - MAD) [20], oraz cztery pracujące przy stałej długości fali). Linia ta zainstalowana została na pierścieniu akumulacyjnym MAX-II o obwodzie (90 m) i parametrach zbliżonych do planowanych dla pierścienia akumulacyjnego w synchrotronie SOLARIS



Rysunek 2: Teoretyczny profil energetyczny promieniowania synchrotronowego generowanego z użyciem wigglera nadprzewodzącego 3.75 T. Na wykresie zaznaczony został zakres energetyczny możliwy do wykorzystania przez planowaną linię.

### Stacje końcowe

Pierwsza stacja końcowa przeznaczona do badań dyfrakcyjnych monokryształów biomakromolekuł - białek i kwasów nukleinowych (MX)

pracować powinna w pełnym zakresie energetycznym (6 – 18 keV). Oprócz standardowego goniostatu do badań monokryształów wyposażona powinna być także w system umożliwiający pełną automatyzację pomiarów dyfrakcyjnych oraz w przyszłości docelowo umożliwiać prowadzenie pomiarów zdalnych. Tego typu rozwiązania są już rutynowo stosowane w najlepszych liniach biokryystalograficznych [21]-[24]. Z uwagi na podatność próbek biologicznych na destrukcję indukowaną promieniowaniem rentgenowskim pomiary będą prowadzone w warunkach kriogenicznych. Z kolei dzięki wykorzystaniu pełnego zakresu energetycznego stacji możliwe będzie rejestrowanie danych dyfrakcyjnych w eksperymentach opartych na technice MAD [20]. Aby w pełni wykorzystać możliwości stacji na potrzeby techniki MAD jej energetyczna zdolność rozdzielcza powinna wynosić  $\Delta E/E = 10^{-4}$ .

Druga stacja końcowa (pomiarowa) powinna także pracować w tym zakresie energetycznym co stacja MX (6 – 18 keV,  $\Delta E/E = 10^{-4}$ ) i być wyposażona w wysokiej klasy optykę umożliwiającą pomiary układów biologicznych w roztworach (bioSAXS). Rejestracja danych oparta będzie o najlepszy dostępny na światowym rynku detektor półprzewodnikowy (np. typu PILATUS 1M) oraz system pomiarowy umożliwiający pomiary w szerokim zakresie temperatur, przynajmniej od 80 K do 573 K. Z uwagi na potencjalne szerokie wykorzystanie tej stacji pomiarowej także przez fizyków materii miękkiej oraz badaczy polimerów system wyposażony powinien być w układ umożliwiający wytłaczanie próbek polimerowych w trakcie pomiarów oraz zintegrowany kalorymetr skaningowy do rejestracji efektów energetycznych towarzyszącym przejściom fazowym generowanym w funkcji temperatury.

Z kolei trzecia stacja pomiarowa operować będzie przy stałej energii (15 keV) i wyposażona zostanie w dyfraktometr proszkowy wraz z wysokiej klasy detektorem liniowym lub powierzchniowym. Cały system pozwalał będzie na pomiary dyfrakcyjne w szerokim zakresie temperatur (60 – 1500 K) oraz pomiary ciśnieniowe.

## Podsumowanie

Linie o podobnym charakterze do planowanej funkcjonują w prawie wszystkich synchrotronach na świecie. Warto ponownie podkreślić, że w większości przypadków tego typu linie pomiarowe należą do najbardziej produktywnych naukowo linii badawczych. Wielkość środowiska potencjalnych użytkowników stacji MX w Polsce oszacować można na 12 grup biokryystalograficznych oraz przynajmniej 5 kolejnych grup badawczych sporadycznie korzystających z technik biokryystalograficznych, co daje szacunkową liczbę 50 – 60 potencjalnych użytkowników stacji MX. Szacunki zapotrzebowania na czas pomiarowy bazujące tylko na wyko-

rzystaniu linii przez te grupy, nie licząc potencjalnych użytkowników z zagranicy (w szczególności z Europy środkowej), to ponad 100 dni pomiarowych. Co więcej w związku z rozwojem biologii strukturalnej w Polsce i powstawaniem w kraju nowych grup biokryystalograficznych należy szacować, że liczebność tej grupy użytkowników ma tendencje wzrostowe. Jeśli chodzi o pozostałe końcowe stacje pomiarowe (SAXS, XRD) to z uwagi na szerszy (multidyscyplinary) profil badań liczba użytkowników jest znacznie większa.

W powyższych szacunkach uwzględnić należy również efekt generowania zapotrzebowania poprzez dostępność technologii (*technology-driven research*) oraz prowadzone przez personel linii badania własne (*in-house*) w efekcie można powiedzieć, że możliwości planowanej linii pomiarowej będą w pełni wykorzystywane.

**Acknowledgments:** The work was supported by the European Regional Development Fund within the frame of the Innovative Economy Operational Program: POIG.02.01.00-12-213/09.

## References

- [1] Z. Dauter, M. Jaskolski, A. Wlodawer, "Impact of synchrotron radiation on macromolecular crystallography: A personal view," *J. Synchrotron Rad.* **17** (2010) 433 – 444.
- [2] Z. Dauter, A. Wlodawer, M. Jaskolski, "Promieniowanie rentgenowskie ze źródeł synchrotronowych jako katalizator rozwoju krystalografii białek", *Synchrotron Radiation in Natural Science* **9** (2010) 4 – 16.
- [3] J.D. Watson, F.H.C. Crick, "Molecular structure of nucleic acids — a structure for deoxyribose nucleic acid," *Nature* **171** (1953) 737 – 738.
- [4] J.D. Watson, F.H.C. Crick, "Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid," *Nature* **171** (1953) 964 – 967.
- [5] J.C. Kendrew, R.E. Dickerson, B.E. Strandberg, R.G. Hart, D.R. Davies, D.C. Phillips, V.C. Shore, "Structure of myoglobin — 3-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution," *Nature* **185** (1960) 422 – 427.
- [6] M.F. Perutz, M.G. Rossmann, A.F. Cullis, H. Muirhead, G. Will, A.C.T. North, "Structure of haemoglobin — 3-dimensional Fourier synthesis at 5.5 Å resolution, obtained by X-ray analysis," *Nature* **185** (1960) 416 – 422.
- [7] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P.B. Moore, T.A. Steitz, "The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 angstrom resolution," *Science* **289** (2000) 905 – 920.
- [8] J. Harms, F. Schluenzen, R. Zarivach, A. Bashan, S. Gat, I. Agmon, H. Bartels, F. Franceschi, A. Yonath, "High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic Eubacterium," *Cell* **107** (2001) 679 – 688.
- [9] B.T. Wimberly, D.E. Brodersen, W.M. Clemons, R.J. Morgan-Warren, A.P. Carter, C. Vornheim, T.

- Hartsch, V. Ramakrishnan, “Structure of the 30S ribosomal subunit,” *Nature* **407** (2000) 327 – 339.
- [10] A. Wlodawer, M. Miller, M. Jaskolski, B.K. Sathyanarayana, E. Baldwin, I.T. Weber, L.M. Selk, L. Clawson, J. Schneider, S.B.H. Kent, “Conserved folding in retroviral proteases — crystal-structure of a synthetic HIV-1 protease,” *Science* **245** (1989) 616 – 621.
- [11] M. Jaskolski, “From atomic resolution to molecular giants: An overview of crystallographic studies of biological macromolecules with synchrotron radiation,” *Acta Phys. Polon. A* **117** (2009) 257 – 263; *Synchrotron Radiation in Natural Science* **9** (2009) 17 – 23.
- [12] Z. Dauter, M. Jaskolski, “Zastosowanie promieniowania synchrotronowego w krystalografii białek,” in: *Promieniowanie synchrotronowe w spektroskopii i badaniach strukturalnych. Wybrane zagadnienia*, B.J. Kowalski, W. Paszkowicz, E.A. Gorlich, eds., pp. 305 – 328 (PTPS Kraków, 2011).
- [13] J.L. Whittingham, I. Jonassen, S. Havelund, S.M. Roberts, E.J. Dodson, C.S. Verma, A.J. Wilkinson, G.G. Dodson, “Crystallographic and solution studies of N-lithocholyl insulin: A new generation of prolonged-acting human insulins,” *Biochemistry* **43** (2004) 5987 – 5995.
- [14] S.A. Wynne, R.A. Crowther, A.G.W. Leslie, “The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid,” *Mol. Cell* **3** (1999) 771 – 780.
- [15] C.D. Putnam, M. Hammel, G.L. Hura, J.A. Tainer, “X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: Defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution,” *Quarterly Rev. Biophys.* **40** (2007) 191 – 285.
- [16] T. Baranowski, “Die Isolierung von kristallisierten Proteinen aus Kaninchenmuskel,” *Z. Physiol. Chem.* **260** (1939) 43 – 55.
- [17] L. Chrobak, T. Baranowski, “Über verschiedene Kristalle des A-Myogens aus Kaninchenmuskelatur. Comptes Rendus,” (Doklady) *l’Academie des Science de l’USSR* **XXVIII** (1940) 724 – 725.
- [18] T. Baranowski, “Crystalline glycerophosphate dehydrogenase from rabbit muscle,” *J. Biol. Chem.* **180** (1949) 535 – 541.
- [19] C.B. Mammen, T. Ursby, M. Thunnissen, and J. Als-Nielsen, “Bent diamond crystals and multilayer based optics at the new 5-Station Protein Crystallography Beamline ‘Cassiopeia’ at MAX-lab, *AIP Conference Proceedings* **705** (2004) 808 – 811.
- [20] W.A. Hendrickson, “Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation,” *Science* **254** (1991) 51 – 58.
- [21] G. Snell, C. Cork, R. Nordmeyer, E. Cornell, G. Meigs, D. Yegian, J. Jaklevic, J. Jin, R.C. Stevens, T. Earnest, “Automated sample mounting and alignment system for biological crystallography at a synchrotron source,” *Structure* **12** (2004) 537 – 545.
- [22] S.M. Soltis, A.E. Cohen, A. Deacon, T. Eriksson, A. Gonzalez, S. McPhillips, H. Chui, P. Dunten, M. Hollenbeck, I. Mathews, M. Miller, P. Moorhead, R.P. Phizackerley, C. Smith, J. Song, H. van dem Bedem, P. Ellis, P. Kuhn, T. McPhillips, N. Sauter, K. Sharp, I. Tsyba, G. Wolf, “New paradigm for macromolecular crystallography experiments at SSRL: Automated crystal screening and remote data collection,” *Acta Cryst. D* **64** (2008) 1210 – 1221.
- [23] X.D. Wang, M. Gleaves, D. Meredith, R. Allan, C. Nave, “E-science technologies in synchrotron radiation beamline — Remote access and automation (A case study for high throughput protein crystallography),” *Macromol. Res.* **14** (2006) 140 – 145.
- [24] M. Gilski, “Automation and remote synchrotron data collection,” *Acta Phys. Polon. A* **114** (2008) 331 – 338.