

Autoreferat

Andrzej Olczak
Zespół Rentgenografii Strukturalnej i Krystalochemii
Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Łódzka

1. *Dane osobowe.*

Imię i nazwisko: **Andrzej Olczak**

2. *Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.*

- 1997** Stopień doktora nauk chemicznych, rozprawa pt. „Struktura a własności aminokwasowych pochodnych 2,6-ksylidyny, analogów lidokainy”, Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka, promotor: prof. dr hab. inż. Marek Główka
- 1987** Tytuł magistra inżyniera fizyki technicznej, rozprawa pt. „Kinetyka przejścia fazowego z fazy izotropowej do fazy cholesterolowej dla pelargonianu cholesterylu”, Wydział Fizyki Technicznej i Matematyki Stosowanej, Politechnika Łódzka, promotor: dr hab. inż. Przemysław Adamski

3. *Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.*

- 1999–2000** Research fellow, The University of Manchester, School of Chemistry
- 1997–** Adiunkt, Politechnika Łódzka, Wydział Chemiczny
- 1994–1997** Asystent, Politechnika Łódzka, Wydział Chemiczny
- 1992–1994** Pracownik techniczny, Politechnika Łódzka, Wydział Chemiczny
- 1986–1989** Pracownik techniczny, Uniwersytet Łódzki, Wydział Fizyki

4. *Wskazanie osiągnięcia stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego*

Osiągnięciem naukowym wynikającym z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm.) jest cykl powiązanych tematycznie publikacji naukowych pt.: „ROZPRASZANIE REZONANSOWE W RENTGENOGRAFII STRUKTURALNEJ – WYBRANE ASPEKTY TEORETYCZNE I APLIKACYJNE”.

4.2 *Wykaz powiązanych tematycznie artykułów naukowych H1-H9 stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego*

Sumaryczny Impact Factor: 23,76

Liczba cytowań: 162

Liczba prac: 9

- H1.** M. Cianci, P.J. Rizkallah, **A. Olczak**, J. Raftery, N.E. Chayen, P.F. Zagalsky, and J.R. Helliwell. (2001). STRUCTURE OF LOBSTER APOCRUSTACYANIN A₁ USING SOFTER X-RAYS. *Acta Cryst.*, **D57**(9), 1219–1229.
- H2.** **A. Olczak**, M. Cianci, Q. Hao, P.J. Rizkallah, J. Raftery, and J.R. Helliwell. (2003). S-SWAT (SOFTER SINGLE-WAVELENGTH ANOMALOUS TECHNIQUE): POTENTIAL IN HIGHTHROUGHPUT PROTEIN CRYSTALLOGRAPHY. *Acta Cryst.*, **A59**(4), 327–334.
- H3.** M. Cianci, J.R. Helliwell, D. Moorcroft, **A. Olczak**, J. Raftery, P.J. Rizkallah. (2004). THE ROLE OF WAVELENGTH AND SOURCE IN THE SEARCH FOR SULFUR-ATOM POSITIONS EVALUATED IN TWO CASE STUDIES: LYSOZYME AT ROOM TEMPERATURE AND CRYO APOCRUSTACYANIN A₁. *J. of Appl. Crystallogr.*, **37**(4), 555–564.
- H4.** M.L. Główka, **A. Olczak**, J. Bojarska, M. Szczesio, W.L. Duax, B.M. Burkhart, W.A. Pangborn, D.A. Langs, and Z. Wawrzak. (2005). STRUCTURE OF GRAMICIDIN D-RbCl COMPLEX AT ATOMIC RESOLUTION FROM LOW-TEMPERATURE SYNCHROTRON DATA: INTERACTIONS OF DOUBLE-STRANDED GRAMICIDIN CHANNEL CONTENTS AND CATIONS WITH CHANNEL WALL. *Acta Cryst.*, **D61**(4), 433–441.
- H5.** **A. Olczak**, M.L. Główka, M. Szczesio, J. Bojarska, W.L. Duax, B.M. Burkhart, and Z. Wawrzak. (2007). NONSTOICHIOMETRIC COMPLEX OF GRAMICIDIN D WITH KI AT 0.80Å RESOLUTION. *Acta Cryst.*, **D63**(3), 319–327.
- H6.** J.S. Brunzelle, D.B. Jordan, D.R. McCaslin, **A. Olczak**, and Z. Wawrzak. (2008). STRUCTURE OF THE TWO-SUBSITE β-D-XYLOSIDASE FROM SELENOMONAS RUMINANTIUM IN COMPLEX WITH 1,3-BIS[TRIS(HYDROXYMETHYL)METHYLAMINO]PROPANE. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **474**(1), 157–166.
- H7.** **A. Olczak**, M.L. Główka, M. Szczesio, J. Bojarska, Z. Wawrzak, and W.L. Duax. (2010.) THE FIRST CRYSTAL STRUCTURE OF A GRAMICIDIN COMPLEX WITH SODIUM: HIGH-RESOLUTION STUDY OF A NONSTOICHIOMETRIC GRAMICIDIN D-NaI COMPLEX. *Acta Cryst.*, **D66**(8), 874–880.
- H8.** **A. Olczak**. (2011). COMMENT ON PROBABILITY DENSITY FUNCTIONS OF THE AVERAGE AND DIFFERENCE INTENSITIES OF FRIEDEL OPPOSITES BY SHMUELI & FLACK (2010). *Acta Cryst.*, **A67**(3), 315–317.
- H9.** **A. Olczak**, M. Cianci. (2018). THE SIGNAL-TO-NOISE RATIO IN SAD EXPERIMENTS *Crystallography Reviews*, **24**(2), 73-101.

Rozpraszanie rezonansowe w rentgenografii strukturalnej – wybrane aspekty teoretyczne i aplikacyjne

Prezentowany autoreferat zawiera opis osiągnięcia naukowego udokumentowanego cyklem powiązanych tematycznie publikacji (**H1-H9**), z których wyodrębnione zostały dwa główne nurty badawcze, których jestem autorem lub współautorem. Pierwszy dotyczy wybranych zagadnień teoretycznych związanych z rozpraszaniem anomalnym promieniowania rentgenowskiego na kryształach, a bardziej szczegółowo – chodzi o własności statystyczne różnic Bijvoeta. Drugi dotyczy wykorzystania rozpraszania anomalnego (w tym również wspomnianych własności) w badaniach strukturalnych, których efektem jest kilka nowych struktur makromolekularnych.

1 Wprowadzenie

Rozpraszanie rezonansowe i *rozpraszanie anomalne* są terminami używanymi wymiennie do opisu rozpraszania promieniowania np. elektromagnetycznego (w tym rentgenowskiego) w pobliżu krawędzi absorpcji. Zjawisko to niewątpliwie komplikuje opis procesu rozpraszania, ale — jak zazwyczaj w takich wypadkach bywa — otwiera również nowe możliwości badawcze. Możliwości te dla struktur niecentrosymetrycznych i niechiralnych są skromniejsze i sprowadzają się do możliwości określenia bezwzględnej orientacji kryształu względem układu laboratoryjnego. Dla struktur chiralnych wachlarz zastosowań tego zjawiska jest jednak znacznie szerszy. W badaniach makromolekularnych wykorzystuje się je głównie do lokalizacji centrów rozpraszania rezonansowego i określania faz promieni rozproszonych (metody MAD, SAD, MIRAS, SIRAS), natomiast w przypadku związków małowcząsteczkowych – do określenia struktury absolutnej kryształów i konfiguracji absolutnej związków chiralnych. Dzięki wykorzystaniu rozproszenia rezonansowego w roku 1951 poraz pierwszy doszło do oznaczenia konfiguracji absolutnej związku o budowie chiralnej z wykorzystaniem dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego [1].

Przyglądając się bliżej początkom rentgenografii można zauważyć, że przez dłuższy czas zmagano się z tym zjawiskiem. Wprawdzie możliwość wykrycia środka symetrii na podstawie symetrii obrazu dyfrakcyjnego była żywo dyskutowana od momentu odkrycia przez Lauego dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na kryształach w 1912 roku [2], to francuski mineralog i krystalograf Georges Friedel uzasadniał już w 1913 roku, że obraz dyfrakcyjny każdego kryształu (niezależnie od obecności w jego strukturze środka symetrii) musi być centrosymetryczny [3]. Fakt ten zyskał miano *prawa Friedela*. Choć już wtedy istniały przesłanki do stwierdzenia, że dla niektórych kryształów, takich jak np. blenda cynkowa, obraz dyfrakcyjny jest niekoniecznie centrosymetryczny, dopiero w 1927 roku Ewald i Hermann zwrócili uwagę na fakt, że odstępstwo od prawa Friedela dla kryształów niecentrosymetrycznych może być spowodowane absorpcją promieniowania [4]. Wówczas niezerowe różnice intensywności refleksów związanych środkiem symetrii, $I_{hkl} - I_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}}$, tzw. różnice Bijvoeta (oznaczane również jako $I^+ - I^-$) niosą informację o lokalizacji centrów (atomów) wykazujących anomalne rozpraszanie.

W praktyce różnice są raczej niewielkie, a czasami wręcz trudno uchwytnie na tle różnic wynikających z niepewności pomiarowych. Nasuwa się więc pytanie o warunki wykonania pomiaru, pozwalające uzyskać wartościowe dane dla kryształu charakteryzującego się określonym poziomem anomalnego rozpraszania (nawiązuję do tego pytania w pracach **H3** i **H9**). Wpierw jednak należy podać sposób ilościowego zdefiniowania tego poziomu. Można to, oczywiście, zrobić na wiele sposobów, ale wydaje się, że najbardziej naturalnym wyborem jest iloraz wartości średniej modułu różnicy Bijvoeta i średniej intensywności, $\langle |\Delta I| \rangle / \langle I \rangle$. Po pewnym doprecyzowaniu będę ten parametr nazywał *sygnałem anomalnym*, choć w literaturze można sporadycznie spotkać również inne definicje tego terminu [5, 6].

Należy w tym miejscu zrobić ważną uwagę. Różnice Bijvoeta mierzone w eksperymencie mają dwie składowe: jedna jest realnym efektem związanym z rozpraszaniem rezonansowym i oznaczamy ją jako ΔI_{anom} , a druga związana jest z niepewnościami pomiarowymi i oznaczmy ją jako ΔI_{noise} , czyli $\Delta I = \Delta I_{anom} + \Delta I_{noise}$ [**H9**]. Określenie *sygnał anomalny* odnosi się tylko do składowej ΔI_{anom} .

Możliwość oszacowania wielkości sygnału anomalnego *a priori*, przed rozwiązaniem struktury a nawet przed wykonaniem eksperymentu może być bardzo pomocna przy ocenie szans na określenie faz struktury makromolekularnej [**H9**], bądź szans na określenie struktury absolutnej kryształu małowcząsteczkowego, natomiast jego znajomość *a posteriori* może być pomocna w ocenie jakości przeprowadzonego eksperymentu dyfrakcyjnego i detekcji pewnego rodzaju nieprawidłowości w udokładnionej strukturze [**H7**]. Wydaje się więc pożytecznym znalezienie formuły pozwalającej w miarę precyzyjnie określić wielkość tego parametru na podstawie samego składu kryształu (bez znajomości jego struktury), o czym będzie mowa w paragrafie 2 [**H2,H5**].

Tak zdefiniowany sygnał anomalny niesie w sobie tylko ogólną informację o „sile” rozpraszania rezonansowego. Ciekawym więc wydaje się pytanie bardziej szczegółowe, pytanie o kształt statystycznego rozkładu różnic Bijvoeta, $\Delta I = I^+ - I^-$, i jak taki rozkład zależy np. od składu, czy symetrii kryształu (nawiązuję do tego pytania w pracy **H8**). Powszechnie w krytalografii jest wykorzystanie rozkładów statystycznych intensywności bądź znormalizowanych czynników struktury (np. do identyfikacji środka symetrii w strukturze). Przy coraz wyższej precyzji pomiarów, a tym samym różnic Bijvoeta, nie jest wykluczone, że rozkłady tych różnic mogłyby również być użytecznym narzędziem w określonych sytuacjach [**H8**].

2 Wielkość sygnału anomalnego dla dowolnego składu kryształu

Rozpraszanie rezonansowe wywołuje nie tylko zmianę amplitudy rozpraszanego promieniowania, ale — co nawet ważniejsze — zmianę jego fazy. Oznacza to, że w opisie matematycznym atomowy czynnik rozpraszania staje się liczbą zespoloną, którą będę oznaczał jako f^c . Ponieważ co do oznaczeń wielu stosowanych w tym tekście wielkości nie ma ogólnie przyjętych standardów, dla uniknięcia niejednoznaczności zestawiam poniżej oznaczenia tych wielkości, którymi będę się posługiwał.

2.1 Oznaczenia

$\mathbf{H} = (hkl)$	wektor sieci odwrotnej,
i, j, k, A, B	małe indeksy oznaczają numery atomów w komórce elementarnej, a duże numerują typy atomów,
\mathbf{r}_j	położenie j -tego atomu w komórce elementarnej,
$\Delta \mathbf{r}_{jk} = \mathbf{r}_j - \mathbf{r}_k$	różnica położenia atomów j i k w komórce elementarnej,
$f_j^c = f_j + f'_j + i f''_j$	zespolony atomowy czynnik rozpraszania,
$f_j^e = f_{oj} e^{i\delta_j}$	zespolony atomowy czynnik rozpraszania w postaci wykładniczej,
$\Delta_{jk} = \delta_j - \delta_k$	różnica faz dla atomowych czynników rozpraszania,
$\langle X \rangle$	średnia wartość zmiennej losowej X odnosząca się do określonej rozdzielczości,
$e^{-T_j} = e^{-B_j \sin^2 \theta / \lambda^2}$	czynnik uwzględniający drgania termiczne o wielkości B_j dla atomu j -tego,
q_j	czynnik obsadzenia atomu o numerze j ,
$c_j = q_j e^{-T_j}$	czynnik obsadzenia zmodyfikowany o czynnik temperaturowy dla atomu o numerze j ,
$ F^+ , F^- $	amplitudy czynników struktury dla (hkl) i $(\bar{h}\bar{k}\bar{l})$, odpowiednio
$\Delta F _{anom} = F^+ - F^- $	różnice Bijvoeta dla czynników struktury,
$\Delta F ^2_{anom} = F^+ ^2 - F^- ^2$	różnice Bijvoeta dla kwadratów czynników struktury,
$\Delta I_{anom} = I^+ - I^-$	różnice Bijvoeta dla intensywności,
$\Delta_{anom} \equiv \frac{\langle \Delta F _{anom} \rangle}{\langle F \rangle}$	sygnał anomalny zdefiniowany przez czynniki struktury,
$\Delta_{2anom} \equiv \frac{\langle \Delta I_{anom} \rangle}{\langle I \rangle}$	sygnał anomalny zdefiniowany przez intensywności,
Δ_{anom}^{AB}	wkład do Δ_{anom} lub Δ_{2anom} pochodzący od atomów typu A i B ,
$\Delta I_{exp} = \Delta I_{anom} + \Delta I_{noise}$	eksperymentalnie określona różnica Bijvoeta,
$\left\langle \frac{ \Delta I_{exp} }{\sigma_{\Delta I}} \right\rangle$	średnia eksperymentalnych różnic Bijvoeta w stosunku do niepewności pomiarowych oznaczana jako α .

Jak już wspomniano powyżej w definicjach różnic Bijvoeta i sygnału anomalnego oznaczenie „*anom*” wskazuje na fakt, że różnice te są jedynie skutkiem odstępstwa od prawa Friedela i nie zawierają wkładów pochodzących od niepewności pomiarowych (błędów przypadkowych). Różnice pochodzące od błędów przypadkowych, które zawsze są obecne dla różnic uzyskanych eksperymentalnie, oznaczane będą przez ΔI_{noise} .

2.2 Formuła określająca wielkość sygnału anomalnego

Prosta zależność umożliwiająca oszacowanie wielkości sygnału anomalnego w zależności od składu kryształu została podana przez Hendricksona i Teeter w 1981 [7]:

$$\Delta_{anom} = \sqrt{2} \frac{f''_A}{Z_{eff}} \sqrt{\frac{N_A}{N_P}} \quad (1)$$

gdzie $Z_{eff} \approx 6,7$ oznacza efektywny (uśredniony dla różnych typów atomów niewodородowych występujących w strukturach białkowych) atomowy czynnik rozpraszania dla rozproszenia pod kątem równym zero, N_A i N_P oznaczają liczbę atomów rozpraszających

anomalnie i pozostałych, odpowiednio, a f_A'' – urojoną poprawkę do atomowego czynnika rozpraszania. Wzór (1) ma tę istotną wadę, że można go zastosować tylko w bardzo szczególnym przypadku: gdy w strukturze znajduje się tylko jeden typ atomów rozpraszających anomalnie i wszystkie obsadzenia tych atomów są całkowite. Ciekawym byłoby uogólnienie tej formuły na dowolny skład kryształu. W 2001 roku Weiss *et al.* [8] zasugerowali następujące uogólnienie:

$$\Delta_{anom} = \sqrt{\frac{2 \sum_{A=1}^Q N_A f_A''^2}{\sum_{A=1}^Q N_A f_A^2}} \quad (2)$$

gdzie $A = 1, 2, \dots, Q$, a Q oznacza liczbę różnych typów atomów obecnych w strukturze, a N_A oznacza liczbę atomów typu A .¹ Dwa lata później Girard *et al.* [9] uwzględniając niecałkowite współczynniki obsadzenia atomów wyprowadzili natomiast następujące uogólnienie formuły (1):

$$\Delta_{anom} = \frac{1}{Z_{eff}} \sqrt{\frac{2 \sum_{j=1}^N q_j^2 f_j''^2}{N_P}} \quad (3)$$

gdzie N_P oznacza liczbę atomów w komórce elementarnej.

Formuły (2) i (3) mają również pewną podstawową wadę: dają niezerowy wynik w przypadku struktur homogenicznych, dla których sygnał anomalny powinien być równy zero. Z tego powodu na ogół wyniki przez te formuły przewidywane są zawyżone również dla struktur heterogenicznych.

Dla przykładu, wielkość sygnału anomalnego dla związku o składzie $C_{14}H_{20}NOBr$ i długości fali $\lambda = 2\text{\AA}$ na podstawie wzoru (2) to 6,5%, a dla związku z jednym atomem bromu więcej, $C_{14}H_{19}NOBr_2$, to 7,2%. Natomiast według przeze mnie wyprowadzonego wzoru (4) to 3,8% i 3,3%, odpowiednio. Można tu poczynić ciekawą obserwację, że zwiększenie liczby atomów rozpraszających anomalnie nie musi prowadzić do zwiększenia sygnału anomalnego, a czasami wręcz odwrotnie – do jego zmniejszenia.

Zagadnienie uogólnienia formuły (1) zainteresowało mnie w 1999 roku, przy próbie rozwiązania struktury apocrustacjaniny A_1 metodą podstawienia izomorficznego, w której oprócz atomów siarki (białka natywnego) miał(y) oczywiście występować atom(y) ciężki(e). Interesowało mnie czy efekt pochodzący od różnych atomów rozpraszających rezonansowo jest addytywny tzn. czy wkłady od poszczególnych atomów sumują się w prosty sposób. Okazało się, że nie, i że o wielkości sygnału anomalnego nie decyduje sama wielkość poprawki urojonej dla atomowego czynnika rozpraszania, ale różnice faz $\Delta_{AB} = \delta_A - \delta_B$ dla poszczególnych par typów atomów. Wkładów do sygnału anomalnego jest więc tyle ile jest par typów atomów: dla dwu typów będzie to tylko jedna para, dla trzech – trzy, a dla czterech – sześć. Pierwsze, rezultaty zaprezentowałem na SRS User's Meeting w Daresbury w 1999 roku [10], na ECM 20 w Krakowie w 2001 [11] i w 2002 roku we Wrocławiu na Konwersatorium Krystalograficznym [12]. Podane przeze

¹W cytowanym artykule użyto innych oznaczeń.

mnie uogólnienie dotyczyło przypadku dwu typów atomów rozpraszających anomalnie, gdyż struktura apocrustacyaniny A_1 zawierała oprócz atomów siarki tylko atomy ksenonu, który został wpompowany do kryształu pod ciśnieniem 14 atm w celu uzyskania pochodnej izomorficznej.

Prawidłowe formuły słuszne dla dowolnych obsadzeń atomów i traktujące wszystkie atomy jako rozpraszające anomalnie były sukcesywnie podawane przeze mnie w pracach: [11], [12], **H2**, [13] dla dwu typów anomalnie rozpraszających, w pracach [14, 15, 16] dla dowolnej liczby atomów rozpraszających anomalnie i dowolnym obsadzeniu. Postać najogólniejszej formuły otrzymane przeze mnie jest następująca:

$$\Delta_{anom} = \sqrt{\sum_{B>A}^Q (\Delta_{anom}^{AB})^2} \quad (4)$$

gdzie $A, B = 1 \dots Q$ oznaczają typy atomów występujących w strukturze, a indywidualne wkłady od poszczególnych heterogenicznych par, Δ_{anom}^{AB} , w tej sumie mają postać:

$$\Delta_{anom}^{AB} = \frac{8}{\pi^{3/2}} \frac{|f_B''(f_A + f_A') - f_A''(f_B + f_B')|}{\langle |F|^2 \rangle} \sqrt{\sum_{j_A=1}^{N_A} \sum_{i_B=1}^{N_B} c_{j_A}^2 c_{i_B}^2} \quad (5)$$

gdzie c_{A_j} i c_{B_i} – zmodyfikowane czynniki obsadzenia (patrz oznaczenia na str. 6), a N_A i N_B – liczba atomów typu A i B odpowiednio.

W 2007 roku Flack i Shmueli [17] doszli do takiego samego rezultatu jak przedstawiony w formule (4) uzupełniając go o przypadek centrosymetrycznej podstruktury. Jeżeli w strukturze występuje centrosymetryczna podstruktura to zależność (4) przyjmuje następującą formę:

$$\Delta_{anom} = \sqrt{\sum_{B>A}^Q (\Delta_{anom}^{AB})^2 - \sum_{A'>B'}^{Q'} (\Delta_{anom}^{A'B'})^2} \quad (6)$$

gdzie wielkości primowane odnoszą się do centrosymetrycznej podstruktury. Należy zauważyć, że to uzupełnienie ma zastosowanie tylko w przypadku gdy centrosymetryczna podstruktura jest heterogeniczna, gdyż w przeciwnym wypadku jej wkład do sygnału anomalnego jest zerowy z definicji.

2.3 Założenia przyjęte przy wyprowadzenie formuły określającej wielkość sygnału anomalnego

W tym paragrafie przedstawię szkic wyprowadzenia formuły (4), aby uwypuklić założenia przyjęte przy jej wyprowadzeniu. Pozwala to zrozumieć pewne ograniczenia, o których będzie mowa w paragrafie 6.

Aby obliczyć sygnał anomalny wyjdziemy z klasycznego wzoru na czynnik struktury, $F_{\mathbf{H}}$, z uwzględnieniem drgań termicznych i częściowych obsadzenia atomów. Wówczas możemy zapisać, że $F_{\mathbf{H}} = e^{-T} \sum_{j=1}^N c_j f_j^c e^{2\pi i \mathbf{H} \cdot \mathbf{r}_j}$, a kwadrat modułu czynnika struktury

wygodny do obliczeń różnic Bijvoeta przybiera postać:

$$|F_{\mathbf{H}}|^2 = \sum_{j=1}^N c_j^2 f_{oj}^2 + \sum_{k=1}^N \sum_{j>k}^N c_j c_k f_{oj} f_{ok} \left\{ e^{i\Delta_{jk}} e^{2\pi i \mathbf{H} \cdot \Delta \mathbf{r}_{jk}} + e^{-i\Delta_{jk}} e^{-2\pi i \mathbf{H} \cdot \Delta \mathbf{r}_{jk}} \right\}$$

i, jak można wykazać, różnice Bijvoeta wyrażają się wzorem (7) [H2].

$$\Delta |F_{\mathbf{H}}|_{anom}^2 = -4 \sum_{k=1}^N \sum_{j>k}^N c_j c_k f_{oj} f_{ok} \sin \Delta_{jk} \sin(2\pi \mathbf{H} \cdot \Delta \mathbf{r}_{jk}) \quad (7)$$

Położenia atomów, \mathbf{r}_j , traktujemy jako *niezależne* zmienne losowe o rozkładzie jednostajnym w komórce elementarnej. Jest to standardowe założenie stosowane np. przy wyprowadzaniu rozkładów prawdopodobieństwa dla intensywności refleksów, czy znormalizowanych czynników struktury. Przy takim założeniu również różnice $\Delta \mathbf{r}_{jk}$ mają rozkład jednostajny, ale tylko przy — skądinąd oczywistym — założeniu o periodyczności sieci krystalicznej. Co będzie bardzo ważne dla określenia rozkładów prawdopodobieństwa dla par Bijvoeta (paragraf 7) to to, że niezależność zmiennych \mathbf{r}_j nie implikuje niezależności zmiennych $\Delta \mathbf{r}_{jk}$. W przypadku wyprowadzenia formuły (4) ważne jest natomiast — co można prosto wykazać — że zmienne $\sin(2\pi \mathbf{H} \cdot \Delta \mathbf{r}_{jk})$ są nieskorelowane. Można więc różnicę Bijvoeta (7) potraktować jako sumę nieskorelowanych zmiennych losowych

$$\Delta |F_{\mathbf{H}}|_{anom}^2 = \sum_{k=1}^N \sum_{j>k}^N \chi_{jk} \quad (8)$$

o postaci $\chi_{jk} = -4 f_{oj} f_{ok} c_j c_k \sin \Delta_{jk} \sin(2\pi \mathbf{H} \cdot \Delta \mathbf{r}_{jk})$. Jeżeli wariancję zmiennej losowej $\Delta |F_{\mathbf{H}}|_{anom}^2$ oznaczymy jako $\sigma_{\Delta |F|_{anom}^2}^2$, a wariancje zmiennych χ_{jk} jako σ_{jk}^2 , to w przypadku nieskorelowanych zmiennych losowych możemy zapisać:

$$\sigma_{\Delta |F|_{anom}^2}^2 = \sum_{k=1}^N \sum_{j>k}^N \sigma_{jk}^2 \quad (9)$$

gdzie $\sigma_{jk} = \sqrt{8} f_{oj} f_{ok} c_j c_k |\sin \Delta_{jk}|$. Po zagregowaniu atomów tego samego typu można równanie (9) zapisać również w bardziej zwartej postaci:

$$\sigma_{\Delta |F|_{anom}^2}^2 = \sum_{A=1}^Q \sum_{B>A}^Q \sigma_{AB}^2 \quad (10)$$

gdzie: $\sigma_{AB} = \sqrt{8} f_{oA} f_{oB} |\sin \Delta_{AB}| \sqrt{\sum_{j_A=1}^{N_A} \sum_{i_B=1}^{N_B} c_{j_A}^2 c_{i_B}^2}$. Przy założeniu, że różnice Bijvoeta podlegają rozkładowi Gaussa średnia wartości bezwzględnej takiej różnicy wyrazi się zależnością: $\langle |\Delta |F_{\mathbf{H}}|_{anom}^2| \rangle = \sqrt{2/\pi} \sigma_{\Delta |F|_{anom}^2}^2$, co wprost prowadzi do wzoru (4). Wzór ten wskazuje, że określenie konfiguracji absolutnej dla czystego węgłowodoru i dla typowych długości fal graniczy z niemożliwością. Wzór (4 z uzupełnieniem Flacka i Shmuelego (6) został zaimplementowany przeze mnie i L. Sieronią na stronie <http://assc.p.lodz.pl>, która umożliwi obliczenie sygnału anomального dla dowolnego składu kryształu w szerokim zakresie długości fal [15, 14].

2.4 Dwie uwagi uzupełniające

Pierwsza uwaga ma charakter metodologiczny i dotyczy relacji między teoriami opisującymi ten sam zakres zjawisk. Jeżeli pojawia się nowa, bardziej ogólna teoria, to powinna być ona zgodna z teorią starą w zakresie jej stosowalności jak to się dzieje np. w przypadku mechaniki relatywistycznej i klasycznej. Dlatego w pracy **H2** nowo otrzymany wzór zastosowałem do przypadku kiedy mamy w strukturze tylko jeden typ atomów rozpraszających anomalnie i porównałem go z formułą (1). Okazało się, że obszarze stosowalności obu teorii ich wyniki są bardzo zbliżone, czego należało oczekiwać.² Jak się okaże ta ogólna zależność między teoriami może być bardzo pomocna w testowaniu słuszności nowych teorii, o czym wspominam w paragrafie 7 opisującym rozkłady prawdopodobieństwa par Bijvoeta.

Druga uwaga ma charakter historyczny. Kiedy postawiłem sobie pytanie o wielkość sygnału anomalnego dla dowolnego składu kryształu znałem jedynie formułę (1). W pracy [7] nie było, żadnych odnośników do prac wcześniejszych na ten temat. Dopiero po wielu latach natknąłem się na pracę Grochowskiego i Serdy [19] w której autorzy zajmują się podobnymi zagadnieniami, choć w bardziej ograniczonym zakresie, i powołują się na pracę Zachariasena z 1965 roku [20] w której to zagadnienie również się zdawkowo pojawia. Co ciekawe, ani Weiss *et al.* [8], ani Girard *et al.* [9], ani Flack i Shmueli [18] również nie powoływali się na te prace. Mamy tu do czynienia z wielokrotnym niezależnym podejściem do tego samego problemu, co czasami się zdarza w badaniach naukowych.

3 Wpływ długości fali, redundancji danych oraz źródła promieniowania na wielkość użytecznego sygnału anomalnego [H3,H2]

Proces określenia struktury makromolekularnej nie jest jeszcze tak zautomatyzowany jak rozwiązywanie struktury małowcząsteczkowej³. Nawet metoda podstawienia cząsteczkowego (MR) oparta na pojedynczym zbiorze danych dyfrakcyjnych wymaga często interwencji badacza. Tym bardziej dotyczy to metod wymagających przeprowadzenia dodatkowych eksperymentów dla różnych pochodnych izomorficznych (SIR, MIR), lub różnych długości fali (MAD). Metody oparte na pomiarach różnic anomalnych jak MAD i SAD wymagają bardzo dokładnych pomiarów i jest dość oczywiste, że w takich przypadkach preferowane są źródła synchrotronowe. Jednak postęp zarówno jeśli chodzi o źródła konwencjonalne i coraz doskonalsze detektory sprawia, że również w warunkach laboratoryjnych można wykonywać takie pomiary [21, 22]. W pracy **H3** głównym celem było określenie warunków umożliwiających lokalizację atomów słabo rozpraszających anomalnie dla lizozymu i apocrustacyaniny A₁. W odróżnieniu od wcześniejszych prac [23, 22, 24] podjęliśmy próbę wyznaczenia tych pozycji na podstawie pomiarów w temperaturze pokojowej. Wyższy po-

²Niestety ta oczywista zależność między teoriami nie jest powszechnie uświadamiana przez krystalografów, o czym mogłem się przekonać podczas dyskusji z autorami pracy [18] pisząc do niej swój komentarz w pracy **H8**.

³Przynajmniej było tak na przełomie roku 1999 i 2000 kiedy zetknąłem się z zagadnieniami krystalografii makromolekularnej

ziona sygnału anomalnego zwiększa szanse na rozwiązanie struktury. Jego wielkość zależy oczywiście nie tylko od składu kryształu, ale również od długości fali użytego promieniowania (poprzez czynniki f'' we wzorze 4). W pracy **H2**⁴ zaproponowaliśmy metodę rozwiązywania struktur makromolekularnych, będącą modyfikacją metod SIR i SAD z użyciem fali o większej długości w celu zwiększenia sygnału anomalnego.

3.1 Aspekty metodyczne

Precyzyjne wyznaczenie różnic Bijvoeta jest zawsze zadaniem wymagającym, a już szczególnie dla pomiarów w temperaturze pokojowej, ze względu na dodatkową absorpcję pochodzącą od materiału kapilary, w której umieszczony jest kryształ. W związku z tym redukcja danych dyfrakcyjnych powinna być przeprowadzona bardzo starannie. Szczególnie istotne w przedstawionych przykładach okazało się monitorowanie ilości odrzuconych refleksów na poszczególnych ramkach podczas redukcji danych (rys. 2). Również wybór oprogramowania do redukcji danych okazał się mieć znaczenie. W celu uzyskania najlepszego wyniku testowałem dwie alternatywne drogi redukcji danych z jednej strony za pomocą programów *DENZO* i *SCALEPACK* [25], a z drugiej za pomocą programów *MOSFLM* [26] i *SCALA* [27]. Po wielu przeprowadzonych testach okazało się, że pierwsza opcja jest korzystniejsza z dwu powodów. Po pierwsze, dane procesowane za pomocą programów *MOSFLM* i *SCALA* dają nieco niższe (ale wyraźnie zauważalne) odchylenia standardowe dla zmierzonych czynników struktury, co sztucznie poprawiało jakość danych. Po drugie, szczegółowa analiza średnich wartości różnic Bijvoeta w poszczególnych przedziałach rozdzielczości dla danych synchrotronowych i laboratoryjnych pokazała, że wartości te są bliższe zera (w idealnym przypadku powinny być równe zero) w przypadku pierwszej opcji. To spowodowało, że w dalszych próbach korzystałem już tylko z programów *DENZO* i *SCALEPACK*.

Drugim ważnym zagadnieniem było ustalenie rozdzielczości, dla której w danych dyfrakcyjnych istnieje użyteczna informacja o rozpraszaniu anomalnym. Zaproponowałem do tego użycie parametru N_{ref} ⁵ [**H3**], który wydaje się bardziej czuły niż $\langle |\Delta F| \rangle / \sigma_{\Delta F}$ i niezależnie od tego czy wielkości odchyżeń standardowych są przeszacowane czy niedoszacowane, to zmiany tego parametru pozwalają uchwycić dość dokładnie granicę, gdzie pojawia się sygnał anomalny (rys. 1 i 3).

W celu przetestowania wpływu długości fali, rodzaju źródła oraz redundancji na możliwość lokalizacji atomów wykazujących słabe rozpraszanie rezonansowe użyliśmy kryształów lizozymu (HEWL) oraz apocrustacyaniny A_1 (Apo A_1).

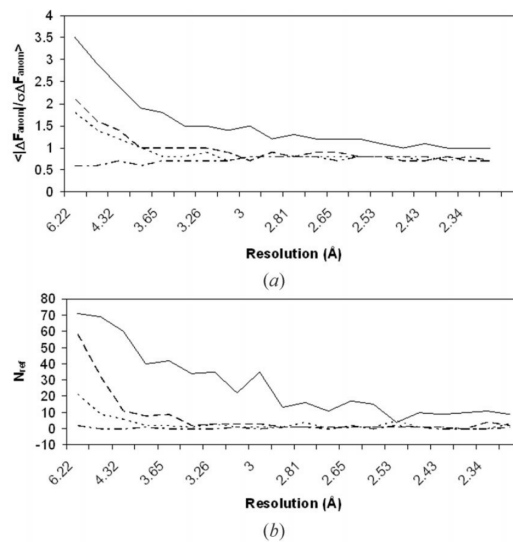
⁴Praca **H2** została wyróżniona przez edytora Crystallography Newsletter w numerze 3 z 2003 roku.

⁵ N_{ref} oznacza liczbę refleksów dla których $\langle |\Delta F| \rangle$ jest większe od $3\sigma_{\Delta F}$ w poszczególnych przedziałach rozdzielczości. Można ten parametr stosunkowo łatwo policzyć korzystając z programu *sftools* z pakietu CCP4 [27].

3.2 Przygotowanie danych dyfrakcyjnych i lokalizacja atomów siarki dla lizozymu (HEWL)

Dla HEWL zostały wykonane eksperymenty dyfrakcyjne dla czterech długości fali: 0,710 Å (MoK $_{\alpha}$) i 1,541 Å (CuK $_{\alpha}$) na dyfraktometrze Rigaku z detektorem powierzchniowym R-Axis IIc oraz 1,488 Å i 2,0 Å na synchrotronie SRS w Daresbury.

Na podstawie zachowania parametru N_{ref} w oceniałem dla jakiej rozdzielczości rozpraszanie rezonansowe staje się widoczne na tle statystycznych błędów pomiarowych. Dane ograniczone do odpowiedniej rozdzielczości (w tym wypadku około 3 Å) (rys. 1) stanowiły dane wejściowe dla programu *SnB* [28] służącego do rozwiązywania struktury metodą „shake and bake”. Działanie tego programu jest stosunkowo czasochłonne, ale w owym

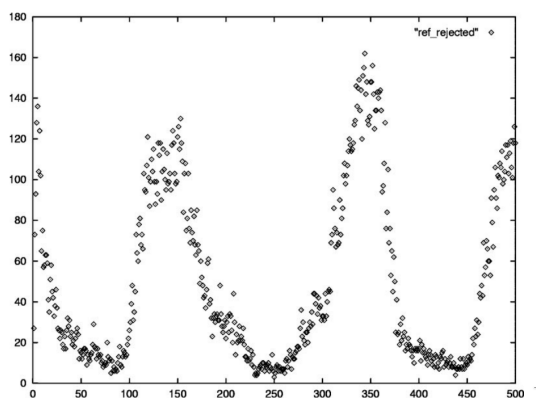


Rys. 1: Statystyka dla HEWL [Mo K $_{\alpha}$ (kropkowano-przerywana linia), Cu K $_{\alpha}$ (kropkowana linia), 1,488 Å synchrotron (przerywana linia) i 2,0 Å synchrotron (linia ciągła), 486 ramek]: $\Delta F / \sigma_{\Delta F}$ w funkcji rozdzielczości (a); N_{ref} w funkcji rozdzielczości (b).

czasie był to program dający bardzo dobre, a może nawet najlepsze rezultaty. Jak widać na rysunku 1 dla danych uzyskanych za pomocą lampy molibdenowej nie ma najmniejszego śladu rejestracji sygnału anomalnego. Dla danych CuK $_{\alpha}$ dopiero przy rozdzielczości około 4 Å pojawia się kilkanaście refleksów wychodzących ponad poziom tła, ale jest to zdecydowanie za mało, aby określić położenia atomów siarki. Nieco lepiej wygląda sytuacja dla danych synchrotronowych 1,488 Å, ale i tutaj rozdzielczość, przy której pojawia się sygnał anomalny jest bardzo niska (~ 4 Å). Wydaje się, że jedyny zbiór danych, który daje nadzieję na rozwiązanie to zbiór dla fali o długości 2 Å, dla którego pierwsze oznaki sygnału anomalnego występują przy rozdzielczości około 2,5 Å. Niestety nawet w tym przypadku przy standardowej procedurze redukcji danych dyfrakcyjnych nie udało się zlokalizować atomów siarki. Przy bliższym przyjrzeniu się procesowi skalowania ramek można było zaobserwować ciekawe zjawisko (rys. 2) polegające na okresowym wzroście liczby refleksów odrzuconych w zależności od kąta rotacji kryształu. Wykluczenie z procesu skalowania ramek wykazujących to anormalne zachowanie (kierując się wskaźnikami takimi jak χ^2 oraz

R_{merge}) zredukowało ich liczbę (ramek) z 943 do 486. Usunięcie prawie połowy ramek spowodowało wyeliminowanie błędów systematycznych i umożliwiło lokalizację atomów rozpraszających rezonansowo za pomocą programu *SnB*.

Pomimo stosunkowo wysokich wartości $\langle I/\sigma_I \rangle$ oraz wysokich redundancji dla wszystkich eksperymentów przy standardowej procedurze redukcji danych nie udało się w żadnym z czterech przypadków znaleźć pozycji atomów siarki.



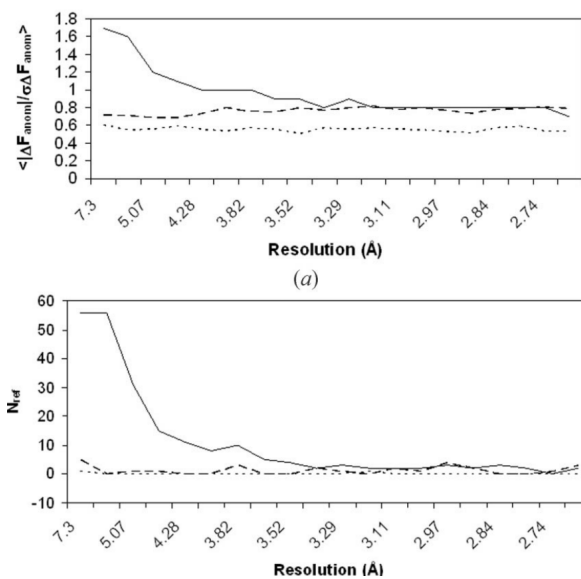
Rys. 2: Liczba refleksów odrzuconych dla lizozymu ($\lambda = 2.0\text{\AA}$) dla pierwszych 500 ramek. Daje się zauważyć wyraźne zachowanie okresowe co 180° . Średnia liczba odrzuconych refleksów wynosi około 70. Rzędna: number of rejected reflections odcięta: numer ramki.

Podsumowując, zlokalizowanie atomów siarki w eksperymencie przeprowadzonym w temperaturze pokojowej okazało się trudniejsze niż mogłoby się początkowo wydawać. Dopiero połączenie kilku warunków takich jak większa długość fali, wysoka redundancja danych, źródło synchrotronowe i staranna redukcja danych przyniosło sukces.

3.3 Przygotowanie danych dyfrakcyjnych i lokalizacja atomów siarki dla Apocrustacyaniny A_1

Trzy pomiary wykorzystane do określenia położenia atomów siarki pochodziły z wcześniej opublikowanych prac. Dane o niskiej redundancji i temperatury pokojowej dla długości fali $1,488\text{\AA}$ oraz $2,0\text{\AA}$ pochodziły z pracy [29]. Natomiast dane dla temperatury 100K i długości fali 2\AA pochodziły z pracy **H1**=[30]. Wykresy na rysunku 3 pokazują wyraźnie, że dla dwu pierwszych eksperymentów rozpraszanie rezonansowe jest zupełnie niewidoczne. Choć w przypadku trzeciego zbioru sygnał anomalny jest bardzo wyraźny, to wielokrotne użycie programu *SnB* dla danych uzyskanych ze standardowej redukcji również nie zakończyło się sukcesem. Dopiero zastosowanie procedury analogicznej do opisanej w poprzednim paragrafie dla HEWL spowodowało wykluczenie 233 ramek ze skalowania 644 zmierzonych. Tak uzyskane dane pozwoliły na zlokalizowanie atomów siarki.

Podsumowując oba przytoczone wyżej przypadki białek, HEWL i Apo A_1 , można stwierdzić, że dla struktur niewielkich takich jak lizozym (około 130 aminokwasów w części niezależnej) możliwe jest określenie pozycji atomów słabo rozpraszających anomalnie



Rys. 3: Statystyka dla apocrustacyaniny A_1 [1.488 Å synchrotron (kropkowana linia), 2.0 Å synchrotron dane o niskiej rozdzielczości (przerywana linia) i 2.0 Å dane o wysokiej redundancji (linia ciągła), 411 ramek]: $\Delta F / \sigma_{\Delta F}$ w funkcji rozdzielczości (a); N_{ref} w funkcji rozdzielczości (b).

takich jak atomy siarki nawet dla eksperymentu wykonanego w temperaturze pokojowej. Jednak w takim przypadku zastosowanie promieniowania konwencjonalnego (lampa z wirującą anodą) pomimo wysokiej redundancji danych może nie być wystarczające. Co więcej znacznie silniejsze promieniowanie synchrotronowe o zbliżonej długości fali 1,488 Å w porównaniu do źródeł konwencjonalnych CuK_α (1,54 Å) nie gwarantuje również sukcesu. Dopiero połączenie silnej wiązki promieniowania z falą o długości 2 Å i bardzo staranym procesem skalowania pozwoliło na lokalizację atomów rozpraszających anomalnie. W przypadku znacznie bardziej wymagającego białka jakim jest apocrustacyanina A_1 (około 360 aminokwasów w części niezależnej) dopiero połączenie kilku warunków pozwoliło osiągnąć sukces: i) większa długość fali, ii) niska temperatura pomiaru, iii) duża redundancja danych, iv) staranne ich skalowanie polegające na odrzuceniu ramek ze zbyt wysokim R_{merge} i χ^2 oraz v) odpowiedni dobór rozdzielczości (za pomocą parametru N_{ref}), przy której rozpraszanie rezonansowe zaczynało być widoczne na tle szumu.

3.4 Zastosowanie fali o większej długości – metoda S-SWAT [H2]

Koniec XX i początek XXI wieku to okres intensywnych poszukiwań najbardziej optymalnych, zautomatyzowanych technik do zastosowania w tzw. krytalografii wysokowydajnej (High-Throughput Crystallography) [31, 32, 33]. Praca **H2** wpisywała się w ten nurt badań.

Typowe promieniowanie stosowane w makromolekularnych badaniach rentgenograficznych ma długość fali 1,54 Å lub mniejszej (0,71 Å lub 0,97 Å w metodzie MAD) natomiast określenie miękkie promieniowanie rentgenowskie jest zarezerwowane dla fal o długo-

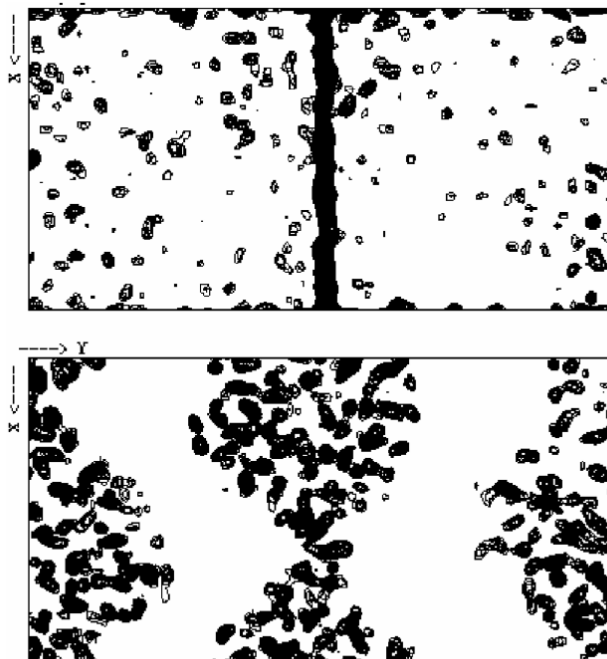
ści 5 Å lub więcej. Dla promieniowania o długości fali około 2 Å bardzo użytecznego z punktu widzenia rozpraszania rezonansowego można by użyć określenia *bardziej miękkie* (softer). W pracy **H2** zaproponowaliśmy pod nazwą S-SWAT (softer single-wavelength anomalous technique) modyfikację metody SAD, która może być alternatywą dla metod TW, MAD, MIR. W połączeniu z wykorzystaniem ksenonu, który wiąże się z białkiem za pomocą słabych oddziaływań van der Waalsa i nie wprowadza większych zmian do struktury krystalicznej może to być efektywną metodą wyznaczania faz.

Do sprawdzenia skuteczności działania tej metody wybrano kryształy apocrustacyaniny A_1 , które zostały umieszczone na godzinę w atmosferze ksenonu pod ciśnieniem 14 atm przy użyciu komory OxfordXcell, a następnie szybko zamrożone w strumieniu gazowego azotu o temperaturze 100K bez użycia krioprotektanta. Eksperyment dyfrakcyjny został wykonany na stacji 7.2 synchrotronu SRS w Daresbury z użyciem promieniowania o długości fali 2 Å. Zarejestrowano 187 ramek na detektorze image-plate MAR 345. Kąt oscylacji wynosił 1° a czas pomiaru jednej ramki 7 min. Dla długości fali 2 Å i odległości kryształ-detektor 109,4 mm dało się zarejestrować dane do rozdzielczości 2,3 Å.

W celu rozwiązania struktury przetestowano dwie alternatywne drogi. Jedna oparta na programach *SnB*, *MLPHARE*, *DM*, a druga na programach *SAPI*, *ABS*, *OASIS* i *DM*. W pierwszym przypadku za pomocą parametru N_{ref} określono rozdzielczość dla której występują użyteczne dane na około 2,5 Å i dane o tej rozdzielczości wprowadzono do programu *SnB* uzyskując współrzędne dla trzech atomów Xe. Na tej podstawie fazy znalezione przez program *MLPHARE* prowadziły do map gęstości elektronowej z dość zaskakującymi cechami (rys. 4), które są spowodowane najprawdopodobniej brakiem refleksów centrosymetrycznych, co jest immanentną cechą metod opartych na rozpraszaniu anomalnym. Jednakże po wykonaniu modyfikacji gęstości elektronowej programem *DM* rezultat okazał się bardzo dobry (FOM=0,7). Po uwzględnieniu symetrii niekrystalograficznej dimeru rezultat był tylko odrobinę lepszy (FOM=0,71).

Niemal identyczny rezultat został osiągnięty przy zastosowaniu alternatywnej drogi rozwiązania struktury. Mapy uzyskane w obu podejściach były dostatecznie dobre, aby rozpocząć manualne budowanie modelu, ale podejście automatyczne za pomocą programu *APR/wARP* niestety nie zakończyło się sukcesem – najprawdopodobniej z powodu niskiej rozdzielczości danych dyfrakcyjnych. Używając danych dla struktury natywnej zebranych na stacji 9.6 SRS [**H1**] rozszerzono za pomocą programu *DM* fazy do rozdzielczości 1,4 Å, co umożliwiło automatyczne zbudowanie modelu.

Podsumowując, metoda opisana w pracy **H2** jest atrakcyjną alternatywą dla metod TW, MIR oraz MAD, szczególnie kiedy oczekiwana jest wysoka wydajność (przepustowość). Pochodne ksenonowe mogą być otrzymane za pomocą komercyjnego sprzętu w relatywnie krótkim czasie (kilkadziesiąt minut) i są zwykle wysoko izomorficzne z kryształami białka natywnego ze względu na bardzo słabe oddziaływania z cząsteczką białka. Wysoki izomorfizm umożliwia łatwe rozszerzenie faz do wyższej rozdzielczości. Prawdopodobnie automatyczne określenie faz byłoby możliwe już dla rozdzielczości 1,8 Å, ale w przypadku omawianej pracy techniczne ograniczenia panujące na stacji 7.2 synchrotronu SRS uniemożliwiły osiągnięcie tej rozdzielczości.



Rys. 4: (górze) Przekrój mapy gęstości elektronowej o grubości 10 Å fazy [MLPHARE(Xe-anom)] z czynnikami struktury Fobs dla $z = 1/2$; (dół) ten sam przekrój po modyfikacji gęstości za pomocą DM. Gęstość elektronowa na poziomie $2.5\sigma \pm 0.5$ r.m.s.

4 Rozwiązanie struktur Apocrustacyaniny A_1 i β -D-ksylozydazy

Zebrane w poprzednim paragrafie różne doświadczenia dotyczące wykonywania eksperymentów dyfrakcyjnych, redukcji danych, określania położenia atomów rozpraszających anomalnie i znajdowania faz powstawały głównie przy próbie rozwiązania struktury Apo A_1 , kiedy dołączyłem do zespołu prof. Helliwella na Uniwersytecie w Manchesterze. Białko to okazało się dość odporne na podejmowane wcześniej próby rozwiązania jego struktury. Metody MR i MIR okazały się nieskuteczne [34, 10].

4.1 Apocrustacyanina A_1 [H1]

Zanim udało mi się rozwiązać strukturę tego białka z wykorzystaniem promieniowania o długości fali 2 Å oraz pochodnej z Xe [H1] przez dłuższy czas próbowałem niestandardowych metod — niestety również nieskutecznie. Jedną z nich polegała na samodzielnym (nie automatycznym) analizowaniu mapy Pattersona dla różnic Bijvoeta w poszukiwaniu śladów mostków dwusiarczkowych, których obecność była spodziewana w tej strukturze. Grupa przestrzenna $P2_12_12_1$ jest „bogata” w przekroje Harkera i jeśli taki mostek ujawniłby się, byłby widoczny w odpowiednich lokalizacjach na trzech wzajemnie prostopadłych przekrojach jednocześnie, co umożliwiłoby określenie jego współrzędnych. Układając odpowiednio wydruki tych przekrojów obok siebie można jednym rzutem oka rozpoznać obecność odpowiedniego maksimum. Takie mapy są dość czułe na ewentualne

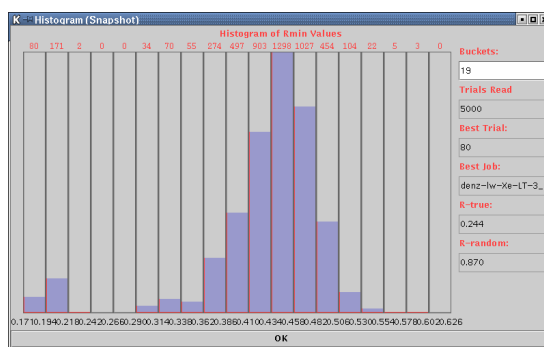


Rys. 5: Przykład rozdzielania atomów siarki mostka dwusiarczkowego przy przejściu z rozdzielczości 3 Å (lewo) do 2 Å (prawo). Symulacja dla danych idealnych z zerowym czynnikiem drgań termicznych.

systematyczne błędy pomiarowe, co zmusiło mnie do bardzo starannego doboru refleksów. W związku z tym przeprowadzałem wielokrotne redukcje danych dyfrakcyjnych w celu usunięcia refleksów obarczonych zbyt dużymi błędami systematycznymi. Te działania pozwoliły mi po pewnym czasie realistycznie ocenić obecność sygnały anomalnego w danych eksperymentalnych, który daje nadzieję na rozwiązanie struktury, co zostało opisane w paragrafie 3.1.

W celu rozwiązania struktury ApoA₁ wykonałem wspólnie z dr Rizkallahem cztery pomiary na kilku stacjach synchrotronu SRS w Daresbury. Pierwszy pomiar struktury natywnej z użyciem fali $\lambda = 2,045 \text{ \AA}$, drugi w tych samych warunkach dla pochodnej ksenonowej, trzeci — zbiór o wysokiej redundancji — dla białka natywnego (stacja 9.5, $\lambda = 2,0 \text{ \AA}$) dla otrzymania jak nasilniejszego sygnału od atomów siarki i czwarty wysokorozdzielczy na stacji 9.6 ($\lambda = 0,87 \text{ \AA}$) również dla białka natywnego.

Lokalizacja atomów ksenonu z użyciem różnic Bijvoeta dała lepsze rezultaty niż z użyciem różnic izomorficznych dla pomiarów przeprowadzonych na stacji 7.2. Wyraźny bimodalny kształt histogramu tzw. funkcji minimalnej (rys. 6) wskazywał na otrzymanie prawidłowego rozwiązania. Były to współrzędne trzech atomów Xe. Zostały one użyte



Rys. 6: Histogram funkcji minimalnej dla Apocrustacyanina A₁.

w połączeniu z danymi natywnymi do znalezienia faz za pomocą programu *MLPHARE* (metoda SIRAS). Na tym etapie trudno było ocenić prawidłowość wyboru właściwej chiralności, więc podobne obliczenia zostały wykonane dla odwróconego układu atomów ksenonu i prawidłowa chiralność została potwierdzona z użyciem danych o wysokiej redundancji dla struktury natywnej. Po zlokalizowaniu czwartego atomu Xe i atomów siarki na mapie anomalnego rozpraszania określiłem parametry niekrystalograficznej osi dwukrotnej, co pozwoliło mi uzyskać jeszcze lepsze fazy i po wykonaniu modyfikacji gęstości (*DM*) FOM osiągnął wartość 0,76 dla rozdzielczości 2,3 Å. Przykładowe mapy anomal-



Rys. 7: Przykładowa gęstość elektronowa dla mostków dwusiarczkowych obliczona dla różnic Bijvoeta i faz po modyfikacji gęstości za pomocą *DM*.

nej gęstości elektronowej dla tej rozdzielczości pokazuje rysunek 7. Rozszerzenie faz do rozdzielczości $1,35 \text{ \AA}$ umożliwiło automatyczne zbudowanie łańcucha głównego za pomocą programu *APR/wARP*. W tym samym czasie zespół pracujący na synchrotronie ESRF w Grenoble dysponując znacznie silniejszą wiązką promieniowania określił strukturę apocru-stacyaniny C_1 , białka o bardzo podobnej sekwencji aminokwasowej korzystając również z rozpraszania rezonansowego. Obie prace ukazały się w tym samym numerze *Acta Crystallographica* [30, 35].

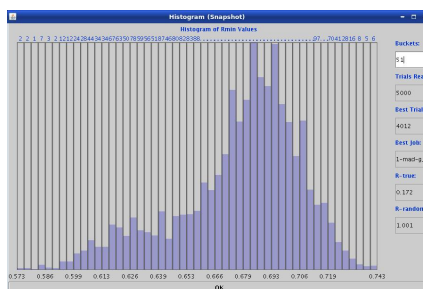
Rozwiązanie struktury ApoA₁ ciekawe samo w sobie miało również ważne konsekwencje, gdyż pozwoliło na rozwiązanie struktury β -crystacyaniny z przyłączonymi cząsteczkami astaksantyny, czyli w formie jakiej to białko występuje w naturze [36]. To z kolei w dużej mierze przyczyniło się do wyjaśnienia mechanizmu efektu batochromowego [37], który obserwuje się dla cząsteczek astaksantyny.⁶

4.2 Rozwiązanie struktury β -D-ksylozydazy [H6]

Znając moje zainteresowania rozpraszaniem anomalnym w roku 2004 dr Wawrzak z Northwestern Synchrotron Research Center – LS CAT w Chicago zaproponował mi współpracę, w ramach której podjąłem się rozwiązania struktury białka β -D-ksylozydazy/ α -L-arabinofuranozydazy (SXA) pochodzącej z beztlenowej bakterii *Selenomonas ruminantium* obecnej w przewodzie pokarmowym przeżuwaczy. Białko to składające się 538 aminokwasów w jednym łańcuchu jest najsilniejszym katalizatorem hydrolizy 1,4- β -D-ksylooligosacharydów do D-ksylozy. Poznanie jego struktury mogłoby przyczynić się do zrozumienia mechanizmu jego działania. Ze względu na rozmiar tego białka (4×538 aminokwasów) jego rozwiązanie było dość dużym wyzwaniem.

Eksperyment dyfrakcyjny dla białka natywnego oraz eksperyment typu MAD dla pochodnej selenometioninowej został wykonany na stacji 5 ID-B na synchrotronie APS w Argonne przez dr Z. Wawrzaka. Po przeanalizowaniu danych dyfrakcyjnych zebranych do

⁶Popularne omówienia pracy [36] ukazały w magazynie *Physics Today* **55**, v. 11, p. 22 (2002) <https://physicstoday.scitation.org/doi/10.1063/1.1534998> i serwisie naukowym BBC: <http://news.bbc.co.uk/2/hi/science/nature/2158940.stm>



Rys. 8: Histogram funkcji minimalnej dla ksylozydazy.

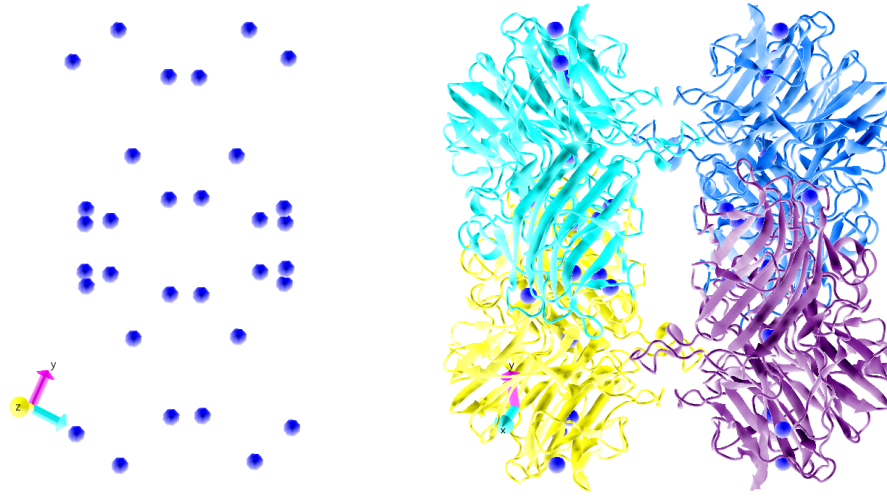
rozdzielczości $1,8\text{ \AA}$ i wybraniu zbioru o najwyższym sygnale anomalnym oraz stosując parametr N_{ref} ograniczyłem rozdzielczość do $2,5\text{ \AA}$. Takie dane posłużyły jako dane wejściowe dla programu *SnB*. Wyraźne maksimum poboczne dla na histogramie funkcji minimalnej (rys. 8) wskazywało na uzyskanie prawidłowego rozwiązania. W rezultacie otrzymałem pozycje 28 atomów selenu. Te pozycje posłużyły do znalezienia wstępnych faz za pomocą programu *MLPHARE* (FOM=0,30), które zostały zmodyfikowane za pomocą *DM*. Z kolei otrzymane fazy w połączeniu z danymi anomalnymi posłużyły do sporządzenia map, na których udało mi się zidentyfikować 4 dodatkowe atomy selenu. W układzie 32 atomów selenu za pomocą programu *FINDNCS* określiłem położenie i orientację trzech wzajemnie prostopadłych osi dwukrotnych opisujących niekrytalograficzną symetrię tego białka. Badane białko okazało się więc tetramerem o symetrii punktowej 222 (rys. 9). Wykorzystałem następnie tę symetrię w procesie modyfikacji gęstości, co doprowadziło do znacznej poprawy jakości mapy (FOM=0.65). Na mapie wizualnie zidentyfikowałem obszary gęstości charakterystyczne dla tryptofanu i za pomocą programu *XtalView/Xfit* zbudowałem model całego tetrameru oraz wstępnie udokładniłem na danych $1,8\text{ \AA}$ za pomocą programu *REFMAC*.

Po udokładnieniu struktury z rozdzielczością $1,3\text{ \AA}$ przez dr J. Brunzelle okazało się, że do białka przyłączony jest 1,3-bis[tris(hydroxymetyl)metylamino]propane, co pozwoliło na zbadanie strukturalnych uwarunkowań przyłączenia tego inhibitora do miejsca wiążącego.

5 Poziom sygnału anomalnego względem szumu w eksperymentach dyfrakcyjnych opartych na metodzie SAD [H9]

Spośród wszystkich metod określania faz refleksów w eksperymentach dyfrakcyjnych metoda SAD jest najbardziej wymagająca jeśli chodzi o dokładność pomiarów [38]. Wielkością, która dobrze opisuje poziom rozpraszania anomalnego w kontekście dokładności z jaką wykonywane są pomiary jest stosunek $\left\langle \frac{|\Delta I_{\text{exp}}|}{\sigma_{\Delta I}} \right\rangle$, który będę oznaczał jako α , lub stosunek $\left\langle \frac{|\Delta F_{\text{exp}}|}{\sigma_{\Delta F}} \right\rangle$, który będę oznaczał jako a . Co ciekawe jak wykazałem w pracy H9 oba te parametry są tożsame tzn. $\alpha = a$.

Sygnał anomalny zdefiniowany w rozdziale 2, nazywany czasami ilorazem Bijvoeta, opisuje wielkość różnic Bijvoeta wynikających wyłącznie z rozpraszania anomalnego w



Rys. 9: (lewo): 32 atomy selenu znalezione z wykorzystaniem rozpraszania rezonansowego; (prawo): struktura tetrameru β -D-ksylozydazy składająca się z 2152 aminokwasów.

stosunku do intensywności. Parametry α i a opisują wielkość zmierzonych różnic w stosunku do niepewności pomiarowych. Ciekawym wydaje się pytanie jak duży musi być parametr α , aby dało się określić pozycje atomów rozpraszających anomalnie albo znaleźć fazy refleksów metodą SAD? W pracy **H9** przeanalizowaliśmy pod tym kątem 115 przypadków struktur wyznaczonych metodą SAD. Problem polegał jednak na tym, że na ogół w raportach z rozwiązania struktury nie pojawia się taki parametr jak α , czy a , często natomiast pojawia się $\langle \frac{I}{\sigma_I} \rangle$. Aby więc określić wartość α należało znaleźć zależność między parametrem α lub a a $\langle \frac{I}{\sigma_I} \rangle$. W pracy [39] pojawia się taka zależność:

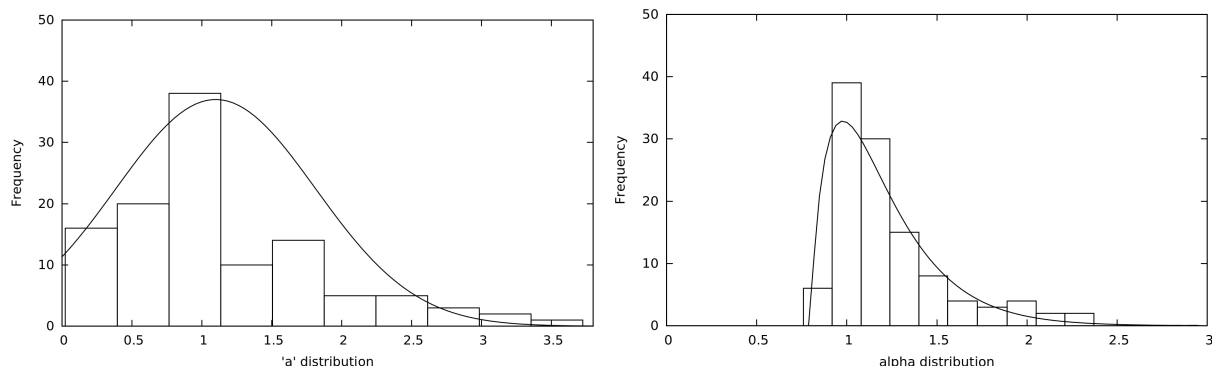
$$\left\langle \frac{I}{\sigma_I} \right\rangle = \frac{\sqrt{2}}{2} \frac{a}{\Delta_{anom}}$$

Niestety opiera się ona na tak daleko idących przybliżeniach, że w kontekście odtworzenia parametru a jej zastosowanie prowadziłoby do absurdu. Wynika z niej bowiem, że dla odpowiednio małych wartości $\langle \frac{I}{\sigma_I} \rangle$ wartości $\langle \frac{|\Delta F_{exp}|}{\sigma_{\Delta F}} \rangle$ stają się dowolnie bliskie zera. I rzeczywiście, próba obliczenia parametru a z danych eksperymentalnych na podstawie powyższego wzoru prowadzi do dość absurdalnego wniosku, że udało się rozwiązać metodą SAD wiele struktur dla których $\langle \frac{|\Delta F_{exp}|}{\sigma_{\Delta F}} \rangle$ jest znacznie mniejsze od $\sigma_{\Delta F}$ i bliskie zera (lewy wykres na rys. 10). Jest to oczywiście niemożliwe, ponieważ w każdym eksperymencie występują przypadkowe niepewności pomiarowe, które powodują, że parametr ten nie może zejść poniżej pewnej granicy. W związku z tym potrzebna jest dokładniejsza relacja wiążąca powyższe parametry, która uwzględnia niepewności pomiarowe. Taką relację wyprowadziłem w pracy **H9**, a jej postać jest następująca:

$$\left\langle \frac{I}{\sigma_I} \right\rangle = \frac{2\sqrt{2}}{\pi} \sqrt{\alpha^2 - \frac{2}{\pi}} \quad (11)$$

Pozwala ona na wiarygodną ocenę wielkości parametru $\langle \frac{|\Delta I_{exp}|}{\sigma_{\Delta I}} \rangle$ na podstawie wielkości $\langle \frac{I}{\sigma_I} \rangle$ oraz parametru Δ_{anom} , który można obliczyć ze wzoru (4) na podstawie znajomości

składu badanej czasteczki.⁷ Histogram pokazujący jak rozkłada się parametr α wśród zbadanych przypadków jest przedstawiony na prawej części rysunku 10.



Rys. 10: Rozkład prawdopodobieństwa dla: (lewo) a obliczonych na podstawie formuły przedstawionej w pracy [39]; (prawo) α obliczonych na podstawie formuły (11) dla wszystkich 115 dostępnych natywnych zbiorów danych typu SAD zawartych w PDB.

Wartość średnia parametru α dla wszystkich 115 uwzględnionych przypadków wynosi 1,2. Jak się okazuje ta stosunkowo niska wartość umożliwia w wielu przypadkach rozwiązanie struktury metodą SAD. Oczywiście trudno powiedzieć, czy zapewnia rozwiązanie struktury, bo do takiego wniosku trzeba by mieć również informacje na temat nieudanych prób rozwiązania. Co ciekawe wartość tej średniej nie zależy od symetrii badanych struktur (tab. 1). Tym niemniej biorąc pod uwagę fakt, że również struktury dla których ten

Tabela 1: Average values of parameter a and α determined from all the seven crystal systems.

Subset	a	α
All (115)	1.2 ± 0.7	1.2 ± 0.3
Triclinic (1)	n/a	n/a
Monoclinic (14)	1.1 ± 0.7	1.2 ± 0.4
Orthorhombic (38)	1.1 ± 0.6	1.1 ± 0.3
Trigonal (15)	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.2
Tetragonal (27)	1.3 ± 0.9	1.2 ± 0.4
Cubic (5)	1.2 ± 0.7	1.2 ± 0.3
Hexagonal (15)	1.5 ± 0.8	1.3 ± 0.4

parametr przyjmuje mniejszą wartość udaje się rozwiązać można chyba dość bezpiecznie założyć, że wartość w dużej mierze gwarantuje rozwiązanie struktury. Żeby taką wartość ($\alpha = 1, 2$) w nowo planowanym eksperymencie osiągnąć, to zgodnie ze wzorem (11) eksperyment należy zaplanować w ten sposób aby wartość $\langle \frac{I}{\sigma_I} \rangle$ wyniosła:

$$\left\langle \frac{I}{\sigma_I} \right\rangle = \frac{72}{\Delta_{anom}} \quad (12)$$

⁷Można do obliczenia parametru Δ_{anom} wykorzystać program <http://assc.p.lodz.pl> napisany przeze mnie i L. Sieronia [15]

jeśli Δ_{anom} wyrazimy w procentach. Ta prosta relacja pozwala więc zaplanować eksperyment tak, aby mieć niemal pewność sukcesu w rozwiązaniu struktury.

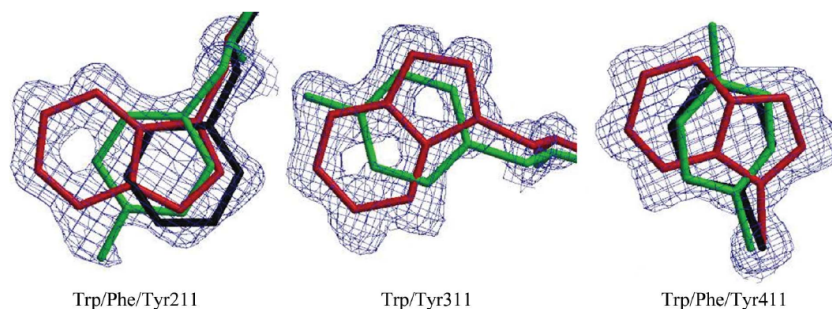
6 Wykorzystanie rozpraszania rezonansowego do wyznaczenia pozycji i obsadzeń jonów w strukturach kompleksów gramicydyny D [H4,H5,H7]

Jeżeli chodzi o ustalenie właściwej chiralności to dla struktur białkowych jest to problem marginalny, gdyż często występujące prawoskrętne helisy dają się jednoznacznie zidentyfikować nawet przy średnich rozdzielczościach pomiaru. Przy wysokich rozdzielczościach sytuacja jest jeszcze bardziej jasna, gdyż białka naturalne składają się z *L*-aminokwasów. Gramicydyna, która jest naturalnym antybiotykiem formującym kanały w błonach komórkowych jest jednak odmienna pod tym względem gdyż — choć jest peptydem naturalnym — jest zbudowana naprzemiennie z aminokwasów typu *L* i typu *D*. To powoduje, że postać liniowa tego peptydu charakteryzuje się różnorodnością struktur przestrzennych w zależności od otoczenia (rozpuszczalnika, błony itp.), w którym występuje. Najczęściej przyjmuje formę helisy, ale helisa ta może być zarówno jednoniciowa jak i dwuniciowa, lewoskrętna bądź prawoskrętna, wąska lub szeroka.

Pierwsza struktura krystaliczna gramicydyny w kompleksie z CsCl została opublikowana w 1988 przez Wallace i Ravikumara jako lewoskrętna, dwuniciowa antyrównoległa β -helisa [40]. Wokół tej struktury pojawiło się jednak wiele kontrowersji [41]. Okazało się, bowiem, że dane dyfrakcyjne uzyskane dla kryształów o niemal identycznych stałych sieciowych prowadzą do struktur prawoskrętnych. Ponadto pierwsze, lewoskrętne struktury charakteryzowały się szeregiem nieprawidłowości strukturalnych. Pojawiła się więc konieczność dokładniejszego zbadania opartego na danych synchrotronowych o wysokiej rozdzielczości.

W Buffalo uzyskano kryształy gramicydyny D w kompleksach z RbCl, NaI, KI oraz CsCl. Eksperymenty dyfrakcyjne zostały wykonane na stacji 5 ID na synchrotronie APS w Argonne przez dr Z. Wawrzaka. Poszczególne kryształy zostały zmierzone dla fal o długościach: $\lambda = 0,71 \text{ \AA}$ dla RbCl, $\lambda = 0,67 \text{ \AA}$ dla KI oraz $\lambda = 0,918 \text{ \AA}$ dla NaI. Dla kompleksu z RbCl uzyskano dane o rozdzielczości $1,14 \text{ \AA}$, z KI – $0,8 \text{ \AA}$, a dla NaI – $1,25 \text{ \AA}$. Redukcję danych przeprowadziłem za pomocą programów *DENZO* i *SCALEPACK*. Do udokładniania za pomocą programu *SHELXL* [42] przyjęto model prawoskrętnej gramicydyny z pracy [41].

Wysoka rozdzielczość (jak dla struktury o tych rozmiarach) i dobra jakość danych umożliwiła na przybliżone ustalenie proporcji różnych odmian gramicydyny: A, B i C różniących się resztą aminokwasową w pozycji jedenastej (rys. 11). Ponadto możliwe było udokładnienie reszt nieuporządkowanych. Największe wyzwanie stanowiło jednak udokładnienie wnętrza kanału gramicydynowego. Mapa różnicowej gęstości tego wnętrza nie zawierała wyraźnych maksimum gęstości tylko gęstość rozmytą wzdłuż całej długości kanału. Dlatego do lokalizacji jonów K^+ , Na^+ oraz Rb^+ , aby odróżnić je od cząsteczek wody użyłem map rozpraszania anomalnego opartych na różnicach Bijvoeta i fazach obliczonych pomniejszych o 90° . W wypadku jonów Rb^+ mapy te wskazywały wyraźnie



Rys. 11: Gęstość elektronowa dla udokładnionego fragmentu (pozycja 11) pokazującego współlistnienie gramicydyny typu A, B i C w strukturze kompleksu gramicydyny D z KI.

miejsca kationów rubidu. W przypadku kompleksu KI jedynie dwa z kationów K^+ były widoczne na mapie anomalnego rozpraszania, a w przypadku kompleksu z NaI widoczne były jedynie aniony I^- . Tak więc szczególnie struktury z KI i NaI wymagały bardzo starannego udokładniania i wypróbowywania wielu wariantów w miejscach, które mogły być jednocześnie zajmowane przez kationy i cząsteczki wody. Wykonanie dodatkowych pomiarów dla większych długości fal ($1,466 \text{ \AA}$ i $1,77 \text{ \AA}$) dla kompleksu gramicydyny z KI nie przyniosło dodatkowy informacji o położeniu kationów potasu. Wynika to najprawdopodobniej z dominującej roli jodu w rozpraszaniu anomalnym, które wzrasta wraz z długością fali w podobnym tempie do wkładu pochodzącego od potasu.

Parametr Flacka, x , stosowany w krystalografii małowcząsteczkowej do określania struktury absolutnej może być wykorzystany w krystalografii makromolekularnej jako swoiste narzędzie diagnostyczne. Jego wartość odbiegająca znacząco od zera może być wskaźnikiem problemów z prawidłowym obsadzeniem atomów rozpraszających rezonansowo. Taka sytuacja przydarzyła się w jeszcze nie opublikowanej strukturze kompleksu gramicydyny z CsCl, gdzie parametr Flacka $x = 0,25(3)$. Jak wykazałem w pracy **H5**=[16] dodatni parametr x może wskazywać na zbyt wysokie obsadzenie atomów rozpraszających anomalnie, a wartość ujemna na zbyt niskie.

W pracy **H7** za pomocą analizy sygnału anomalnego wskazano również na niekonsekwencje w strukturze lewoskrętnej gramicydyny D w kompleksie z CsCl [43]. Autorzy tej pracy podczas udokładniania znacznie przeszacowali obsadzenia kationów cezu, o czym świadczył wysoki poziom sygnału anomalnego obliczonego na podstawie składu w udokładnionej strukturze, znacznie przewyższający wartość zmierzoną w eksperymencie. Jest to jeszcze jeden argument za tym, że struktura ta powinna być w rzeczywistości udokładniona jako struktura prawoskrętna. Okazuje się, że możliwą przyczyną nieprawidłowego oznaczenia chiralności może być prozaiczny błąd polegający na zamianie indeksów (hkl) z indeksami ($\bar{h}\bar{k}\bar{l}$). Taka zamiana prowadzi do tego, że właściwa gęstość elektronowa pojawia się na ujemnej części mapy gęstości elektronowej. W przypadku gdy układ centrów anomalnego rozpraszania jest centrosymetryczny (a tak było w opisaney pracy), to zarówno dodatnia jak i ujemna część map gęstości elektronowej jest interpretowalna [44].

Różnica między tymi częściami jest tylko taka, że wykazują przeciwną chiralność.

7 Rozkłady statystyczne różnic Bijvoeta [H8]

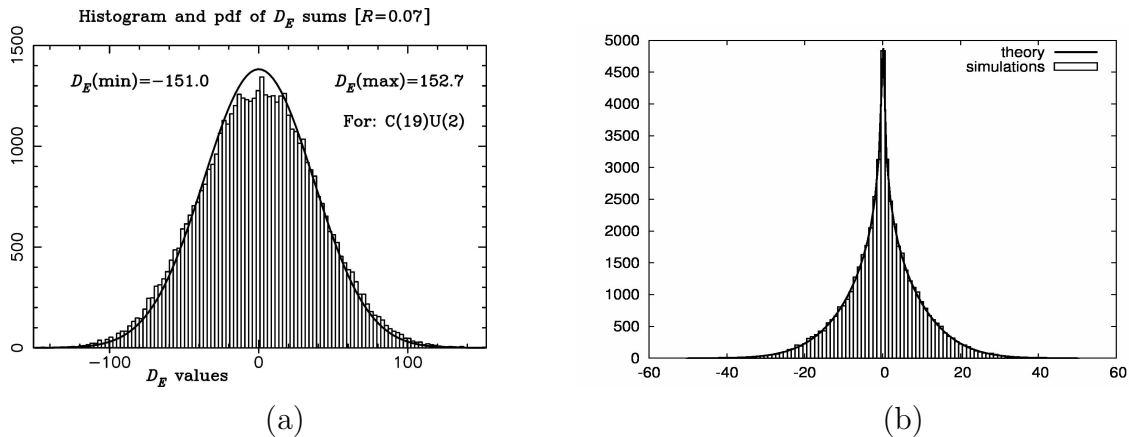
Wyniki swoich badań dotyczących rozkładów prawdopodobieństwa różnic Bijvoeta oraz symulacji tych różnic dla różnych symetrii i składów kryształu prezentowałem na Konwersatorium Krystalograficznym we Wrocławiu [14, 15, 45, 46, 47]. W tej dziedzinie bardzo wiele zostało zrobione przez Parthasarathy’ego i Srinivasana [48]. Swoje rozważania prowadzili oni przy założeniu, że kryształy składają się z dwu rodzajów atomów: jedno z nich wykazuje rozpraszanie rezonansowe, drugie – nie. Niektóre z ich wyników udało mi się uogólnić na przypadek, kiedy oba rodzaje atomów występujących w strukturze wykazują rozpraszanie anomalne [H8]. W podobny sposób można uogólnić większość ich wyników. Był to oczywiście pewien postęp, ale do całkowicie ogólnego sformułowania, czyli kryształu o dowolnym składzie droga jest dość odległa. Dlatego z dużym zainteresowaniem przystąpiłem do lektury pracy H. Flacka i U. Shmuelego [18], w której abstrakcie pojawił się następujący fragment:

„Probability density functions (hereafter p.d.f.s) of these series were then derived by the Fourier method (...) and their expressions, which admit any chemical composition of the unit-cell contents, were obtained for the space group P1.”

Uzyskanie rozkładu prawdopodobieństwa dla dowolnego składu chemicznego wydawało się sporym osiągnięciem. Okazało się niestety, że wszystkie rozważania prowadzące do rzeczonych funkcji rozkładu oparte są na fałszywym założeniu, co wykazałem w pracy H8.

Flack i Shmueli założyli że zmienne losowe \mathbf{R}_{jk} , które zdefiniowane są poprzez równość $\mathbf{R}_{jk} = \mathbf{r}_j - \mathbf{r}_k$ są od siebie statystycznie niezależne, co w konsekwencji prowadzi również do niezależności zmiennych $\sin(2\pi\mathbf{H}\cdot\mathbf{R}_{jk})$ występujących we wzorze (7) jak również do niezależności funkcji $\cos(2\pi\mathbf{H}\cdot\mathbf{R}_{jk})$. Prawdopodobnie autorów pracy zmylił fakt, że powyższe funkcje są *nieskorelowane* dla dowolnych j i k . Jednak z faktu braku korelacji nie wynika statystyczna niezależność tych zmiennych losowych. W konsekwencji nieuprawnione jest przejście z formuły (23) do formuły (24) w pracy [18] i otrzymane w ten sposób rozkłady są pozbawione sensu fizycznego. Autorzy obliczyli funkcję rozkładu dla hipotetycznej struktury U_2C_{19} i dla potwierdzenia teoretycznie otrzymanych rozkładów wykonali również symulacje komputerowe. One niestety również były oparte na tym samym, błędnym założeniu i w efekcie oba podejścia dały dość zgodne rezultaty (rys. 12a). Prawidłowa funkcja rozkładu oraz symulacja oparte na założeniu, że położenia atomów (a nie ich różnice) w komórce elementarnej są opisane niezależnymi zmiennymi losowymi o rozkładzie jednostajnym są przedstawione na rysunku 12b.

W związku z moją krytyką pracy [18] warto zwrócić uwagę na dwa ciekawe zagadnienia metodologiczne. Pierwsze dotyczy relacji między teoriami, drugie dotyczy matematycznej spójności przyjmowanych założeń.



Rys. 12: (lewo) histogram obliczony na podstawie błędnego założenia z pracy [18] ($5 \cdot 10^4$ symulacji); (prawo) histogram obliczony na podstawie prawidłowych założeń przedstawionych w pracy **H8** (taka sama liczba symulacji).

Jeśli chodzi o pierwsze zagadnienie, to nowa bardziej ogólna teoria powinna odtwarzać rezultaty teorii wcześniejszej w zakresie jej stosowalności. Jako przykład można podać znany wszystkim fakt, że mechanika relatywistyczna daje takie same rezultaty jak mechanika klasyczna, kiedy prędkości obiektów opisywanych są małe w porównaniu z prędkością światła. Podobnie wygląda sytuacja w odniesieniu do teorii Shmueliego-Flacka, która jest ogólna (dowolny skład chemiczny) i teorii Parthasarthiego-Srinivasana (tylko dwa typy atomów). Shmueli i Flack jako testowy model przyjęli strukturę dwuskładnikową U_2C_{19} , czyli taką jaką powinna być również prawidłowo opisana przez starą teorię. Stara teoria daje rezultaty podobne do przedstawionych na rysunku 12b. Gdyby autorzy uswiadamiali sobie, że taka relacja między teoriami musi zachodzić mogliby od razu dostrzec niespójność swojej teorii (rys. 12).

Co do drugiego zagadnienia, to w odpowiedzi na moja krytykę, że zmienne \mathbf{R}_{jk} nie mają fizycznego sensu, autorzy stwierdzili, że przyjęte przez nich założenie jest przybliżeniem i wymaga weryfikacji. Ponadto bez czynienia takich założeń nie byłoby możliwy postęp w badaniach naukowych. Dodatkowo stwierdzili, że

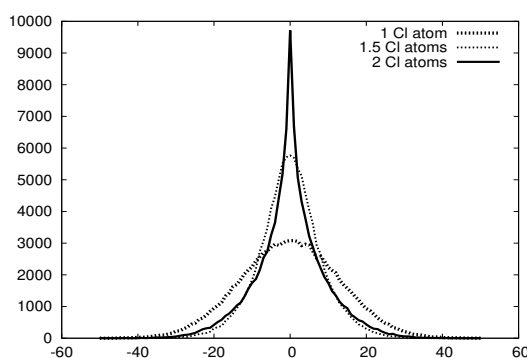
“... a p.d.f. is physically meaningful if it agrees with a distribution related to experimental data...”

Każde z powyższych stwierdzeń jest niestety błędne, ponieważ przyjęte założenie (statystyczna niezależność zmiennych \mathbf{R}_{jk}) jest wewnątrznie sprzeczne, tzn. prowadzi do rezultatów logicznie fałszywych jak np. taki, że kwadrat modułu czynnika struktury jest ujemny ($|F|^2 < 0$).⁸ To tak jakby przyjąć, że $1=0$ i sprawdzać czy przy takim założeniu można otrzymać zgodne z doświadczeniem wyniki. Matematycznie rzecz ujmując jeżeli założenie prowadzi do sprzeczności tzn. że jest fałszywe, a przez to nieakceptowalne.

⁸Nie ma tu mowy oczywiście o danych eksperymentalnych, w których na skutek przypadkowych niepewności pomiarowych może pojawić się fluktuacja np. tła, która spowoduje, że zmierzone natężenie może być mniejsze od zera.

Te rozważania pokazują jak istotne jest nadawanie właściwej interpretacji fizycznej uzyskanym wynikom. Opis matematyczny to jedno, a interpretacja fizyczna to drugie. To że autorzy nie przywiązywali do tego wagi świadczy fakt, że aby otrzymać rozkład dla kwadratu czynnika struktury (oznaczany jako A_E w ich pracy) otrzymawszy wyniki ujemne wzięli po prostu wartość bezwzględną bez żadnego wyjaśnienia dlaczego ta wartość jest ujemna.

W pracy **H8** podałem również rezultaty prawidłowo przeprowadzonych symulacji rozkładu prawdopodobieństwa różnic Bijvoeta dla struktury o składzie $C_{15}H_{23}NO_2$ z dodatkowym atomem/atomami chloru dla fali o długości $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$.



Rys. 13: Histogramy różnic Bijvoeta dla związku o składzie $C_{15}H_{23}NO_2$ (promieniowanie CuK_{α}) (10^5 symulacji) zawierającego dodatkowo 2 atomy Cl (gruba linia ciągła), jeden atom Cl (gruba linia kropkowana), 1,5 atomu Cl (cienka linia kropkowana).

Na rysunku 13 widać, jak kształt rozkładu zmienia się wraz ze składem kryształu. Dla pojedynczego atomu chloru wykazującego znaczące rozpraszanie anomalne rozkład jest zawsze zbliżony do gausowskiego natomiast dla dwu lub więcej takich atomów powoduje znaczne „wyostrenie” tego rozkładu. Stwarza to możliwość rozróżnienia tych sytuacji jeszcze przed rozwiązaniem struktury, tzn. na podstawie kształtu rozkładu przynajmniej teoretycznie jeszcze przed rozwiązaniem struktury istnieje możliwość stwierdzenia czy w komórce elementarnej jest jeden, czy więcej atomów rozpraszających rezonansowo.

8 Podsumowanie

Rozpraszanie rezonansowe odgrywało i wciąż odgrywa dużą rolę w rentgenografii strukturalnej. Z jednej strony znajduje zastosowanie praktyczne w rozwiązywaniu struktur makromolekularnych lub wyznaczaniu konfiguracji absolutnej cząsteczek, a z drugiej strony istnieje jeszcze wiele otwartych problemów teoretycznych czekających na rozwiązanie, jak choćby ogólna postać rozkładu prawdopodobieństwa różnic Bijvoeta dla dowolnego składu kryształu i jego zależność od symetrii. W swoich badaniach opisanych w przedstawionym autoreferacie skupiłem się na niektórych własnościach statystycznych różnic Bijvoeta oraz wykorzystaniu rozpraszania rezonansowego do badań strukturalnych.

- W rozdziale 2 przedstawiłem wyprowadzenie (w całości mojego autorstwa) formuły matematycznej określającej wielkość sygnału anomального dla dowolnego składu

kryształu. Taki sam rezultat został niezależnie, nieco później opublikowany przez Shmueliego i Flacka.

- W rozdziale 3 opisałem opracowane przeze mnie procedury redukcji danych dyfrakcyjnych i odpowiedniego doboru refleksów umożliwiające wydobycie użytecznego sygnału anomalnego z szumu jaki zawsze towarzyszy realnym pomiarom. Prace **H2** i **H3** będące podstawą tego rozdziału wpisywały się w nurt poszukiwań efektywnych procedur dla potrzeb tzw. High-Throughput Crystallography.
- W rozdziale 4 przedstawiłem rozwiązanie dwu struktur makromolekularnych, oparte na wykorzystaniu rozpraszania rezonansowego i metod opisanych w rozdziale 3.
- W rozdziale 5 określiłem wraz dr Cianci rozkład statystyczny dla parametru $\langle |\Delta I_{exp}|/\sigma_{\Delta I} \rangle$ dla 115 struktur określonych metodą SAD, który pokazuje, że przy współczesnym oprogramowaniu służącym do rozwiązywania struktur nawet dane pomiarowe, dla których sygnał anomalny niewiele wykracza ponad tło może prowadzić do sukcesu. Aby taka analiza była możliwa do wykonania wyprowadziłem formułę (wyprowadzenie jest w całości mojego autostwa) wiążącą ze sobą trzy wielkości Δ_{anom} , $\langle I/\sigma_I \rangle$ oraz $\langle |\Delta I_{exp}|/\sigma_{\Delta I} \rangle$. Wartość średnia $\langle |\Delta I_{exp}|/\sigma_{\Delta I} \rangle$ dla zbadanych struktur wynosi 1,2. Na tej podstawie zaproponowaliśmy prostą regułę w postaci wzoru (12), której spełnienie przez dane pomiarowe może w dużym stopniu uprawdopodobnić sukces w rozwiązaniu struktury metodą SAD.
- W rozdziale 6 wykorzystałem rozpraszanie anomalne do wyznaczenia pozycji jonów oraz sprawdzenia prawidłowości ich obsadzeń. Zaproponowałem również wykorzystanie parametru Flacka jak swoiste narzędzie diagnostyczne, które może pomóc w wykryciu nieprawidłowości w obsadzeniu atomów rozpraszających anomalnie w strukturach makromolekularnych. Ponadto wykorzystując formułę dla sygnału anomalnego (4) krytycznie przeanalizowałem rozwiązanie struktury gramicydyny A w kompleksie z CsCl przedstawionej w pracy [43].
- W rozdziale 7 przedstawiłem krytyczną ocenę pracy [18] oraz zaproponowałem podejście prowadzące w wybranych przypadkach do prawidłowych rozkładów prawdopodobieństwa oraz symulacji rozkładów prawdopodobieństwa różnic Bijvoeta.

Literatura

- [1] J.M. Bijvoet, A.F. Peerdeman, and A.J. Van Bommel. Determination of the absolute configuration of optically active compounds by means of X-rays. *Nature*, 168(4268):271–272, 1951.
- [2] André Authier. *Early Days of X-ray Crystallography*. Oxford University Press, 2013.
- [3] G. Friedel. Sur les symétries cristallines que peut révéler la diffraction des rayons röntgen. *X. C. R. Acad. Sci. Paris*, 157(1):1533–1536, 1913.

- [4] P.P. Ewald and C. Hermann. Robust structural analysis of native biological macromolecules from multi-crystal anomalous diffraction data. *Z. Kristallogr.*, 65:251–259, 1927.
- [5] T.C. Terwilliger, G. Bunkóczi, L.-W. Hung, P.H. Zwart, J.L. Smith, D.L. Akey, and P.D. Adams. Can I solve my structure by SAD phasing? anomalous signal in SAD phasing. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 72(3):346–358, 2016.
- [6] T.C. Terwilliger, G. Bunkóczi, L.-W. Hung, P.H. Zwart, J.L. Smith, D.L. Akey, and P.D. Adams. Can I solve my structure by SAD phasing? planning an experiment, scaling data and evaluating the useful anomalous correlation and anomalous signal. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 72(3):359–374, 2016.
- [7] W.A. Hendrickson and M.M. Teeter. Structure of the hydrophobic protein crambin determined directly from the anomalous scattering of sulphur. *Nature*, 290(5802):107–113, 1981.
- [8] M.S. Weiss, T. Sicker, and R. Hilgenfeld. Soft X-rays, high redundancy, and ways & means proper scaling: A new procedure for automated protein structure determination via sas. *Structure*, 9(9):771–777, 2001.
- [9] Éric Girard, Meike Stelter, Jean Vicat, and Richard Kahn. A new class of lanthanide complexes to obtain high-phasing-power heavy-atom derivatives for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D*, 59(11):1914–1922, Nov 2003.
- [10] M. Cianci, A. Olczak, A. Mukherjee, J. Raftery, J.R. Helliwell, P.F. Zagalsky, N.E. Chayen, E.J. Gordon, S. McSweeney, and P.J. Rizkallah. In *Abstracts of the IUCr XVIIIth Congress SR Satellite Meeting, Daresbury Laboratory*, 1999.
- [11] A. Olczak, J.R. Helliwell, P. Rizkallah, and M. Cianci. SWAT (Single Wavelength Anomalous Technique) with softer X-rays for optimised xenon $L_1 f''$, to phase Apocrustacyanin A_1 as a test case. In *European Crystallographic Meeting, Kraków, Poland*, 2001.
- [12] A. Olczak. Wykorzystanie słabego sygnału anomalnego do rozwiązania struktur makromolekularnych na przykładzie apocrustacyaniny A_1 i lizozymu. In *44 Polish Crystallographic Meeting*, volume 44, 2002.
- [13] Andrzej Olczak, Michele Cianci, Quan Hao, Pierre J. Rizkallah, James Raftery, and John Richard Helliwell. S-SWAT (softer single-wavelength anomalous technique): potential in high-throughput protein crystallography. *Acta Crystallographica Section A*, 59(4):327–334, Jul 2003.
- [14] A. Olczak. Statystyczne własności sygnału anomalnego. In *46 Polish Crystallographic Meeting*, page 16, Wrocław, Poland, 2004.

- [15] A. Olczak and L. Sieroń. ASC (Anomalous Signal Calculator) program do obliczania sygnału anomalnego na podstawie znanego składu kryształu. In *49 Polish Crystallographic Meeting*, page 92, Wrocław, Poland, 2007.
- [16] A. Olczak, M. L. Główska, M. Szczesio, J. Bojarska, W. L. Duax, B. M. Burkhart, and Z. Wawrzak. Nonstoichiometric complex of gramicidin D with KI at 0.80 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D*, 63(3):319–327, Mar 2007.
- [17] H. D. Flack and U. Shmueli. The mean-square Friedel intensity difference in *P1* with a centrosymmetric substructure. *Acta Crystallographica Section A*, 63(3):257–265, May 2007.
- [18] U. Shmueli and H. D. Flack. Probability density functions of the average and difference intensities of Friedel opposites. *Acta Crystallographica Section A*, 66(6):669–675, Nov 2010.
- [19] J. Grochowski and P. Serda. Feasibility of chiral discrimination using X-ray anomalous scattering. *Chirality*, 5(4):277–281, 1993.
- [20] W.H. Zachariasen. Dispersion in quartz. *Acta Crystallogr.*, 18:714–716, 1965.
- [21] C. Yang and J.W. Pflugrath. Applications of anomalous scattering from S atoms for improved phasing of protein diffraction data collected at CuK_α wavelength. *Acta Crystallographica - Section D Biological Crystallography*, 57(10):1480–1490, 2001.
- [22] W. Kwiatkowski, J.P. Noel, and S. Choe. Use of cr k_α radiation to enhance the signal from anomalous scatterers including sulfur. *Journal of Applied Crystallography*, 33(3 II):876–881, 2000.
- [23] Z. Dauter, M. Dauter, E. De La Fortelle, G. Bricogne, and G.M. Sheldrick. Can anomalous signal of sulfur become a tool for solving protein crystal structures? *Journal of Molecular Biology*, 289(1):83–92, 1999.
- [24] C.T. Lemke, G.D. Smith, and P.L. Howell. S-SAD, Se-SAD and S/Se-SIRAS using CuK_α radiation: Why wait for synchrotron time? *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 58(12):2096–2101, 2002.
- [25] Z. Otwinowski and W. Minor. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology*, 276:307–326, 1997.
- [26] A.G.W. Leslie. *Jnt CCP4/ESF-EACMB Newslett. Protein Crystallogr.*, 26, 1992.
- [27] The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 50(5):760–763, 1994.
- [28] C.M. Weeks and A.R. Miller. The design and implementation of SnB version 2.0. *Journal of Applied Crystallography*, 32(1):120–124, 1999.

- [29] N.E. Chayen, M. Cianci, A. Olczak, J. Raftery, P.J. Rizkallah, P.F. Zagalsky, and J.R. Helliwell. Apocrustacyanin A₁ from the lobster carotenoprotein α -crustacyanin: Crystallization and initial X-ray analysis involving softer X-rays. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 56(8):1064–1066, 2000.
- [30] M. Cianci, P.J. Rizkallah, A. Olczak, J. Raftery, N.E. Chayen, P.F. Zagalsky, and J.R. Helliwell. Structure of lobster apocrustacyanin A₁ using softer X-rays. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 57(9):1219–1229, 2001.
- [31] W.A. Hendrickson, J.R. Horton, and D.M. LeMaster. Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): A vehicle for direct determination of three dimensional structure. *EMBO Journal*, 9(5):1665–1672, 1990.
- [32] A. González. Faster data-collection strategies for structure determination using anomalous dispersion. *Acta Crystallographica - Section D Biological Crystallography*, 59(2):315–322, 2003.
- [33] A. Hädener, P.K. Matzinger, A.R. Battersby, S. McSweeney, A.W. Thompson, A.P. Hammersley, S.J. Harrop, A. Cassetta, A. Deacon, W.N. Hunter, Y.P. Nieh, J. Raftery, N. Hunter, and J.R. Helliwell. Determination of the structure of seleno-methionine-labelled hydroxymethylbilane synthase in its active form by multiwavelength anomalous dispersion. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 55(3):631–643, 1999.
- [34] Titus J. Boggon. PhD thesis, Department of Chemistry, Manchester University, 1998.
- [35] E.J. Gordon, G.A. Leonard, S. McSweeney, and P.F. Zagalsky. The C₁ subunit of α -crustacyanin: The de novo phasing of the crystal structure of a 40 kDa homodimeric protein using the anomalous scattering from S atoms combined with direct methods. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 57(9):1230–1237, 2001.
- [36] Michele Cianci, Pierre J. Rizkallah, Andrzej Olczak, James Raftery, Naomi E. Chayen, Peter F. Zagalsky, and John R. Helliwell. The molecular basis of the coloration mechanism in lobster shell: β -crustacyanin at 3.2-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(15):9795–9800, 2002.
- [37] S. Begum, M. Cianci, B. Durbeej, O. Falklöf, A. Hädener, J.R. Helliwell, M. Helliwell, A.C. Regan, and C.I.F. Watt. On the origin and variation of colors in lobster carapace. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(26):16723–16732, 2015.
- [38] J.P. Rose, B.-C. Wang, and M.S. Weiss. Native SAD is maturing. *IUCrJ*, 2:431–440, 2015.
- [39] Q. Liu, Q. Liu, and W.A. Hendrickson. Robust structural analysis of native biological macromolecules from multi-crystal anomalous diffraction data. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(7):1314–1332, 2013.

- [40] B.A. Wallace and K. Ravikumar. The gramicidin pore: Crystal structure of a cesium complex. *Science*, 241(4862):182–187, 1988.
- [41] B.M. Burkhart, N. Li, D.A. Langs, W.A. Pangborn, and W.L. Duax. The conducting form of gramicidin A is a right-handed double-stranded double helix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(22):12950–12955, 1998.
- [42] G.M. Sheldrick. SHELXL-97.
- [43] B. A. Wallace, W. A. Hendrickson, and K. Ravikumar. The use of single-wavelength anomalous scattering to solve the crystal structure of a gramicidin A/caesium chloride complex. *Acta Crystallographica Section B*, 46(3):440–446, Jun 1990.
- [44] Jiawei Wang, Alexander Wlodawer, and Zbigniew Dauter. What happens when the signs of anomalous differences or the handedness of substructure are inverted? *Acta Crystallographica Section D*, 63(7):751–758, Jul 2007.
- [45] A. Olczak. Statistical distributions of Bijvoet differences. In *50 Polish Crystallographic Meeting*, page 191, Wrocław, Poland, 2008.
- [46] A. Olczak. Probability distributions of Bijvoet differences. Critical assesment of the Shmueli-Flack theory. In *53 Polish Crystallographic Meeting*, page 33, Wrocław, Poland, 2011.
- [47] A. Olczak. Probability distributions of Bijvoet differences and symmetry – theory and simulations. In *55 Polish Crystallographic Meeting*, page 260, Wrocław, Poland, 2013.
- [48] S. Parthasarathy and R. Srinivasan. The probability distribution of Bijvoet differences. *Acta Crystallographica*, 17(11):1400–1407, Nov 1964.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych)

Struktura a właściwości farmakologiczne

Oprócz tematyki opisanej powyżej zajmuję się od czasu doktoratu również zaganiieniami związanymi z wpływem struktury przestrzennej molekuł na ich właściwości farmakologiczne. Określenie struktury krystalicznej jest istotnym elementem w poszukiwaniu zależności między strukturą a aktywnością. Związki badane pod kątem ich biologicznej aktywności (pochodzące ze współpracy z uczelniami medycznymi w Łodzi, Gdańsku i Lublinie), którymi się zajmujemy mogą być podzielone na trzy grupy:

1. Długołańcuchowe pochodne arylopiiperazyny, które są badane jako ligandy receptora serotoninowego. Związki te charakteryzują się działaniem przeciwdepresyjnym. W naszych pracach wykazaliśmy wpływ protonowania na konformację cząsteczki (preferowana rozciągnięta forma) oraz – parzystości liczby grup metylenowych na aktywność związku [1].
2. a) Pochodne izoniazydu i hydrazyny, które wykazują działanie przeciwbakteryjne, a przede wszystkim przeciwgruźlicze. Dla pochodnych hydrazydowych aktywność przeciwgruźliczą determinuje w dużej mierze „płaskość” cząsteczki. Pochodne amidrazonowe charakteryzują się szerokim działaniem przeciwbakteryjnym. Są aktywne także na bakterie Gram-dodatnie (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. mutans*) [2-9].
c) Pochodne benzoimidazolu, które charakteryzują się również wysoką aktywnością przeciwbakteryjną oraz przeciwgrzybiczną. Aktywne związki charakteryzują się labilnym łańcuchem, a wprowadzenie podwójnego wiązania do łańcuchu powoduje znaczący spadek aktywności [10].
3. Bispochoodne poliamin alifatycznych z różnymi układami terminalnymi, które charakteryzuje się aktywnością przeciwnowotworową. Nowe pochodne zostały zaprojektowane, jako bisinterkalatory o potencjalnej aktywności cytotoksycznej. Aktywność tych związków może wynikać z długości i labilności łącznika. [11]

[1] Lewgowd, W., Bojarski, A. J., Szczesio, M., Olczak, A., Glowka, M. L., Mordalski, S., & Stanczak, A. (2011). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(8), 3348-3361.

[2] Szczesio, M., Olczak, A., Goka, J., Gobis, K., Foks, H., & Główa, M. L. (2011). *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 67(7), o235-o240.

[3] Gobis, K., Foks, H., Augustynowicz-Kopec, E., Napiorkowska, A., Szczesio, M., Olczak, A., & Glowka, M. L. (2012). *Monatshefte Fur Chemie*, 143(4), 607-617.

[4] Szczesio, M., Olczak, A., Gobis, K., Foks, H., & Główa, M. L. (2012). *Planarity Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 68(10), o373-o376.

[5] Szczesio, M., Olczak, A., Gobis, K., Foks, H., & Główa, M. L. (2012). *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 68(3), o99-o103.

[6] Szczesio, M., Olczak, A., Gobis, K., Mazerant, I., Kałużyńska, S., Foks, H., & Główa, M. L. (2016). *Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry*, 72, 75-79.

[7] Szczesio, M., Olczak, A., Gobis, K., & Główa, M. L. (2017). *Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry*, 73(10), 797-802.

[8] Szczesio, M., Olczak, A., Mazerant, I., Gobis, K., Foks, H., & Główa, M. L. (2017). *Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry*, 73(2), 84-90.

- [9] M. Szczesio, M., Gołka, J., Korona-Głowniak, I., Orlewska, C., Gobis, K., Olczak, A. 2018, Acta Cryst. C74, 400-405
- [10] Główska, M. L., Kałużyńska, S., Krause, M., Gobis, K., Foks, H., Szczesio, M., & Olczak, A. (2018). Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry, 74(12), 1684-1691.
- [11] Szulawska-Mroczek, A., Szumilak, M., Szczesio, M., Olczak, A., Nazarski, R. B., Lewgowd, W., Czyz, M., Stanczak, A. (2013).. Archiv Der Pharmazie, 346(1), 34-43.

