

MARIUSZ JASKÓLSKI*

Krystalografia białek w Międzynarodowym Roku Krystalografii**

Na 66. sesji Zgromadzenie Ogólne Organizacji Narodów Zjednoczonych przyjęło Rezolucję 66/284 ustanawiającą rok 2014 Międzynarodowym Rokiem Krystalografii [1]. Mimo swojego niepozornego charakteru, szczególnie w zestawieniu z podstawowymi naukami przyrodniczymi, takimi jak fizyka, chemia czy biologia, krystalografia z pewnością zasługuje na to wyróżnienie i związaną z tym popularyzację w odbiorze społecznym. Przez swój interdyscyplinarny charakter, fundamentalne znaczenie dla wiedzy o strukturze materii i wkład do postępu w takich obszarach, jak nowoczesne materiały czy leki nowej generacji, krystalografia ma znaczenie nie tylko dla badań podstawowych, ale dla każdego człowieka. Znaczenie krystalografii wiąże się z jej wyjątkową metodą badawczą, pozwalającą w sposób dosłowny „zobaczyć” strukturę atomową materii. Dzięki temu stała się krystalografia nieodłączną częścią wszystkich nauk przyrodniczych, ze szczególnie ważkimi konsekwencjami w biologii i medycynie.

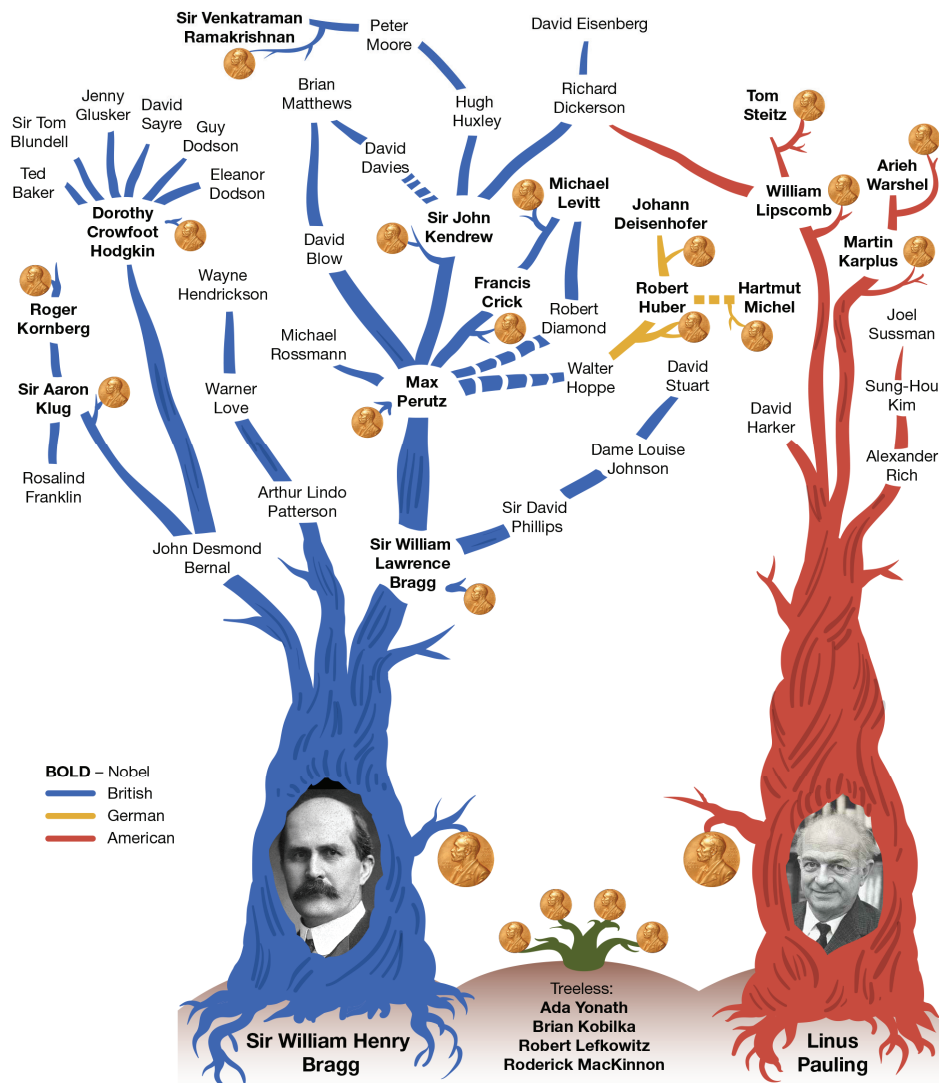
Barwna historia nowożytnej krystalografii rozpoczyna się w roku 1611, gdy Johannes Kepler opublikował niepozorną książeczkę *O sześciokątnych płatkach śniegu (De Nive Sexangula)* [2], w której wyjaśnił zasady ścisłego upakowania w przestrzeni, na przykładzie m.in. kryształu lodu. Tzw. twierdzenie Keplera jest jednym z fundamentów nauki o budowie materii do dziś. Jako ciekawostkę można podać, że jego udowodnienie zajęło matematykom prawie 400 lat, a przedstawienie dowodu wymagało 282 stron druku oraz 3 gigabajtów programu komputerowego [3-5].

Kolejne trzy wieki w historii krystalografii były raczej senne, a dość powolny postęp ograniczał się do mineralogii, optyki i teorii, w tym teorii symetrii. Fundamentalny przewrót dokonał się w roku 1912, kiedy Max von Laue wykazał doświadczalnie, że promieniowanie rentgenowskie ulega dyfrakcji na kryształach. Doświadczenie Lauego zrewolucjonizowało fizykę, a następnie chemię, przez dostarczenie potężnego narzędzia do badania struktury atomowej kryształów. Narzędzie to rozwinęli William Henry (ojciec) i William Lawrence (syn) Braggowie w Anglii. Około 20 lat później, nie bacząc na nie-

* Prof. dr hab. Mariusz Jaskólski, członek korespondent PAN. Zakład Krystalografii, Wydział Chemii UAM, Centrum Badań Biokrystalograficznych, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

** Artykuł opracowany na podstawie wykładu przedstawionego na otwarciu 57. Zjazdu PTChem. i SITPChem. w Częstochowie 14 września 2014 r.

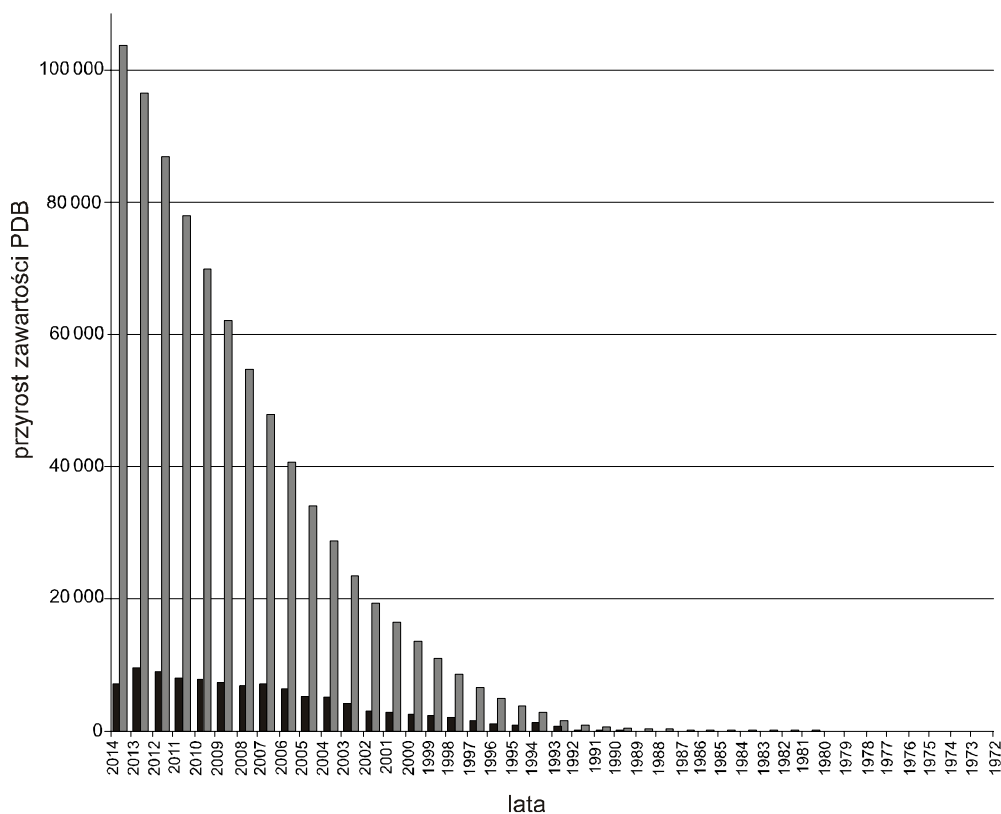
zwykle ograniczone wówczas możliwości techniczne, to samo podejście do określenia struktury gigantycznych makromolekuł życia – białek zaproponowali tacy wizjonerzy, jak Desmond Bernal, Dorothy Hodgkin i Max Perutz. Z wyjątkiem Bernala, wszyscy wymienieni pionierzy krystalografii uhonorowani zostali Nagrodami Nobla. W sumie za wkład do krystalografii i blisko spokrewnione osiągnięcia przyznano 42 Nagrody Nobla, w tym za odkrycia związane z makromolekułami – 24 (ryc. 1).



Ryc. 1. „Drzewo genealogiczne” krystalografii makromolekuł, z zaznaczonymi Nagrodami Nobla. Gałąź brytyjską i amerykańską zaznaczono kolorem ze względu na ich korzenie, a nie narodowość osób (niektóre z nich miały więcej niż jedno obywatelstwo). Linie przerywane oznaczają współpracę inną niż mentoring. (Przedruk dzięki uprzejmości i za zgodą *FEBS Journal* [23])

W międzyczasie największy chemik naszych czasów, Linus Pauling, poprawnie przewidział (1951) podstawowe motywy strukturalne białek, helisę α [6] i arkusz β [7]. Również w międzyczasie (1953) James Watson i Francis Crick zaproponowali poprawny model podwójnej helisy DNA [8], wyjaśniający molekularne podstawy dziedziczenia w biologii. Budując swój model, Watson i Crick posługiwali się (niestety bez wiedzy autorki i z pominięciem jej w publikacji) zdjęciami dyfrakcji rentgenowskiej na włóknach DNA wykonanymi przez „królową” tej metody – Rosalind Franklin.

Pierwszą w historii strukturę przestrzenną białka, mioglobiny, określił doświadczalnie kolega i uczeń Perutza, John Kendrew [9] w 1957 r. Strukturę czterokrotnie większej hemoglobiny rozwiązał Max Perutz [10] w dwa lata później, po 22 latach tytanicznej pracy. Niewiele osób wie, że niemal równoległe z Perutzem, na wschodnich rubieżach przedwojennej Polski, na Uniwersytecie Jana Kazimierza we Lwowie, młody biochemik Tadeusz Baranowski z powodzeniem krystalizował białka [11] i wraz z Ludwikiem Chrobakiem planował ich badania rentgenowskie. Niestety wojna przekreśliła te zamiary, a krystalografia białek w Polsce musiała czekać kolejnych 50 lat na swoje odrodzenie.



Ryc. 2. Przyrost zawartości PDB wg lat. Szary słupek – suma wszystkich depozytów, czarny słupek – depozyty w danym roku (źródło: RCSB PDB www.rcsb.org)

Początkowo postęp krytalografii białek był niewiarygodnie powolny, gdyż określenie struktury kryształu białka zajmowało wiele lat. W roku 1971 znano zaledwie 7 struktur białek; stały się one załącznikiem Banku Struktur Białkowych, Protein Data Bank (PDB) [12], w którym obecnie zgromadzonych jest ponad 105 tys. struktur makromolekuł, z przyrostem 10 tys. struktur rocznie. Analizując statystyki PDB, dostrzegamy, że po kilku dekadach niemal niezauważalnego postępu, w latach 90. ubiegłego wieku rozpoczął się mający charakter eksplozji gwałtowny rozwój tej bazy (ryc. 2). Co go spowodowało?

Przyczyn było kilka, głównie związanych z postępowaniem technicznym, takim jak gwałtowny rozwój technologii komputerowej czy automatyki, pozwalającej na usprawnienie kluczowych etapów doświadczalnych, takich jak oczyszczanie i krystalizacja białek. Najważniejsze było jednak zastosowanie inżynierii genetycznej do otrzymywania dowolnych białek (rekombinowanych) w komórkach bakteryjnych oraz zastosowanie na masową skalę potężnych synchrotronowych źródeł promieniowania rentgenowskiego. Bodźcem do tych „wysokoprzepustowych” innowacji stała się genomika strukturalna, która w przeciwieństwie do klasycznej biochemii stawia sobie za cel rozszyfrowanie funkcji wszystkich białek, kodowanych przez kolejno sekwencjonowane genomy, przez zbadanie ich struktury.

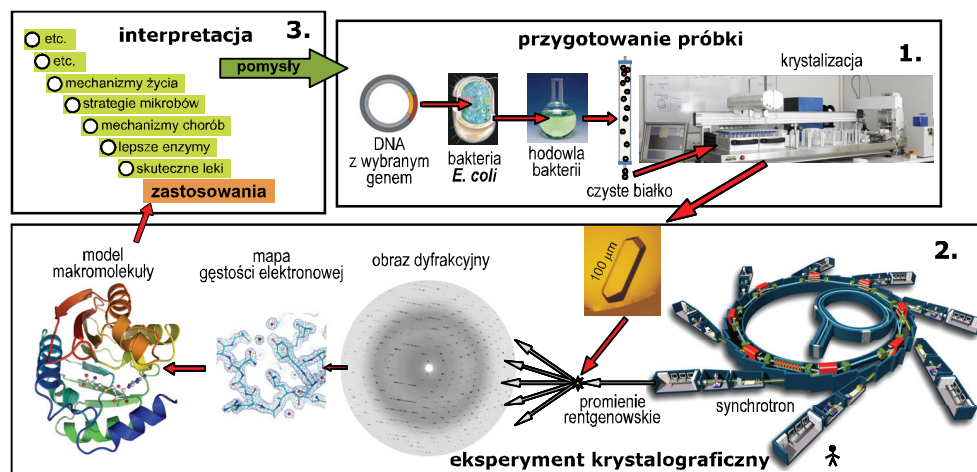
Cykl doświadczalny krytalografii makromolekuł jest mozolny i skomplikowany. W odróżnieniu od krytalografii małych cząsteczek rozpoczyna się on długo przed tym, kiedy wykrytalizowany materiał zostanie poddany dyfrakcji rentgenowskiej w celu wyznaczenia jego struktury atomowej. W krytalografii białek proces badawczy zaczyna się od sekwencji DNA kodującej badane białko, którą klonuje się, zazwyczaj w specjalnych komórkach bakteryjnych, w celu wytworzenia białka rekombinowanego. Białko oczyszczone metodami wysokosprawnej chromatografii kolumnowej poddaje się następnie, po kontroli jakości, krystalizacji (ryc. 3).

Zaletą tego podejścia jest łatwość wprowadzania mutacji (na drodze inżynierii genetycznej) do sekwencji rekombinowanego białka oraz „wyznakowania” go specjalnymi „etykietkami” czy atomami, np. atomami selenu (Se) wprowadzanego za pomocą obecnej w pożywce selenometioniny.

Białka krystalizuje się za pomocą łagodnej wymiany składników roztworu w procesie dyfuzji przez fazę gazową (dyfuzja par) w mikroskopijnych kropelkach o objętości 1 μ l (μ =mikro, milionowa część) lub nawet znacznie mniejszej, które „siedzą” lub „wiszą” nad roztworem czynnika strącającego. W zasadzie odeszliśmy już od ręcznego przygotowania krystalizacji. Wykonują to obecnie szybkie, precyzyjne i oszczędne roboty krystalizacyjne, dla których „ustawienie” tysięcy kropli krystalizacyjnych o objętości $\sim 0.1 \mu$ l jest sprawą kilku godzin.

Jeśli udało się wyhodować odpowiednie monokryształy, można rozpocząć pomiary dyfrakcji rentgenowskiej. Zasadnicza idea takiego eksperymentu jest taka sama jak

w doświadczeniu Lauego: wiązka promieni ze źródła rentgenowskiego, przechodząc przez kryształ, ulega dyfrakcji, a jej obraz rejestruje odpowiedni detektor. Większość pomiarów wykorzystuje promieniowanie monochromatyczne (o jednej długości fali λ).



Ryc. 3. Proces badawczy biokrystalografii rozpoczyna się zwykle od (1) przygotowania na drodze inżynierii genetycznej bardzo czystego białka, które następnie poddaje się procesowi krystalizacji (obecnie z zastosowaniem robotów). Właściwe badania krystalograficzne (2) polegają na zarejestrowaniu dyfrakcji na kryształach przy użyciu superintensywnego promieniowania rentgenowskiego generowanego w cyklotronie, zwanym synchrotronem. Obraz dyfrakcyjny po skomplikowanych obliczeniach zostaje przekształcony w mapę gęstości elektronowej kryształu, która ujawnia obraz atomowy badanej molekuly. Najciekawszy etap badań polega na interpretacji uzyskanych wyników (3) i wiąże się nie tylko z odkrywaniem tajemnic molekularnych życia, ale i z zastosowaniami praktycznymi, takimi jak projektowanie leków, lepszych enzymów czy rozwiązań dla produkcji żywności. W cyklu badawczym najczęściej występuje sprzężenie zwrotne, tj. uzyskane wyniki podpowiadają nowe koncepcje badawcze

Znakomicie upraszcza to interpretację równania Bragga $n\lambda = 2d \sin \theta$: wystarczy zmierzyć kąty dyfrakcji (θ), by uzyskać informację o sieci kryształu (d). Na marginesie zauważymy, że niezależnie od tego, jak daleko posuniemy pomiary przy maksymalnych kątach θ_{\max} , zawsze natrafimy na odpowiadającą im granicę rozdzielczości (analogicznej do rozdzielczości mikroskopu optycznego) d_{\min} .

Nowoczesne stacje pomiarowe, np. przy synchrotronach w Grenoble (ESRF), Hamburgu (DESY), Chicago (APS) czy w Japonii, są niesłychanie zaawansowane technicznie i wyposażone w ultranowoczesną aparaturę. Linia synchrotronowa dostarcza promieniowania rentgenowskiego (często skupionego do średnicy $\sim 1 \mu\text{m}$), kryształ zamontowany na goniometrze o submikronowej precyzji chłodzony jest parami azotu o temperaturze 100 K (-173°C), dyfrakcję rejestruje niezwykle precyzyjny i szybki detektor

powierzchniowy (zaawansowana technologia półprzewodnikowa). Przestrzeń robocza naszpikowana jest dodatkowymi mikroskopami, kamerami CCD, czasem spektrofotometrami, komorami wypełnionymi odpowiednim gazem etc. Znajdziemy tam również dewary z ciekłym azotem, a bardzo często także skomplikowany i precyzyjny automat zwany robotem, który potrafi prowadzić seryjne pomiary bez obecności człowieka.

Synchrotron jest w zasadzie urządzeniem cyklotronowym (o średnicy rzędu 1 km), w którym relatywistyczne (tj. pędzące z prędkością zbliżoną do prędkości światła) elektrony lub pozytony (elektrony antimaterii) przelatując przez skomplikowane i potężne pola magnetyczne emitują fotony promieniowania elektromagnetycznego (np. rentgenowskiego) o astronomicznej jasności, rzędu 10^{20} fotonów na sekundę. Cały pomiar dyfrakcyjny może w związku z tym trwać bardzo krótko, nawet kilka sekund.

Po zarejestrowaniu obrazu dyfrakcyjnego rozpoczynają się skomplikowane obliczenia, których celem jest odtworzenie rozkładu elektronów w kryształach, nazywanego w krytalografii gęstością elektronową. Odtworzenie „mapy” gęstości elektronowej jest możliwe, gdyż promieniowanie rentgenowskie ulega rozproszeniu właśnie na elektronach atomów i molekuł chemicznych. Intensywności, lub raczej amplitudy, refleksów rentgenowskich związane są z gęstością elektronową zależnością zwaną transformacją Fouriera. Istnieje wszakże zasadnicza trudność wynikająca z faktu „zgubienia” faz refleksów podczas wyznaczania amplitud przez pierwiastkowanie intensywności.

W krytalografii makromolekuł znamy trzy podstawowe sposoby rozwiązywania tego Problemu Fazowego. W historycznie pierwszej metodzie Podstawienia Izomorficznego należy wyznaczyć kryształ białkowy bogatymi w elektrony atomami ciężkimi, metalami ciężkimi w wersji pochodzącej od Perutza. Postępowaliśmy tak przez z górą 50 lat, do czasu, gdy nasz znakomity kolega, dr Zbigniew Dauter, zastąpił toksyczne i drogie metale powszechnymi i bezpiecznymi halogenkami [13].

Podstawienie Cząsteczkowe działa świetnie dla podobnych struktur, a szansa powodzenia rośnie wraz z powiększaniem się zbioru dostępnych modeli w banku PDB.

Dla struktur całkowicie nowych (tj. niepodobnych do dotąd poznanych) metodą z wyboru jest MAD (*Multiwavelength Anomalous Diffraction*, czyli metoda dostrojonej dyfrakcji anomalnej), w której przez precyzyjne dostrojenie długości fali promieniowania synchrotronowego wykorzystuje się rozpraszanie anomalne (rezonansowe) specjalnie dobranych atomów w kryształach, zwykle atomów selenu.

Po rozwiązaniu struktury (tj. Problemu Fazowego) możliwe staje się zbudowanie w oparciu o mapy gęstości elektronowej modelu atomowego badanej makromolekuły. Kluczowe jest osiągnięcie jak najwyższej rozdzielczości. Przy niskiej rozdzielczości, np. 6 Å (1 Å (angstrom) to jedna dziesięciomilionowa (10^{-8}) centymetra), problemem może być nawet poprawne wymodelowanie głównego zwoju łańcucha białkowego. Przy 3 Å

łańcuch główny jest zwykle jednoznaczny; wraz ze wzrostem rozdzielczości także łańcuchy boczne stają się coraz bardziej czytelne, umożliwiając bezbłędną korelację struktury z sekwencją aminokwasów. Przy rozdzielczości 1,2 Å osiągnięta zostaje rozdzielczość atomowa. Jej przekroczenie wiąże się z ogromną satysfakcją, jaką daje możliwość rozróżnienia poszczególnych atomów w kryształach, w tym atomów cząsteczek wody. Przy ultrawysokiej rozdzielczości możliwa jest nawet wizualizacja atomów wodoru (zwykle pomijanych w strukturach makromolekularnych). W strukturze małego białka BPTI, określonej przez nas z rozdzielczością 0,86 Å, znaleźliśmy łańcuszek połączonych wiązaniami wodorowymi cząsteczek wody [14].

Rozdzielczość atomowa jest rzadkością w krystalografii makromolekuł, choć w PDB zdarzają się takie perełki. Bezwzględny liderem jest struktura małego białka krambiiny, określona z rozdzielczością 0,48 Å [15]. W grupie kwasów nukleinowych rekord należy do nas i odnosi się do struktury (lewoskrętnego) Z-DNA określonej z rozdzielczością 0,55 Å [16].

Zawsze należy starać się o jak najwyższą rozdzielczość i – co się z tym wiąże – o jak największą liczbę danych doświadczalnych, ponieważ zbudowany model makromolekuły charakteryzuje gigantyczna liczba parametrów. Dla średniej wielkości białka o masie cząsteczkowej 60 tys. daltonów (dalton (Da) jest jednostką masy atomowej; pojedynczemu atomowi wodoru (H) odpowiada ~1 Da, atomowi węgla (C) ~12 Da), nawet najprostszy model zawiera aż 16 000 parametrów: składają się na nie trzy współrzędne (x, y, z) każdego atomu oraz jeden (izotropowy) parametr opisujący amplitudę jego drgań (B). Bardziej realistyczny model, zakładający anizotropowe drgania atomów, wymaga już użycia 45 000 parametrów. Atomy wodoru nie są tu w ogóle brane pod uwagę. Gdybyśmy chcieli je włączyć do modelu, tak jak to praktykuje się w krystalografii małych cząsteczek, wymiary naszego modelu osiągnęłyby gigantyczny poziom 70 000 parametrów!

Ile danych doświadczalnych mamy do dyspozycji, próbując określić te parametry przy różnych poziomach rozdzielczości? Przy 6 Å mielibyśmy zaledwie ~1200 refleksów i brak szans na zbudowanie szczegółowego modelu atomowego. Dopiero przy rozdzielczości ok. 2,7 Å liczba obserwacji równoważy liczbę parametrów rozsądnego modelu. Ponieważ liczba refleksów rośnie z trzecią potęgą w miarę wzrostu rozdzielczości, przy rozdzielczości 0,6 Å mielibyśmy komfortową sytuację: ponad milion niezależnych danych doświadczalnych.

Przy niskiej rozdzielczości, gdy nie wystarcza danych dyfrakcyjnych do udokładnienia modelu atomowego, posilkujemy się dodatkowymi danymi, które stają się więzami dla geometrycznych parametrów modelu. Te dodatkowe równania żądają minimalizacji odstępstw od wartości standardowych, które są nam znane z uprzednich badań. Typowe więzy nakładane są na długości wiązań, kąty walencyjne, płaskie ugrupowania atomów czy kontakty van der Waalsa. Biblioteki standardów geometrycznych dla białek stworzyli

Engl i Huber [17] na podstawie analizy podobnych fragmentów strukturalnych w bazie Cambridge Structural Database (CSD), która gromadzi informację o strukturze krystalicznej związków organicznych [18].

Jakie wyzwania stoją przed krystalografią białek w Międzynarodowym Roku Krystalografii, gdy w świetle nieprzerwanej rewolucji technicznej powinna być ona gotowa na kolejne „odrodzenie”? Wielkie wyzwanie rzuca biologia: dajcie nam więcej struktur! I prędzej! Jednak w tej pogoni za „więcej” nie wolno nam zgubić „lepiej”. Jest ogromne pole do poprawienia dokładności, jakości i rozdzielczości. O dziwo, krystalografia może też dostarczyć informacji o dynamice procesów makromolekularnych.

Jeszcze większym wyzwaniem jest zapotrzebowanie na struktury o coraz większej złożoności: białka błonowe, wirusy, kompleksy wieloskładnikowe, całe organelle. Postęp w tym zakresie jest niezły: struktur białek błonowych ciągle przybywa, w banku PDB można znaleźć kilkaset struktur wirusów, w tym taki rodzynek jak rozdzielczość 1,4 Å [19]. W roku 2009 Nagroda Nobla w dziedzinie chemii, którą odebrali Ada Yonath, Venki Ramakrishnan i Tom Steitz, ukoronowała lata zmagania o strukturę rybosomu. Rybosom bakteryjny składa się z ok. 200 tys. atomów niewodorowych. W rybosomie eukariotycznym jest ich ok. 300 tys. Rybosom to uniwersalna maszyna molekularna syntetyzująca białka na podstawie taśmy mRNA z zakodowaną sekwencją. Rybosomy działają we wszystkich komórkach żywych od miliardów lat. Odpowiedzialne są za biosyntezę wszystkich białek na naszej planecie.

Krystalografia białek atakuje coraz bardziej skomplikowane struktury krystaliczne, na przykład struktury modulowane, w których zaburzona jest trójwymiarowa okresowość. Niedawno w naszym zespole określiliśmy strukturę kryształu białkowego ze współmierną modulacją. Jest ona zbudowana z 28 niezależnych molekuł białkowych złożonych sumarycznie z ~ 40 tys. atomów niewodorowych [20]. Mamy też kolejny, jeszcze bardziej skomplikowany przypadek: rozwiązaliśmy strukturę kryształu z 72 cząsteczkami białka w części asymetrycznej komórki elementarnej.

Czas to kolejny wymiar, który może być badany za pomocą metod krystalografii białek. W tradycyjnych eksperymentach, które trwały wiele dni, a nawet tygodni, było to nieosiągalne. Jednakże źródła synchrotronowe działające w trybie polichromatycznym umożliwiają skrócenie czasu pomiaru do nanosekund (nano to jedna tysięczna jednej milionowej albo 10^{-9}) i to przy jednorazowej ekspozycji. Jeśli więc w kryształach zachodziłaby reakcja enzymatyczna trwająca 1 milisekundę (0,001 s), jej przebieg można by uchwycić na serii zdjęć poklatkowych zarejestrowanych w tym trybie, zwanym metodą Lauego. Laser rentgenowski na swobodnych elektronach (XFEL) umożliwia jeszcze szybszą rejestrację dyfrakcji, jednak monochromatyczny charakter jego promieniowania nie jest odpowiedni do tego typu zastosowań. W eksperymencie Lauego wiązka polichromatyczna umożliwia zarejestrowanie wszystkich danych dyfrakcyjnych na jednym obrazie.

Lasery XFEL można sobie wyobrazić jako otwarty, liniowy, długi na kilka kilometrów synchrotron. W jego specjalnej strukturze rezonansowej i magnetycznej tworzy się strumień relatywistycznych elektronów, które oddziałują z polem elektromagnetycznym (promieniowaniem), które same wytworzyły. Prowadzi to do efektu SASE (*Self-Amplified Spontaneous Emission*, samowzmocniona emisja spontaniczna), w którym generowane są ultrajaskawe błyski fotonowe. Jedno takie urządzenie już działa, następne są w budowie. Jasność lasera XFEL przewyższa o 10 rzędów najpotężniejsze źródła synchrotronowe. Wiązka taka niszczy każdą materię w czasie ok. 100 femtosekund (1 femtosekunda = 10^{-15} s; gdyby sekundę skrócić do femtosekundy, wiek Wszechświata (~14 mld lat) skróciłby się do 7 minut).

Gdyby jednak udało się zarejestrować dyfrakcję jeszcze szybciej, przed destrukcją – krystalograf byłby górą! Pierwsze doświadczenia pokazały już, że jest to możliwe. Super cienki strumień zawieszony nanometrowych kryształków wstrzykuje się wprost do pulsującej wiązki lasera XFEL. Za każdym razem, gdy błysk rentgenowski trafi w kryształ – rejestrowana jest dyfrakcja. Składając ~15 000 takich cząstkowych obrazów dyfrakcyjnych uchwyconych w czasie 3 mln błysków, krystalografowie na Uniwersytecie Stanforda rozwiązali i udokładnili kilka struktur krystalicznych [21], w tym białek błonowych [22].

Na naszych oczach rodzi się krystalografia z kryształami zredukowanymi do rozmiarów nanometrów, naświetlanych błyskami rentgenowskimi o astronomicznej jasności. Eksperyment taki – choć niewiarygodnie szybszy – koncepcyjnie nie odbiega od modelu klasycznej krystalografii. Jednak następny krok, z całkowitą zmianą paradygmatu, wydaje się oczywisty: obrazowanie rentgenowskie pojedynczych molekuł.

Czeka nas więc krystalografia bez kryształów, w skali nanometrów i w czasie femtosekund. Perspektywa przyprawiająca o zawrót głowy i niezwykle jasna przyszłość: w przenośni i dosłownie. Mocny i optymistyczny akcent na Międzynarodowy Rok Krystalografii!

Literatura

- [1] Resolution A/RES/66/284/ adopted by the General Assembly, United Nations, 12 July 2012.
- [2] Kepler J. (1611) *Strena Seu De Nive Sexangula*, G. Tampach, Francofurti ad Moenum. *Noworoczny podarek, albo osześciokątnych płatkach śniegu*, tłumaczenie pol. D. Sutkowska, Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa, 2006.
- [3] Hales T.C. (2000) *Cannonballs and honeycombs*. Notices Amer. Math. Soc. 47, 440-449.
- [4] Hales T.C. (2005) *A proof of the Kepler conjecture*. Ann. Math. 162, 1065-1185.
- [5] Hales T.C. (2006) *Historical overview of the Kepler conjecture*. Discrete Comput. Geom. 36, 5-20.
- [6] Pauling L., Corey R.B., Branson H.R. (1951) *The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 37, 205-211.
- [7] Pauling L., Corey R.B. (1951) *The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chain*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 37, 251-256.

- [8] Watson J.D., Crick F.H.C. (1953) *Molecular structure of nucleic acids*. Nature 171, 737-738.
- [9] Kendrew J.C., Bodo G., Dintzis H.M. et al. (1958) *A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis*. Nature 181, 662-666.
- [10] Perutz M.F., Rossmann M.G., Cullis A.F. et al. (1960) *Structure of haemoglobin. A three-dimensional Fourier synthesis at 5.5 Å resolution, obtained by X-ray analysis*. Nature 185, 416-421.
- [11] Baranowski T. (1939) *Die Isolierung von kristallisierten Proteinen aus Kaninchenmuskel*. Z. Physiol. Chem. 260, 43-55.
- [12] Berman H.M., Westbrook J., Feng Z. et al. (2000) *The Protein Data Bank*. Nucleic Acids Res. 28, 235-242.
- [13] Dauter Z., Dauter M., Rajashankar K.R. (2000) *Novel approach to phasing proteins: derivatization by short cryo-soaking with halides*. Acta Cryst. D56, 232-237.
- [14] Addlagatta A., Czapińska H., Krzywda Sz. et al. (2001) *Ultra-high-resolution structure of a BPTI mutant*. Acta Cryst. D57, 649-663.
- [15] Schmidt A., Teeter M., Weckert E., Lamzin V.S. (2011) *Crystal structure of a small protein crambin at 0.48 Å resolution*. Acta Cryst. D67, 424-428.
- [16] Brzezinski K., Brzuszkiewicz A., Dauter M. et al. (2011) *High regularity of Z-DNA revealed by ultra high-resolution crystal structure at 0.55 Å*. Nucleic Acids Res. 39, 6238-6248.
- [17] Engh R., Huber R. (1991) *Accurate bond and angle parameters for X-ray protein-structure refinement*. Acta Cryst. A47, 392-400.
- [18] Allen F.H. (2002) *The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising*. Acta Cryst. B58, 380-388.
- [19] Larson S.B., Day J.S., McPherson A. (2014) *Satellite tobacco mosaic virus refined to 1.4 Å resolution*. Acta Cryst. D70, 2316-2330.
- [20] Sliwiak J., Jaskolski M., Dauter Z. et al. (2014) *Likelihood-based molecular replacement solution for a highly pathological crystal with tetartohedral twinning and seven-fold translational non-crystallographic symmetry*. Acta Cryst. D70, 471-480.
- [21] Redecke L., Nass K., DePonte D.P. et al. (2013) *Natively inhibited Trypanosoma brucei cathepsin B structure determined by using an X-ray laser*. Science 339, 227-230.
- [22] Weierstall U., James D., Wang C. et al. (2014) *Lipidic cubic phase injector facilitates membrane protein serial femtosecond crystallography*. Nature Commun. 5, 3309-3309.
- [23] Jaskolski M., Dauter Z., Wlodawer A. (2014) *A brief history of macromolecular crystallography, illustrated by a family tree and its Nobel fruits*. FEBS J. 281, 3985-4009.

Protein crystallography in International Year of Crystallography

The United Nations proclaimed 2014 as International Year of Crystallography. Unlike physics, chemistry or biology, crystallography is a rather narrowly defined science. It is, however, very powerful through its structure-penetrating methodology and interdisciplinary intergrowth with all other natural and life sciences. Evolved from a mineralogy-related subject, crystallography gained momentum with the discovery of Max Laue (1912) that X-rays can be diffracted by crystals. In the hands of the father-and-son team of the Braggs in England, this discovery became a powerful tool for unraveling the atomic structure of matter. Starting with simple chemical molecules and crystals, the method of X-ray crystallography has also been used for biological macromolecules and their complexes, such as viruses, biological machines and organelles.

In a spectacular synergism, crystallography and technology have fueled their own advances. The most dramatic change happened, and is still happening, in the generation of powerful X-ray beams. Home sources are almost forgotten and even the most powerful synchrotrons are being dwarfed by the looming X-ray Free Electron Lasers. With brightness that makes our Sun look terribly pale, these sources will ultimately allow us to get rid of the final constraint: of the crystal. We are thus looking into crystallography without crystals, at nanometer scale and in femto-second time. However, the principle of diffraction holds, and the goal is the same: to understand the processes of life through the elucidation of the atomic structure of matter, even if it is transient, dynamic, or otherwise delicate.

Key words: protein crystallography, International Year of Crystallography, structural biology, Data Protein Bank, synchrotron radiation, XFEL

