

**Μία μη μαθηματική εισαγωγή
στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών**

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Μ. ΓΛΥΚΟΣ

Αλεξανδρούπολη, Φθινόπωρο 2015

Πίνακας περιεχομένων

Μέρος 1^ο : Θεμέλιο

0	Don't panic.....	5
1	Ποια είναι η ερώτηση ;.....	7
2	Το ιδεατό πείραμα [I].....	10
3	Το ιδεατό πείραμα [II].....	17
4	Τι είναι οι κρύσταλλοι (σε 2 λεπτά).....	19
5	Το ιδεατό πείραμα [III].....	24
6	Η ζωή χωρίς φακούς.....	27
7	Το σχεδόν υλοποιήσιμο πείραμα.....	32
8	Το πρόβλημα των φάσεων.....	34
9	Το κρυσταλλογραφικό πείραμα.....	37
10	Αλληλεπίδραση ύλης – ακτίνων-X.....	41
11	Φάσματα περίθλασης.....	47
12	Γιατί υπάρχουν 'ανακλάσεις' ;.....	59
13	Επανάληψη πρώτη.....	66
14	Προσδιορισμός φάσεων :	
	Ισόμορφη αντικατάσταση [I].....	71

15 Προσδιορισμός φάσεων :	
Ισόμορφη αντικατάσταση [II].....	86
16 Προσδιορισμός φάσεων :	
MAD, SAD και άλλα τέτοια.....	99
17 Προσδιορισμός φάσεων :	
Μοριακή αντικατάσταση.....	107
18 Το προϊόν και η ερμηνεία του.....	121
19 Επανάληψη δεύτερη.....	136

Μέρος 2^ο : Βαθύτερα νερά

20 ☼ All things Fourier.....	140
21 ☼ Ατομικοί παράγοντες σκέδασης, Εφαρμογές μετασχηματισμών Fourier.....	169
22 ☼ Θεώρημα συνέλιξης, πραγματικό και αντίστροφο πλέγμα, μοριακός μετασχηματισμός.....	188
23 ☼ Το πρόβλημα των φάσεων : Άμεσες μέθοδοι και η συνάρτηση Patterson.....	208
24 Αντί βιβλιογραφίας.....	244

Μέρος 1^ο : Θεμέλιο

ο Don't panic

Για να το διαβάσετε αυτό, έχετε ήδη μπλεχτεί –με τον έναν ή τον άλλο τρόπο– με την κρυσταλλογραφία. Ίσως, μάλιστα, οι πρώτες σας προσπάθειες να βάλετε σε μία τάξη τις βασικές ιδέες να μη στέφθηκαν με απόλυτη επιτυχία. *Don't panic*. Δεν είναι τίποτα. Ό,τι χρειάζεστε για να καταλάβετε τις βασικές αρχές της μεθόδου, το γνωρίζετε ήδη από τα Λυκειακά σας χρόνια. Στόχος αυτού του βιβλίου είναι να βάλει τις θεμελιώδεις ιδέες της κρυσταλλογραφίας σε μία τάξη στο κεφάλι σας, αποφεύγοντας ταυτόχρονα την απότομη έκθεση σε μαθηματικά που ίσως να μη θυμάστε. Προκειμένου να γίνει η είσοδος ιδεών στο κεφάλι σας πιο εύκολη, ο συγγραφέας αποφάσισε να χρησιμοποιήσει (χωρίς πολλές αναστολές είναι η αλήθεια) την παλιά-καλή διδακτική μέθοδο της ελεγχόμενης πολυπλοκότητας [sic]: Αυτά που αναφέρονται σε αυτό το βιβλίο σίγουρα δεν είναι όλη η αλήθεια, και σε μερικές περιπτώσεις δεν είναι καν η αλήθεια όπως είναι γνωστή σήμερα. Το αισιόδοξο

είναι ότι όταν θα είστε σε θέση να αναγνωρίσετε τις υπεραπλουστεύσεις αυτού του βιβλίου, τότε το βιβλίο αυτό θα σας είναι (αισιώς) άχρηστο.

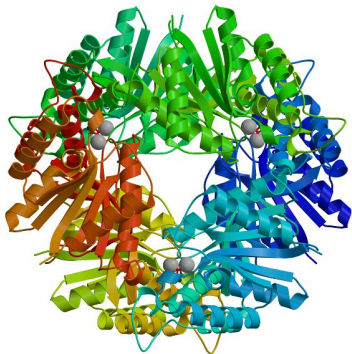
NMG, 2015

ΥΓ(1). Το βιβλίο αυτό είναι το αποτέλεσμα της αποφασιστικότητας με την οποία προπτυχιακοί και μεταπτυχιακοί φοιτητές του Δ.Π.Θ. και του Παν/μίου Κρήτης βασάνισαν τον συγγραφέα μέχρι να εκμαιεύσουν τις απαντήσεις στα ερωτήματα τους. Για τα τυχόν εναπομείναντα θολά σημεία σε αυτό το βιβλίο οι φοιτητές δε φέρουν καμία ευθύνη.

ΥΓ(2). Αυτό το “μη μαθηματική” στον τίτλο του βιβλίου είναι ένα ωμό ψέμα που χρησιμοποίησα για να σας κάνω λίγο πιο δεκτικούς. Ελπίδα του συγγραφέα είναι ότι τα λίγα μαθηματικά που όντως υπάρχουν στα τελευταία κεφάλαια αυτού του βιβλίου παρουσιάζονται τόσο αργά και προσεκτικά ώστε να αρκούν οι αναμνήσεις από το Λύκειο για να τα παρακολουθήσετε. Και το “λίγα” είναι επίσης ψέμα.

1 Ποια είναι η ερώτηση ;

Η ερώτηση που θέλουμε να απαντήσουμε είναι : *Ποια είναι η σχετική θέση των ατόμων της πρωτεΐνης που μελετάμε ; Ποια είναι η δομή της πρωτεΐνης στο χώρο ;* Με άλλα λόγια, θέλουμε να μπορέσουμε να φτιάξουμε μία ακόμα από αυτές τις υπέροχες εικόνες που έχουν κατακλύσει τα περισσότερα συγγράμματα βιοχημείας και μοριακής βιολογίας :



Με ακόμα πιο απλά λόγια, αυτό που θέλουμε είναι να “δούμε” μια πρωτεΐνη σε ατομική διακριτικότητα. Η πεζή πραγματικότητα, βέβαια, είναι ότι το τελικό προϊόν της κρυσταλλογραφίας δεν είναι μία ωραία εικόνα, αλλά ένα αρχείο που περιέχει μια υπερβολικά αναλυτική περιγραφή της φύσης και θέσης (στον τρισδιάστατο χώρο) του κάθε ατόμου της πρωτεΐνης. Ένα παράδειγμα από ένα τέτοιο αρχείο είναι το εξής :

Όνομα πολυπεπτιδικής αλυσίδας					Αύξων αριθμός αμινοξέος					
ΑΤΟΜ	6	CG	MET	A	1	-26.663	31.576	47.042	1.00	67.37
ΑΤΟΜ	7	SD	MET	A	1	-27.271	32.080	45.416	1.00	81.10
ΑΤΟΜ	8	CE	MET	A	1	-26.801	33.812	45.390	1.00	83.44
ΑΤΟΜ	9	N	THR	A	2	-24.839	30.550	49.793	1.00	31.28
ΑΤΟΜ	10	CA	THR	A	2	-23.436	30.184	49.949	1.00	31.78
ΑΤΟΜ	11	C	THR	A	2	-22.705	30.260	48.608	1.00	43.24

X Y Z
 συντεταγμένες του αντίστοιχου ατόμου

Αύξων αριθμός ατόμου Όνομα αμινοξέος
 Τύπος ατόμου

Εικόνα 1: Το τελικό προϊόν της κρυσταλλογραφίας πρωτεϊνών: Απόσπασμα από μία καταχώρηση της Protein Data Bank (PDB) που περιγράφει την ατομική σύσταση και δομή μίας πρωτεΐνης.

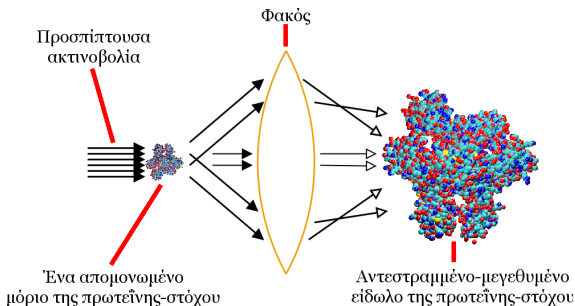
Για να συνοψίσουμε, στόχος μας είναι να προσδιορίσουμε τη θέση του κάθε ατόμου της πρωτεΐνης που μελετάμε. Το τελικό προϊόν είναι ένας μακρύς κατάλογος από τις (x,y,z) συντεταγμένες του κάθε ατόμου σε κάποιο ορθοκανονικό (Καρτεσιανό) σύστημα αναφοράς¹. Σημειώστε ότι η επιλογή του συστήματος αναφοράς δεν αλλάζει σε τίποτα αυτή καθ' αυτή τη δομή της πρωτεΐνης : Η δομή εξαρτάται από τις σχετικές θέσεις των ατόμων μεταξύ τους και είναι ανεξάρτητη από τυχόν περιστροφές και/ή μετατοπίσεις [η δομή μίας πολυθρόνας παραμένει (ευτυχώς) αμετάβλητη όσο και εάν της αλλάξετε θέση στο ορθοκανονικό σύστημα του δωματίου σας].

Κάτι τελευταίο : στο βιβλίο αυτό θα μιλάμε συνέχεια για πρωτεΐνες αλλά να θυμάστε ότι όλα αυτά που θα πούμε ισχύουν αυτούσια και για τον προσδιορισμό των δομών όλων των άλλων τύπων βιομακρομορίων, όπως π.χ. νουκλεϊκών οξέων.

1 Το ορθοκανονικό σύστημα αναφοράς που χρησιμοποιείται δεν είναι αυθαίρετο αλλά εξαρτάται (και ορίζεται) με βάση τη συμμετρία των κρυστάλλων της πρωτεΐνης που μελετάμε. Δε θέλετε να μάθετε περισσότερα.

2 Το ιδεατό πείραμα [I]

Το πλέον άμεσο και απλό πείραμα που θα μπορούσαμε να κάνουμε (βασισμένο στις αρχές της μικροσκοπίας) θα ήταν το εξής :



Εικόνα 2: Το ιδεατό πείραμα. Μία παράλληλη και μονοχρωματική δέσμη ακτινοβολίας σκεδιάζεται από το μόριο-στόχος. Ο φακός αλλάζει τη διεύθυνση διάδοσης των σκεδαζόμενων κυμάτων και επιτρέπει τη δημιουργία του μεγεθυμένου ειδώλου. Προσέξτε την ισοδυναμία της πληροφορίας : Όλη η πληροφορία που περιέχεται στο μεγεθυμένο είδωλο της πρωτεΐνης, προέρχεται από τα κύματα που σκεδάστηκαν από το αντικείμενο (δηλαδή από το μόριο-στόχο).

Μην πάρετε την Εικόνα 2 ελαφρά. Όλες οι κεντρικές ιδέες της κρυσταλλογραφίας είναι κρυμμένες σε αυτήν την εικόνα. Για το λόγο αυτό, θα συζητήσω αυτήν την εικόνα μέχρι εξαντλήσεως. Here we go.

Εάν με κάποιον τρόπο μπορούσαμε να απομονώσουμε ένα μόνο αντίγραφο της πρωτεΐνης που μελετάμε, και εάν μπορούσαμε αυτό το ένα μόριο να το σταθεροποιήσουμε σε κάποια θέση και να το περιστρέφουμε κατά βούληση (όπως φαίνεται στην Εικόνα 2), τότε θα μπορούσαμε να προσδιορίσουμε την τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει με το να “δούμε” την πρωτεΐνη από πολλές διαφορετικές όψεις. Ο λόγος που χρειάζεται να “δούμε” το είδωλο της πρωτεΐνης από πολλές διαφορετικές όψεις (με το να την περιστρέφουμε) είναι ότι αυτό που βλέπουμε στο είδωλο είναι μια δισδιάστατη προβολή του αντικειμένου, και όχι η τρισδιάστατη δομή του. Για μια χαζή παρομοίωση, είναι σαν να θέλατε να βρείτε το πάχος των πτυχώσεων μιας κουρτίνας ενώ την κοιτάτε κάθετα στο βασικό της επίπεδο. Ο τρόπος, βέβαια, να

ανακτήσετε πληροφορία για την τρίτη διάσταση είναι να δείτε το αντικείμενο από πολλές διαφορετικές όψεις (δηλαδή να έχετε πολλές διαφορετικές προβολές).

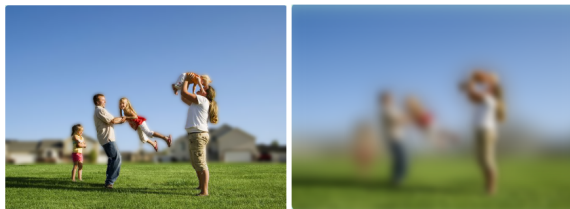
Άρα, το ιδεατό μας πείραμα μέχρι αυτό το σημείο είναι το εξής : πάρε ένα αντίγραφο του βιομορίου που μας ενδιαφέρει, βάλτο μπροστά από μια δέσμη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, και σχημάτισε (μέσω της δράσης του φακού στα κύματα που σκέδασε το μόριο) το ανεστραμμένο-μεγεθυμένο είδωλο. Αυτή είναι η πρώτη μας προβολή της δομής της πρωτεΐνης, η οποία όμως δεν αρκεί για να συνάγουμε την τρισδιάστατη δομή. Στη συνέχεια : περίστρεψε την πρωτεΐνη κατά έναν καλά καθορισμένο τρόπο, και κατέγραψε μία δεύτερη προβολή. Επανέλαβε τη διαδικασία μέχρι να έχεις αρκετή πληροφορία, δηλαδή αρκετές προβολές τόσες ώστε να μπορείς να προσδιορίσεις τις σχετικές θέσεις όλων των ατόμων της πρωτεΐνης.

Όπως καταλαβαίνετε, το ιδεατό μας πείραμα φαίνεται να έχει πολλά-πολλά προβλήματα. Το πρώτο

είναι τι τύπου ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία χρειάζεται για να καταφέρουμε να “δούμε” –ως διακριτές οντότητες– τα άτομα μιας πρωτεΐνης. Προφανώς, η ακτινοβολία που θέλουμε σίγουρα δεν είναι στο ορατό φάσμα, γιατί αλλιώς κάθε φορά που θα βάζατε ένα δείγμα στο απλό οπτικό μικροσκόπιο θα μπορούσατε δυνητικά να βλέπατε τα διακριτά άτομα από τα οποία αποτελείται το δείγμα σας. Το οποίο μας φέρνει στην έννοια της διακριτικής ικανότητας (για συντομία *διακριτικότητας* ή και *διακριτότητας*) και τη σχέση που υπάρχει μεταξύ διακριτικότητας και μήκους κύματος ακτινοβολίας.

Η διακριτικότητα (resolution) είναι ένα μέτρο της λεπτομέρειας/ευκρίνειας που υπάρχει στο *είδωλο* ενός αντικειμένου (και όχι βέβαια στο αντικείμενο αυτό καθ' αυτό). Ένα είδωλο χαμηλής διακριτικότητας περιέχει πληροφορία μόνο για τα αδρά χαρακτηριστικά του αντικειμένου, ένα είδωλο υψηλής διακριτικότητας είναι πλούσιο σε λεπτομέρειες για τη δομή του αντικειμένου. Εάν παρ' ελπίδα κάποιος από εσάς έχετε μυωπία, τότε

γνωρίζετε με βιολογική αμεσότητα τη διαφορά ανάμεσα στην υψηλή και τη χαμηλή διακριτικότητα : το μόνο που έχετε να κάνετε είναι να βάλετε ή να βγάλετε τα γυαλιά σας. Για τους υπόλοιπους, η Εικόνα 3 έχει τις λεπτομέρειες (or not).



Εικόνα 3: Υψηλή διακριτικότητα (αριστερά) και χαμηλή διακριτικότητα (δεξιά). Καθώς η διακριτικότητα μειώνεται, ανεξάρτητα σημεία του ειδώλου ενώνονται φαινομενικά μεταξύ τους.

Η διακριτικότητα έχει μονάδες απόστασης, και ο επίσημος ορισμός είναι ότι διακριτικότητα είναι η ελάχιστη απόσταση προσέγγισης δύο ανεξάρτητων σημείων του ειδώλου πριν αυτά φαινομενικά ενωθούν σε ένα. Στη δομική βιολογία η καθολικά χρησιμοποιούμενη μονάδα διακριτικότητας είναι το

Ångström (Å) το οποίο αντιστοιχεί σε 0.1 nm ή 10^{-10} m. Για να έχετε μία φυσική αίσθηση του μεγέθους, να θυμάστε ότι η διάμετρος του ατόμου του υδρογόνου είναι περίπου 1Å (1.06Å για τους σχολαστικούς).

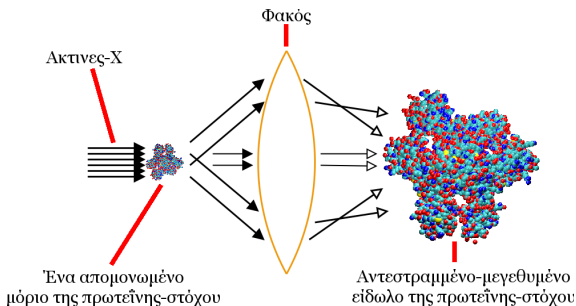
Τώρα έρχεται το δύσκολο σημείο : η μέγιστη δυνατή διακριτικότητα με την οποία μπορεί να καταγραφεί το είδωλο ενός αντικειμένου εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία αυτού του ειδώλου (όσοι δε θυμάστε τι στο καλό είναι το μήκος κύματος, ρίξτε μία ματιά στην Εικόνα 9). Όσο πιο μικρό είναι το μήκος κύματος, τόσο υψηλότερη διακριτικότητα μπορεί να έχει το είδωλο του αντικειμένου. Για τη φυσική ερμηνεία αυτής της σχέσης μεταξύ διακριτικότητας και μήκους κύματος δείτε πάλι την Εικόνα 2 : το είδωλο της πρωτεΐνης σχηματίζεται από τη συμβολή των κυμάτων που σκεδάστηκαν από το μόριο (μετά την παρεμβολή της δράσης του φακού). Το οποίο σημαίνει ότι αυτό που εμείς βλέπουμε ως είδωλο είναι στην πραγματικότητα το αποτέλεσμα της άθροισης πολλών απλών κυμάτων που σκεδάστηκαν από το

αντικείμενο. Άρα, εάν αυτό που επιδιώκουμε είναι να “δούμε” ένα αντικείμενο σε ατομική διακριτικότητα, τότε θα πρέπει τα κύματα που χρησιμοποιούμε να είναι τέτοια ώστε η άθροιση τους να μπορεί να διακρίνει γειτονικά μεταξύ τους άτομα. Εάν η ακτινοβολία έχει πολύ μεγάλο μήκος κύματος, π.χ. 1000\AA , τότε όσα τέτοια κύματα και εάν αθροίσουμε, δεν πρόκειται ποτέ να επιτύχουμε την επιθυμητή διακριτικότητα του $\sim 1\text{\AA}$ γιατί το άθροισμα των κυμάτων θα εξακολουθεί να έχει μήκος κύματος ίσο με 1000\AA . Συνεπώς : αφού αυτό που θέλουμε είναι διακριτικότητα της τάξης του 1\AA (ώστε να μπορούμε να “δούμε” άτομα), η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που χρειαζόμαστε θα πρέπει επίσης να έχει μήκος κύματος της τάξης του 1\AA (ούτως ώστε η άθροιση πολλών τέτοιων κυμάτων να μπορεί να “δείξει” ως διακριτές οντότητες τα γειτονικά άτομα).

Το τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που αντιστοιχεί σε μήκη κύματος της τάξης του 1\AA είναι γνωστό ως ακτίνες-X, εξ ου και το “κρυσταλλογραφία ακτίνων-X”.

3 Το ιδεατό πείραμα [II]

Μετά από όλα αυτά, το ιδεατό μας πείραμα είναι σχεδόν ίδιο με πριν, το μοναδικό που έχει αλλάξει είναι ότι τώρα γνωρίζουμε τι τύπου ακτινοβολία χρειαζόμαστε :



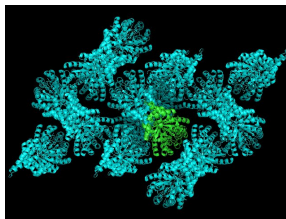
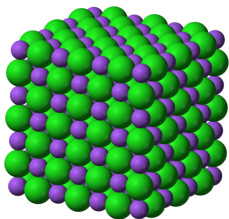
Εικόνα 4: Το ιδεατό πείραμα [II]. Μία παράλληλη και μονοχρωματική δέσμη ακτίνων-X σκεδάζεται από το μόριο-στόχος. Ο φακός αλλάζει τη διεύθυνση διάδοσης των σκεδαζόμενων κυμάτων και επιτρέπει τη δημιουργία του μεγεθυμένου ειδώλου.

Το υποθετικό πείραμά μας εξακολουθεί να έχει πολλά προβλήματα : πώς θα απομονώσουμε ένα και μόνο ένα αντίγραφο της πρωτεΐνης, πώς θα το σταθεροποιήσουμε σε μία θέση, πώς θα μπορέσουμε να το περιστρέψουμε με ακρίβεια και κατά βούληση, και το χειρότερο, θα είναι η σκέδαση από ένα μόνο μόριο αρκετά ισχυρή ώστε να δούμε με ευκρίνεια το είδωλο του μορίου-στόχου ;

Όλα αυτά τα προβλήματα λύνονται εάν μπορέσουμε να παράγουμε κρυστάλλους του υπό μελέτη βιομορίου (το οποίο ερμηνεύει και το “κρυσταλλογραφία” στην κρυσταλλογραφία ακτίνων-X). Πριν συζητήσουμε το πώς η ύπαρξη κρυστάλλων λύνει όλα αυτά τα προβλήματα, ας ανοίξουμε μία μικρή παρένθεση για να πούμε δυο λόγια για το τι είναι οι κρύσταλλοι.

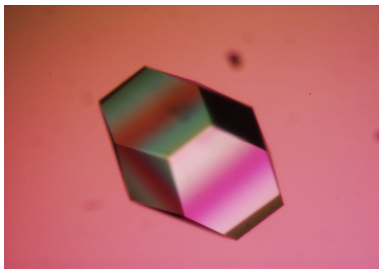
4 Τι είναι οι κρύσταλλοι (σε 2 λεπτά)

Οι κρύσταλλοι είναι μία φάση της στερεάς κατάστασης που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μιας περιοδικής διευθέτησης (στις τρεις διαστάσεις) των ατόμων και μορίων που αποτελούν τον κρύσταλλο. Με εικόνες :



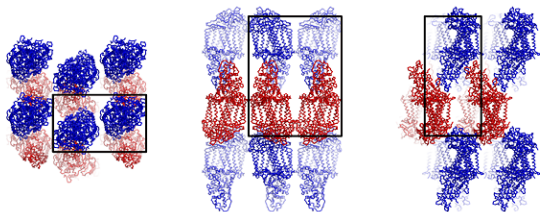
Εικόνα 5 : Περιοδική διευθέτηση ατόμων και μορίων σε κρυστάλλους. Αριστερά μία αναπαράσταση της δομής του χλωριούχου νατρίου, δεξιά ένα μικρό τμήμα από την εσωτερική δομή κρυστάλλων μίας πρωτεΐνης. Και στις δύο περιπτώσεις υπάρχει ένα σταθερό μοτίβο (η λεγόμενη στοιχειώδης κυψελίδα) το οποίο –μέσω της επανάληψης στις τρεις διαστάσεις– δημιουργεί το μακροσκοπικό αντικείμενο που ονομάζεται 'κρύσταλλος'.

Για τα πλαίσια αυτού του βιβλίου ό,τι χρειάζεται να γνωρίζετε είναι μόνο αυτό: Οι κρύσταλλοι δημιουργούνται μέσω της επανάληψης με απλή μετάθεση (δηλαδή χωρίς περιστροφή) ενός βασικού μοτίβου που έχει το σχήμα ενός παραλληλεπίπεδου το οποίο ονομάζεται στοιχειώδης κυψελίδα. Διαδοχικές κυψελίδες (στον τρισδιάστατο χώρο) είναι μεταξύ τους πανομοιότυπες τόσο σε διαστάσεις όσο και σε περιεχόμενα και συγκροτούν το μακροσκοπικό αντικείμενο που ονομάζεται “κρύσταλλος” :



Εικόνα 6 : Ένας ευμεγέθης πρωτεϊνικός κρύσταλλος λυσοζύμης. Η μεγάλη διάσταση του κρυστάλλου ξεπερνά τα 2 χιλιοστά του μέτρου (το οποίο για πρωτεϊνικούς κρυστάλλους είναι πολύ).

Σημειώστε ότι δεν είναι απαραίτητο να υπάρχει μόνο ένα πρωτεϊνικό μόριο ανά στοιχειώδη κυψελίδα. Αντιθέτως : το πλέον συνηθισμένο είναι να υπάρχουν πολλά αντίγραφα της πρωτεΐνης ανά κυψελίδα, με τα αντίγραφα αυτά να σχετίζονται μεταξύ τους μέσω της ύπαρξης επιπλέον στοιχείων συμμετρίας, όπως φαίνεται στο διάγραμμα που ακολουθεί :



Εικόνα 7 : Τρεις ορθοκανονικές όψεις ενός μικρού τμήματος από έναν πρωτεϊνικό κρύσταλλο ο οποίος περιέχει περισσότερα από ένα αντίγραφα της πρωτεΐνης ανά στοιχειώδη κυψελίδα. Οι μαύρες γραμμές δείχνουν τα όρια της στοιχειώδους κυψελίδας, ενώ με μπλε και κόκκινο χρώμα αναπαρίστανται διαφορετικά αντίγραφα της πρωτεΐνης.

Η συμμετρία των κρυστάλλων είναι ένα μεγάλο και

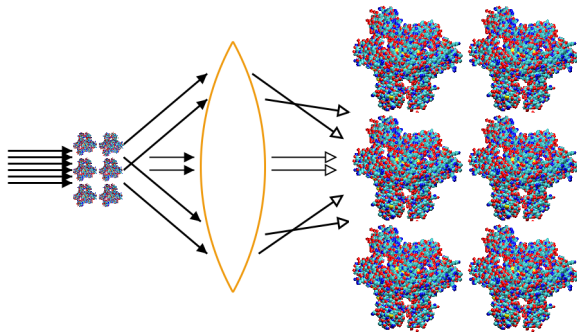
πολύπλοκο κεφάλαιο το οποίο δεν έχει θέση σε αυτό το βιβλίο. Για να έχετε μία αίσθηση της πολυπλοκότητας, να πω ότι υπάρχουν 230 διακριτοί (από άποψη συμμετρίας) τρόποι για να πακετάρεις αντικείμενα με τέτοιο τρόπο ώστε να μπορούν να φτιάξουν έναν κρύσταλλο (οι λεγόμενες ομάδες χώρου, space groups). Δε θέλετε να μάθετε –προς το παρόν– περισσότερα.

Δεν γίνεται να κλείσουμε αυτό το θέμα χωρίς μία έστω εξαιρετικά σύντομη αναφορά στο πώς μπορούμε να δημιουργήσουμε πρωτεϊνικούς κρυστάλλους. Εν τάχει η βασική ιδέα στηρίζεται στην δημιουργία ενός υπέρκορου διαλύματος του υπό μελέτη βιομορίου (υπέρκορο ονομάζεται ένα μετασταθερό διάλυμα στο οποίο η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας είναι υψηλότερη από τη διαλυτότητα ισορροπίας για τις συγκεκριμένες συνθήκες περιβάλλοντος). Η δημιουργία υπέρκορων διαλυμάτων πρωτεϊνών συνήθως επιτυγχάνεται μέσω μιας εξαιρετικά αργής μεταβολής, όπως π.χ. η σταδιακή εξάτμιση του διαλύτη (νερού). Άπαξ και δημιουργηθεί ένα

υπέρκορο διάλυμα πρωτεΐνης (το οποίο είναι ασταθές), υπάρχουν δύο πιθανές λύσεις για να επιστρέψει το διάλυμα σε κατάσταση ισορροπίας : ή η δημιουργία ενός άμορφου ιζήματος της πρωτεΐνης (δεν το θέλουμε αυτό), ή η δημιουργία πρωτεϊνικών κρυστάλλων. Να κλείσουμε αυτήν την παρένθεση λέγοντας πως η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην παραγωγή υψηλής ποιότητας πρωτεϊνικών κρυστάλλων είναι μία χρονοβόρος, επίπονη, και ενίοτε ανεπιτυχής διαδικασία (για την ακρίβεια, η παραγωγή κρυστάλλων κατάλληλων για δομικές μελέτες θεωρείται στις ημέρες μας το καθοριστικό βήμα για τον προσδιορισμό της δομής ενός βιομακρομορίου).

5 Το ιδεατό πείραμα [III]

Εάν με κάποιον τρόπο καταφέρουμε να δημιουργήσουμε κρυστάλλους του υπό μελέτη μακρομορίου, το ιδεατό μας πείραμα γίνεται αυτό που σχηματικά παρουσιάζεται στην Εικόνα 8.



Εικόνα 8 : Το ιδεατό πείραμα παρουσία κρυστάλλων : μία παράλληλη και μονοχρωματική δέσμη ακτίνων-X σκεδάζεται από τον κρύσταλλο, ο φακός αλλάζει τη διεύθυνση των σκεδαζόμενων κυμάτων και επιτρέπει τη δημιουργία του ανεστραμμένου/μεγεθυμένου ειδώλου του κρυστάλλου.

Η ύπαρξη κρυστάλλων λύνει όλα τα προβλήματα που είχαν αναφερθεί προηγουμένως : επειδή ο κρύσταλλος είναι ένα ευμέγεθες μακροσκοπικό αντικείμενο μπορούμε εύκολα να το απομονώσουμε, να το σταθεροποιήσουμε σε μία θέση και να το περιστρέφουμε με ακρίβεια και κατά βούληση ώστε να μπορέσουμε να 'δούμε' τις διαφορετικές προβολές του (πράγμα που χρειάζεται για να προσδιορίσουμε τη δομή του στις τρεις διαστάσεις). Και το καλύτερο από όλα είναι ότι επειδή τώρα έχουμε σκέδαση όχι από ένα, αλλά από εκατομμύρια αντίγραφα της πρωτεΐνης που μελετάμε το πειραματικό σήμα θα είναι πολύ ισχυρότερο και συνεπώς εύκολα μετρήσιμο.

Με τα πολλά, φτάσαμε αισίως στο να ερμηνεύσουμε πλήρως αυτό το “κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ” : Χρειαζόμαστε ακτίνες-Χ για να μπορέσουμε να επιτύχουμε την υψηλή διακριτικότητα που απαιτείται για να 'δούμε' άτομα. Και χρειαζόμαστε κρυστάλλους για να μπορούμε με ακρίβεια να χειριζόμαστε το αντικείμενο που μελετάμε και, κυρίως, για να έχουμε

ένα ισχυρό και εύκολα μετρήσιμο σήμα από το πείραμα.

Δυστυχώς, το ιδεατό μας πείραμα όπως φαίνεται στην Εικόνα 8 είναι μη υλοποιήσιμο πρακτικά: το πολύ μικρό μήκος κύματος των ακτίνων-Χ καθιστά αδύνατη τη δημιουργία φακών κατάλληλων για ένα τέτοιο πείραμα σκέδασης από κρυστάλλους. Ο λόγος είναι ότι δεν υπάρχει υλικό το οποίο να μπορεί να αλλάξει σημαντικά τη διεύθυνση διάδοσης των κυμάτων ακτίνων-Χ με τρόπο αντίστοιχο με αυτό των κλασικών φακών. Αλλά, χρειαζόμαστε στα αλήθεια φακούς;

6 Η ζωή χωρίς φακούς

Κάθε φακός που σέβεται τον εαυτό του θα ήθελε να κάνει ένα και μόνο ένα πράγμα : να αλλάξει (με τρόπο σταθερό και προβλέψιμο) τη διεύθυνση διάδοσης των κυμάτων που προσπίπτουν επάνω του χωρίς όμως να μεταβάλει οποιοδήποτε από τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά αυτών των κυμάτων (δηλαδή το πλάτος τους, τη φάση τους ή το μήκος κύματός τους). Τα κύματα αυτά (μετά την αλλαγή διεύθυνσης εξαιτίας του φακού), συμβάλλουν μεταξύ τους και δημιουργούν το ανεστραμμένο/μεγεθυμένο είδωλο του αντικειμένου.

Ελπίζω να συμφωνείτε πως ο τρόπος με τον οποίο ένας τέτοιος ιδανικός φακός αλλάζει τη διεύθυνση διάδοσης των κυμάτων δεν έχει τίποτα το μυστηριώδες ή το αφύσικο ή το ακατανόητο : Η δράση ενός ιδανικού φακού είναι ένα κατά τα άλλα εύκολα μελετήσιμο, μετρήσιμο και προβλέψιμο φυσικό φαινόμενο, το οποίο σημαίνει ότι η δράση των φακών είναι δυνατό να προσομοιωθεί αναλυτικά

[αυτό το 'αναλυτικά' στην προηγούμενη πρόταση σημαίνει ότι μπορούν να γραφτούν εξισώσεις που να περιγράφουν το υπό μελέτη φαινόμενο. Για την περίπτωση των φακών αυτή η εξίσωση λέγεται 'σύνθεση Fourier', και θα τη συζητήσουμε αναλυτικά αργότερα].

Η κεντρική, λοιπόν, ιδέα αυτής της ενότητας είναι η εξής: Εάν γνωρίζουμε τι συμβαίνει *πριν* από τον φακό, τότε μπορούμε με τη βοήθεια ενός υπολογιστή (για να κάνει τις αριθμητικές πράξεις με τις εξισώσεις) να υπολογίσουμε τι θα συμβεί *μετά* το φακό. Με άλλα λόγια, εάν μπορούμε να μετρήσουμε τα κύματα πριν τον φακό, τότε μπορούμε να υπολογίσουμε το τι θα έκανε ο φακός (εάν υπήρχε) και μπορούμε συνεπώς να δημιουργήσουμε με τη βοήθεια ενός υπολογιστή το ανεστραμμένο/μεγεθυμένο είδωλο του αντικειμένου.

Το οποίο μας φέρνει στο τι σημαίνει αυτό το “να μετρήσουμε τα κύματα πριν τον φακό”. Τι ακριβώς έχουμε να μετρήσουμε ; Αυτό που έχουμε να μετρήσουμε είναι τις ιδιότητες όλων των κυμάτων

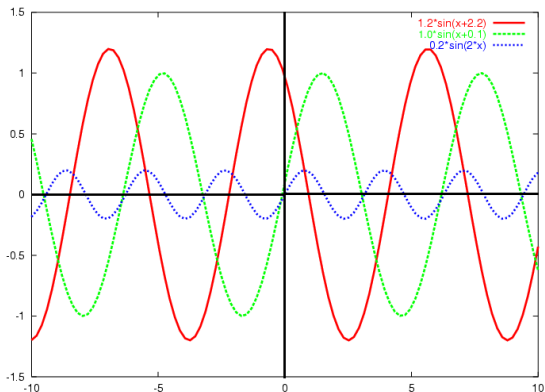
που σκέδασε το αντικείμενο (δηλαδή ο κρύσταλλος). Όπως ίσως θυμάστε από τα Λυκειακά σας χρόνια, οι ιδιότητες εκείνες που χαρακτηρίζουν πλήρως ένα κύμα είναι (δείτε και την Εικόνα 9) οι ακόλουθες :

(α) Η διεύθυνση διάδοσης του κύματος, δηλαδή το προς τα που πηγαίνει αυτό το κύμα στο χώρο,

(β) Το μήκος κύματος (ή ισοδύναμα η συχνότητα) του κύματος (θεωρήστε την ταχύτητα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ως γνωστή και σταθερή),

(γ) Το πλάτος του κύματος (το οποίο είναι ανάλογο με την ένταση/λαμπρότητα του, όσο μεγαλύτερο είναι το πλάτος, τόσο πιο 'φωτεινό' είναι το εν λόγω κύμα), και τέλος,

(δ) Η φάση του κύματος (ή η σχετική φάση εάν έχουμε ένα κύμα αναφοράς) η οποία περιγράφει με ποιο τρόπο γίνεται η περιοδική μεταβολή του κύματος.



Εικόνα 9 : Πλάτος, φάση και μήκος κύματος. Στην εικόνα συγκρίνονται τρία κύματα με διάφορους συνδυασμούς πλατών, φάσεων και μηκών κυμάτων. Επιβεβαιώστε [ίσως και με τη βοήθεια των εξισώσεων στην επάνω δεξιά γωνία του διαγράμματος, $\sin()$ είναι η ημιτονοειδής συνάρτηση και οι εξισώσεις χρησιμοποιούν ακτίνια (και όχι μοίρες)], ότι αναγνωρίζετε με ευκολία τις τρεις αυτές ιδιότητες.

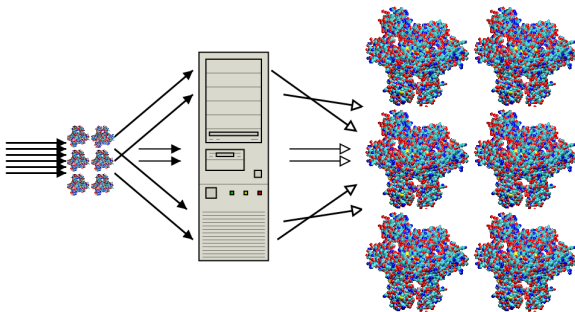
Αυτές οι τέσσερις ιδιότητες περιγράφουν με πληρότητα ένα κύμα, και είναι αυτές οι ιδιότητες που θα πρέπει να μετρηθούν πειραματικά για κάθε ένα

από τα κύματα που σκέδασε ο κρύσταλλος για να μπορέσουμε (με τη βοήθεια της σύνθεσης Fourier που είναι η εξίσωση του φακού) να υπολογίσουμε το μεγεθυμένο είδωλο του πρωτεϊνικού κρυστάλλου.

Έτσι, φτάσαμε επιτέλους σε ένα σχεδόν υλοποιήσιμο κρυσταλλογραφικό πείραμα.

7 Το σχεδόν υλοποιήσιμο πείραμα

Η διευθέτηση στην οποία έχουμε καταλήξει με τα πολλά είναι αυτή :



Εικόνα 10 : Το σχεδόν υλοποιήσιμο πείραμα. Οι ακτίνες-X που περιθλώνονται από τον κρύσταλλο συλλέγονται από έναν ανιχνευτή (που θα πρέπει να τον φανταστείτε να είναι τοποθετημένος εκεί που είναι η εικόνα του υπολογιστή). Μέσω του ανιχνευτή μετράμε τις διευθύνσεις, τα πλάτη και τις φάσεις αυτών των κυμάτων, και μετά – με τη βοήθεια του υπολογιστή– προσομοιώνουμε τη δράση ενός φακού ώστε να ανακτήσουμε το μεγεθυμένο είδωλο του αντικειμένου (δηλαδή, του πρωτεϊνικού κρυστάλλου).

Το πείραμα της Εικόνας 10 είναι αρκετά κοντά στην

πραγματικότητα, με μία μόνο πολύ σημαντική διαφορά που αφορά την ικανότητά μας να μετρήσουμε πειραματικά τις φάσεις (ή τις σχετικές φάσεις) κυμάτων ακτίνων-X :

Οι ακτίνες-X έχουν μικρό μήκος κύματος (το οποίο χρειαζόμαστε για να 'δούμε' άτομα), πράγμα που σημαίνει ότι έχουν πολύ μεγάλη συχνότητα (ίσως να θυμάστε εκείνη η σχέση $v=c/\lambda$ από τα Λυκειακά σας χρόνια). Εφαρμογή αυτής της σχέσης δίνει μία συχνότητα για τις ακτίνες-X της τάξης των $\sim 10^{18}$ Hz, το οποίο σημαίνει ότι τα κύματα αυτά αλλάζουν φάση μερικές δισεκατομμύρια δισεκατομμυρίων φορές μέσα σε ένα δευτερόλεπτο.

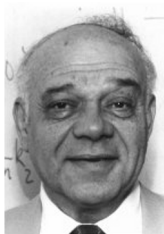
Είναι πειραματικά αδύνατο να μετρηθούν οι φάσεις κυμάτων τόσο υψηλής συχνότητας, το οποίο μας φέρνει στο τελικό πρόβλημα της κρυσταλλογραφίας, το πρόβλημα των φάσεων.

8 Το πρόβλημα των φάσεων

Το πρόβλημα των φάσεων της κρυσταλλογραφίας είναι αυτό : από το πείραμα (και με τη βοήθεια ενός ανιχνευτή ακτίνων-Χ) μπορούμε να προσδιορίσουμε τις διευθύνσεις και τα πλάτη των κυμάτων που περιθλώνται από τους κρυστάλλους, αλλά όχι τις φάσεις τους. Αυτό σημαίνει ότι δεν μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την εξίσωση του φακού (τη σύνθεση Fourier) για να ανακτήσουμε το μεγεθυμένο είδωλο του αντικειμένου (δηλαδή του μακρομοριακού κρυστάλλου).

Στην πραγματικότητα τα πράγματα είναι ακόμα χειρότερα : το τμήμα της πληροφορίας που μας λείπει (δηλαδή οι φάσεις), είναι –τουλάχιστον για την κατηγορία προβλημάτων με την οποία ασχολούμαστε– πιο σημαντικό από την πληροφορία που έχουμε, δηλαδή τα πλάτη των κυμάτων. Τα αποτελέσματα από τον υπολογισμό που φαίνεται στην Εικόνα 11 θα σας πείσουν :

Φάσεις και πλάτη
από Prof Karle



Φάσεις και πλάτη
από Prof Hauptmann



Φάσεις από Prof Karle
Πλάτη από
Prof Hauptmann



Φάσεις από
Prof Hauptmann
Πλάτη από Prof Karle

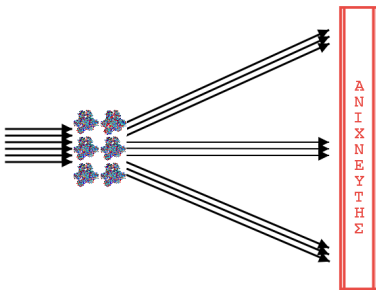
Εικόνα 11 : Η σημασία των φάσεων. Για το σχηματισμό αναγνωρίσιμων ειδώλων αυτών των δύο Νομπελιστών οι φάσεις είναι πολύ πιο σημαντικές από τα πλάτη.

Τα συμπεράσματα από την εικόνα αυτή είναι ξεκάθαρα : η πληροφορία που περιέχεται στις φάσεις είναι αυτή που κυρίως καθορίζει την υπόσταση και την αναγνωρισιμότητα του ειδώλου των εν λόγω αντικειμένων.

Το πρόβλημα των φάσεων είναι το θεμελιώδες κρυσταλλογραφικό πρόβλημα, και οι μέθοδοι επίλυσής του συνιστούν τον πυρήνα της κρυσταλλογραφίας πρωτεϊνών. Το θέμα του πώς προσδιορίζονται οι φάσεις θα αναλυθεί εκτενώς στη συνέχεια αυτού του βιβλίου, αλλά πριν από αυτό, θα πρέπει να κλείσουμε το θέμα του ποιό τελικά είναι το κρυσταλλογραφικό πείραμα.

9 Το κρυσταλλογραφικό πείραμα

... είναι μινιμαλιστικό :



Εικόνα 12: Το κρυσταλλογραφικό πείραμα.

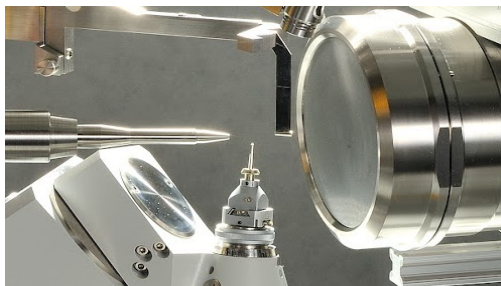
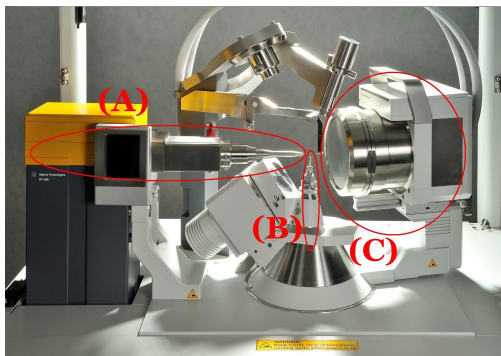
Μία ισχυρή, παράλληλη και μονοχρωματική δέσμη ακτίνων-Χ προσπίπτει στον υπό μελέτη μακρομοριακό κρύσταλλο. Ο κρύσταλλος αλληλεπιδρά με τις ακτίνες-Χ και τις σκεδάζει προς διάφορες διευθύνσεις. Οι σκεδαζόμενες ακτίνες-Χ

συλλέγονται από έναν ανιχνευτή [π.χ. ένα φιλμ ευαίσθητο στην ενέργεια (μήκος κύματος) των ακτίνων-X]. Από τη θέση πρόσπτωσης των κυμάτων στην επιφάνεια του ανιχνευτή μπορούμε να προσδιορίσουμε τη *διεύθυνση* των κυμάτων. Από το πόσο πολύ 'μαυρίζει' το φιλμ σε κάποια θέση, μπορούμε να βρούμε πόσο 'φωτεινό' είναι, δηλαδή πόση ένταση (ενέργεια) είχε το κάθε κύμα. Από την ένταση (φωτεινότητα) όπως την μετράμε στον ανιχνευτή, μπορούμε να προσδιορίσουμε το *πλάτος* των κυμάτων. Το μήκος κύματος των κυμάτων που σκεδάζονται από τον κρύσταλλο είναι ίδιο με αυτό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (ο λόγος για αυτό θα εξηγηθεί στο επόμενο κεφάλαιο). Εάν μπορούσαμε με κάποιο τρόπο να βρούμε και τις φάσεις αυτών των κυμάτων, είχαμε τελειώσει : Θα παίρναμε τις διευθύνσεις, τα πλάτη και τις φάσεις αυτών των κυμάτων, θα τα δίνουμε στην εξίσωση του φακού (σύνθεση Fourier) και θα ανακτούσαμε το μεγεθυμένο είδωλο.

Άρα : από το κρυσταλλογραφικό πείραμα μπορούμε

να προσδιορίσουμε τις διευθύνσεις και τα πλάτη των περιθλώμενων κυμάτων, μας λείπουν οι φάσεις. Εάν μπορέσουμε με κάποιο τρόπο να βρούμε και τις φάσεις, τότε προσομοιώνουμε υπολογιστικά τη δράση ενός υποθετικού φακού, και ανακτάμε το είδωλο της πρωτεΐνης.

Για να έχετε μία αίσθηση με τι περίπου μοιάζει στα αλήθεια ένα κρυσταλλογραφικό πείραμα, η Εικόνα 13 δείχνει δύο όψεις από μία πραγματική πειραματική διάταξη στην οποία διακρίνεται τμήμα του εξοπλισμού παραγωγής ακτίνων-X (αριστερά), η θέση του κρυστάλλου (μαζί με τον εξοπλισμό που απαιτείται για την κατά βούληση περιστροφή του κρυστάλλου, κέντρο), και, τέλος, ο ανιχνευτής ακτίνων-X (δεξιά).

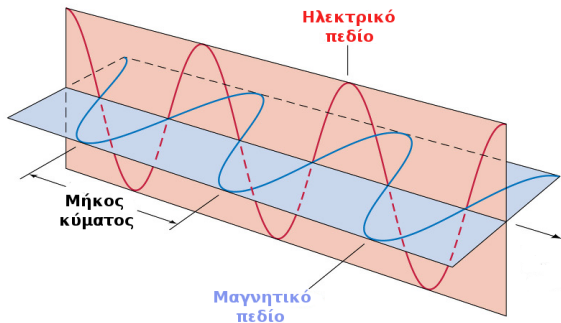


Εικόνα 13: Μία πραγματική διάταξη κρυσταλλογραφικού πειράματος. (A) πηγή ακτίνων-X, (B) κρύσταλλος, (C) ανιχνευτής.

10 Αλληλεπίδραση ύλης – ακτίνων-Χ

Αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο ότι το μήκος κύματος των σκεδαζόμενων από τον κρύσταλλο ακτίνων-Χ είναι ίδιο με αυτό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η ερμηνεία του γιατί ισχύει αυτό απαιτεί να πάμε λιγάκι πίσω και να συζητήσουμε τι είναι αυτή η 'σκέδαση' και πώς δουλεύει. Here we go.

Οι ακτίνες-Χ είναι μία μορφή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και συνεπώς η συνηθισμένη αναπαράσταση με τις δύο κάθετες συνιστώσες ενός μεταβαλλόμενου ηλεκτρικού και ενός μαγνητικού πεδίου ισχύει αυτούσια και για τις ακτίνες-Χ, όπως φαίνεται στην Εικόνα 14.



Εικόνα 14: Αναπαράσταση ηλεκτρομαγνητικού κύματος με τις δύο κάθετες συνιστώσες του μαγνητικού κύματος (οριζόντιο επίπεδο) και του ηλεκτρικού κύματος (στο κάθετο επίπεδο). Το μήκος κύματος (μία πλήρης περίοδος) είναι επίσης σημειωμένο.

Για τα πλαίσια αυτού του βιβλίου αγνοήστε τη μαγνητική συνιστώσα και φανταστείτε τις ακτίνες-X σαν ένα κύμα που αποτελείται από ένα μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (το κύμα που είναι παράλληλο με το επίπεδο του χαρτιού στην Εικόνα 14). Όταν οι ακτίνες-X πέσουν σε ένα υλικό αντικείμενο (π.χ. έναν κρύσταλλο), τότε είναι σαν να έχετε τοποθετήσει ένα μεγάλο πλήθος από φορτία (τα

ηλεκτρόνια και πρωτόνια των ατόμων του κρυστάλλου) μέσα σε ένα μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (αυτό των ακτίνων-Χ). Τώρα : όταν ένα φορτίο βρεθεί εντός ενός ηλεκτρικού πεδίου, του ασκείται δύναμη και το φορτίο επιταχύνεται (και κινείται) ως αποτέλεσμα της ύπαρξης του πεδίου. Επειδή όμως το ηλεκτρικό πεδίο των ακτίνων-Χ είναι μεταβαλλόμενο και περιοδικό, η δύναμη που ασκείται στα φορτία του αντικειμένου θα είναι επίσης περιοδική, και ως αποτέλεσμα, τα ηλεκτρόνια και πρωτόνια του αντικειμένου εκτελούν αυτό που ονομάζεται *εξαναγκασμένη ταλάντωση*. Σε αυτή τη μορφή της κίνησης, τα φορτία επιταχύνονται προς μία κατεύθυνση υπό την επίδραση του πεδίου, αλλά μετά από λίγο το πεδίο αλλάζει φορά με αποτέλεσμα τα φορτία να αποταχυνθούν και να αλλάξουν κατεύθυνση κίνησης επιστρέφοντας προς την αρχική τους θέση. Όταν όμως ένα φορτίο επιταχύνεται (ή αποταχύνεται) γίνεται με τη σειρά του πομπός ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (αυτός είναι ο τρόπος που δουλεύουν οι πομποί της τηλεόρασης, του ραδιοφώνου και της κινητής τηλεφωνίας μεταξύ

άλλων). Επειδή τα φορτία (ηλεκτρόνια και πρωτόνια του κρυστάλλου) εκτελούν εξαναγκασμένη ταλάντωση, η συχνότητα με την οποία ταλαντώνονται είναι ίδια με τη συχνότητα των ακτίνων-X, και συνεπώς η ακτινοβολία που δευτερογενώς εκπέμπουν έχει το ίδιο μήκος κύματος (και, βεβαίως, συχνότητα) με αυτήν της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Υπάρχουν δύο σημαντικά σημεία που πρέπει να σημειώσετε για να μην έχουμε παρανοήσεις στη συνέχεια. Το πρώτο είναι ότι ένα ηλεκτρόνιο ενός ατόμου του κρυστάλλου που εκτελεί εξαναγκασμένη ταλάντωση εκπέμπει ακτινοβολία προς όλες τις διευθύνσεις γύρω του (και όχι προς κάποια συγκεκριμένη διεύθυνση μόνο). Με άλλα λόγια εκπέμπει ένα σφαιρικά διαδιδόμενο κύμα, κάτι ανάλογο (στις δύο διαστάσεις) με τον κυματισμό που προκαλείται όταν ρίξετε μία πέτρα στο νερό, όπως φαίνεται στην Εικόνα 15.

Το δεύτερο είναι ότι στη σκέδαση από τους κρυστάλλους των ακτίνων-X συνεισφέρουν σχεδόν

αποκλειστικά τα ηλεκτρόνια των ατόμων (και όχι οι πυρήνες με τα πρωτόνια τους). Ο λόγος για αυτό είναι ότι τα πρωτόνια έχουν μάζα ~1800 φορές μεγαλύτερη από αυτή των ηλεκτρονίων, συνεπώς το πλάτος της εξαναγκασμένης ταλάντωσης των πρωτονίων είναι πολύ-πολύ μικρότερο από αυτό των ηλεκτρονίων και άρα η συνεισφορά τους στη σκεδαζόμενη (από τους κρυστάλλους) ακτινοβολία είναι αμελητέα. Με άλλα λόγια, σε ό,τι αφορά τη σκέδαση των ακτίνων-X, είναι σαν οι κρύσταλλοι να αποτελούνται μόνο από ηλεκτρόνια.

Για να συνοψίσουμε : με το που τοποθετούμε έναν κρύσταλλο εντός μίας δέσμης ακτίνων-X, κάθε ηλεκτρόνιο του κρυστάλλου αρχίζει να εκτελεί εξαναγκασμένη ταλάντωση, και συνεπώς, κάθε ηλεκτρόνιο γίνεται –δευτερογενώς– πηγή ακτινοβολίας και εκπέμπει προς όλες τις διευθύνσεις ένα σφαιρικό κύμα με το ίδιο μήκος κύματος με αυτό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Το τι κύμα θα «βγει» από ολόκληρο τον κρύσταλλο προς κάποια συγκεκριμένη κατεύθυνση θα είναι το άθροισμα (το

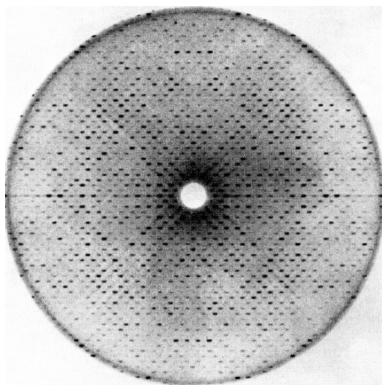
αποτέλεσμα της συμβολής) όλων των κυμάτων από κάθε ηλεκτρόνιο του κρυστάλλου. Για ένα χειροπιαστό –αλλά δισδιάστατο– παράδειγμα του για τι πράγμα μιλάμε δείτε την Εικόνα 15.



Εικόνα 15: Ένα παράδειγμα συμβολής δισδιάστατων κυκλικών (αντί για τρισδιάστατων σφαιρικών) κυμάτων. Το πλάτος και η φάση των κυμάτων που εκπέμπει το σύστημα προς κάποια διεύθυνση είναι το αποτέλεσμα της άθροισης (συμβολής) όλων των κυκλικών κυμάτων προς εκείνη τη διεύθυνση.

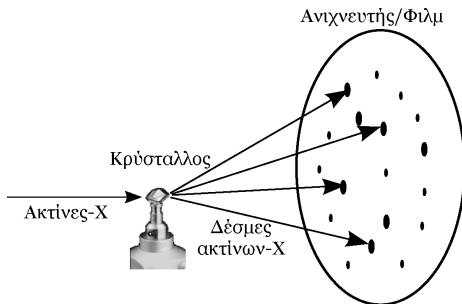
11 Φάσματα περιθλασης

Η εικόνα που ακολουθεί είναι ένα παράδειγμα σκέδασης από έναν πρωτεϊνικό κρύσταλλο, όπου όσο πιο έντονη η αμαύρωση, τόσο μεγαλύτερη η ένταση (και το πλάτος) των κυμάτων ακτίνων-X που έπεσαν στο φιλμ (συγκρίνετε με τις Εικόνες 17, 13 και 12).



Εικόνα 16: Παράδειγμα σκέδασης (περίθλασης) ακτίνων-X από έναν κρύσταλλο όπως καταγράφεται στον ανιχνευτή. Δείτε και την επόμενη εικόνα.

Υπάρχουν αρκετά σημεία που πρέπει να συζητηθούν εδώ. Το πρώτο είναι ότι η σκέδαση από κρυστάλλους είναι 'οργανωμένη' σε ανεξάρτητες (πολλές μεμονωμένες) δέσμες ακτίνων-X: Κάθε μαύρη κουκκίδα στο φιλμ αντιστοιχεί σε μία δέσμη ακτίνων-X που 'βγήκε' από τον κρύσταλλο και έπεσε στον ανιχνευτή/φιλμ, όπως φαίνεται στο σχηματικό διάγραμμα της Εικόνας 17.



Εικόνα 17: Σχηματικό διάγραμμα της περιθλάσης ακτίνων-X από κρυστάλλους. Για το με τι στα αλήθεια μοιάζει μία πραγματική πειραματική διάταξη δείτε την Εικόνα 13.

Θα τα πούμε ξανά (και ξανά) παρακάτω, αλλά αυτά τα κύματα/δέσμες ακτίνων- X που βγαίνουν από τον κρύσταλλο είναι γνωστές ως 'ανακλάσεις' (reflections) ενώ η αλγεβρική τους περιγραφή ονομάζεται 'παράγοντας δομής' (structure factor). Το γιατί η σκέδαση από τους κρυστάλλους είναι οργανωμένη σε διακριτά κύματα θα το συζητήσουμε στο επόμενο κεφάλαιο.

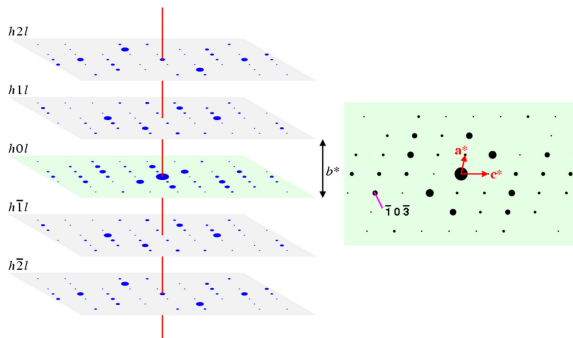
Η λευκή περιοχή στο κέντρο του φιλμ οφείλεται στην παρουσία ενός μεταλλικού εμποδίου ρόλος του οποίου είναι να σταματά την πολύ ισχυρή προσπίπτουσα δέσμη ακτίνων- X από το να χτυπήσει το φιλμ (και να τα 'μαυρίσει' όλα). Μπορείτε να δείτε αυτό το εμπόδιο (γνωστό ως backstop) στο δεύτερο τμήμα της Εικόνας 13 (είναι εκείνο το μαύρο παραλληλόγραμμο που παρεμβάλλεται ανάμεσα στον κρύσταλλο και τον ανιχνευτή).

Το δεύτερο αξιοσημείωτο στοιχείο της Εικόνας 16 είναι η προφανής παρουσία συμμετρίας στο φάσμα περίθλασης, το οποίο, βέβαια, είναι άμεση συνέπεια της ύπαρξης συμμετρίας στους κρυστάλλους. Για

αρχή, σημειώστε ότι όλες οι ανακλάσεις (οι μαύρες κουκκίδες) είναι οργανωμένες σε ένα γεωμετρικό σχήμα, σε ένα πλέγμα με παράλληλες γραμμές. Προσέξτε επίσης ότι το δεξί μισό της εικόνας είναι το κατοπτρικό είδωλο του αριστερού μισού, και ταυτόχρονα το άνω μισό είναι το κατοπτρικό είδωλο του κάτω μισού. Όλη αυτή η τάξη και συμμετρία στο φάσμα περίθλασης ενισχύει την προηγούμενη συζήτηση για την ισοδυναμία της πληροφορίας : Το φάσμα περίθλασης περιέχει όλη την πληροφορία που απαιτείται για τη δημιουργία του ειδώλου του αντικειμένου, και συνεπώς είναι αναμενόμενο ότι ένα συμμετρικό αντικείμενο θα δώσει ένα συμμετρικό φάσμα περίθλασης.

Τώρα έρχεται το δύσκολο σημείο : Αυτό που βλέπετε στην Εικόνα 16 δεν είναι το σύνολο της σκέδασης/περίθλασης από έναν κρύσταλλο. Αυτό που βλέπετε σε αυτήν την εικόνα περιέχει πληροφορία για μία μόνο όψη (προβολή) του τρισδιάστατου αντικειμένου που είναι ο κρύσταλλος, και όχι για την τρισδιάστατη ολότητα του. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει,

προκειμένου να ανακτήσουμε πληροφορία και για τις τρεις διαστάσεις θα πρέπει επαναληπτικά να περιστρέφουμε τον κρύσταλλο και να καταγράψουμε φάσματα περίθλασης από πολλές διαφορετικές όψεις (προβολές) του κρυστάλλου. Ένας τρόπος να φανταστείτε για το τι πράγμα μιλάμε φαίνεται στην Εικόνα 18.



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση του τρισδιάστατου φάσματος περίθλασης από έναν κρύσταλλο. Το αριστερό μισό της εικόνας είναι η πλήρης αναπαράσταση ολόκληρου του φάσματος περίθλασης. Το δεξί μισό δείχνει μία μεγέθυνση ενός μόνο επιπέδου από το τρισδιάστατο φάσμα (είναι το επίπεδο $h0l$ του αριστερού μισού της εικόνας που έχει σημειωθεί με διαφορετικό χρώμα).

Το φάσμα περίθλασης από έναν κρύσταλλο είναι μία τρισδιάστατη οντότητα που μπορείτε να την φανταστείτε ως ένα τρισδιάστατο πλέγμα από ανακλάσεις. Αυτό λοιπόν που βλέπετε στην Εικόνα 16 είναι ένα μόνο επίπεδο από την τρισδιάστατη ολότητα (φανταστείτε ότι η Εικόνα 16 αντιστοιχεί στο επίπεδο με το διαφορετικό χρώμα της Εικόνας 18). Κάθε μία κουκκίδα στην Εικόνα 18 αντιστοιχεί σε ένα κύμα που υπό τις κατάλληλες συνθήκες μπορεί να σκεδαστεί από τον κρύσταλλο. Προκειμένου να συλλέξουμε ένα πλήρες σετ δεδομένων από έναν κρύσταλλο θα πρέπει να τον περιστρέψουμε με τέτοιο τρόπο ώστε όλες αυτές οι ανακλάσεις (κύματα) να μπορούν να καταγραφούν στον ανιχνευτή.

Το ότι η σκέδαση από τους κρυστάλλους είναι οργανωμένη σε διακριτές δέσμες που μπορούν να αναπαρασταθούν σαν ένα τρισδιάστατο πλέγμα, απλοποιεί πολύ το χαρακτηρισμό της διεύθυνσης αυτών των κυμάτων (θυμηθείτε ότι για να χαρακτηρίσουμε ένα κύμα χρειαζόμαστε διεύθυνση,

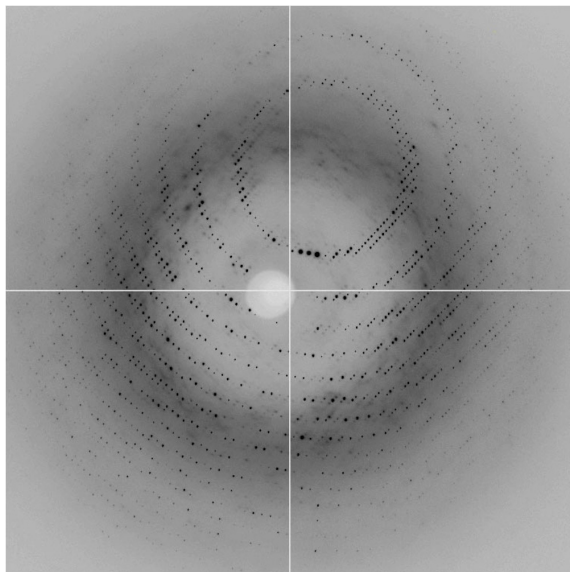
πλάτος, φάση και μήκος κύματος). Αρκεί σε κάθε τέτοιο κύμα (ανάκλαση) να αποδώσουμε τις συντεταγμένες της συγκεκριμένης ανάκλασης στο τρισδιάστατο σύστημα αξόνων που φαίνεται, για παράδειγμα, στην Εικόνα 18. Οι συντεταγμένες αυτές είναι τρεις ακέραιοι αριθμοί που δείχνουν τη θέση κάθε ανάκλασης (κύματος) στο τρισδιάστατο πλέγμα. Οι τρεις αυτοί αριθμοί συμβολίζονται ως h , k , και l (για συντομία hkl) και είναι γνωστοί ως δείκτες Miller (Miller indices). Ένα παράδειγμα με βάση την Εικόνα 18 για να είμαστε σίγουροι: Το επίπεδο με διαφορετικό χρώμα είναι το επίπεδο ($h0l$) το οποίο σημαίνει ότι για όλες αυτές τις ανακλάσεις, ο δείκτης k είναι πάντα μηδέν, ενώ οι άλλοι δύο δείκτες (οι h και l) είναι μεταβλητοί. Στο ίδιο σχήμα –και στο επίπεδο $h0l$ – έχει σημειωθεί η ανάκλαση (κύμα) $-1, 0, -3$ (εκείνες οι παύλες πάνω από τα hkl είναι ο τρόπος των κρυσταλλογράφων να δείχνουν αρνητικούς αριθμούς). Πάνω από το επίπεδο $h0l$, είναι το επίπεδο $h1l$, το οποίο σημαίνει ότι για τις ανακλάσεις εκείνου του επιπέδου ο δείκτης k έχει πάντα τιμή ίση με ένα, ενώ οι άλλοι δύο δείκτες (οι h και l) είναι

μεταβλητοί. Σημειώστε ότι το πλέγμα της Εικόνας 18 θα μπορούσαμε να το είχαμε ζωγραφίσει με έναν τελείως άλλο τρόπο χωρίς όμως να αλλάξει τίποτα στην ουσία του πειράματος. Θα μπορούσαμε, για παράδειγμα, αντί να ζωγραφίζουμε τα επίπεδα $h0l$, $h1l$, $h2l$, ... να ζωγραφίζαμε τα επίπεδα $hk0$, $hk1$, $hk2$, ... κοκ.

Για πληρότητα, ας πούμε και τι είναι αυτά τα a^* , b^* , και c^* που έχουν σημειωθεί στην εικόνα αυτή. Πρόκειται για τα μοναδιαία ανύσματα που ορίζουν τους τρεις άξονες του συστήματος αναφοράς, με το a^* να αντιστοιχεί στους δείκτες h , το b^* στους k , και το c^* στους l . Προς το παρόν δε θέλετε να μάθετε περισσότερα (όπως, π.χ. γιατί μας ήρθε να βάλουμε αστεράκια στα ονόματα των αξόνων).

Ένα τελευταίο σημείο πριν κλείσει αυτό το κεφάλαιο. Υπάρχουν πολλοί τρόποι (πειραματικές διατάξεις) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων, και μερικοί από αυτούς τους τρόπους δεν αναδεικνύουν άμεσα την ύπαρξη της συμμετρίας, παρ' ότι, βέβαια, η συμμετρία

είναι πάντα παρούσα. Ένα παράδειγμα ενός φάσματος περίθλασης που καταγράφηκε μέσω μίας διαφορετικής πειραματικής διάταξης φαίνεται στην Εικόνα 19. Η σκέδαση/περίθλαση από τον κρύσταλλο είναι πάλι οργανωμένη σε διακριτές ανακλάσεις (κουκκίδες) που κάθε μία αντιστοιχεί σε ένα κύμα που σκεδάστηκε από τον κρύσταλλο. Η ύπαρξη του πλέγματος είναι επίσης προφανής (δείτε πώς οι ανακλάσεις είναι οργανωμένες σε παράλληλες γραμμές). Αλλά η άμεση αναπαράσταση της συμμετρίας στις εντάσεις –και συνεπώς και στα πλάτη– των ανακλάσεων φαίνεται να λείπει. Το σημαντικό που πρέπει να κρατήσετε είναι ότι δε λείπει, απλά η μέθοδος συλλογής δεδομένων της Εικόνας 19 δεν επιτρέπει την άμεση ανάδειξή της (σε αντίθεση με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για την Εικόνα 16). Για όσους έχετε καταφέρει να είστε ακόμα συγκεντρωμένοι, να αναφέρω μία ιδέα που συνδέει την Εικόνα 19 με την Εικόνα 18. Δείτε ότι στην Εικόνα 19 οι ανακλάσεις φαίνεται να είναι οργανωμένες σε κάτι που μοιάζει με μία σειρά ομόκεντρων κύκλων.



Εικόνα 19: Παράδειγμα σκέδασης (περίθλασης) ακτίνων-X από έναν κρύσταλλο όπως καταγράφεται στον ανιχνευτή, αλλά χρησιμοποιώντας μια μέθοδο συλλογής δεδομένων διαφορετική από αυτήν της Εικόνας 16. Τις δύο λευκές γραμμές (κάθετη και οριζόντια) μπορείτε να τις αγνοήσετε, είναι συνέπεια της πειραματικής διάταξης που χρησιμοποιήθηκε για την συλλογή αυτών των δεδομένων.

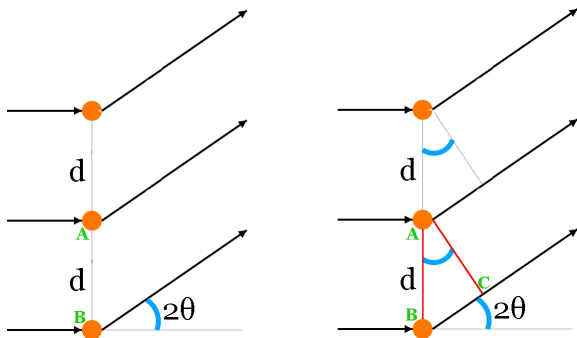
Φανταστείτε ότι κάθε τέτοιος κύκλος είναι το αποτέλεσμα της τομής ανάμεσα σε κάθε ένα από τα διαδοχικά παράλληλα επίπεδα που δείχνει η Εικόνα 18 με μία σφαίρα (που λέγεται 'σφαίρα ανάκλασης', αλλά ξεχάστε ότι το είπα αυτό). Έτσι, για παράδειγμα, φανταστείτε ότι ο μικρός εσωτερικός κύκλος περιέχει ανακλάσεις που ανήκουν στο επίπεδο $h,-1,l$, ο επόμενος κύκλος (που περνάει από τη λευκή περιοχή) περιέχει ανακλάσεις του τύπου $h,0,l$, ο επόμενος έχει μερικές από τις ανακλάσεις του τύπου $h,1,l$, μετά οι $h,2,l$, οι $h,3,l$, κοκ. Από αυτήν την άποψη, η Εικόνα 19 αναδεικνύει την τρισδιάστατη υπόσταση του φάσματος περίθλασης καλύτερα απ' ό τι η Εικόνα 16 και εξηγεί γιατί πρέπει να περιστρέψουμε τον κρύσταλλο ώστε να συλλέξουμε όλα τα δεδομένα περίθλασης.

Μια τελευταία κουβέντα. Ίσως να παρατηρήσατε ότι έχω αρχίσει συστηματικά να μπερδεύω τις λέξεις 'σκέδαση' και 'περίθλαση', μερικές φορές στην ίδια πρόταση. Για τους σχολαστικούς, ας κλείσουμε και αυτό το θέμα με έναν ορισμό. Περίθλαση είναι το

μακροσκοπικό αποτέλεσμα της σκέδασης από έναν κρύσταλλο. Ξανά : σκέδαση είναι αυτό που συμβαίνει σε μικροσκοπικό επίπεδο (άσχετα με το εάν ένα αντικείμενο είναι κρυσταλλικό ή όχι), περίθλαση είναι το μακροσκοπικό αποτέλεσμα της σκέδασης από ένα περιοδικό αντικείμενο (με διακριτές, μεμονωμένες δέσμες ακτίνων-Χ που έχουν τάξη, συμμετρία κ.ο.κ.).

12 Γιατί υπάρχουν 'ανακλάσεις' ;

Στο προηγούμενο κεφάλαιο είδαμε ότι η σκέδαση από κρυστάλλους είναι οργανωμένη σε μεμονωμένες/ διακριτές δέσμες ακτίνων-X. Αυτό είναι συνέπεια της περιοδικότητας των κρυστάλλων. Είναι ώρα να το εξηγήσουμε αυτό. Δείτε το αριστερό τμήμα της Εικόνας 20.



Εικόνα 20: Σκέδαση από ένα μονοδιάστατο κρύσταλλο. Οι πορτοκαλί κύκλοι αντιστοιχούν σε μεμονωμένα ηλεκτρόνια, η προσπίπτουσα ακτινοβολία έρχεται από αριστερά.

Αυτό που βλέπετε στο αριστερό μισό της Εικόνας 20 είναι μία περιοδική διευθέτηση σκεδαστών (π.χ. μεμονωμένων ηλεκτρονίων) που σχηματίζουν ένα μονοδιάστατο κρύσταλλο με περιοδικότητα (απόσταση επανάληψης) ίση με d). Προφανώς αυτό που βλέπουμε είναι ένα πολύ μικρό τμήμα αυτού του υποθετικού μονοδιάστατου κρυστάλλου (ο οποίος συνεχίζεται επ' άπειρον προς τα πάνω και προς τα κάτω). Αυτό που θέλουμε να βρούμε είναι το σε ποιες διευθύνσεις αυτός ο κρύσταλλος όντως θα εκπέμπει ακτινοβολία (δηλαδή θα περιθλάσει). Επειδή το παράδειγμα είναι μονοδιάστατο, η διεύθυνση μπορεί να περιγραφεί από μία γωνία, ας την πούμε 2θ (μη ασχοληθείτε προς το παρόν με το γιατί αντί να γράψω την γωνία θ την εγραψα 2θ). Here we go.

Αυτό που θα βγει από τον κρύσταλλο στη διεύθυνση 2θ θα είναι το άθροισμα (το αποτέλεσμα της συμβολής) όλων των κυμάτων που εκπέμπονται από όλους τους σκεδαστές. Το κύμα που εκπέμπει το ηλεκτρόνιο της θέσης 'Α' προς τη διεύθυνση 2θ ίσως να έχει διαφορά φάσης σε σχέση με το κύμα που

εκπέμπει το ηλεκτρόνιο της θέσης 'B' (προς την ίδια διεύθυνση). Ο λόγος για αυτό γίνεται κατανοητός εάν εστιάσετε στο κόκκινο ορθογώνιο τρίγωνο στο δεξί μισό της Εικόνας 20. Το κύμα που εκπέμπεται από το B έχει *διαφορά δρόμου* (σε σχέση με αυτό από το A) και αυτή η διαφορά δρόμου είναι ίση με την απόσταση BC. Το δύσκολο σημείο τώρα : η απόσταση BC καθορίζει τη διαφορά φάσης μεταξύ των κυμάτων που εκπέμπουν τα A και B στη διεύθυνση 2θ . Αν π.χ. η απόσταση BC είναι ίση με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας (ή ίση με π.χ. δύο φορές το μήκος κύματος), τότε το κύμα που εκπέμπει το B θα προλάβει (στην απόσταση BC) να κάνει έναν (ή δύο) πλήρεις κύκλους, και συνεπώς δε θα υπάρχει διαφορά φάσης ανάμεσα στα κύματα που προέρχονται από τα A και B. Σε αυτήν την περίπτωση τα κύματα αυτά θα συμβάλουν θετικά και θα ενισχύσει το ένα το άλλο. Αν από την άλλη, το μήκος του BC είναι π.χ. το μισό του μήκους κύματος, τότε το κύμα από το B θα προλάβει (σε σχέση με το κύμα από το A) να κάνει μόνο μισό κύκλο, και τα δύο κύματα θα βρεθούν να είναι ακριβώς εκτός φάσης (και θα αναιρέσει το ένα το

άλλο). Ας κάνουμε λίγη γεωμετρία στο κόκκινο ορθογώνιο τρίγωνο της Εικόνας 20. Η γωνία της κορυφής A (δηλαδή η γωνία BAC) είναι ίση με την γωνία 2θ (επειδή οι πλευρές είναι μεταξύ τους κάθετες). Το ημίτονο, λοιπόν, αυτής της γωνίας είναι $\sin(2\theta) = BC/AB = BC/d$ όπου \sin είναι ο συμβολισμός για το ημίτονο (cos για το συνημίτονο, tan για την εφαπτομένη). Λύνοντας για το BC έχουμε $BC = d \cdot \sin(2\theta)$. Προκειμένου τα κύματα που εκπέμπονται από τα A και B να είναι σε φάση (δηλαδή, να ενισχύει το ένα το άλλο), θα πρέπει το BC να είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της ακτινοβολίας (ας συμβολίσουμε το μήκος κύματος με το γράμμα ' λ '). Άρα, η συνθήκη για την ενισχυτική συμβολή των κυμάτων στην περίπτωση που εξετάζουμε είναι

$$d \cdot \sin(2\theta) = n \cdot \lambda$$

όπου (n) είναι ένας ακέραιος, (λ) είναι το μήκος κύματος, (d) είναι η περιοδικότητα του κρυστάλλου, και (2θ) η διεύθυνση του εκπεμπόμενου κύματος. Δύο πράγματα είναι σημαντικά εδώ. Το πρώτο είναι ότι

αυτή η λύση θετικής συμβολής που βρήκαμε ισχύει για όλα τα πιθανά ζεύγη σκεδαστών και όχι μόνο για τα A-B (εάν σας αρέσουν οι ασκήσεις γεωμετρίας, μπορείτε να δείξετε ότι όταν ισχύει η συνθήκη για τους σκεδαστές A-B, τότε θα ισχύει και για π.χ. το σκεδαστή που είναι πάνω από το A με το B). Το δεύτερο σημαντικό να προσέξετε είναι ότι η εξίσωση αυτή έχει λύσεις για πολλές τιμές του (n), και ότι διαδοχικές λύσεις (για $n=1, 2, 3, \dots$ ή $n=-1, -2, -3, \dots$) αντιστοιχούν σε διαδοχικά μεγαλύτερες απόλυτες τιμές του $d \cdot \sin(2\theta)$, και συνεπώς σε διαδοχικά μεγαλύτερες τιμές του $\sin(2\theta)$, και συνεπώς σε διαδοχικά μεγαλύτερες τιμές της γωνίας 2θ . Χρησιμοποιήστε τώρα δημιουργικά τη φαντασία σας και δε θα δυσκολευτείτε να δείτε ότι αυτόν τον ακέραιο αριθμό (n) τον ξαναείδαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο αλλά με άλλο όνομα : ήταν ο δείκτης Miller (h) [και εάν ήμασταν στις δύο διαστάσεις θα ήταν οι δείκτες hk , και στις τρεις οι δείκτες hkl].

Κάτι τελευταίο πριν κλείσουμε και αυτό το θέμα. Αυτό που βρήκαμε σε αυτό το κεφάλαιο είναι μία

γεωμετρική συνθήκη προκειμένου να υπάρχει περίθλαση από έναν κρύσταλλο (δηλαδή βρήκαμε σε ποιές διευθύνσεις θα περιμέναμε δυνητικά να δούμε περίθλαση). Δε μάθαμε όμως τίποτα για το τι πλάτη και φάσεις θα έχουν το κάθε ένα από τα κύματα αυτά. Όντως, η εξίσωση (συνθήκη περίθλασης) που βρήκαμε εξαρτάται μόνο από το (d) δηλαδή τις διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας και όχι από το τι περιέχεται σε αυτήν την κυψελίδα. Άρα : το σε ποιές διευθύνσεις θα παρατηρήσουμε περίθλαση εξαρτάται μόνο από τις διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας, και δυστυχώς αυτό δε μας μαθαίνει απολύτως τίποτα για την ουσία του πράγματος, που είναι το ποιά είναι τα πλάτη και οι φάσεις αυτών των κυμάτων (που είναι αυτά που χρειαζόμαστε για να δημιουργήσουμε το είδωλο του αντικειμένου).

Επειδή αυτό είναι σημαντικό, θα πω την ίδια ιδέα με άλλο τρόπο. Ξυπνήστε. Με το που βάζουμε έναν κρύσταλλο μέσα σε μία δέσμη ακτίνων-X, κάθε ηλεκτρόνιο κάθε ατόμου ολόκληρου του κρυστάλλου γίνεται δευτερογενώς πηγή ακτινοβολίας και αρχίζει

να εκπέμπει σφαιρικά ένα κύμα. Όλα αυτά τα κύματα κάνουν αυτό που πάντα κάνουν τα κύματα, δηλαδή συμβάλλουν όλα μεταξύ τους. Επειδή ο κρύσταλλος είναι περιοδικό αντικείμενο, σε μερικές διευθύνσεις που εξαρτώνται από τη γεωμετρία (αλλά όχι τα περιεχόμενα) του κρυστάλλου, αυτά τα κύματα συμβάλλουν θετικά και παρατηρούμε περίθλαση. Το πλάτος και η φάση του κύματος που τελικά θα βγει από τον κρύσταλλο σε κάποια διεύθυνση (hkl) είναι το άθροισμα (το αποτέλεσμα συμβολής) όλων των κυμάτων από κάθε ηλεκτρόνιο κάθε ατόμου ολόκληρου του κρυστάλλου στη διεύθυνση (hkl). Το ποιο όμως θα είναι το πλάτος και η φάση του κάθε τέτοιου κύματος εξαρτάται από τις σχετικές θέσεις (τη δομή) των ηλεκτρονίων του κρυστάλλου. Άρα : σε κάθε κύμα που βγαίνει από τον κρύσταλλο συνεισφέρουν όλα τα ηλεκτρόνια του κρυστάλλου. Οι διευθύνσεις στις οποίες θα δούμε περίθλαση καθορίζονται από τις διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας, το πλάτος και η φάση των κυμάτων καθορίζεται από την εσωτερική δομή του κρυστάλλου (που είναι αυτό που τελικά θέλουμε να βρούμε).

13 Επανάληψη πρώτη

Θέλουμε να 'δούμε' βιομακρομόρια σε ατομική διακριτικότητα. Χρειαζόμαστε ακτίνες-X γιατί αυτές έχουν αρκετά μικρό μήκος κύματος ούτως ώστε να μπορέσουμε όντως να δούμε (να διακρίνουμε) άτομα. Χρειαζόμαστε κρυστάλλους για να έχουμε αρκετά ισχυρό σήμα και για να μπορούμε κατά βούληση να αλλάζουμε τη θέση του αντικειμένου ώστε να μπορούμε να συλλέξουμε τα τρισδιάστατα δεδομένα. Δεν υπάρχουν φακοί για ακτίνες-X, και το μήκος κύματός τους είναι τόσο μικρό (η συχνότητά τους τόσο υψηλή) που δεν μπορούμε να μετρήσουμε τις φάσεις τους. Το μοναδικό που μπορούμε να κάνουμε είναι να συλλέξουμε τα κύματα που σκεδάζει ο κρύσταλλος με τη βοήθεια ενός ανιχνευτή (π.χ. φιλμ) μέσω του οποίου μπορούμε μόνο να μετρήσουμε το πλάτος (ένταση) των κυμάτων. Από τη θέση πρόσπτωσης των κυμάτων στον ανιχνευτή (και δεδομένου ότι γνωρίζουμε τη σχετική θέση κρυστάλλου-ανιχνευτή) μπορούμε να βρούμε τη

διεύθυνση των κυμάτων. Επειδή στην περίπτωση των κρυστάλλων η σκέδαση έχει τη μορφή από διακριτές δέσμες (κύματα) ακτίνων-Χ, η διεύθυνση του κάθε ενός από τα περιθλώμενα (από τον κρύσταλλο) κύματα μπορεί να χαρακτηριστεί με τρεις ακεραίους αριθμούς, τους δείκτες (hkl). Από την αμαύρωση του ανιχνευτή/φίλμ μπορούμε να βρούμε το πλάτος του κάθε (hkl) κύματος. Το μήκος κύματος αυτών των κυμάτων είναι γνωστό (και ίσο με αυτό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας). Άρα τα πρωταρχικά δεδομένα από ένα κρυσταλλογραφικό πείραμα είναι ένα κατεβατό του τύπου :

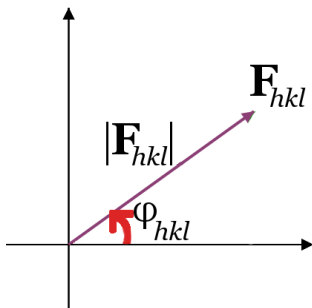
h	k	l	$ \mathbf{F}_{hkl} $	$\sigma(\mathbf{F}_{hkl})$
-2	-1	0	232	23
-2	0	1	52	6
...

όπου κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε ένα περιθλώμενο από τον κρύσταλλο κύμα (και υπάρχουν χιλιάδες

τέτοιες γραμμές, όσες τα κύματα που μετρήθηκαν), τα hkl είναι οι δείκτες που περιγράφουν τη διεύθυνση του κύματος, το $|\mathbf{F}_{hkl}|$ είναι το πλάτος (το μέτρο) του κύματος με διεύθυνση hkl , και το $\sigma(|\mathbf{F}_{hkl}|)$ είναι μία εκτίμηση του πειραματικού σφάλματος της μέτρησης αυτού του πλάτους (είναι η τυπική απόκλιση της μέτρησης). Εάν τα δεδομένα μας περιείχαν ακόμα μία στήλη με τις φάσεις αυτών των κυμάτων, δε θα είχαμε τίποτα να κάνουμε : θα δίναμε τα $h, k, l, |\mathbf{F}_{hkl}|, \varphi_{hkl}$ (όπου φ_{hkl} η φάση του κύματος hkl) σε ένα πρόγραμμα υπολογιστών που κάνει συνθέσεις Fourier (είναι η εξίσωση του φακού), και θα παίρναμε πίσω το είδωλο του κρυστάλλου σε ατομική διακριτικότητα. Δεν έχουμε τις φάσεις των κυμάτων και αυτό είναι το πρόβλημα των φάσεων της κρυσταλλογραφίας (και η αιτία που υπάρχει αυτό το βιβλίο).

Μιας, και όπως σίγουρα παρατηρήσατε, άρχισα πολύ ήμερα, ήπια και διακριτικά να εισάγω μερικούς συμβολισμούς, ας τους πούμε και χωρίς αναστολές μία φορά ακόμα για να είμαστε σίγουροι : τα hkl είναι οι ακέραιοι δείκτες που ταυτοποιούν το για ποιο

συγκεκριμένο κύμα μιλάμε. Το \mathbf{F}_{hkl} είναι ο λεγόμενος παράγοντας δομής (structure factor) και το σύμβολο αυτό αναπαριστά με πληρότητα (δηλαδή τόσο κατά πλάτος όσο και κατά φάση) το κύμα με διεύθυνση hkl . Ο τρόπος να το οπτικοποιήσετε αυτό είναι να φαντάζεστε κάθε ένα από τα \mathbf{F}_{hkl} σαν ένα άνυσμα σε ένα ορθοκανονικό σύστημα αξόνων :



Εικόνα 21: Αναπαράσταση του παράγοντα δομής ως ένα άνυσμα. Το μέτρο (μήκος) του ανύσματος αντιστοιχεί στο πλάτος $|\mathbf{F}_{hkl}|$ του κύματος, η γωνία ανάμεσα στο άνυσμα και τον άξονα των x αντιστοιχεί στη φάση φ_{hkl} του κύματος. Η σύμβαση είναι ότι οι θετικές φάσεις μετρώνται αριστερόστροφα (όπως στο σχήμα), ενώ οι αρνητικές δεξιόστροφα.

Το μέτρο (μήκος) του ανύσματος αντιστοιχεί στο πλάτος του κύματος και η γωνία που σχηματίζει το άνυσμα με τον άξονα των x αντιστοιχεί στη φάση του κύματος (καλύτερα, αντιστοιχεί στη σχετική φάση του παράγοντα δομής σε σχέση με ένα κύμα αναφοράς). Το πλάτος και η φάση του κάθε παράγοντα δομής καθορίζεται από τη δομή του κρυστάλλου : Σε κάθε παράγοντα δομής (σε κάθε περιθλώμενο κύμα) συνεισφέρουν όλα τα ηλεκτρόνια όλων των ατόμων του κρυστάλλου. Το πλάτος και η φάση του F_{hkl} είναι, λοιπόν, το αποτέλεσμα της συμβολής των κυμάτων που σκέδασαν όλα τα ηλεκτρόνια του κρυστάλλου στη διεύθυνση hkl . Οι διαφορές στα πλάτη και τις φάσεις των διαφορετικών F_{hkl} οφείλονται στο ότι τα κύματα (από όλα τα ηλεκτρόνια του κρυστάλλου) συμβάλλουν με διαφορετικό τρόπο σε διαφορετικές διευθύνσεις (δείτε την Εικόνα 15 ξανά : παρ' ότι η δομή των 'σκεδαστών' είναι πάντα η ίδια, σε διαφορετικές διευθύνσεις το σύστημα σκεδάζει διαφορετικά). Είμαστε πλέον έτοιμοι να πάρουμε μία γεύση από το πώς θα μπορούσε να λυθεί το πρόβλημα των φάσεων.

14 Προσδιορισμός φάσεων : Ισόμορφη αντικατάσταση [I]

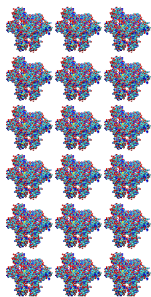
Στόχος αυτού του κεφαλαίου είναι να σας δώσει μία ιδέα του πώς θα μπορούσαμε να βρούμε τις φάσεις που μας λείπουν. Το υπεραπλουστευμένο παράδειγμα που ακολουθεί βασίζεται σε μία μέθοδο που είναι γνωστή με το όνομα ισόμορφη αντικατάσταση (isomorphous replacement), αλλά ξεχάστε προς το παρόν ότι το είπα αυτό. Για αυτά που θα πούμε παρακάτω –και προκειμένου να κάνουμε το παράδειγμα πιο κατανοητό– θα υποθέσουμε ότι οι φάσεις των κυμάτων που περιθλώνται από τον κρύσταλλο μπορούν να έχουν μόνο δύο πιθανές τιμές : ή θα έχουν φάση μηδέν μοίρες (και θα τις λέμε 'θετικές' φάσεις) ή θα έχουν φάση 180 μοιρών (και θα τις λέμε 'αρνητικές'). Αυτό δεν είναι ένα τελείως φανταστικό σενάριο : όντως ανάλογα με τη συμμετρία των κρυστάλλων μερικές κατηγορίες ανακλάσεων έχουν φάσεις ή θετικές ή αρνητικές (και όχι γενικές, δηλαδή οτιδήποτε ανάμεσα στις μηδέν

και τις 360 μοίρες). Το πώς λύνουμε το πρόβλημα στη γενική περίπτωση (όπου οι φάσεις μπορούν να έχουν οποιαδήποτε τιμή) θα το πούμε στο επόμενο κεφάλαιο.

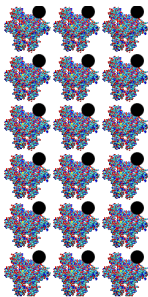
Η ουσία της μεθόδου της ισόμορφης αντικατάστασης όπως θα δούμε παρακάτω είναι να απλοποιήσει δραματικά το πρόβλημα φάσεων και όχι να το λύσει. Δουλεύει ως εξής :

Υπάρχουν μεταλλικά στοιχεία (όπως π.χ. ο υδράργυρος) τα οποία λατρεύουν να φτιάχνουν ισχυρούς δεσμούς με τις πλευρικές ομάδες διάφορων αμινοξικών καταλοίπων πρωτεϊνών (όπως, π.χ. με την πλευρική ομάδα της κυστεΐνης). Επειδή οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι περιέχουν (με τη μορφή καναλιών, Εικόνα 5) ~50% υδατικό διάλυμα, είναι εφικτό να εκθέσουμε τους πρωτεϊνικούς κρυστάλλους σε ένα διάλυμα που περιέχει τέτοια βαριά μεταλλικά στοιχεία και –μέσω διάχυσης– τα βαρέα αυτά άτομα να αλληλεπιδράσουν και να συνδεθούν ισχυρά και σταθερά με τα πρωτεϊνικά μόρια. Επειδή αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι ειδικές, όλα τα πρωτεϊνικά

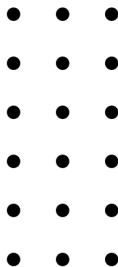
μόρια στον κρύσταλλο συνδέονται με βαρέα άτομα με τον ίδιο τρόπο και, συνεπώς, καταλήγουμε με μία τροποποιημένη μορφή των πρωτεϊνικών κρυστάλλων. Αυτή η τροποποιημένη μορφή είναι καθ' όλα ίδια με την αρχική δομή των κρυστάλλων εκτός από την προσθήκη ενός βαρέως ατόμου στην ίδια ακριβώς θέση κάθε πρωτεϊνικού μορίου που περιέχει ο κρύσταλλος όπως φαίνεται στην Εικόνα 22.



Φυσικοί
κρυστάλλοι



Κρυστάλλοι
με βαρέα άτομα



Δομή
βαρέων ατόμων

Εικόνα 22: Ειδική πρόσδεση βαρέων ατόμων (μαύροι κύκλοι) σε πρωτεϊνικούς κρυστάλλους.

Σημειώστε δύο πράγματα εδώ. Το πρώτο είναι ότι δεν έχουμε ιδέα σε ποια θέση της πρωτεΐνης (και, βέβαια, σε ποια θέση στη στοιχειώδη κυψελίδα) έχουν δεθεί τα βαρέα άτομα. Το δεύτερο είναι ότι δεν μπορούμε να γνωρίζουμε από πριν το συνολικό αριθμό βαρέων ατόμων ανά πρωτεΐνη (θα μπορούσαμε να έχουμε δύο ή και περισσότερες θέσεις πρόσδεσης ανά πρωτεΐνη).

Τώρα που έχουμε τόσο τους φυσικούς όσο και τους τροποποιημένους κρυστάλλους, μπορούμε να προχωρήσουμε με το πείραμα. Κάνουμε μία πλήρη συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων από τους φυσικούς –μη τροποποιημένους– κρυστάλλους και (αγνοώντας τις τυπικές αποκλίσεις) καταλήγουμε με μία ωραία μεγάλη λίστα ανακλάσεων του τύπου $h, k, l, |\mathbf{F}_{P, hkl}|$, όπου hkl είναι οι δείκτες Miller και $|\mathbf{F}_{P, hkl}|$ είναι τα πλάτη των ανακλάσεων hkl όπως μετρήθηκαν από αυτούς τους φυσικούς πρωτεϊνικούς κρυστάλλους (το κεφάλαιο Αγγλικό 'P' στον δείκτη είναι από τη λέξη 'Protein'). Στη συνέχεια κάνουμε μία πλήρη συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων από τους τροποποιημένους κρυστάλλους (ας τους

συμβολίζουμε 'PH' για 'Protein plus Heavy atoms') και παίρνουμε πάλι τη λίστα των ανακλάσεων $h, k, l, |F_{PH, hkl}|$. Σε αυτές τις δύο λίστες, τα hkl είναι τα ίδια (γιατί οι διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας υποθέσαμε ότι δεν έχουν αλλάξει), και το μόνο που έχει αλλάξει είναι τα πλάτη των ανακλάσεων: Για κάποιο συγκεκριμένο hkl η διαφορά ανάμεσα στο $|F_{P, hkl}|$ και στο $|F_{PH, hkl}|$ είναι ίση με το πόσο έχουν συνεισφέρει τα βαρέα άτομα στη σκέδαση κατά μήκος της διεύθυνσης hkl . Άρα, το προϊόν του πειράματος είναι ένας μεγάλος πίνακας με τιμές για τα $h, k, l, |F_{P, hkl}|, |F_{PH, hkl}|$. Για να κάνουμε τη ζωή μας πιο εύκολη, θα βγάλουμε από τη μέση αυτό το hkl από τους δείκτες των F 's, και αντί να γράφουμε $|F_P|$ για να συμβολίσουμε το πλάτος κάποιας ανάκλασης, θα γράφουμε F_P (με το F μη εμφατικό). Με αυτόν το νέο συμβολισμό, τα πειραματικά δεδομένα μας είναι h, k, l, F_P, F_{PH} , όπου F_P είναι το πλάτος της ανάκλασης hkl από τους φυσικούς κρυστάλλους και F_{PH} το πλάτος της ίδιας ανάκλασης από τους τροποποιημένους.

Αυτό που έχουμε κάνει μέχρι τώρα φαίνεται να είναι

μία τρύπα στο νερό. Να το εξηγήσω αυτό. Υποθέστε ότι για κάποια συγκεκριμένη ανάκλαση hkl βρήκαμε ότι το πλάτος από τους φυσικούς κρυστάλλους είναι 15 μονάδες. Το πρόβλημα της φάσης (για το συγκεκριμένο παράδειγμα που εξετάζουμε) έγκειται στο ότι δε γνωρίζουμε αν το συγκεκριμένο κύμα έχει θετική ή αρνητική φάση, δηλαδή εάν ο παράγοντας δομής F_P είναι +15 ή -15 (προσέξτε ότι με το που έβαλα το πρόσημο της φάσης μίλησα για 'παράγοντα δομής' και όχι για πλάτος). Πείτε τώρα, ότι το ίδιο κύμα hkl όταν το μετρήσαμε από τους τροποποιημένους κρυστάλλους το βρήκαμε να έχει πλάτος F_{PH} ίσο με 20 μονάδες. Εξακολουθούμε να μην έχουμε ιδέα εάν το κύμα από τους τροποποιημένους κρυστάλλους έχει θετική ή αρνητική φάση, δηλαδή εάν το F_{PH} είναι +20 ή -20. Φαίνεται όντως να είναι μία τρύπα στο νερό, αλλά δεν είναι :

Η διαφορά των 5 μονάδων ανάμεσα στο F_P και το F_{PH} (για τη συγκεκριμένη ανάκλαση hkl) οφείλεται, βέβαια, στην ύπαρξη του βαρέως ατόμου. Λέγοντας το ίδιο πράγμα συμβολικά : $F_{PH}=F_P+F_H$, όπου F_H είναι

ο παράγοντας δομής εξαιτίας των βαρέων ατόμων και μόνο αυτών (δείτε ξανά την Εικόνα 22 που δείχνει την φυσική υπόσταση των δομών που αντιστοιχούν σε αυτούς τους παράγοντες δομής). Προσέξτε ότι το άθροισμα αυτό είναι ανυσματικό άθροισμα μεταξύ παραγόντων δομής, δηλαδή με τις φάσεις τους (και όχι απλό άθροισμα πλάτων). Ένα παράδειγμα για να είμαστε σίγουροι. Εάν για κάποιο hkl ο παράγοντας δομής F_P είναι +40 και η συνεισφορά των βαρέων ατόμων είναι $F_H = -5$ (δηλαδή η συνεισφορά των βαρέων είναι ακριβώς εκτός φάσης σε σχέση με την πρωτεΐνη) τότε το κύμα από τους τροποποιημένους κρυστάλλους θα έχει $F_{PH} = +35$ (και πλάτος, βέβαια, 35 μονάδες). Αν είστε ακόμα εδώ, θα παρατηρήσατε ότι θα είχαμε τα ίδια πλάτη για τα F_P , F_{PH} και F_H ακόμα και εάν οι φάσεις ήταν όλες ανάποδες, δηλαδή εάν $F_P = -40$, $F_H = +5$, $F_{PH} = -35$.

Προσέξτε τώρα. Εάν για κάποιο hkl δούμε ότι το πλάτος αυξήθηκε μετά την προσθήκη των βαρέων ατόμων, τότε μάθαμε ότι η φάση του F_P και η φάση του F_H είναι ίδιες (ή και οι δύο θετικές ή και οι δύο

αρνητικές). Εάν μετά την προσθήκη βαρέων ατόμων το πλάτος μειώθηκε, τότε μάθαμε ότι τα F_P και F_H έχουν αντίθετες φάσεις. Πάμε αυτόν τον συλλογισμό ένα βήμα παραπέρα. Εάν με κάποιο 'μαγικό' τρόπο κάποιος μας έλεγε ποια είναι η φάση (δηλαδή το πρόσημο) του F_H για κάποια ανάκλαση hkl , τότε θα μπορούσαμε να βρούμε και τη φάση του F_P για την ίδια ανάκλαση. Ό,τι θα είχαμε να κάνουμε θα ήταν να συγκρίνουμε τα πλάτη F_P και F_{PH} : εάν το πλάτος αυξήθηκε τότε το F_P έχει την ίδια φάση με το F_H , εάν μειώθηκε τότε το F_P έχει την ανάποδη φάση από το F_H .

Άρα, αυτό που φαίνεται να έχουμε καταφέρει είναι να μεταθέσουμε το πρόβλημα των φάσεων από τα F_P στα F_H . Αντί να ψάχνουμε τις φάσεις των κυμάτων που περιθλά ο πρωτεϊνικός κρύσταλλος, ψάχνουμε τις φάσεις των κυμάτων εξαιτίας της δομής των βαρέων ατόμων μόνο (Εικόνα 22). So what, I hear you say. Η διαφορά είναι τεράστια: οι φάσεις και τα πλάτη των κυμάτων των φυσικών κρυστάλλων (τα F_P) είναι συνάρτηση των θέσεων (της δομής) των χιλιάδων

ατόμων του πρωτεϊνικού μορίου. Οι φάσεις και τα πλάτη των F_H είναι συνάρτηση της δομής των βαρέων ατόμων και μόνο αυτών. Αυτά τα βαρέα άτομα μπορεί κάλλιστα να είναι ένα και μόνο ένα άτομο ανά στοιχειώδη κυψελίδα. Από εκεί που είχαμε να βρούμε τις θέσεις (τη δομή) χιλιάδων ατόμων, τώρα απλοποιήσαμε το πρόβλημα μερικές τάξεις μεγέθους και έχουμε μόνο να βρούμε τη δομή των βαρέων ατόμων. Για την ακρίβεια, απλοποιήσαμε το πρόβλημα τόσο πολύ, ώστε να μπορώ να σας περιγράψω ένα πολύ απλοϊκό παράδειγμα του πώς θα μπορούσαμε να βρούμε τις φάσεις των F_H (και συνεπώς και τις φάσεις των F_P).

Πριν να συζητήσουμε αυτό το παράδειγμα όμως, πρέπει να ξεκαθαρίσουμε μία θεμελιώδη ιδέα σχετικά με την ισοδυναμία της πληροφορίας μεταξύ των παραγόντων δομής και του ειδώλου του αντικειμένου. Ακούστε. Η πληροφορία που περιέχεται στο είδωλο του αντικειμένου και η πληροφορία που περιέχεται στα κύματα που συμβάλλουν για να φτιάξουν αυτό το είδωλο (δηλαδή στους παράγοντες δομής) είναι

απόλυτα ισοδύναμη, είναι δύο διαφορετικοί τρόποι για να περιγράψεις το ίδιο πράγμα. Το οποίο σημαίνει ότι εάν γνωρίζω το ένα, τότε αναγκαστικά θα πρέπει να μπορώ να υπολογίσω το άλλο (γιατί εάν όχι, τότε δε θα ίσχυε η ισοδυναμία της πληροφορίας, και συνεπώς η συμβολή των κυμάτων δε θα οδηγούσε στο σχηματισμό του ειδώλου, πράγμα άτοπο).

Τη μία οδό, αυτήν που πάει από τα F_p στην ατομική δομή του κρυστάλλου την έχουμε ήδη αναφέρει, είναι η εξίσωση του φακού, η *σύνθεση Fourier*. Σκεφτείτε τώρα το ανάποδο : Εάν με κάποιο τρόπο γνωρίζω ήδη το είδωλο του αντικειμένου, δεν είναι αυτονόητο ότι θα έπρεπε να μπορώ να υπολογίσω τα πλάτη και τις φάσεις των κυμάτων που οδήγησαν στο σχηματισμό αυτού του ειδώλου ; Η απάντηση είναι, βέβαια, ναι, και η διαδικασία με την οποία ξεκινώντας από το είδωλο υπολογίζουμε τα κύματα (τους παράγοντες δομής) που θα έδιναν αυτό το είδωλο λέγεται *ανάλυση Fourier*. Έφτασε η ώρα για ένα σημαντικό ιδεολογικό 'Αχα!' : η ανάλυση Fourier είναι αυτό που συμβαίνει όταν βάζετε έναν κρύσταλλο μέσα σε μία

δέσμη ακτίνων-Χ και αυτός περιθλά, με άλλα λόγια ολόκληρο το κρυσταλλογραφικό πείραμα είναι μία ανάλυση Fourier. Σκεφτείτε το : αυτό που στα αλήθεια κάνουμε με το κρυσταλλογραφικό πείραμα είναι να μετατρέψουμε την πληροφορία για τη δομή του κρυστάλλου σε μερικές χιλιάδες κύματα (αυτά που περιθλώνται από τον κρύσταλλο). Και εάν είχαμε φακούς, θα πέρναμε αυτά τα χιλιάδες κύματα, θα τα βάζαμε πάλι μαζί να συμβάλλουν και θα ανακτούσαμε το μεγεθυμένο είδωλο του αντικειμένου. Η ανάλυση και η σύνθεση Fourier είναι οι δύο απόλυτα ισοδύναμοι μεταξύ τους τρόποι με τους οποίους μπορούμε να πηγαίνουμε από τα κύματα στο είδωλο (σύνθεση Fourier) ή από το αντικείμενο στα κύματα (ανάλυση Fourier). Εάν γνωρίζουμε τους παράγοντες δομής (κατά πλάτος και φάση) μπορούμε να υπολογίσουμε το είδωλο, εάν γνωρίζουμε το είδωλο, μπορούμε να βρούμε τα πλάτη και τις φάσεις των κυμάτων που έφτιαξαν το είδωλο.

Ας γυρίσουμε τώρα στο πρόβλημα των φάσεων για να συζητήσουμε έναν τρόπο με τον οποίο θα

μπορούσαμε να βρούμε τις φάσεις των F_H (πράγμα που θα μας επέτρεπε να βρούμε τις φάσεις των F_P και συνεπώς να λύσουμε τη δομή). It goes like this.

Από το πείραμα έχουμε ένα μεγάλο κατεβατό του τύπου h, k, l, F_P, F_{PH} με τα πλάτη των φυσικών και των τροποποιημένων κρυστάλλων για κάθε ένα από τα πολλά hkl . Από τη διαφορά ανάμεσα στα πλάτη F_P και F_{PH} μπορούμε να βρούμε το πλάτος (αλλά όχι τη φάση) του F_H . Άρα μπορούμε να φτιάξουμε μία μεγάλη λίστα του τύπου h, k, l, F_H . Αυτό που θέλουμε είναι να βρούμε τις φάσεις των F_H , ή ισοδύναμα (με βάση αυτά που είπαμε στην προηγούμενη παράγραφο) τη δομή/είδωλο των βαρέων ατόμων. Επειδή τόσο οι διαστάσεις όσο και η συμμετρία της στοιχειώδους κυψελίδας είναι ήδη γνωστές, αυτό που τελικά θέλουμε είναι το να βρούμε ποιες είναι οι συντεταγμένες (x,y,z) στη στοιχειώδη κυψελίδα του καθενός από τα βαριά άτομα (το να γνωρίζουμε τις συντεταγμένες είναι το ίδιο με το να γνωρίζουμε τη δομή του αντικειμένου). Εάν για απλότητα υποθέσουμε ότι υπάρχει μόνο ένα βαρύ άτομο ανά

στοιχειώδη κυψελίδα, μπορούμε να βρούμε τις συντεταγμένες (x,y,z) αυτού του ατόμου μέσω μιας βαρετά επίπονης και συστηματικής έρευνας ως εξής.

Υποθέτουμε ότι το βαρύ άτομο έχει συντεταγμένες $x=0, y=0, z=0$. Με το που έχουμε κάνει αυτήν την υπόθεση, έχουμε τιμές για τα x,y,z , και συνεπώς μπορούμε (μέσω της ανάλυσης Fourier) να υπολογίσουμε τόσο τα πλάτη όσο και τις φάσεις των F_H που θα βρίσκαμε εάν όντως το βαρύ άτομο ήταν σε $x=0, y=0$ και $z=0$. Έχουμε λοιπόν δύο σετ από πλάτη για τα F_H . Το πρώτο σετ είναι τα πλάτη που βρήκαμε από το κρυσταλλογραφικό πείραμα (και είναι αυτά που αντιστοιχούν, βέβαια, στην πραγματικότητα). Το δεύτερο σετ είναι υποθετικό και αντιστοιχεί στα πλάτη που θα περιμέναμε να βρούμε εάν όντως το βαρύ άτομο ήταν σε συντεταγμένες $x=0, y=0$ και $z=0$. Εάν τα πειραματικά πλάτη δεν ταιριάζουν καθόλου με τα υπολογισμένα, τότε μπορούμε με ασφάλεια να συνάγουμε ότι το βαρύ άτομο δεν είναι σε συντεταγμένες $x=0, y=0$ και $z=0$, και μπορούμε να πάμε παρακάτω με τη συστηματική έρευνα :

Αυξάνουμε κατά πολύ λίγο την τιμή της x συντεταγμένης και ξαναδοκιμάζουμε την ίδια διαδικασία. Ταιριάζουν τώρα ; Εάν όχι αυξάνουμε ξανά τη x συντεταγμένη μέχρι να φτάσουμε στο όριο της στοιχειώδους κυψελίδας κατά μήκος του x . Μετά κάνουμε το x πάλι μηδέν, αλλά αυξάνουμε πολύ λίγο το y , κοκ. Με άλλα λόγια 'ψάχνουμε/σκανάρουμε' όλες τις πιθανές θέσεις του βαρέως ατόμου στη στοιχειώδη κυψελίδα μέχρι να βρούμε εκείνη τη θέση (x,y,z) για την οποία τα πλάτη που βρήκαμε πειραματικά και τα πλάτη που υπολογίζουμε από αυτήν τη θέση να ταιριάζουν μεταξύ τους. Αυτή θα είναι η πραγματική θέση του βαρέως ατόμου, και επειδή ξέρουμε πλέον τη δομή των βαρέων ατόμων, μπορούμε να βρούμε το \mathbf{F}_H τόσο κατά πλάτος όσο και κατά φάση. Από τις φάσεις του \mathbf{F}_H βρίσκουμε τις φάσεις του \mathbf{F}_P και τελειώσαμε, λύσαμε το πρόβλημα των φάσεων.

Η μέθοδος αυτή (της συστηματικής έρευνας) μπορεί να εφαρμοστεί μόνο με τη βοήθεια υπολογιστή και μόνο εάν ο αριθμός βαρέων ατόμων ανά κυψελίδα

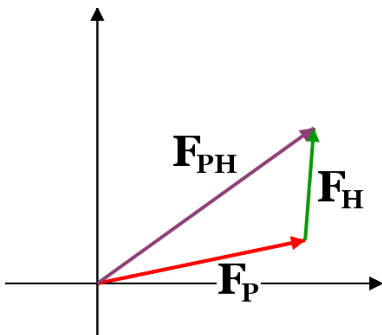
είναι πολύ μικρός. Ένα παράδειγμα για να έχετε μία ιδέα του γιατί είναι έτσι. Ας πούμε ότι δοκιμάζετε μόνο 50 διαφορετικές θέσεις (τιμές) για το x , 50 για το y και 50 για το z . Τότε έχετε να εξετάσετε $50 \cdot 50 \cdot 50 = 125,000$ διαφορετικές θέσεις για ένα μόνο βαρύ άτομο. Εάν έχετε δύο βαρέα άτομα ανά στοιχειώδη κυψελίδα, τότε για κάθε πιθανή θέση του πρώτου ατόμου, θα πρέπει να δοκιμάσετε κάθε πιθανή θέση του δεύτερου, το οποίο σας πάει στους $125,000 \cdot 125,000$ συνδυασμούς, κάτι παραπάνω από 15 δισεκατομμύρια συνδυασμών. Πράγμα που σημαίνει ότι ούτε καν σκέφτεστε το ενδεχόμενο τρίτου ατόμου. Δεν είναι της ώρας, αλλά υπάρχουν πολύ καλύτερες μέθοδοι για να βρεθούν οι θέσεις των βαρέων ατόμων, όπως για παράδειγμα μέθοδοι που ακούνε στο όνομα της συνάρτησης Patterson ή οι λεγόμενες 'άμεσες μέθοδοι'. Ξεχάστε τα αυτά προς το παρόν και πάμε να δούμε τι γίνεται όταν οι φάσεις μπορούν να έχουν οποιαδήποτε τιμή (και όχι μόνο μηδέν ή 180 μοίρες όπως είχαμε υποθέσει ως τώρα).

15 Προσδιορισμός φάσεων : Ισόμορφη αντικατάσταση [II]

Δείτε την Εικόνα 21 ξανά, είναι εκείνη με την αναπαράσταση του παράγοντα δομής ως ένα άνυσμα στο επίπεδο (σημειώστε ότι τέτοιου τύπου διαγράμματα ονομάζονται 'διαγράμματα Argand'). Η ιδέα των διαγραμμάτων Argand είναι εξαιρετικά χρήσιμη για αυτό που θέλουμε να κάνουμε τώρα, που είναι το να βρούμε το πώς θα λύσουμε το πρόβλημα των φάσεων στην περίπτωση που οι φάσεις είναι γενικές, όταν δηλαδή μπορούν να πάρουν οποιαδήποτε τιμή μεταξύ μηδέν και 360 μοιρών.

Η βασική προσέγγιση είναι ίδια με αυτήν που συζητήσαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο και στηρίζεται στην ιδέα ότι η περίθλαση από τους τροποποιημένους κρυστάλλους είναι το άθροισμα του πώς σκεδάζει η πρωτεΐνη μόνη της συν τη σκέδαση από τα βαρέα άτομα, δηλαδή ότι $F_{PH} = F_P + F_H$. Όσο οι φάσεις ήταν υποχρεωτικά ή μόνο θετικές ή μόνο αρνητικές (όπως υποθέσαμε για τις ανάγκες του

κεφαλαίου 14), μπορούσαμε να φερθούμε στους παράγοντες δομής σαν να ήταν πραγματικοί αριθμοί με τη φάση να είναι το πρόσημο. Στη γενική περίπτωση που συζητάμε τώρα αυτό δε γίνεται, και η εξίσωση $\mathbf{F}_{PH} = \mathbf{F}_P + \mathbf{F}_H$ αποκτά το πραγματικό ανυσματικό της νόημα όπως φαίνεται στο διάγραμμα Argand που ακολουθεί.

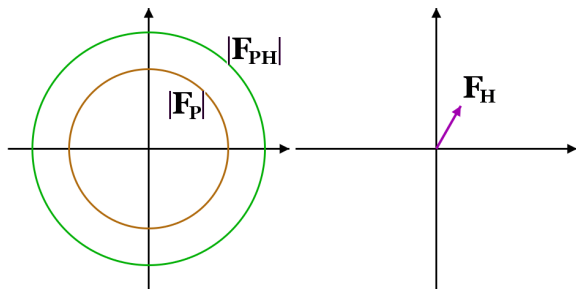


Εικόνα 23: Αναπαράσταση μέσω ενός διαγράμματος Argand της σχέσης $\mathbf{F}_{PH} = \mathbf{F}_P + \mathbf{F}_H$.

Ωραία είναι η Εικόνα 23 για να μας δείξει τι στα

αλήθεια συμβαίνει, αλλά για το πρόβλημα μας είναι τελείως άχρηστη : ούτε τις φάσεις του F_P γνωρίζουμε, ούτε τις φάσεις του F_{PH} (αυτά είναι εκείνα που θέλουμε να βρούμε). Το μοναδικό που ξέρουμε από το πείραμα είναι το πλάτος F_P και το πλάτος F_{PH} . Στην καλύτερη περίπτωση, και αν χρησιμοποιήσουμε τη διαφορά $|F_{PH}-F_P|$ ως μία εκτίμηση του πλάτους του F_H , τότε ίσως να καταφέρουμε –όπως περιγράψαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο– να βρούμε τις θέσεις των βαρέων ατόμων στη στοιχειώδη κυψελίδα, και συνεπώς να γνωρίζουμε το F_H τόσο κατά πλάτος όσο και κατά φάση. Άρα, στην περίπτωση των ανακλάσεων με γενικές φάσεις, τα δεδομένα μας είναι : γνωστό το πλάτος F_P , γνωστό το πλάτος F_{PH} , γνωστός ο παράγοντας δομής F_H . Με βάση αυτά θέλουμε να βρούμε τις φάσεις των F_P (και ταυτολογικά και των F_{PH}). Η Εικόνα 24 συνοψίζει διαγραμματικά το τι γνωρίζουμε. Οι κύκλοι στο αριστερό μισό του διαγράμματος δείχνουν ότι γνωρίζουμε μεν τα πλάτη των F_P και F_{PH} , αλλά έχουμε παντελή άγνοια των φάσεων τους (οι άκρες από τα ανύσματα F_P και F_{PH} μπορούν να είναι οπουδήποτε

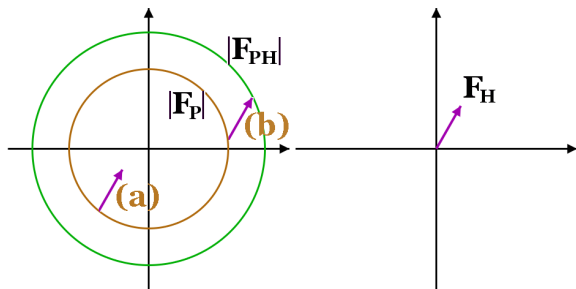
πάνω στους αντιστοιχούς κύκλους). Το δεξί μισό της ίδιας εικόνας δείχνει ότι το \mathbf{F}_H το γνωρίζουμε τόσο κατά πλάτος όσο και κατά φάση.



Εικόνα 24: Αναπαράσταση μέσω διαγραμμάτων Argand των δεδομένων στην περίπτωση ανακλάσεων με γενική φάση.

Με αυτά τα δεδομένα, μπορούμε να βρούμε λύση για το πρόβλημα των φάσεων ; Με άλλα λόγια μπορούμε να βρούμε κάποιες φάσεις για τα F_P και F_{PH} τέτοιες ώστε να ισχύει η ανυσματική σχέση $\mathbf{F}_{PH} = \mathbf{F}_P + \mathbf{F}_H$; Μία πρωτόγονη λύση είναι η εξής : Πάρτε το άνυσμα \mathbf{F}_H όπως ακριβώς είναι (με τη σωστή του φάση) και βάλτε την αρχή του να ακουμπάει πάνω στον κύκλο

F_P σε κάποια θέση. Μετά αρχίστε να κάνετε το F_H γύρω-γύρω πάνω στον κύκλο F_P . Η Εικόνα 25 δείχνει δύο από τις θέσεις του F_H (θέσεις a και b) καθώς κάνει το merry-go-round πάνω στον κύκλο F_P .

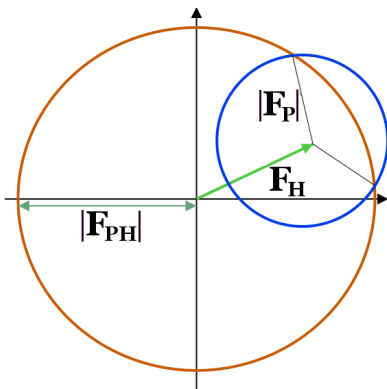


Εικόνα 25: Αναζήτηση λύσης στο γενικό πρόβλημα φάσεων μέσω των διαγραμμάτων Argand. Συγκρίνετε με την Εικόνα 24.

Τώρα είναι η ώρα να πείτε ένα 'Αχα!'. Εάν η φάση του F_P ήταν αυτή που αντιστοιχεί στη θέση (a) της Εικόνας 25 (δηλαδή εάν το άνυσμα του F_P πήγαινε από την αρχή των αξόνων μέχρι την αρχή του άνυσματος F_H), τότε το άθροισμα $F_P + F_H$ δεν θα έκανε F_{PH} (γιατί το πλάτος του $|F_P + F_H|$ είναι πολύ μικρό,

πολύ κοντά στην αρχή των αξόνων, και πολύ μακριά από τον κύκλο F_{PH}). Αντίθετα, η πιθανή λύση (b) φαίνεται να είναι μία χαρά : Αθροίζοντας το άνυσμα του F_P που αντιστοιχεί σε αυτή τη θέση (δηλαδή από την αρχή των αξόνων μέχρι την αρχή του ανύσματος F_H) με το άνυσμα F_H , δίνει ένα άνυσμα για το F_{PH} που συμφωνεί απόλυτα με το γνωστό πλάτος F_{PH} .

Ελπίζω να συμφωνείτε ότι αυτή η διαδικασία με ανύσματα να κάνουν γύρω-γύρω πάνω σε κύκλους και να κοιτάμε τότε η άκρη του ανύσματος F_H θα ακουμπήσει τον κύκλο F_{PH} , δεν είναι βιώσιμη. Υπάρχει μία πιο έξυπνη λύση στο πρόβλημα και αυτή φαίνεται στην Εικόνα 26. Η γεωμετρική κατασκευή είναι η εξής : Με αρχή την αρχή των αξόνων, ζωγραφίζουμε το άνυσμα F_H (πράσινο στην Εικόνα 26) το οποίο είναι γνωστό τόσο κατά πλάτος, όσο και κατά φάση. Με κέντρο επίσης την αρχή των αξόνων, ζωγραφίζουμε έναν κύκλο με ακτίνα ίση με F_{PH} (μεγάλος πορτοκαλί κύκλος στην Εικόνα 26). Τέλος, με κέντρο την άκρη του ανύσματος F_H , ζωγραφίζουμε έναν κύκλο με ακτίνα ίση με F_P (μικρός μπλε κύκλος).



Εικόνα 26: Αναζήτηση λύσης στο γενικό πρόβλημα των φάσεων μέσω των διαγραμμάτων Argand.

Δείτε τα δύο σημεία στα οποία οι κύκλοι F_P και F_{PH} τέμνονται. Κάθε ένα από αυτά τα σημεία ορίζει μονοσήμαντα ένα συγκεκριμένο άνυσμα \mathbf{F}_P και ένα συγκεκριμένο άνυσμα \mathbf{F}_{PH} και για αυτά τα ανύσματα ισχύει η συνθήκη $\mathbf{F}_{PH} = \mathbf{F}_P + \mathbf{F}_H$, δηλαδή είναι λύσεις στο πρόβλημα μας. Το κακό είναι ότι έχουμε δύο διαφορετικές, ανεξάρτητες μεταξύ τους λύσεις, μία

για κάθε ένα σημείο τομής των κύκλων. Άρα, μετά από τόση φασαρία αυτό που μάθαμε είναι το εξής. Στην περίπτωση που οι φάσεις είναι γενικές ένα παράγωγο βαρέων μετάλλων (δηλαδή ένας τροποποιημένος με βαρέα άτομα κρύσταλλος) δεν αρκεί για να λύσουμε το πρόβλημα των φάσεων. Ο λόγος είναι ότι για κάθε μία ανάκλαση (από τις χιλιάδες) έχουμε δύο πιθανές φάσεις και δεν έχουμε ιδέα ποια από τις δύο είναι η σωστή. Την πατήσαμε πάλι ; Η απάντηση είναι όχι, αλλά η δουλειά που έχουμε να κάνουμε στο εργαστήριο αυξάνει σημαντικά. Ακούστε πώς πάει.

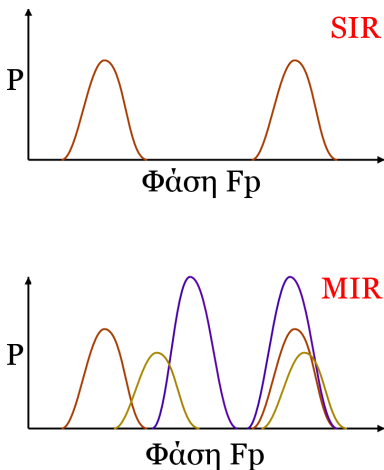
Αντί να φτιάξουμε μία μόνο τροποποίηση των κρυστάλλων (με κάποιου τύπου βαρύ άτομο), κάνουμε πολλαπλές τροποποιήσεις των φυσικών κρυστάλλων χρησιμοποιώντας όμως διαφορετικά βαριά άτομα. Για παράδειγμα, την πρώτη φορά χρησιμοποιούμε άλατα του υδραργύρου, τη δεύτερη της πλατίνας, την τρίτη του ουρανίου, κοκ. Η ελπίδα μας είναι ότι επειδή αυτά τα βαρέα άτομα έχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες θα συνδεθούν

με διαφορετικό τρόπο (σε διαφορετικές θέσεις) στην πρωτεΐνη μας. Για κάθε ένα από αυτά τα διαφορετικά παράγωγα βαρέων ατόμων, συλλέγουμε κανονικά πλήρη κρυσταλλογραφικά δεδομένα, και καταλήγουμε με μία μεγάλη λίστα του τύπου $h, k, l, F_P, F_{PH_1}, F_{PH_2}, F_{PH_3}, \dots$, όπου F_{PH_1} είναι τα πλάτη από την πρώτη τροποποίηση, F_{PH_2} είναι τα πλάτη από την δεύτερη, κ.ο.κ. Οι διαφορές $|F_{PH_1}-F_P|, |F_{PH_2}-F_P|, \dots$, μας δίνουν μία εκτίμηση για τα πλάτη F_{H_1}, F_{H_2}, \dots , και από αυτά μπορούμε να βρούμε τη δομή (τις συντεταγμένες) των βαρέων ατόμων, και συνεπώς βρίσκουμε τα F_{H_1}, F_{H_2}, \dots , τόσο κατά πλάτος όσο και κατά φάση.

Προσέξτε τώρα. Εάν όντως στις διαφορετικές τροποποιήσεις τα βαριά άτομα συνδέθηκαν σε διαφορετικές θέσεις, τότε για κάποια ανάκλαση hkl το άνυσμα F_{H_1} θα είναι διαφορετικό από το F_{H_2} και εάν ζωγραφίσουμε τους κύκλους της Εικόνας 26, θα βρούμε δύο πιθανές φάσεις από το F_{H_1} και δύο πιθανές φάσεις από το F_{H_2} . Από αυτές τις (2+2) πιθανές φάσεις για το F_P , η μία (η σωστή) θα είναι

ίδια και θα έχουμε επιτυχώς λύσει το πρόβλημα των φάσεων και στη γενική περίπτωση.

Η μέχρι τώρα συζήτηση έχει γίνει θεωρώντας ότι δεν υπάρχουν πειραματικά σφάλματα, ότι όλες οι εκτιμήσεις πλατών και φάσεων είναι ιδανικές. Ευτυχώς δεν είναι έτσι, και όλα τα πειραματικά αποτελέσματα είναι γεμάτα πηγές τυχαίων και συστηματικών σφαλμάτων (πράγμα που κάνει τα πράγματα πολύ πιο ενδιαφέροντα). Αυτό σημαίνει ότι αυτό που έχουμε από τα πειράματα δεν είναι μία και μόνο μία ακριβέστατα προσδιορισμένη φάση, αλλά μία κατανομή πιθανών φάσεων. Για να το βάλουμε αυτό σε μία τάξη, δείτε το πάνω διάγραμμα της Εικόνας 27. Αυτό που δείχνει η εικόνα αυτή (για κάποιο συγκεκριμένο κύμα hkl) είναι: στον μεν οριζόντιο άξονα τις πιθανές φάσεις του F_p (από μηδέν μέχρι 360 μοίρες), στον δε κάθετο άξονα την πιθανότητα (P) η αντίστοιχη φάση να είναι σωστή.



Εικόνα 27: Κατανομή πιθανοτήτων (P) για τη φάση ενός παράγοντα δομής με βάση ένα μόνο παράγωγο βαρέως ατόμου (Single Isomorphous Replacement, άνω διάγραμμα), και με βάση τρία παράγωγα βαρέων μετάλλων (Multiple Isomorphous Replacement, κάτω διάγραμμα).

Η κατανομή αυτή (η επάνω στην Εικόνα 27) προέκυψε από τη χρήση ενός μόνο παραγώγου βαρέως μετάλλου (εξ ου και το SIR, για Single

Isomorphous Replacement) και δείχνει ότι με ένα μόνο τροποποιημένο κρύσταλλο δεν μπορούμε να εκτιμήσουμε ποια είναι η σωστή φάση του F_p (γιατί υπάρχουν δύο εξίσου πιθανές κατανομές γύρω από δύο τελείως διαφορετικές τιμές φάσεων). Το κάτω διάγραμμα της ίδιας εικόνας δείχνει τρία σετ κατανομών όπως προέκυψαν από τη χρήση τριών παραγώγων βαρέων μετάλλων (εξ ου και το MIR για Multiple Isomorphous Replacement). Δείτε ότι για κάθε ένα από τα παράγωγα (π.χ. μοβ ή κίτρινη καμπύλη) η αμφισημία παραμένει. Αλλά κοιτώντας και τις τρεις κατανομές μαζί βλέπουμε ότι υπάρχει μία περιοχή φάσεων στα δεξιά του διαγράμματος όπου και οι τρεις κατανομές συγκλίνουν. Αν προσθέσουμε τις εκτιμήσεις από τις τρεις κατανομές όχι μόνο θα βρούμε μία ξεκάθαρη 'πλέον πιθανή' φάση για το F_p , αλλά θα έχουμε και μία εκτίμηση της αβεβαιότητας (του σφάλματος) αυτής της φάσης. Αυτή η εκτίμηση της αβεβαιότητας στον προσδιορισμό κάποιας φάσης (γνωστή ως figure of merit, FOM) δεν είναι διακοσμητική, αλλά χρησιμοποιείται για να βελτιώσει την ποιότητα

(ακρίβεια) του ειδώλου της δομής του βιομακρομορίου.

Μιας και αρχίσαμε με τα MIR και τα SIR της κρυσταλλογραφίας, ας το πάμε λίγο παρακάτω και ας πούμε και μία πολύ σύντομη κουβέντα για κάτι που λέγεται 'ανώμαλη σκέδαση' και να κλείσουμε αυτό το θέμα.

16 Προσδιορισμός φάσεων : MAD, SAD και άλλα τέτοια

Το κακό με αυτή την ιδέα με τα βαριά άτομα είναι ότι για να δουλέψει η μέθοδος θα πρέπει οι τροποποιημένοι κρύσταλλοι να είναι πανομοιότυποι με τους φυσικούς κρυστάλλους με τη μία και μοναδική εξαίρεση της προσθήκης του βαρέως ατόμου σε κάποια συγκεκριμένη θέση όλων των πρωτεϊνικών μορίων (από εκεί βγήκε και αυτό το 'ισόμορφη αντικατάσταση': οι τροποποιημένοι κρύσταλλοι πρέπει να είναι ισόμορφοι με τους φυσικούς). Συνηθέστατα η φυσική πραγματικότητα δεν μας κάνει αυτή τη χάρη και η προσθήκη διαλυμάτων βαρέων ατόμων προκαλεί μία πληθώρα φαινομένων, από την οριστική διάλυση/καταστροφή των κρυστάλλων, μέχρι μετατοπίσεις/περιστροφές της πρωτεΐνης, μέχρι αλλαγή στη σχετική θέση πρωτεϊνικών επικρατειών (domains), και άλλα τέτοια ευχάριστα. Τελικό αποτέλεσμα όλων αυτών είναι ότι με λίγη τύχη μπορεί ένας πειραματιστής να βρεθεί να

περνάει μήνες δοκιμάζοντας δεκάδες και εκατοντάδες διαφορετικών συνθηκών και διαφορετικών αλάτων βαρέων ατόμων χωρίς αποτέλεσμα. Not nice.

Υπάρχει, λοιπόν, ένας τρόπος να ετοιμαστούν τροποποιημένοι κρύσταλλοι χωρίς όλη αυτή τη φασαρία με την έκθεση σε διαλύματα βαρέων ατόμων. Για να καταλάβετε τη μέθοδο θα πρέπει να πούμε δύο λέξεις για κάτι που λέγεται 'ανώμαλη σκέδαση'. Πάει ως εξής.

Μέχρι τώρα είχαμε υποθέσει ότι η σκέδαση δουλεύει με το να εκτελούν τα ηλεκτρόνια εξαναγκασμένη ταλάντωση, να γίνονται δευτερογενώς πομποί ακτινοβολίας σφαιρικών κυμάτων, αυτά τα κύματα να συμβάλλουν μεταξύ τους, και να παρατηρούμε μακροσκοπικά τα αποτελέσματα της σκέδασης και περίθλασης από τους κρυστάλλους. Αυτή η παρουσίαση συμπεριφέρεται στα ηλεκτρόνια σαν να ήταν το κάθε ηλεκτρόνιο μόνο του, χωρίς καμία αλληλεπίδραση με οτιδήποτε άλλο, όπως π.χ. με τους πυρήνες των ατόμων. Επειδή οι ακτίνες-X έχουν πολύ υψηλή συχνότητα, αυτή η προσέγγιση (με τα

ηλεκτρόνια να θεωρούνται ελεύθερα) δουλεύει ως επί το πλείστον μία χαρά, με μία εξαίρεση η οποία έχει να κάνει με κάτι που λέγεται 'ακμή απορρόφησης' (absorption edge). Μία χρήσιμη –αλλά κατά βάθος λανθασμένη– ιδέα για να αποκτήσετε μία φυσική αίσθηση του φαινομένου είναι η εξής. Τα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα των εσωτερικών στοιβάδων των ατόμων, είναι ισχυρά συνδεδεμένα με τους αντιστοίχους πυρήνες τους. Φανταστείτε το σαν ένα σύστημα με δύο σφαίρες (η μία ο πυρήνας, η άλλη το ηλεκτρόνιο) συνδεδεμένες με ένα ελατήριο. Ένα τέτοιο σύστημα (δύο σφαίρες συνδεδεμένες με ένα ελατήριο) έχει μία ιδιότητα που ονομάζεται ιδιοσυχνότητα : εάν αρχίσεις να προσφέρεις ενέργεια ταλάντωσης σε ένα τέτοιο σύστημα, τότε για κάποια συχνότητα το πλάτος ταλάντωσης μεγιστοποιείται, και για αυτήν την συχνότητα η απορρόφηση ενέργειας από το σύστημα επίσης μεγιστοποιείται (ίσως να αποκτήσετε μία αίσθηση του τι είναι αυτή η ιδιοσυχνότητα αν θυμηθείτε το πώς τρίζουν ή δεν τρίζουν τα τζάμια του σπιτιού σας ανάλογα με την συχνότητα του ήχου που παράγουν τα οχήματα που περνούν απ' έξω). Για

τέτοιες κατάλληλες συχνότητες, τα αντίστοιχα ηλεκτρόνια δεν είναι πλέον 'ελεύθερα' και σκεδάζουν διαφορετικά (εκτός φάσης) σε σχέση με τα υπόλοιπα –δηλαδή τα όντως ελεύθερα– ηλεκτρόνια. Αυτό προκαλεί ασυνέχειες στο φάσμα απορρόφησης ενέργειας των ατόμων και είναι αυτές οι ασυνέχειες που είναι γνωστές με το όνομα ακμές απορρόφησης (absorption edges). Σημειώστε ότι οι συχνότητες που αντιστοιχούν σε αυτές τις ακμές απορρόφησης εξαρτώνται από τον τύπο του ατόμου και διαφέρουν από στοιχείο σε στοιχείο. Για να συνοψίσουμε. Με το να μεταβάλλουμε τη συχνότητα (μήκος κύματος) της ακτινοβολίας που προσπίπτει σε ένα άτομο, μπορούμε να εξαναγκάσουμε τα ηλεκτρόνια αυτού του τύπου ατόμου να σκεδάζουν διαφορετικά (εκτός φάσης) από τα ηλεκτρόνια των υπόλοιπων ατομικών τύπων.

Πάμε τώρα στο πώς τα εφαρμόζουμε όλα αυτά για να λύσουμε το πρόβλημα των φάσεων. Η βασική ιδέα είναι απλή: εάν με κάποιο τρόπο είχαμε ένα πολύ μικρό αριθμό 'διαφορετικών' ατόμων σε μία

πρωτεΐνη, τότε αλλάζοντας το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (ώστε να είμαστε σε μία ακμή απορρόφησης αυτών των ατόμων) θα μπορούσαμε να κάνουμε αυτά τα λίγα άτομα να σκεδάζουν διαφορετικά από όλα τα υπόλοιπα, και θα ήταν σαν ξαφνικά να είχαμε φτιάξει 'βαρέα άτομα' με μοναδικό μέσο την αλλαγή του μήκους κύματος των ακτίνων-X που προσπίπτουν στον κρύσταλλο. Ωραία ακούγεται, αλλά πού θα βρούμε αυτά τα λίγα 'διαφορετικά' πρωτεϊνικά άτομα που χρειαζόμαστε ; Παραδόξως, θα πρέπει να μιλήσουμε και για λίγη βιολογία εδώ. Ακούστε πώς δουλεύει.

Παίρνουμε ένα στέλεχος του αγαπημένου μοντέλου της μοριακής βιολογίας, του βακτηρίου *Escherichia coli*, και κάνουμε δύο πράγματα. Το πρώτο είναι να εισάγουμε το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη της οποίας τη δομή θέλουμε να προσδιορίσουμε. Το δεύτερο είναι να κάνουμε το βακτήριο να μην μπορεί να συνθέσει το αμινοξύ μεθειονίνη (δηλαδή, όπως λένε οι βιολόγοι, το κάνουμε 'αυξότροφο' για αυτό το αμινοξύ). Μετά

καλλιεργούμε κανονικά την *Escherichia* μόνο που της προσφέρουμε εξωγενώς (δηλαδή μέσω του θρεπτικού μέσου στο οποίο μεγαλώνει) ένα υποκατάστατο της μεθειονίνης, τη σελήνο-μεθειονίνη. Η σελήνο-μεθειονίνη είναι πανομοιότυπη με το αμινοξύ μεθειονίνη με μία μόνο αλλαγή : στη θέση του ατόμου θείου της μεθειονίνης έχει το στοιχείο σελήνιο. Τώρα έρχεται το ωραίο. Η *Escherichia* δεν έχει απολύτως κανένα πρόβλημα, ζει, μεγαλώνει, και αναπαράγεται κανονικότατα, μόνο που όλες της οι πρωτεΐνες αντί για μεθειονίνη περιέχουν σελήνο-μεθειονίνη. Μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών είναι και η δική μας πρωτεΐνη, την οποία απομονώνουμε από όλες τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του βακτηρίου, και την κρυσταλλώνουμε. Και έτσι, λοιπόν, έχουμε κρυστάλλους της πρωτεΐνης που μελετάμε οι οποίοι αντί για μεθειονίνη περιέχουν σελήνο-μεθειονίνη. Από αυτούς τους κρυστάλλους μαζεύουμε κρυσταλλογραφικά δεδομένα σε κάποιο μήκος κύματος (συχνότητα) μακριά από την συχνότητα της ακμής απορρόφησης του σεληνίου. Αυτά είναι τα F_p . Μετά αλλάζουμε το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (χωρίς να

πειράξουμε απολύτως τίποτα στον κρύσταλλο) ώστε να πάμε σε μία ακμή απορρόφησης του σεληνίου, και μαζεύουμε ξανά δεδομένα. Αυτά τα δεδομένα (για τα οποία τα άτομα σεληνίου σκεδάζουν διαφορετικά από τα υπόλοιπα άτομα) είναι τα F_{PH} . Υπάρχει η τεχνική δυνατότητα (πάλι μέσω αλλαγής του μήκους κύματος) να συλλέξουμε και ακόμα ένα σετ δεδομένων, κάτι ανάλογο του F_{PH2} , αλλά δεν είναι της ώρας να πούμε περισσότερα για το πώς και το γιατί. Από εκεί και πέρα η διαδικασία για τον προσδιορισμό των φάσεων των F_P μοιάζει πολύ με τη διαδικασία που περιγράψαμε προηγουμένως, με τα άτομα σεληνίου να παίζουν το ρόλο των βαρέων ατόμων.

Όλη αυτή η διαδικασία έχει ένα χαριτωμένο όνομα, ονομάζεται MAD για Multi-wavelength Anomalous Diffraction, και το καλύτερο, υπάρχει και το SAD (για Single-wavelength Anomalous Diffraction). Αυτά είναι τα ανάλογα των MIR και SIR που συζητήσαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Εάν δε σας φτάνουν όλα αυτά τα αρκτικόλεξα, έχει και άλλα. Η ιδέα είναι ότι εάν έχουμε ήδη ένα

κλασικό παράγωγο βαρέως ατόμου (με το οποίο θα μπορούσαμε μόνο να κάνουμε SIR, και συνεπώς, να μείνουμε με αμφίσημες φάσεις), είναι εφικτό να συλλέξουμε από το ίδιο παράγωγο και δεδομένα ανώμαλης περίθλασης. Με τον τρόπο αυτό το σύνολο της διαθέσιμης πειραματικής πληροφορίας για τις φάσεις αυξάνει και γίνεται εφικτό να λυθεί η αμφισημία φάσεων που είναι εγγενής στο SIR (ο τρόπος να το φανταστείτε είναι ότι μέσω της χρήσης της ανώμαλης σκέδασης είναι σαν να έχουμε δύο παράγωγα βαρέων μετάλλων αντί για ένα). Το αποτέλεσμα του συνδυασμού του SIR με την ανώμαλη σκέδαση έχει, βέβαια, το δικό του όνομα και είναι γνωστό ως SIRAS (για Single Isomorphous Replacement with Anomalous Scattering). Όπως θα έχετε ήδη φανταστεί, υπάρχει και το MIRAS (για Multiple Isomorphous Replacement with Anomalous Scattering) το οποίο αυξάνει την ακρίβεια προσδιορισμού των φάσεων με το να αυξάνει την πειραματική πληροφορία που χρησιμοποιείται για αυτόν τον προσδιορισμό. Καλύτερα να σταματήσουμε εδώ πριν κάνετε block and delete το βιβλίο.

17 Προσδιορισμός φάσεων : Μοριακή αντικατάσταση

Αυτός είναι ο τελευταίος τρόπος προσδιορισμού φάσεων για τα πλαίσια αυτού του βιβλίου. Η μεγάλη διαφορά της μεθόδου της μοριακής αντικατάστασης από αυτές που αναφέρθηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια είναι ότι για αυτή τη μέθοδο δεν ξεκινάμε από το μηδέν (δηλαδή με παντελή άγνοια της πιθανής δομής της πρωτεΐνης), αλλά έχουμε λόγους να πιστεύουμε ότι η δομή της πρωτεΐνης που έχουμε κρυσταλλώσει μοιάζει πολύ με κάποια ήδη γνωστή πρωτεϊνική δομή. Για την ακρίβεια, έχουμε λόγους να πιστεύουμε ότι η δομή της πρωτεΐνης που μελετάμε μοιάζει τόσο πολύ με κάποια ήδη γνωστή δομή, ώστε να μπορούμε να βρούμε σχετικά ακριβείς αρχικές φάσεις για τη δική μας πρωτεΐνη χρησιμοποιώντας ακριβώς αυτή την ομοιότητα με αυτή την άλλη γνωστή δομή. Ένα παράδειγμα για το τι μιλάμε είναι το να θέλουμε π.χ. να βρούμε τη δομή μίας πρωτεΐνης απομονωμένης από άνθρωπο, όταν ήδη γνωρίζουμε

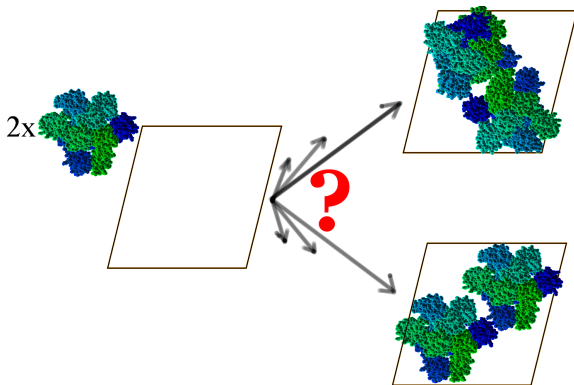
τη δομή της ίδιας πρωτεΐνης από π.χ. το ποντίκι.

Τα πρώτα βήματα της μεθόδου είναι τα ίδια με αυτά που έχουμε ήδη περιγράψει. Απομονώνουμε και κρυσταλλώνουμε την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, συλλέγουμε τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα h, k, l , F_p , και βρίσκουμε τη συμμετρία των κρυστάλλων και τις διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας αυτών των κρυστάλλων. Πείτε τώρα ότι μετά από έρευνα της Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/>, αυτή είναι η βάση δεδομένων στην οποία κατατίθενται οι γνωστές δομές πρωτεϊνών), βρήκαμε ότι υπάρχει μία πρωτεΐνη με γνωστή δομή της οποίας η πρωτεϊνική αλληλουχία μοιάζει πολύ με την αλληλουχία της δικής μας πρωτεΐνης. Τότε υπάρχουν εξελικτικά ισχυρές ενδείξεις ότι η δομή (και λειτουργία) της πρωτεΐνης που μελετάμε θα μοιάζουν πολύ με τη δομή (και λειτουργία) αυτής της γνωστής πρωτεΐνης. Το ερώτημα είναι: μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε αυτήν την αναμενόμενη ομοιότητα σε επίπεδο δομών για να βρούμε κάποιες σχετικά ακριβείς αρχικές φάσεις για τους κρυστάλλους της δική μας πρωτεΐνης

(και να αποφύγουμε όλη τη φασαρία με SIRAS, MIRAS, κοκ) ; Η απάντηση στο ερώτημα είναι : “εάν μοιάζουν αρκετά οι δομές, τότε ναι μπορούμε”, και η μέθοδος που το κάνει αυτό ονομάζεται μοριακή αντικατάσταση (μην ασχοληθείτε τώρα με τα πώς και τα γιατί της κρυσταλλογραφικής ονοματολογίας). Η μέθοδος δουλεύει ως εξής.

Από το κρυσταλλογραφικό πείραμα γνωρίζουμε τη συμμετρία των κρυστάλλων μας, τις διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας, και, βέβαια, τα h , k , l , F_p . (αγνοήστε προς το παρόν τις τυπικές αποκλίσεις των πλατών). Από την έρευνα της PDB (protein data bank) έχουμε τις συντεταγμένες (τη δομή) μιας πρωτεΐνης που πιστεύουμε ότι μοιάζει πολύ με τη δική μας. Αυτό που δε γνωρίζουμε είναι τη θέση και τον προσανατολισμό αυτής της δομής μέσα στους δικούς μας κρυστάλλους. Δείτε την Εικόνα 28. Γνωρίζουμε (για το συγκεκριμένο παράδειγμα αυτής της εικόνας) ότι οι κρύσταλλοι μας περιέχουν δύο αντίγραφα της δομής που φαίνεται αριστερά, αλλά δεν έχουμε ιδέα ποιες είναι οι θέσεις και οι προσανατολισμοί αυτών

των δομών στο εσωτερικό των κρυστάλλων μας.



Εικόνα 28: Το πρόβλημα της μοριακής αντικατάστασης. Έχουμε κάποια γνωστή πρωτεϊνική δομή (σε αυτήν την περίπτωση, δύο αντίγραφα του μορίου που φαίνεται στην πάνω αριστερά γωνία της εικόνας) και έναν κρύσταλλο με γνωστά κρυσταλλογραφικά δεδομένα, αλλά δεν έχουμε ιδέα του πώς είναι διευθετημένα αυτά τα μόρια στο εσωτερικό του κρυστάλλου.

Ελπίζω να συμφωνείτε ότι χρειάζονται συνολικά έξι παράμετροι για να περιγράψουμε τη θέση και τον προσανατολισμό ενός αντικειμένου σε κάποιο

τριδιάστατο σύστημα αναφοράς : Τρεις παράμετροι –ας τις πούμε (x,y,z) – χρειάζονται για να περιγράψουν την θέση του γεωμετρικού κέντρου του αντικειμένου στο σύστημα αναφοράς. Και άλλες τρεις παράμετροι –ας τις πούμε γωνίες (α,β,γ) – χρειάζονται για να περιγράψουν τον προσανατολισμό (περιστροφή) του αντικειμένου γύρω από το γεωμετρικό του κέντρο. Άρα, το πρόβλημα της μοριακής αντικατάστασης είναι να βρούμε τις τιμές αυτών των 6 παραμέτρων $(x,y,z$ και $\alpha,\beta,\gamma)$ ανά αντίγραφο πρωτεΐνης.

Πριν συνεχίσουμε, ας δούμε πού πάει αυτό. Πείτε ότι με κάποιον τρόπο βρήκαμε τις σωστές τιμές για τα $(x,y,z,\alpha,\beta,\gamma)$. Και λοιπόν ; Πού είναι οι φάσεις που θέλουμε ; Θυμηθείτε αυτή την κουβέντα με την ισοδυναμία της πληροφορίας ανάμεσα στο είδωλο ενός αντικειμένου και τα κύματα (τους παράγοντες δομής) των οποίων η συμβολή δίνει αυτό το είδωλο. Εάν γνωρίζουμε τη δομή/είδωλο του αντικειμένου, τότε μπορούμε να βρούμε τους παράγοντες δομής (πλάτος και φάση) που έδωσαν αυτό το είδωλο. Εάν

λοιπόν γνωρίζουμε τα $(x,y,z,\alpha,\beta,\gamma)$ είναι σαν να γνωρίζουμε τη θέση της δομής/μοντέλου στην στοιχειώδη κυψελίδα, είναι το ίδιο με το να γνωρίζουμε τα πλάτη και τις φάσεις των κυμάτων που θα έδιναν αυτή τη δομή. Εδώ υπάρχει ένα δύσκολο σημείο. Η δομή που χρησιμοποιούμε σαν μοντέλο δεν είναι, βέβαια, ίδια με τη δομή που θέλουμε να λύσουμε (γιατί εάν ήταν ίδια δε θα είχαμε λόγο να κάνουμε όλη τη φασαρία). Η δομή που χρησιμοποιούμε ως μοντέλο είναι μία χρήσιμη προσέγγιση της δομής που ψάχνουμε. Αυτό σημαίνει ότι ακόμα και εάν βρούμε τα σωστά $(x,y,z,\alpha,\beta,\gamma)$, τα πλάτη και οι φάσεις που θα υπολογίσουμε θα είναι τέτοια ώστε να δώσουν πίσω το μοντέλο από το οποίο ξεκινήσαμε και όχι αυτό που ψάχνουμε. Ένα παράδειγμα για να είμαστε σίγουροι. Πείτε ότι θέλουμε να βρούμε τη δομή μίας πρωτεΐνης απομονωμένης από άνθρωπο, όταν ήδη γνωρίζουμε τη δομή της ίδιας πρωτεΐνης από το ποντίκι. Παίρνουμε, λοιπόν, τη δομή της πρωτεΐνης του ποντικού από την PDB, παίρνουμε τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα των δικών μας

κρυστάλλων (που περιέχουν την πρωτεΐνη από άνθρωπο) και με κάποιο τρόπο –που θα πούμε παρακάτω– βρίσκουμε τα σωστά $(x,y,z,\alpha,\beta,\gamma)$, δηλαδή τέτοια ώστε να 'βάλουμε' στη σωστή θέση (των δικών μας κρυστάλλων) τη δομή από την πρωτεΐνη του ποντικιού. Άρα αυτό που έχουμε τώρα είναι ένα μοντέλο για το πώς θα έμοιαζε η δομή της πρωτεΐνης από το ποντίκι αλλά στο εσωτερικό των κρυστάλλων που περιέχουν την ανθρώπινη πρωτεΐνη. Αυτό φαίνεται να είναι χαζό. Εάν υπολογίσουμε πλάτη και φάσεις από αυτό το μοντέλο (δομή πρωτεΐνης ποντικού σε στοιχειώδη κυψελίδα από ανθρώπινη πρωτεΐνη), τότε αυτά τα πλάτη και οι φάσεις θα μας δώσουν ταυτολογικά πίσω τη δομή από το ποντίκι (και όχι τη δομή από τον άνθρωπο όπως θα θέλαμε). Συγκεντρωθείτε, η εξήγηση είναι κάπως δύσκολη. Τα πειραματικά προσδιορισμένα κρυσταλλογραφικά δεδομένα είναι $h, k, l, F_{\text{HUMAN}}$, όπου F_{HUMAN} είναι τα πλάτη των ανακλάσεων από τους κρυστάλλους που περιέχουν την ανθρώπινη πρωτεΐνη (και αυτό που θα θέλαμε να βρούμε είναι τις φάσεις ϕ_{HUMAN}). Με το που έχουμε βρει τα σωστά $(x,y,z,\alpha,\beta,\gamma)$

μπορούμε να βάλουμε τη δομή από το ποντίκι στη σωστή θέση στη στοιχειώδη κυψελίδα και να υπολογίσουμε (μέσω της ανάλυσης Fourier) τα $h, k, l, F_{\text{MOUSE}}, \varphi_{\text{MOUSE}}$, όπου F_{MOUSE} και φ_{MOUSE} είναι τα πλάτη και οι φάσεις που θα περιμέναμε εάν οι κρύσταλλοι μας περιείχαν τη δομή της πρωτεΐνης από το ποντίκι. Και εδώ είναι που υπεισέρχεται το θέμα του πόσο πολύ μοιάζουν μεταξύ τους η δομή που ψάχνουμε με τη δομή που χρησιμοποιήσαμε σαν μοντέλο. Όσο περισσότερο μοιάζουν οι δομές, τόσο περισσότερο τα $(F_{\text{MOUSE}}, \varphi_{\text{MOUSE}})$ θα τείνουν προς τα $(F_{\text{HUMAN}}, \varphi_{\text{HUMAN}})$ [και εάν οι δομές από το ποντίκι και τον άνθρωπο ήταν πανομοιότυπες, τα δύο σετ από πλάτη και φάσεις θα ήταν επίσης μεταξύ τους πανομοιότυπα]. Εάν οι διαφορές στις δομές είναι μικρές (για παράδειγμα, έχουν μόνο αλλάξει μερικές πλευρικές ομάδες αμινοξέων, αλλά κατά τα άλλα οι δομές είναι ίδιες), τότε οι περισσότερες από τις φάσεις φ_{MOUSE} θα είναι σχετικά ακριβείς εκτιμήσεις των φάσεων φ_{HUMAN} που ψάχνουμε. Άρα εάν κάνουμε μία σύνθεση Fourier χρησιμοποιώντας τα $h, k, l, F_{\text{HUMAN}}, \varphi_{\text{MOUSE}}$ υπάρχουν καλές πιθανότητες να δούμε στο είδωλο τις μικρές

διαφορές ανάμεσα στη δομή από το ποντίκι και τον άνθρωπο (προσέξτε ότι για αυτή τη σύνθεση Fourier χρησιμοποιούμε τα πλάτη από την ανθρώπινη πρωτεΐνη με τις φάσεις από το μοντέλο). Αυτή η ιδέα βελτιώνεται και άλλο : Αφού έχουμε μόνο ένα σετ από φάσεις (τις φ_{MOUSE}) όλη η πληροφορία που διαθέτουμε για τις διαφορές ανάμεσα στις δύο δομές περιέχεται στις διαφορές ανάμεσα στα πλάτη F_{HUMAN} και F_{MOUSE} . Μπορούμε λοιπόν να υπολογίσουμε ένα “είδωλο δομικών διαφορών” με το να κάνουμε μία σύνθεση Fourier χρησιμοποιώντας ως πλάτη τις διαφορές ανάμεσα στα πλάτη ($F_{\text{HUMAN}} - F_{\text{MOUSE}}$) και ως φάσεις τις φ_{MOUSE} . Σε μία τέτοιου τύπου σύνθεση διαφορών αυτό που περιμένουμε να δούμε στο είδωλο δεν είναι η δομή ολόκληρης της πρωτεΐνης, αλλά πληροφορία μόνο για τις διαφορές (αλλαγές) ανάμεσα στη δομή που θέλουμε να βρούμε και τη δομή που χρησιμοποιήσαμε ως μοντέλο. Με βάση αυτές τις διαφορές μπορούμε να μεταβάλουμε το αρχικό μοντέλο (από το ποντίκι) ώστε να μετατραπεί στη σωστή πρωτεϊνική δομή (από τον άνθρωπο).

Πριν κλείσουμε αυτό το θέμα –και πάμε επιτέλους στο δια ταύτα (δηλαδή το πώς βρίσκουμε τα $x, y, z, \alpha, \beta, \gamma$)– είναι ευκαιρία να συζητήσουμε το βασικό πρόβλημα με τη μέθοδο της μοριακής αντικατάστασης. Και το βασικό πρόβλημα είναι αυτό που έχουμε ήδη δει σχηματικά στην Εικόνα 11 (είναι εκείνη η εικόνα στην οποία ανακατεύαμε πλάτη και φάσεις από τις φατσούλες δύο Νομπελιστών): Οι φάσεις, για αυτήν την κατηγορία προβλημάτων, είναι πιο σημαντικές από τα πλάτη για τη δημιουργία ενός αναγνωρίσιμου ειδώλου. Οι φάσεις όμως στη μοριακή αντικατάσταση προέρχονται από το μοντέλο (και όχι από το πείραμα) το οποίο σημαίνει ότι η βασική πηγή πληροφορίας που έχουμε (δηλαδή οι φάσεις) τείνουν όχι προς τη δομή που θέλουμε να προσδιορίσουμε, αλλά προς το μοντέλο που διαλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε (αυτό λέγεται *model bias*). Ό,τι μας μένει για να τα βγάλουμε πέρα (δηλαδή για να λύσουμε τη δομή που μας ενδιαφέρει) είναι να χρησιμοποιήσουμε με μεγάλη προσοχή τις διαφορές στα πλάτη (δηλαδή τα $F_{\text{HUMAN}} - F_{\text{MOUSE}}$ του προηγούμενου παραδείγματος) ώστε σταδιακά να

'μετασχηματίσουμε' τη δομή του μοντέλου στη δομή που θέλουμε να προσδιορίσουμε. Αυτό δεν πρόκειται να συμβεί εάν το αρχικό μοντέλο δεν μοιάζει αρκετά με τη δομή-στόχο, αν δηλαδή οι φάσεις είναι τελείως λάθος.

Πώς βρίσκουμε –επιτέλους– αυτά τα $(x,y,z,\alpha,\beta,\gamma)$; Η βασική μέθοδος επίλυσης του προβλήματος στηρίζεται σε κάτι που λέγεται 'συνάρτηση Patterson' η οποία είναι μία επικίνδυνη, μυστικιστική και ανελέητη συνάρτηση (dangerous, mystical and unforgiving είναι οι επίσημοι κρυσταλλογραφικοί όροι) για την οποία θα πούμε δύο λέξεις αργότερα. Προς το παρόν θα δώσουμε ένα παράδειγμα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της συστηματικής έρευνας που είναι πιο κατανοητή (και την έχετε ήδη ακούσει όταν μιλούσαμε για τα βαριά άτομα). Η μέθοδος στηρίζεται στο να κάνουμε μία συστηματική έρευνα (μία σάρωση/σκανάρισμα) όλων των πιθανών τιμών των $(x,y,z,\alpha,\beta,\gamma)$ μέχρι να βρούμε το σωστό συνδυασμό. Χρησιμοποιώντας ως παράδειγμα την πρωτεΐνη από άνθρωπο και το ποντίκι που

αναφέραμε πριν, η μέθοδος δουλεύει ως εξής.

Δώσε στις παραμέτρους που μας ενδιαφέρουν αρχικές τιμές $x=0$, $y=0$, $z=0$, $\alpha=0$, $\beta=0$, $\gamma=0$ (η πρώτη τριάδα σε μονάδες μήκους, η δεύτερη σε μοίρες). Με το που έχουμε κάνει αυτήν την υπόθεση για τις τιμές των $(x,y,z,\alpha,\beta,\gamma)$ μπορούμε να κατασκευάσουμε ένα ατομικό μοντέλο της δομής των κρυστάλλων και συνεπώς μπορούμε (μέσω της ανάλυσης Fourier) να υπολογίσουμε τόσο τα πλάτη όσο και τις φάσεις των F_{MOUSE} που θα βρίσκαμε εάν όντως το πρωτεϊνικό μοντέλο είχε $x=0$, $y=0$, $z=0$, $\alpha=0$, $\beta=0$, $\gamma=0$. Συγκρίνουμε τώρα τα πλάτη F_{HUMAN} (που μετρήσαμε πειραματικά) με τα πλάτη F_{MOUSE} (που υπολογίσαμε από την τρέχουσα υπόθεση για τις τιμές των $x,y,z,\alpha,\beta,\gamma$). Εάν τα πειραματικά πλάτη δεν ταιριάζουν καθόλου με αυτά που υπολογίζουμε από το μοντέλο, τότε μπορούμε με ασφάλεια να συνάγουμε ότι η πρωτεϊνική δομή δεν είναι στα $x=0$, $y=0$, $z=0$, $\alpha=0$, $\beta=0$, $\gamma=0$, και πάμε παρακάτω με τη συστηματική έρευνα ως εξής : Αυξάνουμε κατά πολύ λίγο την τιμή της x συντεταγμένης και

ξαναδοκιμάζουμε την ίδια διαδικασία. Ταιριάζουν τώρα ; Εάν όχι αυξάνουμε ξανά τη x συντεταγμένη μέχρι να φτάσουμε στο όριο της στοιχειώδους κυψελίδας κατά μήκος του x . Μετά κάνουμε το x πάλι μηδέν, αλλά αυξάνουμε πολύ λίγο το y , μετά κάνουμε το ίδιο με την τιμή του z , μετά αλλάζουμε την τιμή της γωνίας α , μετά της β , κοκ. Με άλλα λόγια 'σαρώνουμε' όλες τις πιθανές θέσεις και προσανατολισμούς της πρωτεΐνης στη στοιχειώδη κυψελίδα μέχρι να βρούμε εκείνη τη θέση (x,y,z) και εκείνο τον προσανατολισμό (α,β,γ) για τους οποίους τα πλάτη που βρήκαμε από το πείραμα να ταιριάζουν με αυτά που υπολογίζουμε από τα $(x,y,z,\alpha,\beta,\gamma)$. Αυτή θα είναι η λύση που ψάχνουμε, και με που την έχουμε βρει μπορούμε να υπολογίσουμε τα F_{MOUSE} και φ_{MOUSE} , και να συνεχίσουμε με τον προσδιορισμό της δομής όπως περιγράψαμε στις προηγούμενες παραγράφους.

Όπως είχαμε αναφέρει και στο κεφάλαιο της ισόμορφης αντικατάστασης, αυτή η διαδικασία είναι εξαιρετικά επίπονη υπολογιστικά και μπορεί να γίνει μόνο εάν έχουμε ένα σετ από $(x,y,z,\alpha,\beta,\gamma)$ να

προσδιορίσουμε. Αλλά ακόμα και έτσι είναι δύσκολα εφαρμόσιμη : εάν έχουμε μόνο 50 διαφορετικές τιμές να δοκιμάσουμε για κάθε ένα από τα $(x,y,z,\alpha,\beta,\gamma)$, τότε πρέπει να κάνουμε περίπου 15 δις μετασχηματισμούς (αναλύσεις) Fourier για να υπολογίζουμε τα F_{MOUSE} , και αυτή τη φορά όχι για ένα βαρύ άτομο (όπως στο Κεφάλαιο 14), αλλά για ολόκληρο πρωτεϊνικό μόριο με χιλιάδες άτομα. Είναι τέτοια η έκταση και η βαρύτητα των υπολογισμών που απαιτούνται, ώστε είναι ελάχιστες οι φορές που μία τέτοια συστηματική εξαδιάστατη έρευνα έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία.

18 Το προϊόν και η ερμηνεία του

Έχει περάσει σχεδόν ολόκληρο το βιβλίο, και ακόμα αυτό το περίφημο 'είδωλο' δεν το είδαμε και δεν το συζητήσαμε. Τώρα είναι καιρός να το βάλουμε και αυτό σε μία τάξη και να κλείσουμε αυτόν τον κύκλο με τις εισαγωγικές ιδέες της κρυσταλλογραφίας πρωτεϊνών. Ακούστε.

Όπως είπαμε στα αρχικά κεφάλαια, στην περίθλαση από κρυστάλλους συνεισφέρουν σχεδόν αποκλειστικά τα ηλεκτρόνια των ατόμων. Άρα αυτό που 'βλέπουν' οι ακτίνες-Χ είναι η κατανομή ηλεκτρονίων στην στοιχειώδη κυψελίδα και τον κρύσταλλο. Αυτό το 'κατανομή ηλεκτρονίων' της προηγούμενης πρότασης σημαίνει με απλά λόγια το να ξέρουμε πού μέσα στον κρύσταλλο συχνάζουν τα ηλεκτρόνια, δηλαδή σε ποιες θέσεις στη στοιχειώδη κυψελίδα έχει πολλά ηλεκτρόνια (π.χ. κοντά στον πυρήνα ενός ατόμου με μεγάλο ατομικό αριθμό), και που έχει λίγα (π.χ. σε μία άδεια από άτομα εσοχή της πρωτεΐνης). Αυτό το 'πολλά' και 'λίγα' ηλεκτρόνια θα πρέπει να το

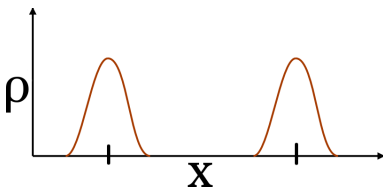
αντιληφθείτε σε μονάδες πυκνότητας ηλεκτρονίων, κάτι σαν “ο στοιχειώδης όγκος στη θέση x_1, y_1, z_1 της στοιχειώδους κυψελίδας έχει κατά μέσο όρο (ρ_1) ηλεκτρόνια ανά μονάδα όγκου, στη θέση x_2, y_2, z_2 έχει (ρ_2) ηλεκτρόνια ανά μονάδα όγκου,” κοκ.

Άρα, το πειραματικό προϊόν της κρυσταλλογραφίας πρωτεϊνών είναι η κατανομή ηλεκτρονίων στη στοιχειώδη κυψελίδα. Αυτή η κατανομή εκφράζεται με τη μορφή της πυκνότητας ηλεκτρονίων ως συνάρτηση της θέσης (x, y, z) στην κυψελίδα. Αυτή η συνάρτηση που περιγράφει τη μεταβολή πυκνότητας ηλεκτρονίων ως συνάρτηση της θέσης συμβολίζεται ως $\rho(x, y, z)$ και είναι γνωστή ως η “συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας” (electron density function, θα το βρείτε και ως “ηλεκτρονιακή πυκνότητα”).

Η αναπαράσταση μίας τρισδιάστατης συνάρτησης όπως της $\rho(x, y, z)$ είναι δύσκολη [φανταστείτε π.χ. να θέλετε να αναπαραστήσετε την κατανομή πυκνότητας ρύπων στον αέρα ως συνάρτηση των διαφορετικών θέσεων (και καθ' ύψος) στην ατμόσφαιρα του πλανήτη]. Για να μη χαθούμε λοιπόν,

ας το πάρουμε αργά-αργά ξεκινώντας από το πώς περιγράφουμε κατανομές στη μία διάσταση, μετά στις δύο, για να φτάσουμε αισίως και στις ζητούμενες τρισδιάστατες κατανομές.

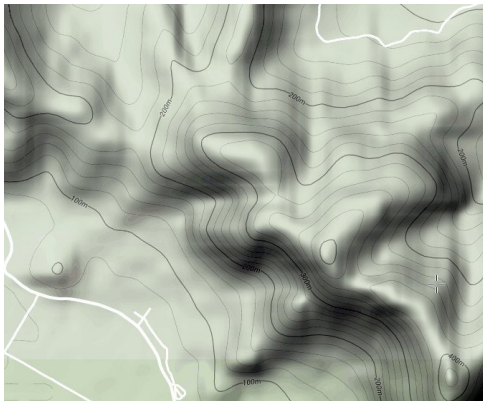
Στη μία διάσταση, δηλαδή με μία ανεξάρτητη μεταβλητή, τα πράγματα είναι απλά. Η συνάρτηση είναι η $\rho(x)$ [ή γράφοντας το ίδιο πράγμα με άλλο τρόπο, είναι η $\rho=f(x)$] και η συνηθισμένη αναπαράσταση με δύο άξονες αρκεί :



Εικόνα 29: Η συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας $\rho(x)$ στη μία διάσταση.

Αυτό που βλέπετε στην Εικόνα 29 θα μπορούσε να είναι το προφίλ της ηλεκτρονικής πυκνότητας δύο ατόμων στη μία διάσταση.

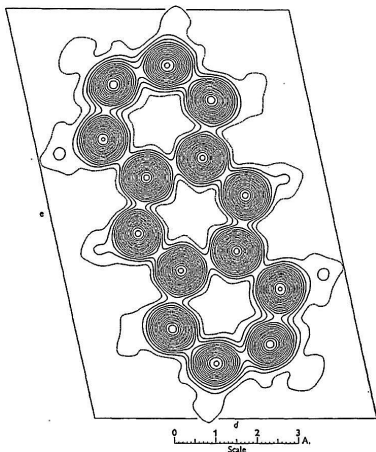
Για τις δύο διαστάσεις, το πράγμα μπερδεύεται λιγάκι. Δείτε αυτόν τον τοπογραφικό χάρτη από το Google :



Εικόνα 30: Αναπαράσταση ενός τοπογραφικού χάρτη ο οποίος περιέχει υψομετρική πληροφορία του τύπου $Y=f(x,y)$ όπου Y το υψόμετρο. Προσέξτε τις ισοϋψείς γραμμές που έχουν σημειωμένο και το ύψος (σε μέτρα). Κάθε τέτοια γραμμή περικλείει όλες τις θέσεις του χάρτη με υψόμετρο μεγαλύτερο από το όριο που αντιστοιχεί σε κάθε τέτοια γραμμή.

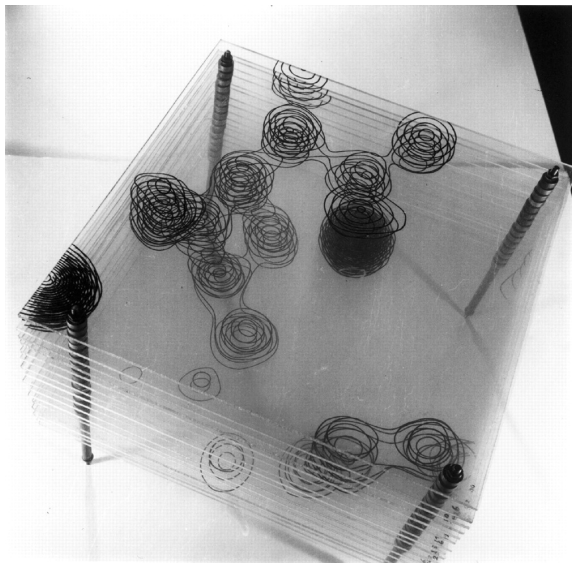
Η συνάρτηση είναι της μορφής $Y=f(x,y)$ με δύο

ανεξάρτητες μεταβλητές που περιγράφουν τη θέση στο επίπεδο, και μία εξαρτημένη μεταβλητή (την Y) που περιγράφει το ύψος πάνω από την επιφάνεια της θάλασσας. Αγνοήστε τη φωτοσκίαση της Εικόνας 30 και εστιάστε στις γραμμές (γνωστές ως ισοϋψείς) που περιγράφουν πώς αλλάζει το υψόμετρο ως συνάρτηση της θέσης στο επίπεδο. Με τον ίδιο τρόπο, δηλαδή με ισοϋψείς μπορούμε να αναπαραστήσουμε και τη συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας $\rho(x,y)$ όπως φαίνεται στην Εικόνα 31. Οι συγκεντρώσεις ηλεκτρονικής πυκνότητας σε αυτήν την εικόνα αντιστοιχούν σε άτομα άνθρακα. Για κάθε άτομο υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ομόκεντρων ισοϋψών. Οι εξωτερικές ισοϋψείς αντιστοιχούν σε χαμηλή πυκνότητα, οι εσωτερικές σε σταδιακά αυξανόμενη ηλεκτρονική πυκνότητα. Το σχήμα και η θέση διαδοχικών ισοϋψών μας δείχνει ότι καθώς πλησιάζουμε τα κέντρα των ατόμων η μέση ηλεκτρονική πυκνότητα αυξάνει. Οι μικρές σε πυκνότητα προεκβολές που φαίνονται να βγαίνουν από τα άτομα άνθρακα δεν είναι θόρυβος, είναι τα άτομα υδρογόνου αυτής της ένωσης.



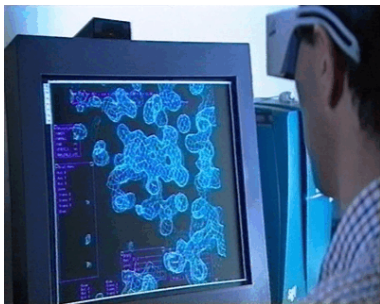
Εικόνα 31: Δισδιάστατος χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας $\rho(x,y)$ ενός αρωματικού υδρογονάνθρακα με το όνομα ανθρακένιο. Κάθε συγκέντρωση ('λόφος') ηλεκτρονικής πυκνότητας αντιστοιχεί σε ένα άτομο άνθρακα. Το βήμα για τις διαδοχικές ισοϋψείς είναι 0.5 ηλεκτρόνια ανά κυβικό Ångström και η κλίμακα για τις συντεταγμένες των ατόμων φαίνεται στο κάτω μέρος της εικόνας. Οι μικρές (σε ηλεκτρονική πυκνότητα) προεξοχές που φαίνεται να 'βγαίνουν' από τα άτομα άνθρακα είναι τα άτομα υδρογόνου του ανθρακενίου.

Για τις τρεις διαστάσεις τώρα θα πρέπει να χρησιμοποιήσετε δημιουργικά τη φαντασία σας. Εκεί που στις δύο διαστάσεις είχαμε γραμμές που δήλωναν πυκνότητα, στις τρεις έχουμε επιφάνειες που περιβάλλουν έναν όγκο του τρισδιάστατου χώρου. Οι επιφάνειες αυτές ονομάζονται ισοεπιφάνειες, και διαδοχικές ισοεπιφάνειες περικλείουν όγκους με διαδοχικά αυξανόμενη ηλεκτρονική πυκνότητα. Εκεί που στις δύο διαστάσεις είχαμε ομόκεντρους κύκλους ισοϋψών να αντιστοιχούν σε άτομα, στις τρεις διαστάσεις έχουμε ομόκεντρες σφαίρες ισοεπιφανειών να αντιστοιχούν στα άτομα. Θεωρητικά μιλώντας, ίσως η ιδέα να βγάζει νόημα, αλλά αυτό δε διορθώνει το πρόβλημα του πώς να αναπαραστήσουμε μία τρισδιάστατη συνάρτηση. Τις παλιές ημέρες (πριν τους υπολογιστές με κάρτες γραφικών που να υποστηρίζουν στερεοσκοπική όραση), υπήρχαν τα διαφανή φύλλα πλεξιγκλάς που επέτρεπαν την αναπαράσταση μιας τρισδιάστατης συνάρτησης μέσω της αναπαράστασης διαδοχικών επιπέδων της όπως φαίνεται στην Εικόνα 32.



Εικόνα 32: Τρισδιάστατος χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας της πενικιλίνης. Η τρισδιάστατη αναπαράσταση της ηλεκτρονικής πυκνότητας επιτυγχάνεται μέσω της υπέρθεσης διαδοχικών τομών (επιπέδων). Σε κάθε μεμονωμένο (δισδιάστατο) επίπεδο η ηλεκτρονική πυκνότητα αναπαρίστανται με ισοϋψείς όπως αυτές της Εικόνας 31.

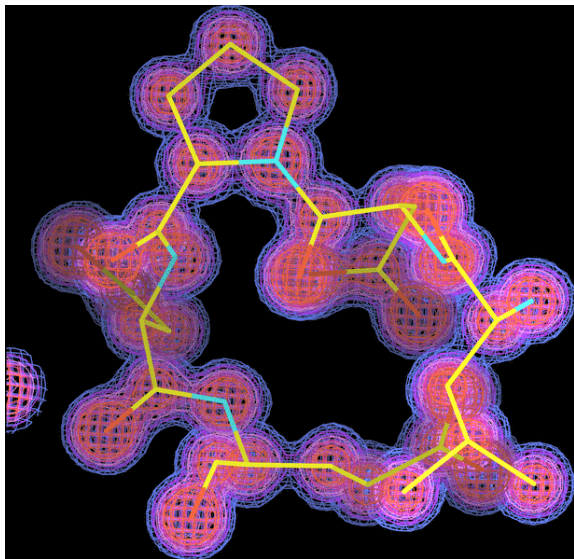
Στις παρηκμασμένες μέρες μας, είναι πολύ πιο εύκολο, γρήγορο και ακριβές το να γίνεται αυτή η ανάλυση με τη βοήθεια υπολογιστών εξοπλισμένων με τα ειδικά γυαλιά στερεοσκοπικής όρασης :



Εικόνα 33: Μία ωραία ημέρα στο κρυσταλλογραφικό εργαστήριο.

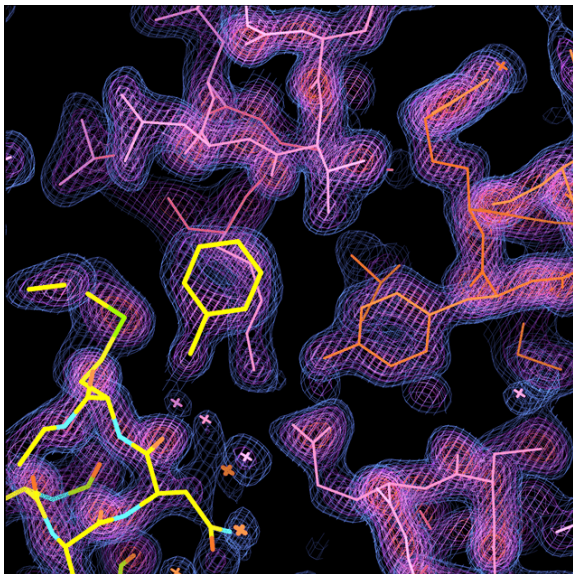
Τώρα που κλείσαμε το θέμα του με τι μοιάζει το πειραματικά προσδιορισμένο προϊόν της κρυσταλλογραφίας, είναι καιρός να γυρίσουμε πίσω σε εκείνη την ιδέα της διακριτικότητας γιατί στην πραγματικότητα τα πράγματα δεν είναι τόσο απλά

όσο αφήσαμε να εννοηθεί. Ακούστε. Ιδανικά θα θέλαμε οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι να έχουν τόσο υψηλή εσωτερική τάξη (δηλαδή οι κρύσταλλοι να είναι τέτοιας ποιότητας) ώστε τα δεδομένα που συλλέγουμε από αυτούς να αρκούν για να επιτύχουμε την επιδιωκόμενη ατομική διακριτικότητα. Εάν οι κρύσταλλοι είναι όντως τέτοιας ποιότητας, τότε στο είδωλό τους (δηλαδή στο χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας) πράγματι θα βλέπουμε τα διακριτά άτομα της πρωτεΐνης με τη μορφή σφαιρών υψηλής ηλεκτρονικής πυκνότητας. Το μοναδικό που θα έμενε να κάνουμε θα ήταν να συγκρίνουμε αυτό που βλέπουμε στο χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας με τη γνωστή αλληλουχία της πρωτεΐνης ώστε να ταυτοποιήσουμε το ποιο άτομο (στο χάρτη) είναι ποιο άτομο (της πρωτεΐνης). Με το που έχουμε κάνει και αυτήν την ταυτοποίηση, μπορούμε εύκολα να φτιάξουμε το ατομικό μοντέλο της πρωτεΐνης όπως φαίνεται στην Εικόνα 34.



Εικόνα 34: Μικρό τμήμα από έναν υψηλής ποιότητας και διακριτικότητας χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας (με ισοεπιφάνειες διαφορετικού χρώματος) πάνω στον οποίο έχει γίνει υπέρθεση του ατομικού μοντέλου που προέκυψε από την ερμηνεία του (τα ευθύγραμμα τμήματα είναι ομοιοπολικοί δεσμοί, στις γωνίες είναι τα άτομα, τα χρώματα των ευθύγραμμων τμημάτων δηλώνουν τον τύπο των αντίστοιχων ατόμων, κίτρινο→άνθρακας, μπλε→άζωτο, κόκ).

Δυστυχώς, τα πράγματα πολύ σπάνια είναι τόσο ωραία και εύκολα όσο υπονοεί η Εικόνα 34. Οι πραγματικοί πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι σπάνια μας κάνουν το χατήρι να έχουν την εξαιρετική τάξη και οργάνωση που απαιτείται για να παραχθούν είδωλα του επιπέδου της Εικόνας 34 με αυτά τα ωραία, σφαιρικά και σαφώς διαχωρισμένα μεταξύ τους άτομα. Με άλλα λόγια, τα δεδομένα περίθλασης από πρωτεϊνικούς κρυστάλλους συνήθως δεν αρκούν για την επίτευξη της επιδιωκόμενης ατομικής διακριτικότητας. Ο λόγος για αυτό είναι ότι οι πρωτεΐνες είναι μεγάλες, δυναμικές και ευμετάβλητες δομές οι οποίες πολύ δύσκολα μπορούν να δημιουργήσουν τους κρυστάλλους υψηλής τάξης και οργάνωσης που απαιτούνται για να μπορέσουμε να καταγράψουμε ατομικής διακριτικότητας δεδομένα. Το αποτέλεσμα είναι ότι οι συνηθισμένες για πρωτεϊνικούς κρυστάλλους διακριτικότητες δεν είναι στο $\sim 1\text{\AA}$ όπως θα θέλαμε, αλλά περίπου στα 2 με 3\AA . This is bad news όπως φαίνεται στην Εικόνα 35.



Εικόνα 35: Μικρό τμήμα από έναν συνηθισμένης ποιότητας χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας μιας πρωτεΐνης. Για ευκολία αναγνώρισης του τι βλέπετε, στην εικόνα φαίνεται και ένα ατομικό μοντέλο που ερμηνεύει το χάρτη. Συγκρίνετε με την Εικόνα 34 και δείτε πόσο θολή και συγκεχυμένη έγινε η πληροφορία για την ατομική δομή της πρωτεΐνης λόγω της μείωσης της διακριτικότητας.

Όλη η πληροφορία που είχαμε για τις ακριβείς και διακριτές θέσεις των ατόμων έχει χαθεί. Τα γειτονικά άτομα της πρωτεΐνης έχουν φαινομενικά ενωθεί μεταξύ τους σε μία ενιαία και συνεχή κατανομή ηλεκτρονικής πυκνότητας με μόνο το γενικό σχήμα των πλευρικών ομάδων μερικών αμινοξέων να είναι εύκολα ταυτοποιήσιμο (όπως π.χ. οι πλευρικές ομάδες μίας τυροσίνης και μιας φαινυλαλανίνης στο κέντρο της Εικόνας 35).

Η απώλεια ατομικής διακριτικότητας έχει μία πολύ σημαντική συνέπεια : η διαδικασία που μας πάει από το χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας στο ατομικό μοντέλο που κατατίθεται στην PDB δεν είναι πλέον αυτονόητη και 'αντικειμενική', αλλά απαιτεί την *ερμηνεία* εκ μέρους του πειραματιστή του τι σημαίνει (σε όρους πρωτεϊνικής δομής) αυτό που βλέπει στο χάρτη. Το αποτέλεσμα είναι ότι οι πρωτεϊνικές δομές που είναι διαθέσιμες από την PDB δεν είναι οι πειραματικά προσδιορισμένες δομές, αλλά οι *ερμηνείες* των πειραματικά προσδιορισμένων χαρτών ηλεκτρονικής πυκνότητας. Εδώ, λοιπόν, υπάρχει ένα

λεπτό θέμα. Αυτή η 'ερμηνεία' του χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας υποχρεωτικά υπονοεί την πιθανότητα το ατομικό μοντέλο (από την PDB) να περιέχει σφάλματα, με την πιθανότητα σφαλμάτων να αυξάνει καθώς η διακριτικότητα χειροτερεύει (μειώνεται). Δεν είναι η ώρα να συζητήσουμε (ή να κουτσομπολέψουμε) τις διάσημες λανθασμένες δομές της κρυσταλλογραφίας, αλλά το μήνυμα παραμένει : μη δέχεστε ό,τι είναι στην PDB ως την άνευ όρων καθολικά αποδεκτή φυσική πραγματικότητα όπως έχει προσδιοριστεί με αυστηρές και αδιάβλητες πειραματικές μεθόδους, γιατί ίσως να μην είναι ακριβώς έτσι.

19 Επανάληψη δεύτερη

Υπάρχουν δύο κυρίαρχες μέθοδοι προσδιορισμού φάσεων στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών. Η πρώτη μέθοδος (καλύτερα, ομάδα μεθόδων) στηρίζεται στη δημιουργία μίας τροποποιημένης μορφής των φυσικών κρυστάλλων στην οποία τροποποιημένη μορφή υπάρχει ένας μικρός αριθμός 'διαφορετικών' ατόμων (είτε βαριά άτομα για τις μεθόδους SIR, MIR, MIRAS, SIRAS, ή άτομα που σκεδάζουν με ιδιαίτερο τρόπο ανάλογα με το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας για τα MAD, SAD). Η παρουσία αυτού του μικρού αριθμού 'διαφορετικών' ατόμων επιτρέπει τη μετάθεση του προβλήματος των φάσεων από τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής δομής στον προσδιορισμό της δομής (θέσης στη στοιχειώδη κυψελίδα) αυτών των διαφορετικών ατόμων. Αυτή η μετάθεση του προβλήματος οδηγεί σε μία τόσο δραματική απλοποίηση του προβλήματος (από χιλιάδες ή δεκάδες χιλιάδες πρωτεϊνικά άτομα σε λίγα βαρέα άτομα), που το πρόβλημα της δομής

των βαρέων ατόμων να μπορεί όντως να λυθεί από μηδενική βάση με τη χρήση μεθόδων όπως της συστηματικής έρευνας, της συνάρτησης Patterson, με τις λεγόμενες 'άμεσες μεθόδους' (direct methods), κοκ. Με το που έχουμε βρει τη δομή αυτών των 'διαφορετικών' ατόμων, μπορούμε να υπολογίσουμε τους παράγοντες δομής που αντιστοιχούν στα βαρέα άτομα και μέσω αυτών να υπολογίσουμε τις φάσεις των πρωτεϊνικών κρυστάλλων.

Η δεύτερη βασική μέθοδος προσδιορισμού μακρομοριακών δομών είναι η μοριακή αντικατάσταση. Σε αυτήν την περίπτωση η επίλυση του προβλήματος των φάσεων γίνεται καθαρά υπολογιστικά και βασίζεται στο να χρησιμοποιήσουμε κάποια ήδη γνωστή πρωτεϊνική δομή ως μοντέλο για να προσδιορίσουμε ένα σετ αρχικών φάσεων για την άγνωστη δομή το οποίο στη συνέχεια βελτιστοποιούμε επαναληπτικά. Η θεμελιώδης ιδέα της μεθόδου είναι ότι εάν η δομή που επιλέγουμε ως μοντέλο μοιάζει αρκετά με τη δομή που θέλουμε να προσδιορίσουμε, τότε οι φάσεις που θα υπολογίσουμε

από το μοντέλο θα είναι τόσο κοντά στις πραγματικές φάσεις ώστε να μπορέσουμε μέσω κύκλων αλλαγής του αρχικού μοντέλου να προσδιορίσουμε την άγνωστη δομή-στόχος. Καθώς το πλήθος των γνωστών πρωτεϊνικών δομών αυξάνει, η σημασία της μοριακής αντικατάστασης ως μεθόδου επίλυσης του προβλήματος των φάσεων αυξάνει αναλογικά.

Κάπου εδώ αυτή η “Μη μαθηματική εισαγωγή στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών” τελείωσε. Τα κεφάλαια που ακολουθούν είναι ευκρινώς σημειωμένα ως δύσπεπτα, περιέχουν λίγα μαθηματικά, και στόχος τους είναι να βάλουν σε μία πιο στέρεη βάση τις ιδέες που αναφέρθηκαν στο πρώτο τμήμα αυτού του βιβλίου. Καλή συνέχεια.

Μέρος 2^ο : Βαθύτερα νερά

20 ☼ All things Fourier

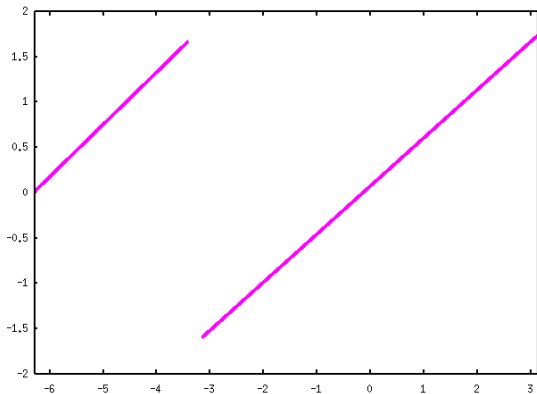
Με μία μικρή μόνο δόση υπερβολής, η κρυσταλλογραφία είναι συμμετρία και μετασχηματισμοί Fourier. Επειδή η μελέτη της συμμετρίας δε συνεισφέρει άμεσα στην κατανόηση της φυσικής της περίθλασης δε θα ασχοληθούμε σχεδόν καθόλου με τα πώς και τα γιατί της συμμετρίας. Αντίθετα, οι μετασχηματισμοί, δηλαδή η ανάλυση και η σύνθεση Fourier, είναι οι θεμελιώδεις διαδικασίες της κρυσταλλογραφίας και θα τους συζητήσουμε μέχρι εξαντλήσεως. Ακούστε.

Ο κ. Fourier πριν από πολύ-πολύ καιρό είπε (και απέδειξε) ότι κάθε περιοδική συνάρτηση –άσχετα από το πόσο απλή ή πολύπλοκη είναι– μπορεί να γραφτεί/αναλυθεί σαν ένα άθροισμα απλών κυμάτων. Το σημαντικό είναι πως αυτό που περιέγραψε ο κ. Fourier ως θεώρημα είναι ακριβώς αυτό που συμβαίνει πειραματικά όταν βάζουμε ένα κρύσταλλο μέσα σε μία δέσμη ακτίνων-X : η πληροφορία για τη δομή μίας πολύπλοκης περιοδικής συνάρτησης (που

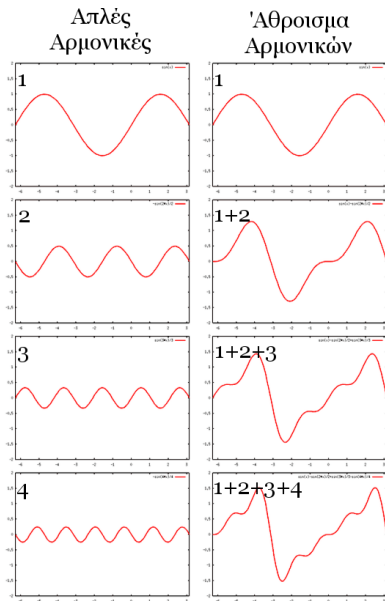
είναι ο κρύσταλλος) αναλύεται σε απλά κύματα (που είναι οι δέσμες ακτίνων-Χ που περιθλώνται από τον κρύσταλλο). Αυτή η διαδικασία ονομάζεται *ανάλυση Fourier* και μας πηγαίνει από την περιοδική συνάρτηση (δηλαδή τον κρύσταλλο) στα απλά κύματα (δηλαδή το φάσμα περίθλασης). Η αντίστροφη διαδικασία που μας πάει από τα απλά κύματα (το φάσμα περίθλασης) στην περιοδική συνάρτηση (το είδωλο του αντικειμένου) είναι η *σύνθεση Fourier*. Για να τα βάλουμε αυτά σε εικόνες, ας δούμε ένα παράδειγμα με μία ιδιαίτερα 'δύσκολη' περιοδική συνάρτηση, αυτή της Εικόνας 36. Η συνάρτηση αυτή είναι μία ιδιαίτερα δύσκολη περίπτωση γιατί έχει ένα σημείο ασυνέχειας (κάτι που, για παράδειγμα, δεν υπάρχει σε πραγματικούς κρυστάλλους). Οι Εικόνες 37 και 38 δείχνουν το φυσικό νόημα της σύνθεσης και της ανάλυσης Fourier για αυτήν τη συνάρτηση. Καθώς προσθέτουμε απλές αρμονικές (απλά κύματα) μεταξύ τους, το άθροισμα τους τείνει προς την αρχική μας συνάρτηση (της Εικόνας 36).

Το ανάποδο της ίδιας διαδικασίας, δηλαδή το να πάμε

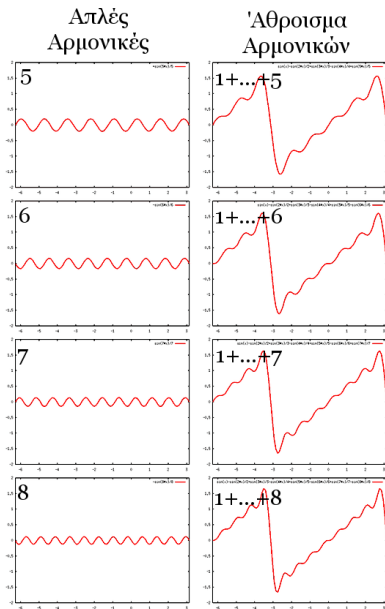
από το άθροισμα των κυμάτων στα απλά κύματα, είναι η ανάλυση Fourier.



Εικόνα 36: Μικρό τμήμα μίας αυθαίρετης περιοδικής συνάρτησης. Μία πλήρης περίοδος (δηλαδή μία πλήρης στοιχειώδης κυψελίδα) φαίνεται στο τμήμα που εκτείνεται από το -3 έως το +3 κατά μήκος του x . Το τμήμα από το -6 μέχρι το -3 (πάλι κατά μήκος του x) προέρχεται από την προηγούμενη κυψελίδα. Σημειώστε ότι αυτή είναι μία ιδιαίτερη συνάρτηση γιατί έχει ένα σημείο ασυνέχειας στο όριο μεταξύ γειτονικών κυψελίδων.



Εικόνα 37: Σύνθεση και ανάλυση Fourier. Αυτή και η επόμενη εικόνα δείχνουν πώς προσθέτοντας ένα μικρό αριθμό απλών κυμάτων (αρμονικών) μπορούμε να προσεγγίσουμε την περιοδική συνάρτηση της Εικόνας 36. Η πρόσθεση αρμονικών που οδηγεί στο είδωλο είναι η σύνθεση Fourier, η ανάποδη πορεία είναι η ανάλυση.



Εικόνα 38: Σύνθεση και ανάλυση Fourier. Αυτή και η προηγούμενη εικόνα δείχνουν πώς προσθέτοντας ένα μικρό αριθμό απλών κυμάτων (αρμονικών) μπορούμε να προσεγγίσουμε την περιοδική συνάρτηση της Εικόνας 36. Η πρόσθεση αρμονικών που οδηγεί στο είδωλο είναι η σύνθεση Fourier, η ανάποδη πορεία είναι η ανάλυση.

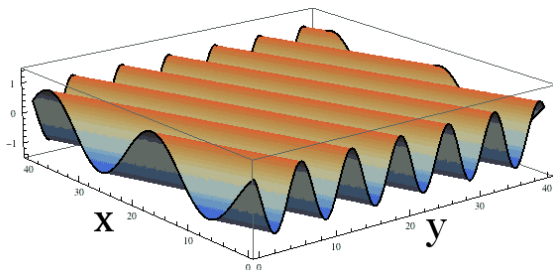
Το παράδειγμα των Εικόνων 37 και 38 δείχνει τη φυσική σημασία των μετασχηματισμών Fourier, αλλά δεν εξηγεί το πώς βρήκαμε τα πλάτη και τις φάσεις των απλών κυμάτων που απαιτούνται ούτως ώστε η πρόσθεσή τους όντως να μας δώσει πίσω τη συνάρτηση της Εικόνας 36. Αυτό το 'πώς' το απαντούν οι λεγόμενες εξισώσεις του παράγοντα δομής. Αλλά πριν από αυτό, πρέπει να κάνουμε κάτι για τους τυχόν εξαγριωμένους αναγνώστες.

Κάποιοι από εσάς, λοιπόν, ίσως να φωνάζετε με ιερή αγανάκτηση ότι οι Εικόνες 37 και 38 είναι τελείως ασύμβατες με ό,τι λέγαμε στο πρώτο μέρος αυτού του βιβλίου. Και ο λόγος είναι ο εξής. Σε όλο το βιβλίο λέγαμε και ξαναλέγαμε ότι ολόκληρο το κρυσταλλογραφικό πείραμα είναι μονοχρωματικό, ότι δηλαδή τόσο η προσπίπτουσα ακτινοβολία όσο και οι περιθλώμενες δέσμες έχουν το ίδιο σταθερό και αμετάβλητο μήκος κύματος. Τώρα ξαφνικά έρχονται οι Εικόνες 37 και 38 και δείχνουν ότι τα κύματα που προσθέτουμε για να πάρουμε πίσω το είδωλο του αντικειμένου έχουν όλα τους διαφορετικά μήκη

κύματος. Οι πλέον παρατηρητικοί ίσως να προσέξατε μάλιστα ότι τα μήκη κύματος των διαδοχικών απλών αρμονικών 1, 2, ..., 8 των Εικόνων 37 και 38 δεν είναι μεταξύ τους άσχετα : Το κύμα '1' της Εικόνας 37 κάνει έναν πλήρη κύκλο ανά στοιχειώδη κυψελίδα (μη ξεχνάτε ότι αυτές οι εικόνες δείχνουν το ισοδύναμο μιάμισης κυψελίδας ώστε να φαίνεται η ασυνέχεια της συνάρτησης). Το κύμα '2' κάνει δύο πλήρεις κύκλους, η αρμονική '3' τρεις κύκλους, κοκ. Είναι σαν να έχουμε τόσα διαφορετικά μήκη κύματος όσα και τα κύματα που προσθέτουμε. Η ερμηνεία του πώς όλα αυτά όχι μόνο βγάζουν φυσικό νόημα αλλά είναι και συνεπή με όσα είπαμε στο πρώτο μέρος του βιβλίου είναι κάπως δύσκολη, συγκεντρωθείτε.

Στο κεφάλαιο 12 είχαμε βρει εκείνη τη συνθήκη περίθλασης [την $d \cdot \sin(2\theta) = h \cdot \lambda$] και είχαμε συνδέσει διαδοχικά κύματα (με αυξανόμενο δείκτη 'h') με διαδοχικά αυξανόμενες γωνίες περίθλασης 2θ . Εάν υπήρχε ένας φακός ώστε να κάνει τη σύνθεση αυτών των κυμάτων, τότε οι διευθύνσεις των κυμάτων θα άλλαζαν εξαιτίας του φακού και τα κύματα αυτά θα

συνέκλιναν πάλι μεταξύ τους για να δημιουργήσουν το είδωλο του αντικειμένου. Οι διαφορές όμως μεταξύ των γωνιών με τις οποίες τα κύματα θα συνέκλιναν μετά τη δράση του φακού δε θα άλλαζαν : το κύμα με $h=1$ θα συνεισέφερε στη δημιουργία του ειδώλου με μικρή γωνία πρόσπτωσης, το κύμα $h=2$ με μεγαλύτερη γωνία, κοκ. Τώρα το δύσκολο. Κύματα τα οποία ναι μεν έχουν το ίδιο μήκος κύματος αλλά η γωνία με την οποία συνεισφέρουν στη δημιουργία ειδώλου είναι διαφορετική θα συμβάλουν –στη δημιουργία του ειδώλου– με φαινομενικά διαφορετικό μήκος κύματος ανάλογα με τη γωνία (διεύθυνση) διάδοσής τους. Αυτή η ιδέα είναι τόσο δύσκολη που σίγουρα χρειαζόμαστε μία εικόνα. Δείτε την Εικόνα 39. Αυτό που βλέπετε σε αυτήν την εικόνα είναι ένα επίπεδο κύμα (plane wave) το οποίο ανάλογα με τη διεύθυνση παρατήρησης (ή ισοδύναμα, με τη διεύθυνση με την οποία συμβάλλει με άλλα κύματα) συνεισφέρει με ένα φαινομενικά τελείως διαφορετικό μήκος κύματος. Σιγουρευτείτε ότι καταλάβατε αυτή την ιδέα και την Εικόνα 39 γιατί είναι η ώρα να τα βάλουμε όλα μαζί.



Εικόνα 39: Πώς το φαινomenικό μήκος κύματος ενός επίπεδου κύματος αλλάζει ανάλογα με τη γωνία (διεύθυνση) παρατήρησης. Συγκρίνετε το φαινomenικό μήκος κύματος (γκρι περιοχές) στην αριστερή πλευρά του διαγράμματος (x άξονας) με αυτό της δεξιάς πλευράς (y άξονας).

Αυτό που μας έμαθε η Εικόνα 39 είναι ότι τα φαινomenικά διαφορετικά μήκη κυμάτων που είδαμε στις Εικόνες 37 και 38 δεν οφείλονται στο ότι τα κύματα έχουν όντως διαφορετικό μήκος κύματος, αλλά στο ότι τα κύματα αυτά συμβάλλουν στη δημιουργία ειδώλου έχοντας διαφορετικές διευθύνσεις διάδοσης, δηλαδή διαφορετικούς δείκτες

Miller (hkl). Το κύμα με αριθμό '1' στην Εικόνα 37 που κάνει ένα κύκλο (μία πλήρη περίοδο) ανά στοιχειώδη κυψελίδα είναι το κύμα με $h=1$ και είναι επίσης το κύμα που συμβάλλει στη δημιουργία ειδώλου έχοντας τη μικρότερη γωνία περίθλασης. Τα αντίστοιχα ισχύουν για τα κύματα 2, 3, ...

Ας ξαναπούμε τις ίδιες ιδέες με άλλο τρόπο γιατί τα πράγματα δυσκόλεψαν. Αυτά λοιπόν τα σιχαμένα (hkl) έχουν πολλά νόημα. Το πρώτο νόημα που είχαμε βρει (το εύκολο) ήταν ότι τα (hkl) είναι οι ακέραιοι δείκτες που 'μετρούν' συντεταγμένες σε εκείνο το πλέγμα από κουκκίδες (τις ανακλάσεις) που είχαμε δει στην Εικόνα 18. Το δεύτερο νόημα είναι εκείνο που προέκυψε από τις συνθήκες περίθλασης και στο οποίο αυτοί οι ίδιοι δείκτες μετρούσαν διαφορές δρόμων μεταξύ κυμάτων (εκπεφρασμένων σε ακέραιο αριθμό μηκών κύματος) ώστε αυτά τα κύματα να συμβάλλουν θετικά μεταξύ τους. Και τώρα έχουμε και την τρίτη ερμηνεία η οποία είναι ότι οι δείκτες αυτοί –επειδή αντιστοιχούν σε διαφορετικές γωνίες περίθλασης– μετρούν επίσης το φαινομενικό

μήκος κύματος με το οποίο διαφορετικές ανακλάσεις συνεισφέρουν στο σχηματισμό του τελικού ειδώλου του αντικειμένου. Ίσως διαισθητικά να βλέπετε ότι αυτές οι ερμηνείες είναι στην πραγματικότητα πολλές όψεις του ίδιου πολυδιάστατου νομίσματος : για π.χ. $h=2$ η διαφορά δρόμου μεταξύ κυμάτων από διαδοχικές κυψελίδες είναι ίση με δύο μήκη κύματος, και το αντίστοιχο κύμα θα συνεισφέρει στο τελικό είδωλο του αντικειμένου κάνοντας δύο πλήρεις κύκλους ανά κυψελίδα (με κάποιο πλάτος και κάποια φάση που καθορίζονται από τα περιεχόμενα/δομή του κρυστάλλου). Ταυτόχρονα, το ίδιο κύμα εάν το ζωγραφίζαμε ως μία κουκκίδα σε ένα πλέγμα όπως της Εικόνας 18 θα ήταν σε διπλάσια απόσταση από την αρχή των αξόνων σε σχέση με το κύμα $h=1$ και θα του αποδίδαμε ως συντεταγμένη τον δείκτη '2'.

Τώρα πάω γυρεύοντας, αλλά υπάρχει και μία τέταρτη σημασία των (hkl) που πρέπει να αναφερθεί και η οποία έχει σχέση με τη διακριτικότητα. Δείτε πάλι τις Εικόνες 37 και 38 αλλά αυτή τη φορά εστιάστε στο πώς τα μικρά h (λίγοι κύκλοι ανά στοιχειώδη

κυψελίδα) καθορίζουν τα αδρά, δηλαδή τα χαμηλής διακριτικότητας χαρακτηριστικά του χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας, ενώ τα μεγάλα h καθορίζουν τις λεπτομέρειες, δηλαδή τα υψηλής διακριτικότητας χαρακτηριστικά του χάρτη. Επειδή τα μικρά h υπονοούν και μικρές γωνίες περίθλασης ενώ τα μεγάλα h μεγάλες γωνίες, είναι επίσης σωστό να δείτε το ίδιο πράγμα με όρους γωνιών περίθλασης : οι ανακλάσεις που έχουν μικρό 2θ (και είναι συνεπώς κοντά στην αρχή των αξόνων, κοντά στην κατεύθυνση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας) περιέχουν χαμηλής διακριτικότητας πληροφορία, οι ανακλάσεις με μεγάλο 2θ (προς την περιφέρεια του φάσματος περίθλασης) περιέχουν την υψηλής διακριτικότητας πληροφορία. Να μην σας κουράσω, αλλά αυτός είναι από τους καθιερωμένους τρόπους που οι κρυσταλλογράφοι μπορούν με μία ματιά σε ένα φάσμα περίθλασης να αποφανθούν για το εάν κάποιοι κρύσταλλοι είναι χρήσιμοι ή όχι : Αυτό που κοιτάζουν είναι (α) πόσο ομοιόμορφες, διακριτές, συμπαγείς, ισχυρές και καλοσχηματισμένες (κυκλικές) είναι οι ανακλάσεις, και, (β) σε πόσο

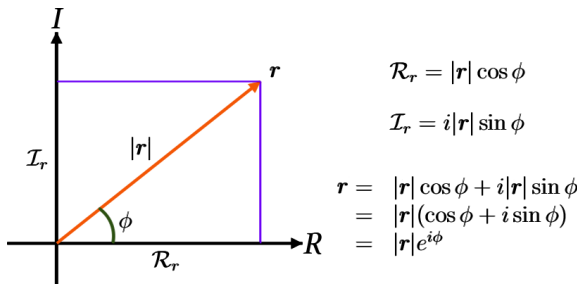
υψηλή διακριτικότητα φτάνει η πληροφορία από την περίθλαση, δηλαδή πόσο μέχρι την περιφέρεια του φάσματος περίθλασης εκτείνονται οι ανακλάσεις. Οι σκεπτικιστές θα σημειώσουν σε αυτό το σημείο ότι αυτό το σχόλιο με την 'περιφέρεια' του φάσματος περίθλασης δε βγάζει νόημα: Εάν πάμε τον ανιχνευτή πιο μακριά από τον κρύσταλλο τότε οι ανακλάσεις θα φανεί ότι μετακινούνται προς την 'περιφέρεια' ενώ, βέβαια, ούτε οι γωνίες 2θ έχουν αλλάξει, ούτε οι δείκτες (hkl) των ανακλάσεων, ούτε η διακριτικότητα. Και οι σκεπτικιστές, για ακόμα μία φορά, θα είχαν απόλυτο δίκιο. Όντως υπάρχει ένα τρικ εδώ, ας το πούμε και αυτό για πληρότητα μας και πάμε παρακάτω. Μπορούμε γρήγορα να κρίνουμε τη διακριτικότητα σε ένα φάσμα περίθλασης επειδή υπάρχει ένας εσωτερικός μάρτυρας, που δεν είναι άλλος από το νερό που περιέχουν οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι. Το νερό, όπως ίσως θυμάστε, εννοεί να παραμένει στην υγρή κατάσταση για ένα πολύ μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και ο λόγος για αυτό είναι η δημιουργία αυτών των λεγόμενων 'δεσμών υδρογόνου' μεταξύ διακριτών μορίων νερού. Το

αποτέλεσμα της δημιουργίας αυτών των δεσμών είναι ότι υπάρχει μία ισχυρή προτίμηση για το ποια είναι η μέση απόσταση μεταξύ των ατόμων οξυγόνου των μορίων νερού, και αυτή η στατιστικά προτιμώμενη απόσταση είναι γύρω στα 3Å. Επειδή τα μόρια του νερού στους κρυστάλλους κινούνται ελεύθερα στα διαθέσιμα κανάλια, δεν υπακούουν στην κρυσταλλική τάξη και, συνεπώς, αντί να συνεισφέρουν στις ανακλάσεις, φτιάχνουν στο φάσμα περίθλασης ένα 'δαχτυλίδι' συνεχούς σκέδασης σε διακριτικότητα περίπου ίση με 3Å. Μπορείτε να δείτε καθαρά αυτό το 'δαχτυλίδι νερού' (water ring) στην Εικόνα 19.

Μετά από όλα αυτά είμαστε σχεδόν έτοιμοι να δούμε επιτέλους τις εξισώσεις του παράγοντα δομής και να συζητήσουμε το φυσικό τους νόημα. Το μοναδικό που μας λείπει είναι μία σύντομη τεχνική παρένθεση με κάτι παράξενους συμβολισμούς που λατρεύουν οι μαθηματικοί και τους οποίους είμαι σίγουρος πως σύντομα θα αγαπήσετε και εσείς.

Ακούστε. Στους μαθηματικούς δεν αρέσει να κουβαλάνε ζεύγη αριθμών και μάλιστα με

διαφορετικού τύπου πληροφορία –όπως π.χ. (πλάτος+φάση) παράγοντα δομής– εάν μπορούν να έχουν έναν αριθμό που να μπορεί να αναπαραστήσει και τα δύο ταυτόχρονα. Δυστυχώς -για τους μη μαθηματικούς- υπάρχει ένας τέτοιος τρόπος αναπαράστασης ο οποίος ακούει στο όνομα των μιγαδικών αριθμών. Δείτε την Εικόνα 40.



Εικόνα 40: Μιγαδική αναπαράσταση κυμάτων.

Το άνυσμα \mathbf{r} είναι η αναπαράσταση ενός παράγοντα δομής (με το πλάτος του $|\mathbf{r}|$ και τη φάση του ϕ

σημειωμένα στην εικόνα) μόνο που τώρα είμαστε στο επίπεδο των μιγαδικών αριθμών και οι δύο άξονες είναι ο άξονας R των πραγματικών αριθμών και ο άξονας I των φανταστικών αριθμών. Η προβολή του ανύσματος \mathbf{r} στους δύο άξονες είναι τα ανύσματα R_r και I_r που είναι επίσης σημειωμένα στο διάγραμμα. Κάνοντας λίγη κλασική τριγωνομετρία βρίσκουμε τις σχέσεις που δίνουν τα R_r και I_r ως συνάρτηση των $|\mathbf{r}|$ και φ όπως φαίνεται στις εξισώσεις στο δεξί μισό της εικόνας (εκείνο το i είναι το $\sqrt{-1}$ των φανταστικών αριθμών). Τώρα έρχεται το χαριτωμένο μέρος. Γράφουμε το \mathbf{r} ως το ανυσματικό άθροισμα του πραγματικού και του φανταστικού του μέρους (δηλαδή των προβολών του), βγάζουμε ως κοινό παράγοντα το $|\mathbf{r}|$, και ξαφνικά αποφασίζουμε ότι η έκφραση $(\cos \varphi + i \sin \varphi)$ είναι ίση με την έκφραση $e^{i\varphi}$ όπου e είναι η βάση των φυσικών λογαρίθμων. Δεν είναι η ώρα να μπλέξουμε με άλγεβρα και σειρές, οπότε θα πούμε μόνο μία κουβέντα και θα πάμε παρακάτω. Ακούστε. Τόσο το ημίτονο ενός αριθμού $(\sin x)$ όσο και το συνημίτονο $(\cos x)$ και η εκθετική συνάρτηση (e^x) μπορούν να γραφούν με τη μορφή

συγκλινουσών σειρών :

$$\begin{aligned}e^x &= 1 + x + x^2/2! + x^3/3! + \dots \\ \cos x &= 1 - x^2/2! + x^4/4! - \dots \\ \sin x &= x - x^3/3! + x^5/5! - \dots\end{aligned}$$

Εάν πάρετε τη σειρά για το e^x όπως είναι στην ανωτέρω εξίσωση και όπου x βάλετε το $i\varphi$ (και δεν ξεχάσετε ότι π.χ. $i^2 = -1$), τότε εύκολα (not) θα δείτε ότι όντως $(\cos \varphi + i \sin \varphi) = e^{i\varphi}$. Τώρα η κρίσιμη ερώτηση : γιατί τα τραβήξαμε όλα αυτά ; Η απάντηση είναι για να είμαστε σίγουροι ότι καταλαβαίνετε ότι π.χ. η έκφραση $4e^{2i}$ είναι η περιγραφή ενός κύματος (ενός παράγοντα δομής) με πλάτος 4 μονάδες και φάση 2 ακτίνια (εάν σκέφτεστε σε μοίρες είναι καιρός να αλλάξετε mode, όλα είναι ακτίνια) ή ότι η έκφραση e^i είναι ένας παράγοντας δομής με πλάτος 1 μονάδα και φάση 1 ακτίνιο, ή ότι η έκφραση $e^{\pi i}$ είναι ο παράγοντας δομής -1 (προσέξτε το πρόσημο, αυτό το -1 περιέχει πληροφορία και για το πλάτος και για τη φάση).

Αρκετά το βασανίσαμε. Η εξίσωση του παράγοντα δομής στη μία διάσταση που μας επιτρέπει να υπολογίσουμε φάσεις και πλάτη κυμάτων εάν γνωρίζουμε τη συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας ρ είναι :

$$\vec{F}_h = \int_x \rho(x) e^{2\pi i h x} dx \quad [1]$$

Ακούστε τι λέει αυτό. Λέει ότι για να βρούμε τον παράγοντα δομής F_h για το κύμα με διεύθυνση h θα πρέπει να υπολογίσουμε ένα άθροισμα (να κάνουμε ένα ολοκλήρωμα) σε όλη την έκταση της στοιχειώδους κυψελίδας (για κάθε x). Το ολοκλήρωμα σε αυτήν την εξίσωση λέει, λοιπόν, αυτό που λέγαμε σε ολόκληρο το βιβλίο, ότι δηλαδή σε κάθε κύμα συνεισφέρει το κάθε ηλεκτρόνιο του κρυστάλλου. Τώρα έχουμε το δύσκολο κομμάτι που είναι το κατά πόσο και πώς συνεισφέρει το κάθε ηλεκτρόνιο ανάλογα με το πού βρίσκεται στη στοιχειώδη κυψελίδα και για το ποιο κύμα h μιλάμε. Αυτό το απαντά ο όρος $\rho(x)e^{2\pi i h x}$. Όπως μάθαμε πριν από

περίπου 30 δευτερόλεπτα, αυτή η έκφραση είναι η περιγραφή ενός κύματος με πλάτος $\rho(x)$ και φάση $2\pi hx$. Άρα αυτό το $\rho(x)e^{2\pi ihx}$ λέει ότι ένας στοιχειώδης όγκος στη θέση x (καλύτερα ένα στοιχειώδες μήκος στη θέση x αφού είμαστε στη μία διάσταση) θα συνεισφέρει στη διεύθυνση h ένα στοιχειώδες κύμα με πλάτος $\rho(x)$ –ανάλογο δηλαδή με το πόσα ηλεκτρόνια υπάρχουν στη θέση x – και με φάση $2\pi hx$. Αν αθροίσουμε ανυσματικά όλα αυτά τα στοιχειώδη κύματα από κάθε θέση του κρυστάλλου θα βρούμε το ολικό κύμα στη διεύθυνση h . Εδώ υπάρχουν θέματα. Το πρώτο είναι : αυτή η φάση που υπολογίζουμε είναι ως προς τι ; Η απάντηση είναι ότι αυτές οι φάσεις είναι σχετικές φάσεις ως προς τη φάση του μη σκεδαζόμενου/περιθλώμενου κύματος (να θυμάστε ότι ένα κύμα με φάση μηδέν έχει μέγιστο στη θέση $x=0$). Το άλλο θέμα είναι : αυτό το x σε τι μονάδες το μετράμε ; Η απάντηση είναι ότι αυτές οι συντεταγμένες είναι κλασματικές (χωρίς μονάδες) και πηγαίνουν από 0.0 (για την αρχή της κυψελίδας) μέχρι το 1.0 (για το τέλος της). Και το πλέον σημαντικό ερώτημα : ποια είναι η φυσική σημασία

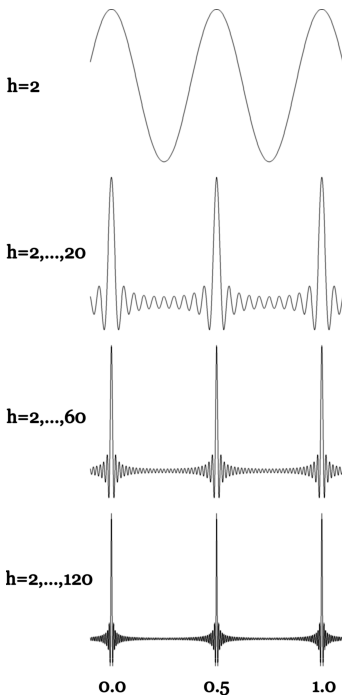
αυτού του $\rho(x)e^{2\pi ihx}$; Το τμήμα που αφορά το πλάτος του στοιχειώδους κύματος [το $\rho(x)$ δηλαδή] είναι εύκολο : όσα περισσότερα είναι τα ηλεκτρόνια στη θέση x τόσο μεγαλύτερη συνεισφορά έχουν στην σκέδαση, τόσο μεγαλύτερο το πλάτος του αντίστοιχου στοιχειώδους κύματος. Το μέρδεμα φαίνεται να είναι η φάση $2\pi hx$. Αργά-αργά. Η παρουσία του (h) στην φάση είναι αυτή που καθορίζει τους πόσους κύκλους (πόσες πλήρεις περιόδους) κάνει αυτό το κύμα στη στοιχειώδη κυψελίδα. Για παράδειγμα, εάν $h=1$, τότε καθώς το x πάει από το 0.0 μέχρι το 1.0, η φάση πάει από το 0 μέχρι το 2π κάνοντας έναν πλήρη κύκλο. Για $h=2$, καθώς το x πάει από το 0.0 μέχρι το 1.0, η φάση πάει από το 0 μέχρι το 4π κάνοντας δύο πλήρεις κύκλους, κοκ. Η παρουσία του (x) είναι αυτή που καθορίζει το με ποια φάση συνεισφέρουν τα $\rho(x)$ ηλεκτρόνια στο κύμα h ανάλογα με τη θέση τους. Ένα παράδειγμα για το κύμα $h=1$ για να δείτε πώς δουλεύει : εάν το $x=0.0$ τότε η φάση γίνεται 0.0 και συνεπώς αυτό το στοιχειώδες κύμα έχει μέγιστο στη θέση 0.0 όπως περιμέναμε. Εάν το x ήταν 0.50, τότε η φάση γίνεται π και το στοιχειώδες κύμα έχει μέγιστο

στη θέση $x=0.50$. Εάν το x ήταν 0.25 τότε η φάση θα ήταν $\pi/2$ και το στοιχειώδες κύμα όντως θα είχε μέγιστο για $x=0.25$ (και ελάχιστο για $x=0.75$).

Ας κάνουμε ένα πιο ολοκληρωμένο παράδειγμα με δύο ηλεκτρόνια για να είμαστε σίγουροι. Πείτε, λοιπόν, ότι έχουμε δύο ηλεκτρόνια, το πρώτο στη θέση $x=0.0$ και το δεύτερο στη $x=0.5$ (δηλαδή στην αρχή και στη μέση της στοιχειώδους κυψελίδας). Στόχος μας είναι να υπολογίσουμε ποια θα είναι η συνεισφορά αυτών των ηλεκτρονίων στα κύματα $h=1$ και $h=2$. Το πλάτος του στοιχειώδους κύματος που θα συνεισφέρει το κάθε ηλεκτρόνιο θα είναι 1, άρα για $h=1$ οι συνεισφορές θα είναι $e^{2\pi \cdot i \cdot 1 \cdot 0.0} + e^{2\pi \cdot i \cdot 1 \cdot 0.50} = 1 + e^{i\pi} = 0$. Για το $h=2$ οι συνεισφορές θα είναι $e^{2\pi \cdot i \cdot 2 \cdot 0.0} + e^{2\pi \cdot i \cdot 2 \cdot 0.5} = 1 + e^{i(2\pi)} = +2$. Προσέξτε πως για το $h=1$ οι συνεισφορές των δύο ηλεκτρονίων αναίρεσαν η μία την άλλη, ενώ για το $h=2$ ενισχύθηκαν. Αυτό βγάζει νόημα εάν θυμηθείτε ότι το κύμα $h=1$ κάνει ένα κύκλο ανά στοιχειώδη κυψελίδα, ενώ το $h=2$ κάνει δύο : Επειδή το $h=1$ κάνει ένα κύκλο, τότε σε απόσταση ίση με το μισό της κυψελίδας (όση η απόσταση μεταξύ

των ηλεκτρονίων) το κύμα αυτό θα έχει ακριβώς αντίθετες τιμές άσχετα με τη φάση του και, συνεπώς, οι συνεισφορές αυτών των ηλεκτρονίων αλληλοαναιρούνται. Από την άλλη το κύμα $h=2$ κάνει δύο πλήρεις κύκλους σε μία στοιχειώδη κυψελίδα και εάν δύο ηλεκτρόνια είναι σε απόσταση ίση με το μισό του μήκους της κυψελίδας υποχρεωτικά θα συνεισφέρουν σε αυτό το κύμα σε συμφωνία. Ας το πάμε αυτό λίγο παρακάτω. Αν κάνετε τις πράξεις, θα δείτε ότι για $h=3$ πάλι οι συνεισφορές των δύο ηλεκτρονίων αναιρούν η μία την άλλη, για $h=4$ πάλι ενισχύονται, κοκ. Συνεπώς, για μια υποθετική δομή που θα είχε μόνο αυτά τα δύο ηλεκτρόνια, όλοι οι παράγοντες δομής με h περιττό θα ήταν μηδέν, ενώ αυτοί με h άρτιο θα ήταν θετικοί. Χρησιμοποιήστε δημιουργικά τη φαντασία σας και θα δείτε ότι αυτή η ανάλυση μας υποδεικνύει το πώς θα μπορούσαμε να κάνουμε και τη σύνθεση Fourier για αυτήν την απλοϊκή περίπτωση : αυτό που έχουμε να κάνουμε είναι να προσθέτουμε απλά κύματα (με το ίδιο πλάτος και θετική φάση) τα οποία να κάνουν δύο, τέσσερις, έξι, ..., κύκλους στη στοιχειώδη κυψελίδα (δηλαδή τα

κύματα με $h=2, 4, 6, \dots$). Άρα αυτό που έχουμε να κάνουμε είναι να υπολογίσουμε τη γραφική παράσταση της $\cos(2\pi \cdot 2 \cdot x) + \cos(2\pi \cdot 4 \cdot x) + \cos(2\pi \cdot 6 \cdot x) + \dots$. Δείτε την Εικόνα 41 για τα αποτελέσματα από αυτόν τον υπολογισμό και για διάφορους συνδυασμούς κυμάτων από πολύ χαμηλή έως υψηλή διακριτικότητα. Ο οριζόντιος άξονας σε όλα αυτά τα γραφήματα αντιστοιχεί στο μήκος της στοιχειώδους κυψελίδας (από το 0.0 έως το 1.0), ενώ ο κάθετος άξονας είναι η ηλεκτρονική πυκνότητα (η κλίμακα στον κάθετο άξονα αλλάζει από γράφημα σε γράφημα). Λόγω της μεταθετικής συμμετρίας των κρυστάλλων, ό,τι υπάρχει στη θέση 0.0, υπάρχει και στη θέση 1.0 (το οποίο αντιστοιχεί στη θέση 0.0 της επόμενης κυψελίδας). Διαδοχικές συνθέσεις (από πάνω προς τα κάτω) έχουν υπολογιστεί με αυξανόμενο αριθμό κυμάτων –και συνεπώς με αυξανόμενη διακριτικότητα– ξεκινώντας από μόνο ένα κύμα ($h=2$), σε δέκα κύματα ($h=2, 4, 6, \dots, 20$), σε τριάντα, και τέλος σε εξήντα παράγοντες δομής.



Εικόνα 41: Συνθέσεις Fourier για δύο ηλεκτρόνια σε $x=0.0$ και 0.5 .

Αφού η κυψελίδα περιέχει δύο ηλεκτρόνια σε συγκεκριμένες θέσεις, αυτό που ιδανικά θα περιμέναμε να δούμε στη σύνθεση Fourier (δηλαδή στο είδωλο) θα ήταν κάθετες γραμμές (που θα δήλωναν υψηλή ηλεκτρονική πυκνότητα) στις θέσεις 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, ..., με όλες τις υπόλοιπες θέσεις της κυψελίδας στο μηδέν. Όπως βλέπετε στην Εικόνα 41 όντως προς τα εκεί τείνουν οι συνθέσεις, αλλά η σύγκλιση είναι αργή. Ο λόγος για αυτό είναι ότι όσο πιο απότομες είναι οι μεταβολές που πρέπει αναπαρασταθούν με τη σύνθεση, τόσο περισσότεροι παράγοντες δομής και τόσο υψηλότερη διακριτικότητα απαιτείται. Ας πούμε το ίδιο πράγμα με έναν άλλο (σχηματικό) τρόπο : Αυτό που θέλουμε να κάνουμε στην Εικόνα 41 είναι να 'δούμε' μερικά απομονωμένα ηλεκτρόνια. Η ακτίνα του κλασσικού ηλεκτρονίου είναι $\sim 0.00001\text{\AA}$ το οποίο σημαίνει ότι χρειαζόμαστε πολύ υψηλότερη διακριτικότητα και, συνεπώς, πολλά περισσότερα δεδομένα.

Είναι η ώρα να σκεφτείτε εάν νιώθετε άνετα με την εξίσωση του παράγοντα δομής στη μία διάσταση. Γιατί εάν ναι, τότε οι εξισώσεις στις δύο και τρεις διαστάσεις μάλλον θα σας φανούν μία από τα ίδια :

$$\vec{F}_{hk} = \int_x \int_y \rho(xy) e^{2\pi i(hx+ky)} dx dy \quad [2]$$

$$\vec{F}_{hkl} = \int_x \int_y \int_z \rho(xyz) e^{2\pi i(hx+ky+lz)} dV \quad [3]$$

Το φυσικό νόημα των εξισώσεων αυτών είναι το ίδιο με αυτό που έχουμε ήδη αναφέρει : κάθε στοιχειώδης όγκος dV της κυψελίδας (και συνεπώς του κρυστάλλου) συνεισφέρει σε κάθε παράγοντα δομής. Η συνεισφορά του κάθε στοιχειώδους όγκου είναι ένα στοιχειώδες κύμα του οποίου το πλάτος είναι η τιμή της ηλεκτρονικής πυκνότητας στο dV και η φάση είναι $2\pi(hx+ky+lz)$ όπου (hkl) οι δείκτες Miller του

παράγοντα δομής που εξετάζουμε και (xyz) οι κλασματικές συντεταγμένες του στοιχειώδους όγκου.

Η ομορφιά και συμμετρία των μετασχηματισμών Fourier γίνεται εμφανής όταν δείτε την εξίσωση της σύνθεσης (από τα \mathbf{F}_{hkl} στην ηλεκτρονική πυκνότητα) :

$$\rho(xyz) = \sum_{hkl} \vec{\mathbf{F}}_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad [4]$$

Είναι βασικά η ίδια εξίσωση με ανταλλαγή μεταβλητών και αλλαγή ενός προσήμου ! Το φυσικό της νόημα είναι το εξής. Η τιμή της ηλεκτρονικής πυκνότητας σε κάθε θέση (xyz) της στοιχειώδους κυψελίδας καθορίζεται από όλους τους παράγοντες δομής, δηλαδή όλοι συνεισφέρουν σε όλους. Για να βρούμε την τιμή ηλεκτρονικής πυκνότητας σε κάποια θέση (xyz) αθροίζουμε τις συνεισφορές από κάθε παράγοντα δομής με τον επιπλέον όρο $e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$ να απαντάει το ερώτημα “ένα κύμα με διεύθυνση (hkl) πόσο (σε τι ποσοστό) συνεισφέρει στη θέση (xyz) της

στοιχειώδους κυψελίδας ;”. Η ίδια ιδέα με άλλο τρόπο για να μην χαθούμε. Ας πούμε ότι ο παράγοντας δομής \mathbf{F}_{312} έχει πλάτος 10 e⁻ και φάση 1 ακτίνιο. Αυτή η πληροφορία μόνη της δε μας μαθαίνει τίποτα για το πόσο θα συνεισφέρει αυτό το κύμα στη διαμόρφωση της τιμής ηλεκτρονικής πυκνότητας στη θέση π.χ. $x=0.102$, $y=0.040$, $z=0.354$. Αυτό που χρειαζόμαστε για να το βρούμε αυτό είναι να 'προβάλλουμε' αυτό το κύμα (με τη σωστή διεύθυνση και φαινομενικό μήκος κύματος, Εικόνα 39) πάνω στο άνυσμα που ορίζει το (xyz). Αυτός είναι ο ρόλος του όρου $e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$. Από αυτήν την άποψη, ίσως να είναι καλύτερα να ξαναγράψουμε την εξίσωση [4] για να θυμάστε ότι ο παράγοντας δομής ήδη κουβαλάει τη δική του φάση :

$$\rho(xyz) = \sum_{hkl} |\vec{\mathbf{F}}_{hkl}| e^{i\phi_{hkl}} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad [5]$$

όπου $|\mathbf{F}_{hkl}|$ είναι το πλάτος και ϕ_{hkl} η φάση του παράγοντα δομής \mathbf{F}_{hkl} .

Ένα παράδειγμα του πώς χρησιμοποιείται η εξίσωση της σύνθεσης Fourier για τον υπολογισμό ενός χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας θα δοθεί αφού μιλήσουμε για τους ατομικούς παράγοντες σκέδασης στο επόμενο κεφάλαιο.

21 ☼ Ατομικοί παράγοντες σκέδασης, Εφαρμογές μετασχηματισμών Fourier.

Στις εξισώσεις [1], [2] και [3] της ανάλυσης Fourier του προηγούμενου κεφαλαίου, ο υπολογισμός των F_{hkl} απαιτούσε την ολοκλήρωση για κάθε στοιχειώδη όγκο της κυψελίδας. Αυτό είναι πρόβλημα γιατί θα πρέπει το βήμα ολοκλήρωσης (το dV) να είναι τόσο μικρό ώστε όσα ηλεκτρόνια όντως βρεθούν σε ένα τόσο μικρό όγκο να μπορεί να θεωρηθεί ότι σκεδάζουν σε φάση. Αυτό σημαίνει ότι το dV πρέπει να γίνει απελπιστικά μικρό και η έκταση των υπολογισμών απελπιστικά μεγάλη. Επιπλέον, τα ηλεκτρόνια είναι οργανωμένα σε άτομα και δεν συνηθίζουν να κάνουν βόλτες μόνα τους στη στοιχειώδη κυψελίδα και, συνεπώς, δεν έχουμε να ανησυχούμε μπας και πέσουμε σε κανένα μοναχικό ηλεκτρόνιο και κάνουμε λάθος υπολογισμούς. Θα απλοποιούσε, λοιπόν, πολύ τα πράγματα υπολογιστικά εάν μπορούσαμε αντί να ολοκληρώναμε για το $\rho(xyz)$ να αθροίζαμε για τα

άτομα. Η ίδια ιδέα αλλιώς: εάν γνωρίζαμε πώς σκεδάζει προς τις διάφορες διευθύνσεις ένα ολόκληρο άτομο, τότε αντί να προσπαθούμε να κάνουμε (ξανά και ξανά) την ολοκλήρωση της ηλεκτρονικής πυκνότητας στον όγκο του ατόμου, θα μπορούσαμε να κάνουμε μονάδα σκέδασης τα άτομα (και να αθροίζουμε για το συνολικό πλήθος ατόμων στη στοιχειώδη κυψελίδα). Αυτή είναι η κεντρική ιδέα με τους ατομικούς παράγοντες σκέδασης (atomic scattering factors) οι οποίοι συμβολίζονται με ένα μικρό f . Εάν έχουμε τιμές για αυτά τα f για τους διαφορετικούς τύπους ατόμων τότε η εξίσωση του παράγοντα δομής στις τρεις διαστάσεις γίνεται :

$$\vec{F}_{hkl} = \sum_{j=1}^{N_{at}} f_{\theta,j} e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} \quad [6]$$

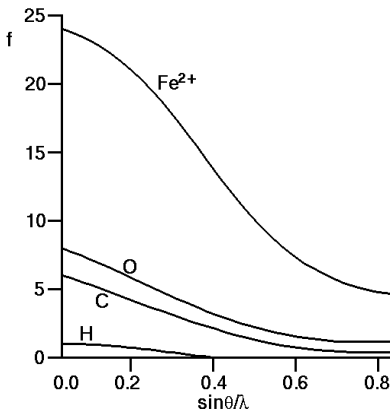
Εκεί που πριν (εξίσωση [3]) είχαμε να ολοκληρώσουμε στον όγκο, τώρα έχουμε να αθροίσουμε για κάθε ένα από τα N_{at} άτομα που περιέχονται στην στοιχειώδη κυψελίδα. Εκεί που πριν

είχαμε τη συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας $\rho(xyz)$, τώρα έχουμε τους ατομικούς παράγοντες σκέδασης $f_{\theta,j}$. Το $f_{\theta,j}$ είναι το πλάτος ενός στοιχειώδους κύματος, ο όρος $e^{2\pi i(hx+ky+lz)}$ αντιστοιχεί στη φάση του, και τα x_j , y_j , z_j είναι οι κλασματικές συντεταγμένες καθενός από τα N_{at} άτομα. Το νόημα των δεικτών ' θ, j ' που κουβαλάνε τα f είναι το εξής. Η παρουσία του μεν ' j ' (που είναι ο μετρητής ατόμων στο άθροισμα, δείτε κάτω από το σύμβολο του αθροίσματος) δηλώνει ότι διαφορετικοί τύποι ατόμων (άνθρακες, άζωτα, οξυγόνα, κοκ) έχουν διαφορετικούς ατομικούς παράγοντες σκέδασης, το οποίο βγάζει μία χαρά νόημα (άτομα με διαφορετικό πλήθος ηλεκτρονίων και διαφορετικές ατομικές ακτίνες δε θα μπορούσαν να σκεδάζουν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο). Το ' θ ' είναι πιο μπερδεμένο. Για τον υπολογισμό των f υποθέτουμε ότι τα άτομα έχουν σφαιρική συμμετρία, ότι δηλαδή όσο και να γυρίζεις γύρω-γύρω ένα άτομο αυτό θα συνεχίσει να σκεδάζει με τον ίδιο τρόπο. Συνέπεια της σφαιρικής συμμετρίας είναι ότι η σκέδαση από ένα άτομο εξαρτάται μόνο από τη γωνία σκέδασης ' θ ' και όχι από το ποια συγκεκριμένα είναι η

διεύθυνση. Το ίδιο πράγμα με αλλά λόγια : ένα άτομο, για παράδειγμα, οξυγόνου θα σκεδάσει με τον ίδιο τρόπο σε γωνία π.χ. 10 μοιρών (από την προσπίπτουσα ακτινοβολία) είτε αυτές οι 10 μοίρες είναι προς τα πάνω ή προς τα κάτω ή εμπρός ή πίσω. Φανταστείτε έναν κώνο που στην κορυφή του είναι το άτομο οξυγόνου, η στερεά γωνία είναι 10 μοίρες, και ο άξονας του κώνου είναι η διεύθυνση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Τότε το άτομο σκεδάζει με τον ίδιο ακριβώς τρόπο σε όλες τις διευθύνσεις που είναι στην επιφάνεια αυτού του κώνου.

Άρα, ο τρόπος που δουλεύει αυτό είναι ο εξής. Φτιάχνουμε πολλούς και μεγάλους πίνακες που περιγράφουν –για κάθε τύπο ατόμου– πώς αυτό το άτομο σκεδάζει ως συνάρτηση της γωνίας σκέδασης θ '. Μετά χρησιμοποιούμε την εξίσωση [6] για να υπολογίσουμε τους παράγοντες δομής χρησιμοποιώντας για κάθε ανάκλαση τις σωστές τιμές των f . Εάν μόλις ήπιατε καφέ ίσως να είδατε ότι σε αυτήν την πορεία υπάρχει ένας επιπλέον υπολογισμός που είναι ο υπολογισμός της τιμής της γωνίας θ

ανάλογα με το για ποιο κύμα (ποιο hkl) κάνουμε την άθροιση. Αυτός είναι ένας σχετικά γρήγορος υπολογισμός που δεν επιβαρύνει σημαντικά τη διαδικασία. Μιας και φτάσαμε ως εδώ, ας δούμε και ένα χειροπιαστό παράδειγμα του με τι μοιάζουν αυτά τα f . Δείτε την Εικόνα 42.



Εικόνα 42: Μοτίβο μεταβολής των ατομικών παραγόντων σκέδασης τεσσάρων διαφορετικών στοιχείων.

Προς το παρόν προσποιηθείτε ότι δεν είδατε εκείνο το $\sin(\theta)/\lambda$ στον οριζόντιο άξονα και ας πούμε ότι είχατε δει ένα θ' (καταλαβαίνω ότι αυτό ονομάζεται νεύρωση, αλλά μη γίνεστε σχολαστικοί προς το παρόν, δε βοηθάει). Αν, λοιπόν, όντως βλέπαμε ένα θ' στην Εικόνα 42, τότε θα μαθαίναμε τουλάχιστον δύο πράγματα. Το πρώτο είναι ότι όσα περισσότερα ηλεκτρόνια έχει ένα άτομο, τόσο περισσότερο σκεδάζει ασχέτως γωνίας θ , και, συνεπώς, τόσο ισχυρότερο σήμα δίνει (τόσο μεγαλύτερη συνεισφορά έχει στη συνολική περίθλαση από τον κρύσταλλο). Αυτός είναι ο λόγος που χρειαζόμαστε βαρέα άτομα στα SIR, MIR, κοκ. Το δεύτερο είναι ότι καθώς η γωνία θ αυξάνει, το πλάτος του κύματος που σκεδάζεται από τα άτομα μειώνεται. Σε γωνία $\theta=0.0$ (δηλαδή παράλληλα με την κατεύθυνση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας) όλα τα ηλεκτρόνια των ατόμων σκεδάζουν σε φάση (χωρίς διαφορές δρόμου) και οι τιμές των f είναι ίσες με τους ατομικούς αριθμούς των αντίστοιχων ατόμων. Καθώς η θ αυξάνει αρχίζουν να αυξάνουν και οι διαφορές φάσης μεταξύ των ηλεκτρονίων των ατόμων και η ένταση

σκέδασης αρχίζει να φθίνει. Πάμε τώρα σε αυτό το $\sin(\theta)/\lambda$. Μία φορά και έναν καιρό είχαμε βρει εκείνη τη σχέση $d \cdot \sin(2\theta) = h \cdot \lambda$. Με δεδομένο έναν κρύσταλλο, η μοναδική πραγματική πειραματική σταθερά σε αυτή τη σχέση είναι το d , δηλαδή οι διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας. Για κάποιο συγκεκριμένο λ μπορούμε να βρούμε κάποιες γωνίες 2θ που να ικανοποιούν αυτήν την σχέση, αλλά εάν αλλάξουμε το μήκος κύματος οι γωνίες 2θ για τις οποίες παρατηρούμε περίθλαση επίσης θα αλλάξουν (καθώς π.χ. το λ θα μειώνεται, οι γωνίες επίσης θα μικραίνουν). Προσέξτε όμως: η διακριτικότητα που αντιστοιχεί στο κύμα π.χ. $h=1$ δεν αλλάζει, αυτό το κύμα θα εξακολουθεί (ασχέτως τιμών λ και 2θ) να κάνει έναν κύκλο σε απόσταση ίση με d . Άρα: η γωνία σκέδασης θ (ή 2θ για τους επίμονους) δεν αρκεί για να περιγράψει μονοσήμαντα τη διακριτικότητα που αντιστοιχεί σε κάποιο κύμα, δηλαδή δεν είναι μία φυσική σταθερά της σκέδασης/περίθλασης γιατί εξαρτάται από το εκάστοτε λ που χρησιμοποιούμε. Η ίδια ιδέα με άλλο τρόπο για να είμαστε σίγουροι. Εάν στην Εικόνα 42

θέλαμε σώνει και καλά ο οριζόντιος άξονας να ήταν θ , τότε θα έπρεπε να είχαμε αναφέρει το ποιο συγκεκριμένο λ χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των τιμών αυτών των f . Για να μην έχουμε λοιπόν να στεναχωριόμαστε και για την ενίοτε τιμή του λ , χρησιμοποιούμε ως ένα φυσικά αμετάβλητο μέγεθος για τη μέτρηση της διακριτικότητας το πηλίκο $\sin(\theta)/\lambda$ που για μάλλον προφανείς λόγους (δείτε τις μονάδες του) είναι γνωστό ως 'αντίστροφη διακριτικότητα'.

Έχουμε πλέον όλες τις βασικές εξισώσεις των κρυσταλλογραφικών μετασχηματισμών Fourier, ας κάνουμε κάτι χρήσιμο με αυτές.

Πρώτη εφαρμογή είναι να αποδείξουμε κάτι που λέγεται νόμος του Friedel. Στόχος μας είναι να βρούμε πώς και εάν συνδέονται τα πλάτη και οι φάσεις των ανακλάσεων (h,k,l) με τις ανακλάσεις $(-h,-k,-l)$, για παράδειγμα η ανάκλαση 3, 1, 2 με την ανάκλαση -3, -1, -2. Εύκολο : στην εξίσωση [6] ο όρος $e^{2\pi i(hx+ky+lz)}$ για την περίπτωση των αρνητικών δεικτών γίνεται $e^{2\pi i(-hx-ky-lz)} = e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$ δηλαδή η φάση του

κάθε στοιχειώδους κύματος (από το κάθε άτομο) γίνεται η αντίθετη από αυτή που ήταν για τους θετικούς δείκτες (εάν ήταν $+0.1$ ακτίνια για τα hkl , γίνεται -0.1 ακτίνια για τα $-h,-k,-l$). Άρα τα κύματα με αρνητικούς δείκτες έχουν το ίδιο πλάτος και την αντίθετη φάση σε σχέση με τα κύματα με θετικούς δείκτες. Αυτός είναι ο νόμος του Friedel. Επειδή σε ένα πείραμα περίθλασης μπορούμε να μετρήσουμε μόνο τα πλάτη των κυμάτων, η ύπαρξη αυτού του νόμου μειώνει στο μισό τις ανακλάσεις που έχουμε να μετρήσουμε πειραματικά (⊕ ο νόμος του Friedel δεν ισχύει στην περίπτωση της ανώμαλης σκέδασης ⊕).

Δεύτερη εφαρμογή είναι να ξαναδούμε εκείνο το θέμα που είχαμε αναφέρει ότι μερικοί παράγοντες δομής έχουν φάση είτε μηδέν είτε π (δηλαδή ή είναι θετικοί ή είναι αρνητικοί αριθμοί). Αυτό συμβαίνει όταν η ατομική δομή έχει ένα κέντρο συμμετρίας, όταν δηλαδή για κάθε άτομο σε θέση x,y,z υπάρχει ένα πανομοιότυπο άτομο σε θέση $-x,-y,-z$. Θα κάνουμε την απόδειξη στη μία διάσταση (με μόνο τα x και τα $-x$) για να έχουμε να γράφουμε λιγότερα.

Το αλγεβρικό τρικ στην απόδειξη που ακολουθεί είναι το σπάσιμο του αθροίσματος ώστε αντί να αθροίζουμε για όλα τα N_{at} άτομα, να αθροίζουμε μόνο για τα μισά ($N_{at}/2$) άτομα, με τα άλλα μισά να προκύπτουν μέσω της συμμετρίας :

$$\begin{aligned}
 \vec{F}_h &= \sum_{j=1}^{N_{at}} f_{\theta,j} e^{2\pi i h x_j} \\
 &= \sum_{j=1}^{N_{at}/2} [f_{\theta,j} e^{2\pi i h x_j} + f_{\theta,j} e^{-2\pi i h x_j}] \\
 &= \sum_{j=1}^{N_{at}/2} f_{\theta,j} [e^{2\pi i h x_j} + e^{-2\pi i h x_j}] \\
 &= \sum_{j=1}^{N_{at}/2} f_{\theta,j} [2 \cos(2\pi h x_j)] \\
 &= 2 \sum_{j=1}^{N_{at}/2} f_{\theta,j} \cos(2\pi h x_j)
 \end{aligned}$$

Εάν αναρωτιέστε για το πώς στο καλό μας προέκυψε αυτό το $2 \cdot \cos(2\pi h x_j)$ ξαφνικά, δείτε την Εικόνα 40 ξανά και θυμηθείτε ότι $\cos(-x) = \cos(x)$ αλλά $\sin(-x) = -\sin(x)$ το οποίο σημαίνει ότι όταν προσθέτουμε δύο κύματα με ίδιο πλάτος αλλά αντίθετη φάση τα φανταστικά μέρη αναιρούνται και μένουν μόνο τα πραγματικά (αυτά με το συνημίτονο). Το τελικό αποτέλεσμα (άθροισμα συνημιτόνων) είναι ένας πραγματικός αριθμός και οι μοναδικές φάσεις που

μπορεί να έχει είναι είτε να είναι θετικός (φάση μηδέν) ή να είναι αρνητικός (φάση π). Σημειώστε ότι επειδή οι πρωτεΐνες αποτελούνται αποκλειστικά από L αμινοξέα, δεν υπάρχουν πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι που να έχουν κέντρο συμμετρίας (γιατί τότε θα έπρεπε το κεντροσυμμετρικό αντίγραφο της πρωτεΐνης να αποτελείται από D αμινοξέα). Είναι όμως δυνατόν ανάλογα με τη συμμετρία κάποιες προβολές των πρωτεϊνικών κρυστάλλων να έχουν κέντρο συμμετρίας (προσοχή εδώ, μόνο κάποιες συγκεκριμένες δισδιάστατες προβολές μπορούν να έχουν κέντρο συμμετρίας, όχι ολόκληρος ο κρύσταλλος). Σε αυτήν την περίπτωση, οι ανακλάσεις που αντιστοιχούν σε τέτοιες προβολές θα έχουν φάσεις μηδέν ή π (\oplus ανάλογα με τη συμμετρία υπάρχουν περιπτώσεις που αντί οι φάσεις να είναι μηδέν ή π , μπορούν να είναι π.χ. μόνο $\pi/2$ ή $3\pi/2$ \oplus).

Μιας και έχετε πάρει φόρα, ας κάνουμε τις πράξεις και για το ανάποδο σενάριο, δηλαδή για το πώς θα υπολογίσουμε τη συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας για έναν μονοδιάστατο κρύσταλλο με

κέντρο συμμετρίας (και συνεπώς φάσεις είτε θετικές είτε αρνητικές). Here it is :

$$\begin{aligned}
 \rho(x) &= \sum_h \vec{F}_h e^{-2\pi i h x} \\
 &= \sum_h F_h e^{-2\pi i h x} \\
 &= \sum_{h \geq 0} F_h [e^{-2\pi i h x} + e^{-2\pi i (-h)x}] \\
 &= \sum_{h \geq 0} F_h [e^{-2\pi i h x} + e^{2\pi i h x}] \\
 &= 2 \sum_{h \geq 0} F_h \cos(2\pi h x)
 \end{aligned}$$

Το κόλπο αυτή τη φορά ήταν η χρήση του νόμου του Friedel στην τρίτη γραμμή των εξισώσεων. Όπως βλέπετε πάλι οι μιγαδικοί χάθηκαν και αυτό που μας έμεινε πίσω είναι απλά αθροίσματα συνημιτόνων.

Αυτά τα αθροίσματα είναι τόσο απλά που μπορούμε να κάνουμε και ένα παράδειγμα του πώς στα αλήθεια θα υπολογίζαμε τη συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας. Πείτε λοιπόν ότι έρχεται κάποιος και μας λέει ότι για έναν μονοδιάστατο κεντροσυμμετρικό κρύσταλλο τα δεδομένα περίθλασης (μετά τη χρήση του νόμου του Friedel) ήταν :

h	F
1	+150
2	-50
3	+120
4	+100

και το ζητούμενο είναι να υπολογίσουμε την $\rho(x)$. Ό,τι έχουμε να κάνουμε είναι να υπολογίσουμε πολλά-πολλά αθροίσματα για διαφορετικές κλασματικές τιμές του x το οποίο (αγνοώντας τον παράγοντα του 2 στις εξισώσεις της προηγούμενης σελίδας) μοιάζει με αυτό :

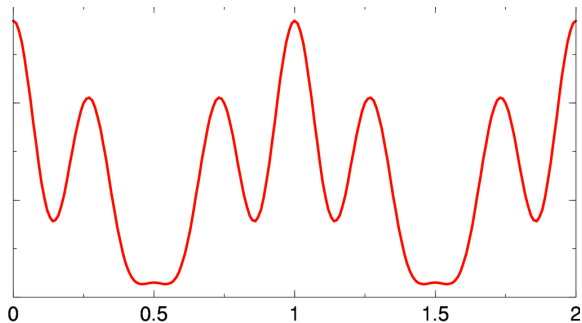
$$\begin{aligned}\rho(0.1) = & 150 \cdot \cos(2\pi \cdot 1 \cdot 0.1) + \\ & -50 \cdot \cos(2\pi \cdot 2 \cdot 0.1) + \\ & 120 \cdot \cos(2\pi \cdot 3 \cdot 0.1) + \\ & 100 \cdot \cos(2\pi \cdot 4 \cdot 0.1)\end{aligned}$$

....

$$\begin{aligned}\rho(0.3) = & 150 \cdot \cos(2\pi \cdot 1 \cdot 0.3) + \\ & -50 \cdot \cos(2\pi \cdot 2 \cdot 0.3) + \\ & 120 \cdot \cos(2\pi \cdot 3 \cdot 0.3) + \\ & 100 \cdot \cos(2\pi \cdot 4 \cdot 0.3)\end{aligned}$$

...

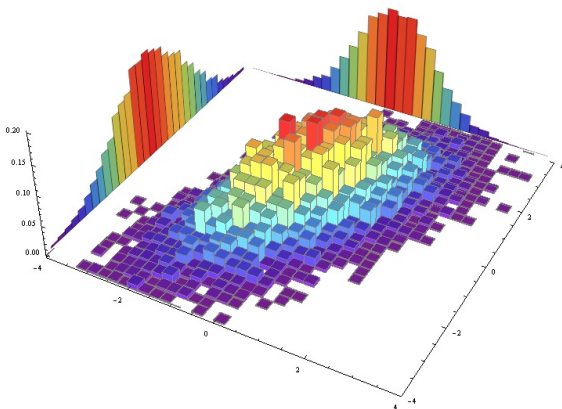
και μετά να χρησιμοποιήσουμε αυτές τις τιμές για να κάνουμε τη γραφική παράσταση της ηλεκτρονικής πυκνότητας :



Αυτό που πρέπει να σας μείνει σε αυτό το σημείο

είναι ότι όλο αυτό το μέρδεμα με μιγαδικούς αριθμούς και εκθετικές συναρτήσεις στην πράξη (δηλαδή σε επίπεδο πραγματικών κρυσταλλογραφικών υπολογισμών) δεν υπάρχει: μέσω της συμμετρίας τα πάντα (σε επίπεδο υπολογισμών) καταλήγουν να είναι αθροίσματα και γινόμενα τριγωνομετρικών συναρτήσεων.

Η τελευταία εφαρμογή πριν κλείσουμε αυτό το κεφάλαιο είναι το λεγόμενο θεώρημα προβολών (projection theorem). Για αρχή, δείτε την Εικόνα 43 και σιγουρευτείτε ότι κατανοείτε το τι είναι οι προβολές. Η εκφώνηση του θεωρήματος μοιάζει με γλωσσοδέτη: “Ο μετασχηματισμός Fourier μιας προβολής ενός αντικείμενου είναι ένα επίπεδο από το μετασχηματισμό Fourier του αντικείμενου το οποίο είναι κάθετο στον άξονα της προβολής και περνάει από την αρχή αξόνων του μετασχηματισμού”. Πάμε αργά να μη χαθούμε. Ένα τρισδιάστατο αντικείμενο (όπως ένας κρύσταλλος) έχει ένα τρισδιάστατο μετασχηματισμό Fourier (το φάσμα περίθλασης, Εικόνα 18).



Εικόνα 43: Το νόημα των προβολών. Το οριζόντιο κεντρικό επίπεδο σε αυτό το γράφημα δείχνει με τη μορφή ιστογράμματος μία διδιάστατη κατανομή του τύπου $\rho=f(x,y)$. Οι δύο κάθετες γραφικές παραστάσεις στα άκρα του επιπέδου είναι οι προβολές αυτής της διδιάστατης κατανομής κατά μήκος των αντίστοιχων αξόνων. Προσέξτε ότι σε κάθε προβολή η πληροφορία έχει αθροιστικά συμπιεστεί στη μία διάσταση, με την πληροφορία για την άλλη διάσταση να έχει εξαφανιστεί.

Η ερώτηση που απαντάει το θεώρημα προβολών είναι το ποια είναι η σχέση ανάμεσα στο μετασχηματισμό

Fourier μίας προβολής του αντικειμένου (π.χ. της προβολής του κρυστάλλου κατά μήκος του άξονα y) και το μετασχηματισμό Fourier ολόκληρου του αντικειμένου (δηλαδή ολόκληρου του φάσματος περίθλασης). Αυτό που λέει το θεώρημα είναι ότι ο μετασχηματισμός Fourier μίας προβολής του αντικειμένου είναι ένα ήδη υπάρχον επίπεδο του τρισδιάστατου μετασχηματισμού. Για την ακρίβεια ο μετασχηματισμός Fourier της προβολής είναι το επίπεδο εκείνο του τρισδιάστατου μετασχηματισμού που περνάει από την αρχή αξόνων (του τρισδιάστατου φάσματος περίθλασης) και είναι κάθετο στον άξονα προβολής. Το ανάποδο ισχύει αυτούσιο : εάν από το φάσμα περίθλασης διαλέξουμε ένα επίπεδο που να περνάει από την αρχή των αξόνων, όπως π.χ. το επίπεδο $h0l$, τότε αυτό το επίπεδο είναι ο μετασχηματισμός Fourier της προβολής του κρυστάλλου κατά μήκος ενός άξονα κάθετου σε αυτό το επίπεδο, σε αυτήν την περίπτωση του άξονα y . Η ορθότητα του θεωρήματος μπορεί να δειχτεί εύκολα :

Στην εξίσωση του παράγοντα δομής

$$\vec{F}_{hkl} = \sum_{j=1}^{N_{at}} f_{\theta,j} e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)}$$

εάν ισχύει ότι π.χ. το $k=0$ (ώστε να εξετάσουμε το επίπεδο $h0l$), τότε οι τιμές των παραγόντων δομής γίνονται ανεξάρτητες από το ποιες είναι οι y συντεταγμένες των ατόμων (το γινόμενο ky_j στον εκθέτη μηδενίζεται). Αυτό σημαίνει ότι οι τιμές των F_{h0l} εξαρτώνται μόνο από την κατανομή των ατόμων κατά μήκος των αξόνων x και z ενώ η y συντεταγμένη μπορεί να είναι οποιαδήποτε. Άρα τα F_{h0l} περιέχουν πληροφορία για το μετασχηματισμό Fourier της προβολής του κρυστάλλου κατά μήκος του y . Το ίδιο πράγμα ισχύει και εάν το δούμε από τη μεριά της σύνθεσης Fourier. Στην εξίσωση

$$\rho(xyz) = \sum_{hkl} \vec{F}_{hkl} e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}$$

εάν χρησιμοποιήσουμε μόνο τους παράγοντες δομής με $k=0$ (δηλαδή τους F_{h0l}) τότε οι τιμές ηλεκτρονικής πυκνότητας γίνονται ανεξάρτητες από το y (δηλαδή θα είναι οι ίδιες άσχετα από την τιμή του y) όπως θα περιμέναμε για μία προβολή κατά μήκος του y .

Το θεώρημα των προβολών ξεκαθάρισε αυτό που λέγαμε στο πρώτο μέρος του βιβλίου ότι δηλαδή ένα τμήμα του φάσματος περίθλασης δεν αρκεί για τον προσδιορισμό της δομής στις τρεις διαστάσεις. Το θεώρημα επίσης ανέδειξε τη σχέση που υπάρχει ανάμεσα στους άξονες (x,y,z) του κρυστάλλου και τους άξονες των (hkl) στο φάσμα περίθλασης. Θα συζητήσουμε αυτή τη σχέση αργότερα. Αλλά η πιο γνωστή χρήση του θεωρήματος είναι στην ηλεκτρονική μικροσκοπία όπου το θεώρημα χρησιμοποιείται για την τρισδιάστατη επανασύσταση ενός αντικειμένου από τις δισδιάστατες προβολές του.

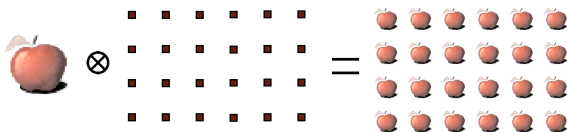
22 ☼ Θεώρημα συνέλιξης, πραγματικό και αντίστροφο πλέγμα, μοριακός μετασχηματισμός

Έχουμε φτάσει, αισίως, στο στάδιο που εάν κάποιος μας δώσει τις κλασματικές συντεταγμένες των ατόμων στη στοιχειώδη κυψελίδα να μπορούμε να υπολογίσουμε τα πλάτη και τις φάσεις των κυμάτων που θα περιθλούσε αυτός ο κρύσταλλος. Αυτό που δε γνωρίζουμε είναι το με τι στα αλήθεια θα έμοιαζε το φάσμα περίθλασης από την άποψη του γεωμετρικού μοτίβου των ανακλάσεων. Παράδειγμα: έρχεται κάποιος και μας λέει ότι ο τάδε κρύσταλλος σε κάποια προβολή του έχει διαστάσεις στοιχειώδους κυψελίδας $a=100\text{\AA}$, $b=70\text{\AA}$ με τη μεταξύ τους γωνία να είναι π.χ. $\gamma=100$ μοίρες. Δεν έχουμε ιδέα πώς με βάση αυτήν την πληροφορία θα μπορούσαμε να προβλέψουμε το γεωμετρικό μοτίβο περίθλασης όπως φαίνεται για παράδειγμα στην Εικόνα 16. Με άλλα λόγια, γνωρίζουμε πώς να βρούμε ότι π.χ. οι ανακλάσεις 312 και 501 είναι και οι δύο ισχυρές, αλλά εάν μας

ζητούσαν να ζωγραφίσουμε τη σχετική τους θέση στο χώρο δεν θα είχαμε ιδέα για το ποια είναι η γεωμετρική διεύθυνση των ανακλάσεων. Και εδώ είναι που μπαίνουν αυτά τα ακαταλαβίστικα του τίτλου του κεφαλαίου.

Φανταστείτε να βάζετε ένα μαθηματικό σημείο σε κάθε γωνία της κάθε κυψελίδας ολόκληρου του κρυστάλλου. Αυτά τα όμορφα και τακτικά διευθετημένα σημεία θα φτιάξουν ένα 'πλέγμα' σημείων που θα το βαφτίσουμε 'πραγματικό πλέγμα' (real space lattice). Αυτό λοιπόν το πλέγμα από σημεία περιγράφει με ακρίβεια το επαναλαμβανόμενο μοτίβο του κρυστάλλου, και όντως εάν σε κάθε τέτοιο σημείο βάζατε πάνω του ένα αντίγραφο των περιεχομένων της στοιχειώδους κυψελίδας θα παίρνατε πίσω ολόκληρο τον κρύσταλλο από τον οποίο ξεκινήσατε. Αυτή η ιδέα, το να βάλετε δηλαδή από ένα αντίγραφο της στοιχειώδους κυψελίδας σε κάθε ένα από τα σημεία του πραγματικού πλέγματος, είναι γνωστή στους μαθηματικούς ως συνέλιξη (convolution). Επειδή οι

μαθηματικοί είναι αυτοί που είναι, υπάρχει και ένα όμορφο ολοκλήρωμα για να μας εξηγήσει πώς ακριβώς να κάνουμε την πράξη της συνέλιξης, αλλά δεν είναι ώρα για τέτοια. Σχηματικά αυτό που έχουμε περιγράψει ως τώρα φαίνεται στην Εικόνα 44 (εκείνο το '⊗' είναι το σύμβολο για την πράξη της συνέλιξης).



Εικόνα 44: Σχηματική αναπαράσταση της πράξης της συνέλιξης (\otimes). Το μήλο αριστερά αναπαριστά τα περιεχόμενα της στοιχειώδους κυψελίδας, το πλέγμα από τελείες είναι το πραγματικό πλέγμα, το αποτέλεσμα της συνέλιξης είναι ο κρύσταλλος.

Αυτό που φαίνεται να έχουμε καταφέρει με την πράξη της συνέλιξης είναι να διαχωρίσουμε τα περιεχόμενα της στοιχειώδους κυψελίδας από το μοτίβο επανάληψης του κρυστάλλου (το πραγματικό πλέγμα). Συμβολικά μιλώντας, έχουμε πει ότι

“κρύσταλλος = κυψελίδα \otimes πλέγμα”. Τώρα έρχεται το ενδιαφέρον κομμάτι. Υπάρχει ένα θεώρημα, το λεγόμενο θεώρημα της συνέλιξης το οποίο λέει ότι “ο μετασχηματισμός Fourier της συνέλιξης δύο συναρτήσεων είναι ίσος (ταυτίζεται) με το γινόμενο των μετασχηματισμών Fourier της κάθε μίας από τις συναρτήσεις”. Αργά μη χαθούμε. Ο μετασχηματισμός Fourier του κρυστάλλου είναι το φάσμα περίθλασης και εμείς μόλις δείξαμε ότι “κρύσταλλος = κυψελίδα \otimes πλέγμα”. Εάν συμβολίσουμε με το FT την πράξη του μετασχηματισμού Fourier, τότε συμβολικά το θεώρημα της συνέλιξης λέει :

Φάσμα περίθλασης =

$$= \text{FT}(\text{κρύσταλλος}) =$$

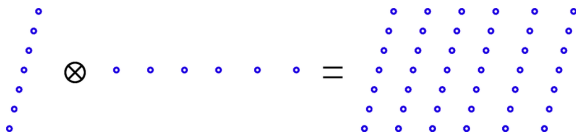
$$= \text{FT}(\text{κυψελίδα} \otimes \text{πραγματικό πλέγμα}) =$$

$$= \text{FT}(\text{κυψελίδας}) \cdot \text{FT}(\text{πραγματικό πλέγμα}) \quad [7]$$

Δεν είναι ακόμα ώρα να ενθουσιαστείτε, αλλά ίσως διαισθητικά να βλέπετε πού πάει αυτό. Ο μετασχηματισμός Fourier ενός πλέγματος είναι

επίσης ένα πλέγμα (γνωστό ως αντίστροφο πλέγμα, reciprocal space lattice), αλλά αυτή τη φορά είναι το πλέγμα του φάσματος περίθλασης που είχαμε δει στις Εικόνες 18, 16, 19, κοκ. Ας το πάρουμε αυτό παρακάτω, ομορφαίνει και άλλο.

Θέλουμε να βρούμε ποιο είναι το φυσικό νόημα του FT (πραγματικό πλέγμα), δηλαδή θέλουμε να βρούμε το μετασχηματισμό Fourier του πραγματικού τρισδιάστατου πλέγματος. Δείτε πόσο ισχυρό εργαλείο είναι η συνέλιξη: ένα δισδιάστατο πλέγμα είναι το αποτέλεσμα της συνέλιξης δύο μονοδιάστατων πλεγμάτων όπως φαίνεται στην Εικόνα 45.

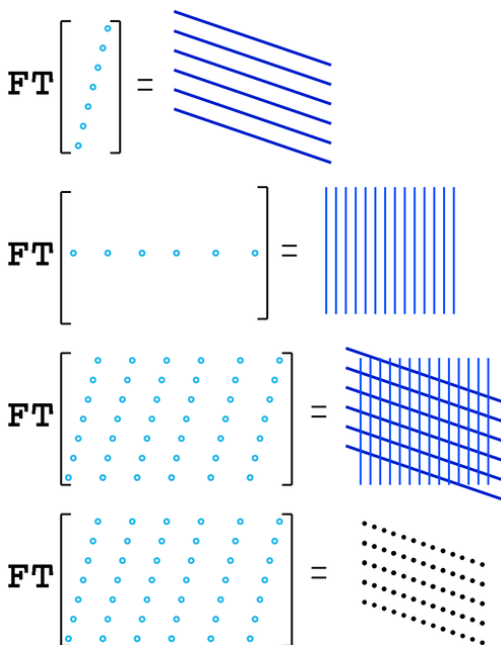


Εικόνα 45: Ένα δισδιάστατο πλέγμα (δεξιά) είναι το αποτέλεσμα της συνέλιξης των δύο μονοδιάστατων πλεγμάτων που φαίνονται αριστερά: σε κάθε θέση του πρώτου μονοδιάστατου πλέγματος μπαίνει ένα αντίγραφο του δεύτερου μονοδιάστατου πλέγματος.

Το θεώρημα της συνέλιξης μας λέει ότι για να βρούμε το αντίστροφο πλέγμα (δηλαδή το μετασχηματισμό Fourier του πραγματικού πλέγματος) θα πρέπει να πολλαπλασιάσουμε τους μετασχηματισμούς Fourier των δύο μονοδιάστατων πλεγμάτων. Άρα, το πρόβλημά μας είναι αυτό: ποιος είναι ο μετασχηματισμός Fourier ενός μονοδιάστατου πλέγματος; Αυτό το ερώτημα το έχουμε ήδη έμμεσα απαντήσει όταν είχαμε βρει τη σχέση $d \cdot \sin(2\theta) = h \cdot \lambda$ στην Εικόνα 20. Αυτό που είχαμε δείξει ήταν ότι ένα μονοδιάστατο πλέγμα σκεδαστών περιθλά ομοιόμορφα σε διαδοχικά βήματα του $\sin(2\theta)/\lambda$, δηλαδή σε σταθερά βήματα του $1/d$ (της αντίστροφης διακριτικότητας που αναφέραμε στο προηγούμενο κεφάλαιο). Επειδή για τους μονοδιάστατους σκεδαστές δεν υπάρχει μπρος/πίσω/δεξιά/αριστερά (έχουν αξονική συμμετρία), η σκέδαση θα είναι ομοιόμορφη προς όλες τις διευθύνσεις. Αυτό σημαίνει ότι ο μετασχηματισμός Fourier ενός μονοδιάστατου πλέγματος είναι ένα σετ από ισαπέχοντα επίπεδα κάθετα στον άξονα των σκεδαστών με τις αποστάσεις μεταξύ των επιπέδων να είναι ανάλογες του $(1/d)$

όπου d είναι η απόσταση μεταξύ των σημείων του πραγματικού πλέγματος. Αυτή η αντιστροφή των αποστάσεων (από το d στο $1/d$) είναι η αιτία για τους όρους 'πραγματικό' και 'αντίστροφο' πλέγμα.

Ας τα βάλουμε σε μία σειρά με τη βοήθεια μιας εικόνας. Δείτε την Εικόνα 46 σε συνδυασμό με την Εικόνα 45. Η πρώτη σειρά γραφημάτων στην Εικόνα 46 δείχνει ότι ο μετασχηματισμός Fourier (FT) του πρώτου μονοδιάστατου πλέγματος της Εικόνας 45 είναι ένα σετ από ισαπέχοντα επίπεδα τα οποία είναι κάθετα στον άξονα του πραγματικού μονοδιάστατου πλέγματος, με τις αποστάσεις μεταξύ των επιπέδων να είναι αντιστρόφως ανάλογες των αποστάσεων μεταξύ των σημείων του πραγματικού πλέγματος (αυτό το 'αντιστρόφως ανάλογο' θα φανεί παρακάτω). Η δεύτερη σειρά γραφημάτων στην Εικόνα 46 είναι το ίδιο πράγμα αλλά για το δεύτερο μονοδιάστατο πλέγμα της Εικόνας 45. Προσέξτε πως καθώς αυξήθηκε η απόσταση μεταξύ των σημείων του πραγματικού πλέγματος μειώθηκε η απόσταση μεταξύ των επιπέδων στον αντίστροφο χώρο.



Εικόνα 46: Στάδια απόδειξης ότι ο μετασχηματισμός Fourier ενός πλέγματος είναι ένα άλλο πλέγμα, το λεγόμενο αντίστροφο πλέγμα.

Σύμφωνα με το θεώρημα της συνέλιξης αυτό που μένει να κάνουμε είναι να πολλαπλασιάσουμε τους μετασχηματισμούς Fourier (δηλαδή τα δύο σετ επιπέδων) μεταξύ τους. Η τιμή του γινομένου θα είναι παντού μηδέν εκτός από τα σημεία που αυτά τα επίπεδα τέμνονται. Αλλά η τομή μεταξύ αυτών των δύο ομάδων επιπέδων είναι ένα σύνολο από παράλληλες ευθείες οι οποίες είναι κάθετες στο επίπεδο του δισδιάστατου πραγματικού πλέγματος (οι γραμμές είναι κάθετες στο επίπεδο της Εικόνας 46). Άρα, ο μετασχηματισμός Fourier ενός δισδιάστατου πλέγματος είναι μία σειρά από παράλληλες γραμμές κάθετες στο επίπεδο του πραγματικού δισδιάστατου πλέγματος. Μία τομή αυτού του πλέγματος γραμμών φαίνεται στην τελευταία γραμμή της Εικόνας 46. Προσέξτε πως στο αντίστροφο πλέγμα έχουν μεταβληθεί τόσο οι αποστάσεις όσο και οι γωνίες σε σχέση με το πραγματικό πλέγμα.

Το τελευταίο βήμα προς τις τρεις διαστάσεις είναι να χρησιμοποιήσετε δημιουργικά τη φαντασία σας και

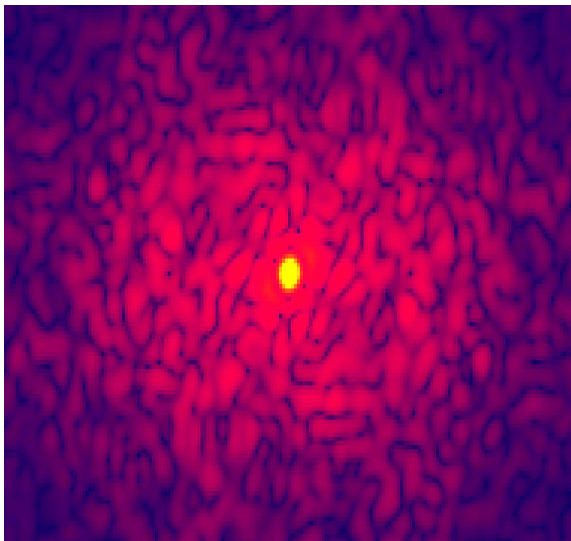
να δείτε ότι ένα τρισδιάστατο πλέγμα στον πραγματικό χώρο είναι το αποτέλεσμα της συνέλιξης ανάμεσα σε ένα δισδιάστατο πλέγμα όπως αυτό της Εικόνας 46 και ένα νέο (μη συνεπίπεδο) τρίτο μονοδιάστατο πλέγμα που ορίζει τον τρίτο άξονα του κρυστάλλου. Το θεώρημα της συνέλιξης μας λέει ότι το $FT(\text{δισδιάστατο πλέγμα} \otimes \text{μονοδιάστατο πλέγμα})$ –που είναι το αντίστροφο πλέγμα που ψάχνουμε– είναι ίσο με το γινόμενο του $FT(\text{δισδιάστατο πλέγμα})$ επί το $FT(\text{μονοδιάστατο πλέγμα})$. Το $FT(\text{δισδιάστατο πλέγμα})$ το έχουμε ήδη βρει : είναι το πλέγμα των παράλληλων ευθειών που συζητήσαμε πριν από λίγο. Το $FT(\text{μονοδιάστατο πλέγμα})$ είναι όπως είπαμε ένα σετ παράλληλων επιπέδων κάθετων στον άξονα του μονοδιάστατου πλέγματος. Το γινόμενο του $FT(\text{δισδιάστατο πλέγμα})$ επί $FT(\text{μονοδιάστατο πλέγμα})$ θα είναι παντού μηδέν εκτός από τα σημεία που οι ευθείες και τα επίπεδα τέμνονται. Η τομή μεταξύ ενός πλέγματος παράλληλων ευθειών και μιας ομάδας παράλληλων επιπέδων είναι ένα σύνολο μεμονωμένων σημείων που δημιουργούν ένα τρισδιάστατο πλέγμα σημείων,

το οποίο είναι γνωστό ως αντίστροφο πλέγμα.

Αυτό που φαίνεται πως μάθαμε από όλη αυτή τη φασαρία είναι το πώς να βρίσκουμε το αντίστροφο πλέγμα (δηλαδή τη γεωμετρία του φάσματος περίθλασης) εάν γνωρίζουμε τις διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας. Δεν είναι αυτή όλη η ιστορία. Η διαδικασία που περιγράψαμε είναι πλήρως αντιστρέψιμη το οποίο σημαίνει ότι πλέον μπορούμε από το φάσμα περίθλασης (από το αντίστροφο πλέγμα) να προσδιορίσουμε τις διαστάσεις του πραγματικού πλέγματος και, συνεπώς, τις διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας του κρυστάλλου. Η εικόνα που θέλετε να σας μείνει είναι το δισδιάστατο παράδειγμα της Εικόνας 46 και το πώς προκύπτει το ένα πλέγμα από το άλλο. Μιας και είμαστε εδώ, ας πούμε και αυτό για πληρότητα. Μια φορά και έναν καιρό (στην Εικόνα 18) είχαμε αναφέρει κάτι μυστηριώδη a^* , b^* και c^* και είχαμε πει ότι ήταν τα τρία ανύσματα που ορίζουν τους τρεις άξονες του συστήματος αναφοράς του φάσματος περίθλασης με το a^* να αντιστοιχεί στους δείκτες h , το b^* στους k ,

και το c^* στους l . Τώρα μπορούμε να βάλουμε το θέμα οριστικά σε μια τάξη : το πραγματικό πλέγμα ορίζεται από τους τρεις άξονες που ορίζουν τη στοιχειώδη κυψελίδα. Τα τρία ανύσματα που οριοθετούν τη στοιχειώδη κυψελίδα συμβολίζονται ως a , b , και c κατά μήκος των τριών αξόνων. Το αντίστροφο πλέγμα (όντως ένα πλέγμα) έχει τους δικούς του άξονες και τη δική του στοιχειώδη κυψελίδα (τη λεγόμενη αντίστροφη κυψελίδα). Όλα αυτά τα 'αντίστροφα' στην κρυσταλλογραφία σηματοδοτούνται με το να τους κολλάμε ένα αστεράκι στο όνομα. Έτσι αυτά τα a^* , b^* και c^* είναι τα τρία ανύσματα που ορίζουν τη στοιχειώδη κυψελίδα του αντίστροφου χώρου.

Ας αφήσουμε προς το παρόν τα τετριμμένα με τα θεωρήματα συνέλιξης και τους αντίστροφους χώρους για να δούμε κάτι πραγματικά μυστηριώδες. Δείτε την Εικόνα 47. Αυτό που βλέπετε σε αυτήν την εικόνα είναι ένα επίπεδο (μία τομή) από κάτι που λέγεται 'μοριακός μετασχηματισμός', σε αυτήν την περίπτωση είναι ένα επίπεδο από το μοριακό μετασχηματισμό μιας πρωτεΐνης που ακούει στο όνομα λυσοζύμη.



Εικόνα 47: Ένα επίπεδο από τον μοριακό μετασχηματισμό της πρωτεΐνης λυσοζύμη. Η εικόνα δείχνει μόνο το μέτρο του μετασχηματισμού, η πληροφορία για τις φάσεις απουσιάζει.

Πάμε αργά-αργά να μη χαθούμε. Μια φορά και έναν

καιρό είχατε δει στην Εικόνα 2 αυτού του βιβλίου εκείνη την ιδέα με το να παίρναμε ένα μόνο αντίγραφο μιας πρωτεΐνης, να το βάζαμε μπροστά από μία πηγή παράλληλης μονοχρωματικής ακτινοβολίας και μέσω της δράσης ενός φακού να 'βλέπαμε' το μεγεθυμένο είδωλό της. Παραδόξως, μετά από ένα μεγάλο κύκλο έχουμε ξαναπλησιάσει αυτήν την ιδέα. Είπαμε στην αρχή αυτού του κεφαλαίου ότι το φάσμα περίθλασης ενός κρυστάλλου μπορεί να γραφεί (εξίσωση [7]) ως το γινόμενο $FT(\text{κυψελίδας}) \cdot FT(\text{πραγματικό πλέγμα})$. Το θέμα του ποιος είναι ο μετασχηματισμός Fourier του πραγματικού πλέγματος το λύσαμε, είναι το αντίστροφο πλέγμα. Το θέμα μας τώρα είναι το ποιο είναι το φυσικό νόημα αυτού του 'FT(κυψελίδας)'. Όπως έχετε μάλλον ήδη καταλάβει το $FT(\text{κυψελίδας})$ είναι το φάσμα σκέδασης που θα παρατηρούσαμε εάν μπορούσαμε να βάλουμε μία και μόνο μία μεμονωμένη στοιχειώδη κυψελίδα με τα περιεχόμενά της μπροστά από τις ακτίνες-X. Εάν η στοιχειώδης κυψελίδα περιείχε ένα μόνο αντίγραφο του πρωτεϊνικού μορίου, τότε το $FT(\text{κυψελίδας})$ θα

ήταν το φάσμα σκέδασης ενός απομονωμένου μορίου. Αυτό ονομάζεται μοριακός μετασχηματισμός (molecular transform) και στην Εικόνα 47 βλέπετε ένα δείγμα του με τι μοιάζει ένα επίπεδο από το μετασχηματισμό Fourier ενός απομονωμένου μορίου λυσοζύμης. Η πληροφορία σε αυτήν την εικόνα αφορά μόνο την κατανομή του πλάτους του μετασχηματισμού, η πληροφορία για τις φάσεις δεν έχει αναπαρασταθεί.

Ακούστε τι έχει γίνει. Εάν μπορούσαμε να παρατηρήσουμε τη σκέδαση από μία μεμονωμένη στοιχειώδη κυψελίδα τότε αυτό που θα βλέπαμε δε θα ήταν διακριτές δέσμες/ανακλάσεις αλλά μία συνεχή κατανομή σκέδασης σαν αυτή που βλέπετε στην Εικόνα 47. Ο λόγος, βέβαια, είναι ότι οι ανακλάσεις προκύπτουν εξαιτίας της κρυσταλλικής συμμετρίας και εάν αυτή δεν υφίσταται τότε παύουν να ισχύουν και οι γεωμετρικοί όροι για συμβολή κυμάτων (και το φάσμα γίνεται συνεχές). Όταν τώρα περνάμε από τη μία κυψελίδα στις πολλές (δηλαδή στους κρυστάλλους) ο μοριακός μετασχηματισμός είναι

ακόμα εκεί, αλλά δεν τον βλέπουμε καθ' ολοκληρία όπως στην Εικόνα 47 αλλά μόνο εκείνα τα σημεία του που αντιστοιχούν στα σημεία του αντίστροφου πλέγματος του κρυστάλλου. Άρα, η σχέση «Φάσμα περίθλασης = $FT(\text{κυψελίδας}) \cdot FT(\text{πραγματικό πλέγμα})$ » μας δίνει ένα νέο τρόπο αντίληψης της περίθλασης: Οι φάσεις και τα πλάτη των κυμάτων καθορίζονται από τα περιεχόμενα της στοιχειώδους κυψελίδας μέσω του μοριακού μετασχηματισμού. Η γεωμετρία της περίθλασης (το πώς και πού θα δούμε ανακλάσεις) καθορίζεται από το αντίστροφο πλέγμα. Ο τρόπος να το οπτικοποιήσετε αυτό είναι να φανταστείτε π.χ. το δισδιάστατο αντίστροφο πλέγμα της Εικόνας 46 να 'κάθεται' πάνω στο μοριακό μετασχηματισμό της Εικόνας 47: κάθε θέση στην οποία υπάρχει ένα σημείο του αντίστροφου πλέγματος είναι μία πιθανή ανάκλαση από τον κρύσταλλο της οποίας το πλάτος και η φάση προκύπτουν από τις τιμές του μοριακού μετασχηματισμού σε εκείνο το σημείο.

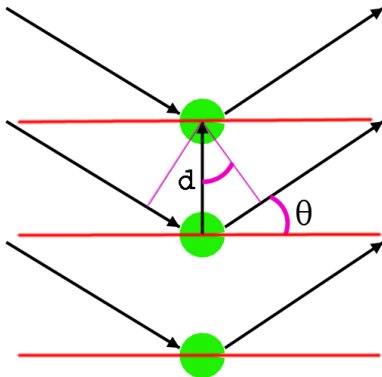
Η ιδέα του μοριακού μετασχηματισμού δεν είναι

χρήσιμη μόνο για να βάλει τις ιδέες μας για την περίθλαση σε μία στέρεη βάση, έχει και πραγματικές/πρακτικές εφαρμογές στην επίλυση του προβλήματος των φάσεων στην περίπτωση της μοριακής αντικατάστασης. Ακούστε πώς πάει. Στην περίπτωση της μοριακής αντικατάστασης έχουμε ένα μοντέλο της δομής της πρωτεΐνης (άρα έχουμε το μοριακό μετασχηματισμό της Εικόνας 47) και γνωρίζουμε και το αντίστροφο πλέγμα (όπως π.χ. της Εικόνας 46) αλλά δεν έχουμε ιδέα για τον προσανατολισμό και τη θέση του μορίου στη στοιχειώδη κυψελίδα. Αυτό που μπορούμε να κάνουμε είναι να υπερθέσουμε το αντίστροφο πλέγμα πάνω στο μοριακό μετασχηματισμό και μετά να αρχίσουμε να περιστρέφουμε το μοριακό μετασχηματισμό (το οποίο αντιστοιχεί στο να περιστρέφουμε την πρωτεΐνη) μέχρι να βρούμε κάποιες γωνίες περιστροφής για τις οποίες τα πλάτη που παίρνουμε από το μετασχηματισμό –στις θέσεις του αντίστροφου πλέγματος– να συμφωνούν με τα πλάτη των ανακλάσεων που μετρήσαμε πειραματικά.

Πριν κλείσουμε αυτό το κεφάλαιο και μιας και ασχοληθήκαμε με τα θέματα του πραγματικού και του αντίστροφου πλέγματος, ας μιλήσουμε και για το νόμο του Bragg ώστε να μάθουμε και γιατί οι ανακλάσεις λέγονται ανακλάσεις.

Ο νόμος του Bragg είναι μία γεωμετρική κατασκευή που ερμηνεύει την περίθλαση από κρυστάλλους ως 'ανακλάσεις' από νοητές ομάδες παράλληλων επιπέδων που διατρέχουν τον κρύσταλλο. Κάθε σετ από τέτοια παράλληλα επίπεδα χαρακτηρίζεται από τρεις ακεραίους αριθμούς, τους συνήθεις ύποπτους (hkl), οι οποίοι αυτή τη φορά καθορίζουν πόσες φορές αυτά τα επίπεδα τέμνουν τους άξονες a , b , c της στοιχειώδους κυψελίδας. Έτσι π.χ. η ομάδα παράλληλων επιπέδων με δείκτες 321 έχει τέτοιες αποστάσεις (μεταξύ των επιπέδων) και τέτοια κλίση (προσανατολισμό) ώστε αυτά τα επίπεδα να τέμνουν τον άξονα a της κάθε στοιχειώδους κυψελίδας τρεις φορές, τον b δύο φορές και τον c μία φορά. Με το που έχουμε φανταστεί αυτά τα επίπεδα μπορούμε να υπολογίσουμε τις γεωμετρικές συνθήκες για να

παρατηρήσουμε περίθλαση με λίγο-πολύ τον ίδιο τρόπο που είχαμε δει στην Εικόνα 20. Δείτε την Εικόνα 48.



Εικόνα 48: Νόμος Bragg. Οι κόκκινες οριζόντιες γραμμές είναι ένα από τα σετ παράλληλων επιπέδων που διατρέχουν τον κρύσταλλο, τα μαύρα βέλη που έρχονται από αριστερά αναπαριστούν την προσπίπτουσα ακτινοβολία, τα μαύρα βέλη προς τα δεξιά είναι η περιθλώμενη δέσμη, d είναι η απόσταση μεταξύ των επιπέδων, θ είναι η γωνία σκέδασης.

Ο τρόπος για να βρούμε τη γεωμετρική συνθήκη περίθλασης είναι σχεδόν πανομοιότυπος με αυτόν που έχουμε ήδη αναφέρει και στηρίζεται στην ιδέα ότι η διαφορά δρόμου μεταξύ των κυμάτων που προσπίπτουν και αυτών που περιθλώνται από τον κρύσταλλο πρέπει να είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος. Εάν κοιτάξετε προσεκτικά τα δύο ορθογώνια τρίγωνα της Εικόνας 48 είμαι σίγουρος ότι θα βρείτε κάτι σαν το $2d \cdot \sin(\theta) = n \cdot \lambda$ το οποίο είναι ο νόμος του Bragg. Ο νόμος του Bragg –με αυτήν την εικόνα των ανακλάσεων από επίπεδα στην οποία στηρίζεται– είναι πολύ χρήσιμος στην καθημερινή πειραματική πρακτική της κρυσταλλογραφίας, και είναι ο τρόπος, για παράδειγμα, που απαντάμε ερωτήσεις του τύπου «πόσο και πώς πρέπει να περιστρέψω τον κρύσταλλο έτσι ώστε το επίπεδο των ανακλάσεων $h0l$ να είναι κάθετο στη διεύθυνση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας για να μπορέσω να καταγράψω μία εικόνα όπως αυτή της Εικόνας 16;».

23 ☼ Το πρόβλημα των φάσεων : Άμεσες μέθοδοι και η συνάρτηση Patterson

Τα πράγματα δυσκόλεψαν. Ακούστε. Το βιβλίο αυτό έχει σχεδόν φτάσει στο τέλος του και ακόμα το ζουμί του προβλήματος των φάσεων δεν έχει αναφερθεί. Και το ζουμί είναι ότι στη γενική περίπτωση που το $\rho(xyz)$ μπορεί να είναι μία οποιαδήποτε αυθαίρετη συνάρτηση (δηλαδή να έχει ό,τι τιμές θέλει), το πρόβλημα των φάσεων είναι θεμελιωδώς άλυτο. Δείτε την εξίσωση [5] ξανά :

$$\rho(xyz) = \sum_{hkl} |\vec{F}_{hkl}| e^{i\phi_{hkl}} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Εάν σε αυτήν την εξίσωση χρησιμοποιήσουμε τα σωστά (δηλαδή τα πειραματικά προσδιορισμένα) πλάτη $|\mathbf{F}_{hkl}|$ αλλά στα ϕ_{hkl} μπορούμε αυθαίρετα να

δίνουμε όποιες τιμές θέλουμε, τότε υπάρχουν άπειρα διαφορετικά $\rho(xyz)$ που όλα τους έχουν τα σωστά πλάτη $|\mathbf{F}_{hkl}|$ αλλά διαφορετικές φάσεις φ_{hkl} και, συνεπώς, όλα αυτά τα $\rho(xyz)$ είναι συμβατά με τα πειραματικά δεδομένα. Ο μοναδικός λόγος που το κρυσταλλογραφικό πρόβλημα φάσεων είναι δυνητικά επιλύσιμο είναι ότι η συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας δεν είναι μία οποιαδήποτε (αυθαίρετη) συνάρτηση. Για αρχή το $\rho(xyz)$ πρέπει να είναι παντού μεγαλύτερο ή ίσο του μηδενός γιατί αρνητική ηλεκτρονική πυκνότητα δε βγάζει ιδιαίτερο νόημα τουλάχιστον για normal everyday physics. Ακόμα καλύτερα, έχουμε πάρα πολύ ξεκάθαρες ιδέες του τι περιμένουμε να δούμε σε ένα 'φυσιολογικό' χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας: περιμένουμε να δούμε ωραία, σφαιρικά, πλήρως διαχωρισμένα άτομα, που να έχουν το σωστό πλήθος και τους σωστούς ατομικούς τύπους (σύμφωνα με τη στοιχειομετρία του μορίου που μελετάμε), τα οποία να φτιάχνουν μόρια με λίγο-πολύ γνωστά και αναμενόμενα μήκη και γωνίες δεσμών, κοκ. Είναι όλη αυτή η προϋπάρχουσα πληροφορία που κάνει την επίλυση του προβλήματος

των φάσεων εφικτή. Και όχι απλώς εφικτή. Το ότι υπάρχουν τόσοι περιορισμοί για το πώς θα πρέπει να μοιάζει το $\rho(xyz)$ δημιουργεί σχέσεις μεταξύ των παραγόντων δομής, με τις σχέσεις αυτές να καθορίζουν τις φάσεις με τέτοιο τρόπο ώστε οι περιορισμοί που έχουμε για το $\rho(xyz)$ να ικανοποιούνται. Ένα βλακώδες παράδειγμα για να μη χαθούμε: η σχέση $m+n-2 = 0$ έχει στη γενική περίπτωση έναν άπειρο αριθμό λύσεων για τα m και n . Αλλά έχει μόνο μία λύση εάν κάποιος μας πει ότι τα m και n πρέπει να είναι ακέραιοι αριθμοί μεγαλύτεροι του μηδενός. Η ύπαρξη περιορισμών μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία σχέσεων. Ας πούμε το ίδιο πράγμα με άλλα λόγια. Εάν πάρετε την εξίσωση [5] και αρχίσετε να δίνετε σωστές τιμές στα πλάτη αλλά τυχαίες τιμές στα φ_{hkl} και να υπολογίζετε τους αντιστοίχους χάρτες $\rho(xyz)$ είναι σχεδόν σίγουρο ότι κανείς από τους χάρτες που θα υπολογίσετε δε θα μοιάζει με έναν πραγματικό χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας. Είναι τόσο σίγουρο που μία πραγματιστική εκφώνηση του προβλήματος των φάσεων είναι η εξής: «Βρείτε ένα σετ από φάσεις

τέτοιο ώστε ο χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας που θα προκύψει από τη χρήση αυτών των φάσεων να συμφωνεί με τη φυσική και τη χημεία που γνωρίζουμε. Αυτές θα είναι οι σωστές φάσεις». Ίσως να σκέφτεστε ότι με αυτήν την εκφώνηση το πρόβλημα των φάσεων ακούγεται σχετικά απλό. Δεν είναι έτσι: Πείτε ότι έχουμε μόνο 100 φάσεις να προσδιορίσουμε, και για να το κάνουμε ακόμα πιο απλό, πείτε ότι αυτές οι φάσεις δεν είναι γενικές (οτιδήποτε ανάμεσα σε 0 και 2π) αλλά μπορούν να είναι είτε μόνο θετικές είτε μόνο αρνητικές. Ο συνολικός αριθμός των διαφορετικών σετ φάσεων που μπορείτε να φτιάξετε είναι 2^{100} που είναι περίπου ίσο με 10^{30} . Εάν μπορούσατε να εξετάζατε ένα τρισεκατομμύριο σετ φάσεων κάθε δευτερόλεπτο, θα σας έπαιρνε δυόμιση φορές την ηλικία του σύμπαντος για να τελειώσετε με αυτό το κατά τα άλλα απλό πρόβλημα. Το ότι είναι τόσο μα τόσο απίθανο να βρεθούν τυχαίοι συνδυασμοί φάσεων που να ικανοποιούν τους περιορισμούς για το $\rho(xyz)$ ίσως να σας βοηθήσει να καταλάβετε το πώς αυτοί οι ισχυροί περιορισμοί μπορούν να ικανοποιηθούν μόνο εάν

υπάρχουν σχέσεις που να καθορίζουν τις φάσεις των παραγόντων δομής δεδομένων των πλατών τους. Οι κρυσταλλογραφικές μέθοδοι οι οποίες στηρίζονται στην εύρεση και τη χρήση τέτοιου είδους αλγεβρικών σχέσεων προκειμένου να λύσουν το πρόβλημα των φάσεων είναι γνωστές με το όνομα άμεσες μέθοδοι (direct methods).

Εάν νιώθετε ότι ίσως η κρυσταλλογραφία έχει αρκετά μαθηματικά είναι επειδή δεν έχετε δει ακόμα δημοσίευση από το χώρο των άμεσων μεθόδων : η κατάσταση είναι τόσο απελπιστική που οι μη μαθηματικοί συνήθως εγκαταλείπουν την προσπάθεια πριν καν τελειώσει η σύνοψη του άρθρου. Άρα το θέμα των άμεσων μεθόδων δεν έχει καμία θέση σε αυτό το εισαγωγικό βιβλίο και θα το προσπεράσουμε σχεδόν αυτούσιο. Για να έχετε όμως μία αίσθηση για του τι τύπου αλγεβρικές σχέσεις μιλάμε θα πούμε μία σύντομη κουβέντα για μία μόνο από αυτές, την εξίσωση Sayre. It goes like this.

Ίσως να θυμάστε τη συνέλιξη και το θεώρημα της συνέλιξης από το προηγούμενο κεφάλαιο. Το

θεώρημα της συνέλιξης ισχύει και από την ανάποδη, δηλαδή ο μετασχηματισμός Fourier του γινομένου δύο συναρτήσεων ταυτίζεται με τη συνέλιξη των μετασχηματισμών Fourier αυτών των συναρτήσεων. Αυτό που σκέφτηκε ο Καθ. κ. Sayre είναι το εξής : εάν έχουμε μία δομή που αποτελείται από πολλά ίδια άτομα πλήρως διαχωρισμένα μεταξύ τους τότε η συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας $\rho(xyz)$ και το τετράγωνο της $\rho(xyz)^2$ θα μοιάζουν απελπιστικά μεταξύ τους. Το μόνο που θα έχει αλλάξει θα είναι μία μικρή μεταβολή στο ακριβές σχήμα των ατόμων (τα 'τετραγωνισμένα' άτομα θα έχουν πιο οξύ σχήμα από τα κανονικά) αλλά όλα τα άλλα θα είναι ίδια. Αυτό σημαίνει πως με μία μικρή μόνο διόρθωση ισχύει ότι $\rho(xyz) \approx \rho(xyz)^2$. Χρησιμοποιώντας το θεώρημα της συνέλιξης από την ανάποδη έχουμε συμβολικά ότι

$$\rho(xyz) \approx \rho(xyz)^2 \Leftrightarrow \text{FT}[\rho(xyz)] \approx \text{FT}[\rho(xyz)^2]$$

και

$$\begin{aligned} \text{FT}[\rho(xyz)^2] &= \text{FT}[\rho(xyz) \cdot \rho(xyz)] = \\ &= \text{FT}[\rho(xyz)] \otimes \text{FT}[\rho(xyz)] \end{aligned}$$

άρα

$$\text{FT}[\rho(xyz)] \approx \text{FT}[\rho(xyz)] \otimes \text{FT}[\rho(xyz)]$$

Ο μετασχηματισμός Fourier του $\rho(xyz)$ είναι το φάσμα περίθλασης, δηλαδή οι παράγοντες δομής \mathbf{F}_{hkl} . Το μπέρδεμα είναι το πώς θα υπολογίσουμε τη συνέλιξη ενός φάσματος περίθλασης με τον εαυτό του (που είναι αυτό που βλέπετε στην τελευταία εξίσωση). Ο σωστός τρόπος θα ήταν να πάμε πίσω και να δούμε επιτέλους αυτό το ολοκλήρωμα που είναι η πράξη της συνέλιξης. Από την άλλη θα ήταν κρίμα να κλείσετε το βιβλίο σε αυτό το όψιμο στάδιο οπότε ίσως είναι καλύτερα να μην το διακινδυνεύσουμε και να προτιμήσουμε να δούμε απ' ευθείας το τελικό αποτέλεσμα :

$$\vec{\mathbf{F}}_{hkl} = \sum_{h'k'l'} \vec{\mathbf{F}}_{h'k'l'} \vec{\mathbf{F}}_{h-h', k-k', l-l'}$$

Τι λέει αυτό. Απλά μιλώντας λέει ότι για τη συγκεκριμένη κατηγορία δομών που εξετάζουμε (όλα

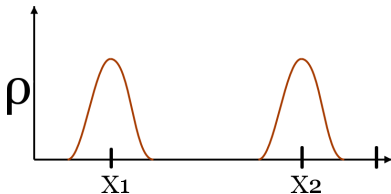
τα άτομα είναι ίδια και έχουμε δεδομένα σε ατομική διακριτικότητα) υπάρχει μία εξίσωση που συνδέει όλους τους παράγοντες δομής μεταξύ τους. Προσέξτε ότι η εξίσωση χρησιμοποιεί παράγοντες δομής (πλάτη και φάσεις) και όχι μόνο πλάτη, το οποίο σημαίνει ότι η λύση της εξίσωσης αυτής προσδιορίζει και τις φάσεις. Τώρα, τι είναι όλα αυτά τα $h, h', k, k', h-h', k-k', l-l'$; Αυτά, βέβαια είναι δείκτες Miller (το ξέρατε αυτό) και αυτό που λένε είναι: Η τιμή (πλάτος και φάση) του παράγοντα δομής F_{hkl} είναι ίση με το άθροισμα των γινομένων πολλών-πολλών ζευγών παραγόντων δομής (των $F_{h'k'l'}$ και $F_{h-h',k-k',l-l'}$). Τα ζεύγη αυτά που χρησιμοποιούμε στο άθροισμα δεν είναι τυχαία, αλλά είναι όλα εκείνα τα ζεύγη για τα οποία ισχύει ότι το άθροισμα των δεικτών τους κάνει hkl (αν προσθέσετε τους δείκτες $h'k'l'$ στους δείκτες $h-h',k-k',l-l'$ το αποτέλεσμα είναι hkl). Επειδή τα hkl (μεταξύ όλων των άλλων νοημάτων που έχουν) είναι και ανύσματα στο αντίστροφο πλέγμα, το ίδιο πράγμα με άλλα λόγια είναι: το F_{hkl} είναι ίσο με το άθροισμα των γινομένων όλων των παραγόντων δομής των οποίων το ανυσματικό άθροισμα των

θέσεων τους είναι ίσο με hkl . Έχοντας διαθέσιμη μία σχέση σαν αυτή της εξίσωσης του Sayre μετασχηματίζει τελείως το πρόβλημα των φάσεων. Η εκφώνηση του προβλήματος τώρα γίνεται: με δεδομένα τα πλάτη των παραγόντων δομής, βρείτε ένα σετ από φάσεις τέτοιες ώστε η εξίσωση Sayre να ισχύει. Δεν πρόκειται να ασχοληθούμε με τα πώς και τα γιατί της πρακτικής εφαρμογής των άμεσων μεθόδων. Το μοναδικό που θα πρέπει να σημειώσουμε πριν κλείσουμε αυτό το θέμα είναι ότι οι άμεσες μέθοδοι σχεδόν πάντα απαιτούν δεδομένα ατομικής διακριτικότητας για την εφαρμογή τους. Για το λόγο αυτό είναι πολύ λίγες οι δομές πρωτεϊνών που έχουν προσδιοριστεί με τέτοιες μεθόδους. Εκεί που πραγματικά βοηθούν οι άμεσες μέθοδοι είναι στον προσδιορισμό των θέσεων των βαρέων ατόμων (ή των 'ιδιαίτερων' σκεδαστών) στις μεθόδους MAD, MIRAS, SAD, SIRAS, κοκ.

Και, έτσι, φτάσαμε στο τελευταίο θέμα που διαπραγματεύεται αυτό το βιβλίο, τη συνάρτηση Patterson. Ο επίσημος τρόπος να συζητήσουμε τη

συνάρτηση Patterson θα ήταν πάλι μέσω συνέλιξης (που αυτή τη φορά θα κατέληγε σε κάτι που λέγεται συνάρτηση αυτοσυσχετισμού, autocorrelation function). Δεν είναι ώρα για τέτοια, θα πάμε γύρω-γύρω.

Δείτε την κατανομή ηλεκτρονικής πυκνότητας για έναν υποθετικό μονοδιάστατο κρύσταλλο με δύο άτομα σε θέσεις x_1 και x_2 της στοιχειώδους κυψελίδας :



Από το πείραμα μετράμε τα πλάτη των παραγόντων δομής, μας λείπουν οι φάσεις. Εάν με κάποιον τρόπο λύναμε το πρόβλημα των φάσεων τότε το άθροισμα των απλών κυμάτων (που είναι οι παράγοντες δομής) θα μας έδινε πίσω τη συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας που βλέπετε. Τώρα έρχεται το δύσκολο :

Προκειμένου το $\rho(x)$ να μοιάζει όντως με αυτό που βλέπετε θα πρέπει οι φάσεις και τα πλάτη των διαφόρων κυμάτων να είναι τέτοια ώστε τα κύματα αυτά να συμβάλουν θετικά μεταξύ τους στις θέσεις x_1 και x_2 της στοιχειώδους κυψελίδας (και να αλληλοαναιρούνται στις υπόλοιπες θέσεις). Ο λόγος βέβαια είναι ότι εάν αυτό δεν ίσχυε τότε δε θα βλέπαμε τα άτομα. Άρα : τα πλάτη και οι φάσεις των κυμάτων είναι τέτοιες ώστε τα κύματα (οι παράγοντες δομής) να συμβάλουν μεταξύ τους θετικά σε δύο θέσεις οι οποίες απέχουν μεταξύ τους απόσταση $|x_1 - x_2|$. Με αλλά λόγια, εάν τα κύματα αυτά είναι τέτοια ώστε να συμβάλουν θετικά σε κάποια θέση, τότε υποχρεωτικά επίσης θα συμβάλουν θετικά σε απόσταση $|x_1 - x_2|$ από εκείνη τη θέση. Ο λόγος για αυτό είναι ο εξής : ο τρόπος που μεταβάλλεται ένα κύμα κατά μήκος κάποιας απόστασης δεν εξαρτάται από την απόλυτη θέση αυτής της απόστασης στη στοιχειώδη κυψελίδα. Εάν π.χ. ένα κύμα ξεκινώντας από το μέγιστό του πέφτει στο μισό σε απόσταση ίση με π.χ. 10\AA τότε θα κάνει ακριβώς το ίδιο άσχετα από το εάν το μέγιστο από το οποίο ξεκίνησε ήταν στη

θέση $x=0.1$ ή 0.3 ή 0.7 της στοιχειώδους κυψελίδας. Ίσως μία εικόνα να βοηθούσε εδώ. Δείτε πάλι τα δύο πρώτα γραφήματα της Εικόνας 41. Καθώς προσθέτουμε πολλά απλά κύματα παίρνουμε σιγά-σιγά πίσω το είδωλο του αντικειμένου με δύο κορυφές στις θέσεις 0.0 και 0.5 . Για το πώς συμβάλλουν τα κύματα μεταξύ τους έχει σημασία η σχετική τους φάση και όχι η απόλυτη, πράγμα που σημαίνει ότι εάν π.χ. 'σπρώχναμε' όλα τα κύματα όπως είναι κατά 0.25 προς τα αριστερά, αυτά τα κύματα πάλι θα έφτιαχναν δύο κορυφές με μεταξύ τους απόσταση ίση με 0.5 , μόνο που οι απόλυτες θέσεις τους αυτή τη φορά θα ήταν -0.25 και 0.25 .

Αυτό που μας λέει όλη αυτή η ανάλυση είναι ότι εάν με κάποιο τρόπο μπορούσαμε να 'υποχρεώσουμε' τα κύματα να συμβάλουν θετικά μεταξύ τους σε κάποια άλλη θέση της στοιχειώδους κυψελίδας, ως την πούμε z , τότε σε απόσταση $z+|x_1-x_2|$ αυτά τα ίδια κύματα επίσης θα συμβάλουν θετικά μεταξύ τους. Ο πλέον άμεσος και εύκολος τρόπος να υποχρεώσεις κύματα να συμβάλουν θετικά σε κάποια συγκεκριμένη θέση

είναι να δώσεις σε όλα τους φάση ίση με το μηδέν, στην οποία περίπτωση η θέση στην οποία όλα συμβάλουν θετικά είναι η θέση μηδέν (η αρχή των αξόνων) της στοιχειώδους κυψελίδας. Με το που έχουμε υποχρεώσει τα κύματα να συμβάλουν θετικά στη θέση μηδέν, τότε σε απόσταση ίση με τις διαατομικές αποστάσεις $|x_1-x_2|$ τα κύματα επίσης θα συμβάλουν θετικά.

Άρα. Εάν κάνουμε μία σύνθεση Fourier στην οποία τα μεν πλάτη είναι τα σωστά (δηλαδή τα πειραματικά προσδιορισμένα) οι δε φάσεις έχουν όλες τιμή ίση με το μηδέν, θα πάρουμε πίσω όχι ένα χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας, αλλά ένα χάρτη που περιέχει πληροφορία για τις αποστάσεις μεταξύ των ατόμων, ένα χάρτη δια-ατομικών ανυσμάτων (interatomic vectors). Αυτή είναι η συνάρτηση του Καθ. κ. Patterson. Για λόγους που δεν είναι της ώρας (κάτι που έχει να κάνει με συνελιξείς και autocorrelations), στον υπολογισμό της συνάρτησης Patterson δε χρησιμοποιούμε τα πλάτη των ανακλάσεων, αλλά τα τετράγωνά τους $|\mathbf{F}_{hkl}|^2$. Για

πληρότητα, ολόκληρη η εξίσωση για τον υπολογισμό της συνάρτησης Patterson είναι :

$$\mathcal{P}(uvw) = \sum_{hkl} |\vec{\mathbf{F}}_{hkl}|^2 e^{-2\pi i(hu+kv+lw)} \quad [8]$$

όπου $|\mathbf{F}_{hkl}|^2$ είναι τα τετράγωνα των πειραματικά προσδιορισμένων πλατών και ο όρος $e^{i\phi hkl}$ έχει χαθεί γιατί όλες οι φάσεις έχουν τιμή ίση με το μηδέν (δείτε την εξίσωση [5] αν δε θυμάστε τι είναι αυτό το $e^{i\phi hkl}$ για το οποίο μιλάμε).

Προσέξτε ότι το όνομα των χωρικών μεταβλητών άλλαξε από xyz σε uvw . Αυτό είναι μία εξαιρετικά χρήσιμη αλλαγή η οποία μας βοηθάει να θυμόμαστε ότι η συνάρτηση Patterson δεν είναι συνάρτηση στον πραγματικό χώρο, αλλά στο χώρο των δια-ατομικών ανυσμάτων.

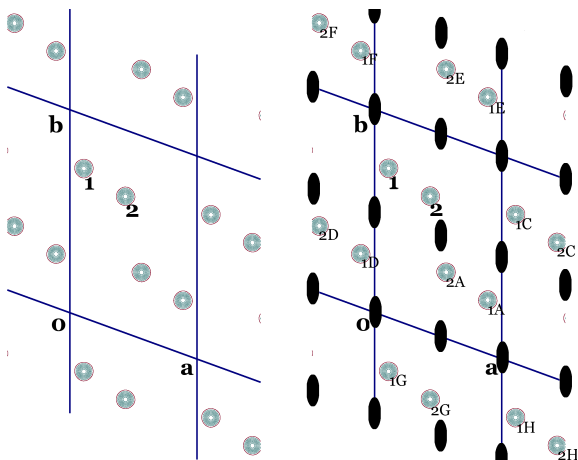
Για να συνοψίσουμε. Τα πειραματικά προσδιορισμένα πλάτη των ανακλάσεων δεν αρκούν για να υπολογίσουμε το χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας, αλλά αρκούν (αν θέσουμε όλες τις

φάσεις σε τιμή ίση με το μηδέν) για τον υπολογισμό της συνάρτησης Patterson. Η συνάρτηση Patterson είναι ένας χάρτης δια-ατομικών ανυσμάτων ο οποίος είναι άμεσα διαθέσιμος από το κρυσταλλογραφικό πείραμα. Το να μπορούμε χωρίς πληροφορία για τις φάσεις να υπολογίσουμε τα δια-ατομικά ανύσματα φαίνεται να είναι ένα εξαιρετικό νέο : Εάν γνωρίζουμε τις αποστάσεις μεταξύ των ατόμων, δε θα πρέπει να μπορούμε να βρούμε τη δομή που θέλουμε ; Στο κάτω-κάτω (όπως λέγαμε στην αρχή του βιβλίου) η δομή καθορίζεται από τη σχετική θέση των ατόμων και αυτό που λέμε τώρα είναι ότι μπορούμε απ' ευθείας από τα πλάτη να βρίσκουμε τα ανύσματα που συνδέουν άτομα. Φαίνεται να είμαστε σε εξαιρετική φόρμα.

Να το ξεχάσετε. Η συνάρτηση Patterson είναι μία επικίνδυνη συνάρτηση που άμεσα ή έμμεσα έχει οδηγήσει σε μερικές από τις πλέον διάσημες γκάφες της κρυσταλλογραφίας. Ο μοναδικός τρόπος να σας πείσω ότι τα πράγματα είναι δύσκολα με τη συνάρτηση Patterson και τα παράγωγά της

(περισσότερα για αυτά τα παράγωγα αργότερα) είναι να υποφέρετε εξαιτίας της, το οποίο και θα πράξουμε μέσω ενός παραδείγματος. Εάν σκεφτόσασταν να κάνετε ένα διάλειμμα τώρα είναι η ώρα, τα πράγματα θα δυσκολέψουν.

Δείτε το αριστερό διάγραμμα της Εικόνας 49. Αυτό που βλέπετε είναι η δομή (η ηλεκτρονική πυκνότητα) ενός υποθετικού δισδιάστατου κρυστάλλου. Η έκταση που βλέπετε στο διάγραμμα εκτείνεται σε κλασματικές συντεταγμένες από -0.50 έως $+1.50$ τόσο κατά μήκος του x όσο και του y . Το κεντρικό παραλληλόγραμμο είναι μία πλήρης στοιχειώδης κυψελίδα με την αρχή των αξόνων και τις πλευρές a και b σημειωμένες. Οι συγκεντρώσεις ('λόφοι') ισοϋψών είναι τα άτομα και υπάρχουν τέσσερα άτομα ανά στοιχειώδη κυψελίδα. Τα τέσσερα αυτά άτομα δεν είναι ανεξάρτητα γιατί αυτός ο κρύσταλλος έχει συμμετρία. Όλα τα στοιχεία συμμετρίας που έχει ο συγκεκριμένος κρύσταλλος είναι κέντρα συμμετρίας τα οποία είναι σημειωμένα με τα μαύρα οβάλ σχήματα στο δεξί τμήμα της Εικόνας 49.

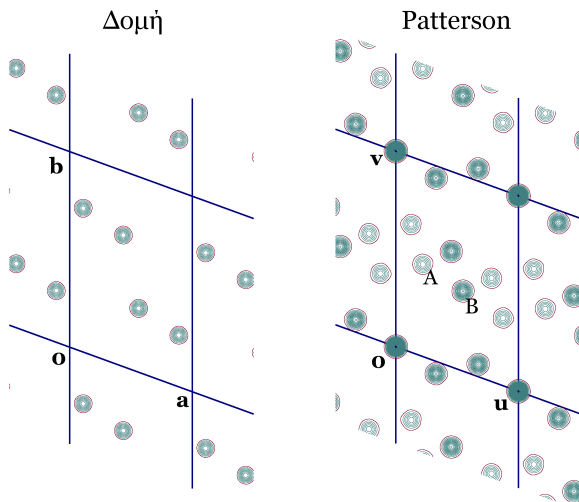


Εικόνα 49: Το διάγραμμα αριστερά είναι ο χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας μιας διδιάστατης δομής με τέσσερα άτομα στη στοιχειώδη κυψελίδα τα οποία ανά δύο συνδέονται μέσω ενός κέντρου συμμετρίας. Το δεξί διάγραμμα είναι η ίδια ακριβώς δομή με τα στοιχεία συμμετρίας σημειωμένα και τα συμμετρικά άτομα μαρκαρισμένα ανάλογα με το ποιο στοιχείο συμμετρίας τα συνδέει.

Αποτέλεσμα της συμμετρίας είναι ότι από τα τέσσερα άτομα της στοιχειώδους κυψελίδας μόνο δύο είναι πραγματικά ανεξάρτητα, τα αλλά δύο (όπως και όλα

των υπολοίπων κυψελίδων) προκύπτουν μέσω της εφαρμογής της συμμετρίας. Υποθέτοντας ότι τα άτομα τα σημειωμένα ως '1' και '2' είναι τα ανεξάρτητα, μπορούμε να ταυτοποιήσουμε σχετικά εύκολα όλα τα συμμετρικά τους. Για παράδειγμα, τα άτομα '1F' και '2F' προκύπτουν από την εφαρμογή του κέντρου συμμετρίας που είναι κοντά στο 'b'. Τα '2A' και '1A' προκύπτουν από την εφαρμογή του κέντρου συμμετρίας που είναι στη μέση της στοιχειώδους κυψελίδας, κοκ.

Αν, λοιπόν, έχουμε μετρήσει τα πλάτη από αυτήν την υποθετική δισδιάστατη δομή και συνδυάσουμε αυτά τα πλάτη με ένα σετ φάσεων που είναι όλες ίσες με το μηδέν, μπορούμε να υπολογίσουμε τη συνάρτηση Patterson αυτού του κρυστάλλου. Το αποτέλεσμα από αυτόν τον υπολογισμό φαίνεται στο δεξί μισό της Εικόνας 50. Πριν καν σκεφτούμε για το πώς θα μπορούσαμε έχοντας μόνο τη συνάρτηση Patterson να βρούμε τη δομή που τη δημιούργησε, πρέπει να καταλάβουμε τι βλέπουμε στην Patterson.



Εικόνα 50: Η ατομική δομή (αριστερά) και η συνάρτηση Patterson (δεξιά) που της αντιστοιχεί.

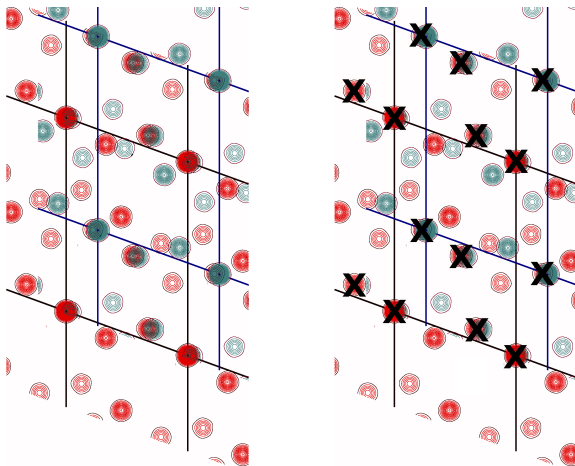
Για αρχή προσέξτε ότι η υψηλότερη κορυφή (ο λόφος με τις περισσότερες ισοϋψείς) είναι στην αρχή των αξόνων και βέβαια –λόγω της μεταθετικής συμμετρίας των κρυστάλλων– σε όλες τις ισοδύναμες

αρχές αξόνων των γειτονικών κυψελίδων. Αυτή η μεγάλη κορυφή (γνωστή ως origin peak) είναι το αποτέλεσμα του ότι όλα τα κύματα υποχρεωτικά συμβάλλουν στη θέση μηδέν γιατί όλα τα κύματα έχουν φάσεις μηδέν στην περίπτωση της συνάρτησης Patterson. Η ίδια ιδέα αλλά βλέποντας την Patterson από την άποψη των δια-ατομικών ανυσμάτων είναι ότι όλα τα ανύσματα από κάθε άτομο στον εαυτό του έχουν όλα μήκος μηδέν και θα πέσουν το ένα πάνω στο άλλο στην αρχή των αξόνων. Προσέξτε, επίσης, ότι η συνάρτηση Patterson έχει υποχρεωτικά κέντρο συμμετρίας ακόμα και στις περιπτώσεις που η δομή που την δημιούργησε δεν είχε συμμετρία. Ο λόγος για αυτό είναι ότι για κάθε ανύσμα π.χ. $\alpha \rightarrow \beta$ υποχρεωτικά υπάρχει και το $\beta \rightarrow \alpha$ το οποίο έχει ίδιο μήκος αλλά αντίθετη φορά. Όλες οι υπόλοιπες κορυφές της Patterson επίσης αντιστοιχούν σε δια-ατομικά ανύσματα αλλά για να γίνει η ζωή σας πιο ενδιαφέρουσα, άλλες από αυτές τις κορυφές έχουν διπλή βαρύτητα (διπλό πλήθος ισοϋψών) όπως η κορυφή που έχει σημειωθεί ως 'B', ενώ άλλες μονή βαρύτητα όπως η κορυφή 'A'. Ο λόγος για αυτή τη

διαφορά είναι ότι οι κορυφές διπλής βαρύτητας αντιστοιχούν σε υπερθέσεις περισσότερων (διπλάσιων) ανυσμάτων σε σχέση με τις κορυφές απλής βαρύτητας. Η εύρεση του ποια ζεύγη ατόμων δίνουν ποια κορυφή στην Patterson θέλει προσοχή και είναι μία επίπονη άσκηση. Για παράδειγμα, η κορυφή 'A' θα μπορούσε να είχε προκύψει από το ζεύγος ατόμων '1D'→'1' ή άλλους ισοδύναμους (από άποψη συμμετρίας) συνδυασμούς. Εάν σας πιάσει κρίση κάποια ημέρα μπορείτε να προσπαθήσετε να βρείτε ποια άτομα δίνουν ποιες κορυφές στην συνάρτηση Patterson της Εικόνας 50.

Όπως καταλαβαίνετε, εάν είναι σπαζοκεφαλιά να κατανοήσουμε τι στο καλό βλέπουμε στην Patterson όταν ήδη γνωρίζουμε τη δομή, το ανάποδο σενάριο – δηλαδή να έχουμε μόνο την Patterson και να προσπαθήσουμε να μαντέψουμε τη δομή που την παρήγαγε– μοιάζει εφιαλτικό. Δεν είναι ακριβώς έτσι, και για τόσο απλοϊκές δομές όσο αυτή της Εικόνας 50 το να βρεις τη δομή από τη συνάρτηση Patterson δεν είναι τόσο δύσκολο όσο ακούγεται. Για ένα άμεσο και

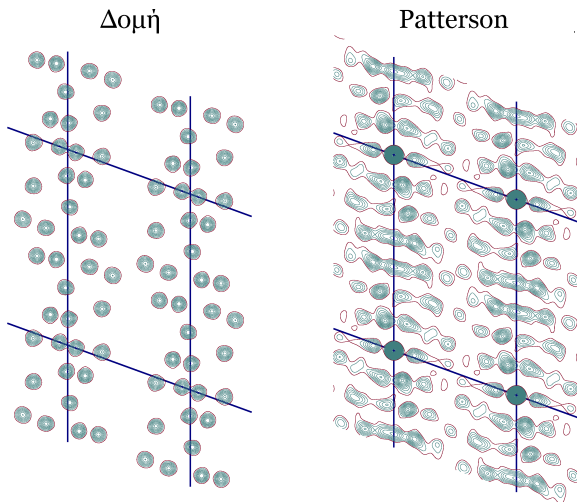
γρήγορο παράδειγμα δείτε την Εικόνα 51.



Εικόνα 51: Η μέθοδος της υπέρθεσης συναρτήσεων Patterson. Το αριστερό διάγραμμα δείχνει την υπέρθεση δύο αντιγράφων της συνάρτησης Patterson της Εικόνας 50. Η υπέρθεση είναι τέτοια ώστε η αρχή αξόνων της δεύτερης (μπλε) να είναι πάνω από την κορυφή 'Α' της πρώτης (κόκκινη). Η υπέρθεση δεν έχει γίνει με ακρίβεια ώστε να φαίνεται εύκολα ποιες κορυφές συμπίπτουν με ποιες. Το δεξιό διάγραμμα είναι η ίδια εικόνα αλλά με τις θέσεις σύμπτωσης κορυφών των δύο συναρτήσεων σημειωμένες με X.

Αυτό που βλέπετε σε αυτήν την εικόνα είναι ένα παράδειγμα του πώς δουλεύει η μέθοδος της υπέρθεσης (superposition) συναρτήσεων Patterson. Συγκρίνετε το μοτίβο των 'X' (των σημείων στα οποία κορυφές από τις δύο συναρτήσεις πέφτουν η μία πάνω στην άλλη) με το μοτίβο της ατομικής δομής στο αριστερό διάγραμμα της Εικόνας 50 και θα δείτε εύκολα ότι τα δύο μοτίβα είναι πανομοιότυπα και ότι, συνεπώς, αυτή η μία υπέρθεση αρκούσε για να λυθεί η συγκεκριμένη δομή. Δεν είναι πάντα τα πράγματα τόσο εύκολα (εάν π.χ. είχαμε κάνει την υπέρθεση σε μία κορυφή διπλής βαρύτητας θα μας περίμεναν εκπλήξεις), αλλά η κεντρική ιδέα είναι ότι σε σχετικά απλές περιπτώσεις δουλεύοντας με τη συνάρτηση Patterson μπορεί να γίνει μία ευχάριστη εμπειρία.

Εκεί που τα πράγματα γίνονται όντως δύσκολα είναι όταν ο αριθμός των ατόμων αυξάνει. Δείτε την Εικόνα 52.



Εικόνα 52: Η ατομική δομή (αριστερά) και η συνάρτηση Patterson (δεξιά) που της αντιστοιχεί. Παράδειγμα με 20 άτομα ανά στοιχειώδη κυψελίδα.

Με το που ο αριθμός των ανεξάρτητων (από άποψη συμμετρίας) ατόμων αυξήθηκε από 2 σε 10, η συνάρτηση Patterson έγινε μία απελπισία: τα διάφορα δια-ατομικά ανύσματα έχουν ενωθεί μεταξύ

τους σε μία σχεδόν συνεχή κατανομή. Η πληροφορία είναι ακόμα εκεί, αλλά τα πράγματα έχουν ήδη αρχίσει –με μόνο 10 ανεξάρτητα άτομα– να γίνονται θολά και επικίνδυνα (εάν παρ' ελπίδα σας έρθει η όρεξη να παίξετε με τη συνάρτηση Patterson και εάν μπορείτε να κάνετε εκτύπωση σε διαφάνεια ή ρυζόχαρτο, είμαι σίγουρος ότι θα το βρείτε ιδιαίτερα διασκεδαστικό το να προσπαθήσετε να λύσετε και αυτή τη δομή μέσω της μεθόδου της υπέρθεσης όπως κάναμε στην Εικόνα 51).

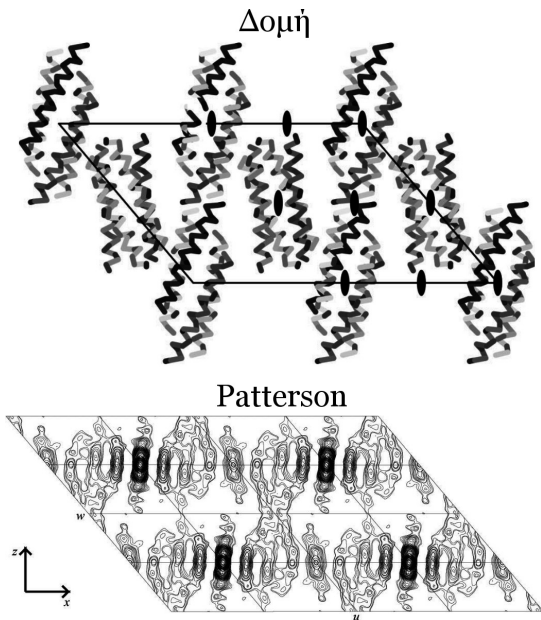
Αυτή η απότομη αύξηση της πολυπλοκότητας της συνάρτησης Patterson καθώς το πλήθος των ατόμων αυξάνει βγάζει νόημα: εάν έχουμε N άτομα στη στοιχειώδη κυψελίδα, τότε το συνολικό πλήθος ανυσμάτων (από κάθε άτομο σε όλα τα άλλα συμπεριλαμβανόμενου και του εαυτού του) θα είναι N^2 . Εάν αφαιρέσουμε τα N ανύσματα μηδενικού μήκους που πάνε από το κάθε άτομο στον εαυτό του – και που όλα τους συμπίπτουν στην αρχή των αξόνων– ο συνολικός αριθμός ανυσμάτων είναι $N(N-1)$. Για 20 άτομα αυτό μας δίνει 380 ανύσματα

ανά κυψελίδα της συνάρτησης Patterson. Προσθέστε σε αυτό ότι καθώς το πλήθος ανυσμάτων αυξάνει αρχίζουν τα διάφορα ανύσματα να πέφτουν το ένα πάνω στο άλλο, βάλτε και το ότι οι κορυφές της συνάρτησης Patterson είναι πλατύτερες απ' ότι της συνάρτησης ηλεκτρονικής πυκνότητας λόγω συνέλιξης (αυτό φαίνεται εύκολα στην Εικόνα 50) και καταλαβαίνετε γιατί η Patterson της Εικόνας 52 κατάντησε έτσι. Φανταστείτε τώρα με τι θα έμοιαζε η κατάσταση εάν είχαμε 50 ή 100 άτομα στη στοιχειώδη κυψελίδα. Το ηθικό δίδαγμα από όλα αυτά είναι ξεκάθαρο. Στη συνάρτηση Patterson φερόμαστε με την προσοχή που της αρμόζει. Με μικρό αριθμό ατόμων και καλής ποιότητας δεδομένα είναι εφικτό –και ίσως και ευχάριστο– να λυθεί μία δομή, αλλά με το που το πλήθος ατόμων ή η συμμετρία των κρυστάλλων αυξάνει η Patterson μετατρέπεται σε ένα χάος υπερσυμπιεσμένης και θορυβώδους πληροφορίας. Αυτή η πολυπλοκότητα της συνάρτησης Patterson φαίνεται να την κάνει άχρηστη για την κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών με τα χιλιάδες άτομα, αλλά δεν είναι έτσι.

Οι εφαρμογές της συνάρτησης Patterson στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών είναι παραδόξως αρκετές. Η ιστορικά παλαιότερη –και πλέον αυτονόητη εφαρμογή– είναι η χρήση της Patterson για την εύρεση της θέσης (δηλαδή τον προσδιορισμό της δομής) των βαρέων ατόμων στη μέθοδο της ισόμορφης αντικατάστασης. Αυτό γίνεται μέσω της χρήσης των πλατών των βαρέων ατόμων F_H όπως έχουμε συζητήσει στα Κεφάλαια 14 και 15. Η εφαρμογή αυτή της Patterson έχει ατονήσει στις ημέρες μας : λίγο το δυσνόητο της συνάρτησης, λίγο η σταδιακή αύξηση της πολυπλοκότητας των προβλημάτων καθώς το πλήθος των 'ιδιαίτερων/βαρέων' ατόμων (ιδιαίτερα σε εφαρμογές ανώμαλης σκέδασης) φαίνεται συνέχεια να αυξάνει, έχουν οδηγήσει την πλειοψηφία των κρυσταλλογράφων σε τακτικές επίλυσης αυτών των προβλημάτων που κυρίως βασίζονται στις άμεσες μεθόδους.

Εκεί που η συνάρτηση Patterson φαίνεται να είναι αναντικατάστατη είναι στην επίλυση του προβλήματος της μοριακής αντικατάστασης που

συζητήθηκε στο Κεφάλαιο 17, και στο χαρακτηρισμό της εσωτερικής συμμετρίας πρωτεϊνικών μορίων με κάτι που λέγεται self-rotation function. Πριν μιλήσουμε για αυτές τις εφαρμογές ας ξεκαθαρίσουμε κάτι. Σε αυτές τις εφαρμογές χρησιμοποιείται η συνάρτηση Patterson ολόκληρης της πρωτεΐνης, με τα χιλιάδες άτομα της. Αυτό δεν φαίνεται να βγάζει νόημα : μία μικρή πρωτεΐνη με π.χ. 2000 άτομα θα έδινε μερικά εκατομμύρια ανύσματα στη συνάρτηση Patterson. Πώς γίνεται από αυτό το χάος να προκύψει κάποια χρησιμότητα ; Αυτό που πρέπει να θυμάστε είναι ότι σε αυτήν την περίπτωση η συνάρτηση χρησιμοποιείται ως μία συνεχής κατανομή πυκνότητας ανυσμάτων και καμία προσπάθεια δε γίνεται να ερμηνευτεί αυτή η κατανομή σε όρους συγκεκριμένων/ταυτοποιημένων δια-ατομικών ανυσμάτων. Για να αποκτήσετε μία φυσική αίσθηση της πολυπλοκότητας μίας συνάρτησης Patterson πρωτεϊνικών κρυστάλλων δείτε την Εικόνα 53 και θυμηθείτε ότι αυτό που βλέπετε είναι το αποτέλεσμα της υπέρθεσης εκατοντάδων χιλιάδων ανυσμάτων.



Εικόνα 53: Το επάνω διάγραμμα είναι μία σχηματική αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής μιας μικρής ελικοειδούς πρωτεΐνης (μόνο Ca άτομα αναπαρίστανται). Το κάτω διάγραμμα είναι ένα επίπεδο από την αντίστοιχη συνάρτηση Patterson.

Η εφαρμογή της συνάρτησης Patterson στη μοριακή αντικατάσταση (Κεφάλαιο 17) στηρίζεται στην αναμενόμενη ομοιότητα μεταξύ της κατανομής των ενδομοριακών ανυσμάτων του μοντέλου που χρησιμοποιούμε και της δομής που θέλουμε να επιλύσουμε [ενδομοριακά (intramolecular) είναι τα ανύσματα μεταξύ ατόμων του ίδιου μορίου, διαμοριακά (intermolecular) είναι τα ανύσματα μεταξύ ατόμων διαφορετικών μορίων]. Η κεντρική ιδέα της μεθόδου είναι ότι δοκιμάζουμε διαφορετικές γωνίες περιστροφής (α, β, γ) του μοντέλου μέχρι να βρούμε κάποιες γωνίες τέτοιες ώστε η κατανομή ενδομοριακών ανυσμάτων που υπολογίζουμε από το μοντέλο να συμφωνεί με την κατανομή που έχουμε παρατηρήσει πειραματικά (για την προς επίλυση δομή). Αυτός ο πρώτος υπολογισμός μπορεί να γίνει χωρίς να γνωρίζουμε τη θέση του μορίου στη στοιχειώδη κυψελίδα: οι μετατοπίσεις (x, y, z) της πρωτεΐνης δε μεταβάλλουν το μοτίβο των ενδομοριακών ανυσμάτων. Με το που έχουμε λύσει το πρόβλημα της περιστροφής (έχουμε δηλαδή τιμές για τα α, β, γ), γίνεται ένας δεύτερος υπολογισμός στον

οποίο κρατάμε σταθερό τον προσανατολισμό του μορίου και δοκιμάζουμε διαφορετικές θέσεις (x,y,z) του μοντέλου στη στοιχειώδη κυψελίδα. Σε αυτό το δεύτερο στάδιο η σύγκριση αφορά όλα τα ανύσματα, δηλαδή τόσο τα ενδομοριακά όσο και τα διαμοριακά. Σε αυτά τα δύο διακριτά στάδια υπολογισμού αντιστοιχούν δύο συναρτήσεις που έχουν τα ονόματα 'συνάρτηση περιστροφής' (rotation function) και 'συνάρτηση μετάθεσης' (translation function). Σημειώστε ότι μέσω της χρήσης της συνάρτησης Patterson γίνεται εφικτή η διάσπαση ενός εξαδιάστατου προβλήματος ('ποιες είναι οι τιμές των $\alpha, \beta, \gamma, x, y, z'$ ') σε δύο τρισδιάστατα προβλήματα, το πρώτο της περιστροφής και το δεύτερο της μετάθεσης. Ο λόγος που αυτός ο διαχωρισμός είναι εφικτός είναι ότι στη συνάρτηση Patterson τα ενδομοριακά και τα διαμοριακά ανύσματα είναι τοπολογικά χωρισμένα : Οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες είναι ως επί το πλείστον συμπαγή σφαιρικά μόρια το οποίο σημαίνει ότι η μεγάλη πλειοψηφία των ενδομοριακών ανυσμάτων είναι μικρού μήκους ανύσματα που βρίσκονται κοντά στην αρχή των

αξόνων (κοντά στο origin peak) της συνάρτησης. Τα διαμοριακά ανύσματα από την άλλη είναι συνήθως μεγάλου μήκους ανύσματα, μακριά από την αρχή των αξόνων. Είναι αυτός ο τοπολογικός διαχωρισμός των ανυσμάτων που κάνει εφικτή τη διάσπαση του προβλήματος της μοριακής αντικατάστασης: η συνάρτηση περιστροφής δεν υπολογίζεται χρησιμοποιώντας ολόκληρη τη συνάρτηση Patterson αλλά μόνο ένα μικρό σφαιρικό τμήμα γύρω από την αρχή των αξόνων το οποίο είναι πλούσιο σε ενδομοριακά ανύσματα.

Η τελευταία εφαρμογή της συνάρτησης Patterson για τα πλαίσια αυτού του βιβλίου είναι κάτι που λέγεται συνάρτηση αυτοπεριστροφής (self-rotation function). Ακούστε. Για λόγους που έχουν να κάνουν με αυτό που οι βιολόγοι ονομάζουν 'αρχή της φειδωλότητας' (parsimony principle), ο ολιγομερισμός φοριέται πολύ στις πρωτεΐνες: από διμερή, τριμερή και τετραμερή, μέχρι δεκαεπταμερή, εικοσιτετραμερή και ακόμα ψηλότερα, οι πρωτεΐνες λατρεύουν τη συνάθροιση. Θα ήταν πολύ ωραία, λοιπόν, εάν μπορούσαμε

– έχοντας ήδη κρυσταλλώσει μία πρωτεΐνη– να μελετήσουμε τη συμμετρία της χωρίς να πρέπει να περιμένουμε το πότε, το πώς, και το εάν θα λύσουμε το πρόβλημα των φάσεων. Και όχι μόνο αυτό. Το να γνωρίζουμε τη συμμετρία του πρωτεϊνικού μορίου από πριν είναι σε αρκετές περιπτώσεις (ιδιαίτερα αυτές με υψηλή συμμετρία) προαπαιτούμενο για τον προσδιορισμό της δομής της πρωτεΐνης. Το πρόβλημα λοιπόν που προσπαθεί να λύσει η συνάρτηση αυτοπεριστροφής είναι το εξής: με δεδομένα τα πλάτη F_p των πρωτεϊνικών κρυστάλλων, μπορούμε με κάποιο τρόπο να χαρακτηρίσουμε την τυχόν εσωτερική συμμετρία της πρωτεΐνης που κρυσταλλώσαμε; Η λύση πάει μέσω της συνάρτησης Patterson και η βασική ιδέα είναι ότι εάν η πρωτεΐνη είναι ένα ολιγομερές, τότε στην περιοχή γύρω από την αρχή των αξόνων της συνάρτησης θα υπάρχει μία γωνιακά περιοδική επανάληψη του ίδιου μοτίβου ενδομοριακών ανυσμάτων, του μοτίβου ανυσμάτων δηλαδή που αντιστοιχεί στο μονομερές της πρωτεΐνης. Εάν π.χ. η πρωτεΐνη είναι τριμερής, τότε θα υπάρχει κάποιος άξονας (που θα αντιστοιχεί στον

άξονα συμμετρίας του τριμερούς) γύρω από τον οποίο αν περιστρέψουμε κατά 120 μοίρες τη συνάρτηση Patterson θα βρούμε το ίδιο μοτίβο ανυσμάτων γύρω από την αρχή της. Καλά ακούγονται αυτά, αλλά τα πράγματα δεν είναι τόσο απλά. Για αρχή δεν γνωρίζουμε εκ των προτέρων τι τύπου συμμετρία αναζητούμε: μία π.χ. εξαμερής πρωτεΐνη θα μπορούσε να σχηματίσει ένα εξαμερές που να μοιάζει με κανονικό εξάγωνο (με γωνία περιστροφής μεταξύ των μονομερών ίση με 60 μοίρες) ή θα μπορούσε να φτιάξει ένα τριμερές διμερών (τρία διμερή που συνδέονται σε ένα εξαμερές μέσω περιστροφής κατά 120 μοίρες). Το δεύτερο πρόβλημα είναι ότι αυτοί οι άξονες εσωτερικής συμμετρίας μπορούν να έχουν οποιοδήποτε πιθανό προσανατολισμό σε σχέση με τους άξονες της κυψελίδας.

Αυτό που υπονοούν όλα αυτά είναι ότι έχουμε πολλούς υπολογισμούς να κάνουμε: πρέπει να ελέγξουμε για την τυχόν παρουσία μη κρυσταλλογραφικής συμμετρίας στη συνάρτηση Patterson τόσο για κάθε πιθανή θέση κάποιου άξονα

περιστροφής όσο και για κάθε πιθανή περιστροφή γύρω από αυτόν τον άξονα. Αυτό είναι ένα τρισδιάστατο πρόβλημα του τύπου $R = f(\varphi, \omega, \kappa)$ όπου R είναι ένα μέτρο του πόσο πολύ μοιάζει η συνάρτηση Patterson με τον εαυτό της εάν την περιστρέψουμε κατά κ μοίρες γύρω από έναν άξονα του οποίου ο προσανατολισμός (στις τρεις διαστάσεις) καθορίζεται από τις γωνίες (φ, ω) . Υπάρχει τρόπος να γίνει αυτός ο υπολογισμός γρήγορα με κάτι που οι μαθηματικοί ονομάζουν σφαιρικές αρμονικές, αλλά ποτέ δεν το είπα αυτό. Με το που έχουμε τιμές για το R μπορούμε να ελέγξουμε τα μέγιστα του και να αποφανθούμε για την τυχόν ύπαρξη μοριακής (κατ' αντίθεση με το κρυσταλλογραφικής) συμμετρίας. Εάν, για παράδειγμα, βρούμε ότι υπάρχει ισχυρό σήμα (μεγάλες τιμές του R) για δύο άξονες που είναι μεταξύ τους κάθετοι και για τους οποίους οι τιμές κ ήταν 120 μοίρες για τον πρώτο (άξονας συμμετρίας τάξεως 3) και 180 μοίρες για τον δεύτερο (άξονας συμμετρίας τάξεως 2) θα μπορούσαμε να το ερμηνεύσουμε αυτό ως ένδειξη ότι η πρωτεΐνη είναι ένα τριμερές διμερών.

Αν η συνάρτηση Patterson είναι μία φορά επικίνδυνη, η συνάρτηση αυτοπεριστροφής είναι δύο : Ανάλογα με το ποια είναι η συμμετρία των κρυστάλλων και το πώς έχουν πακεταριστεί τα μόρια στο εσωτερικό της στοιχειώδους κυψελίδας είναι πιθανό αυτό που φαίνεται να είναι ενδομοριακή συμμετρία να είναι στην πραγματικότητα διαμοριακή συμμετρία που προέκυψε από το 'ιδιαίτερο' πακετάρισμα των μορίων στον κρύσταλλο. Εάν δε σας φόβισα αρκετά, να κλείσω λέγοντας ότι ο κρυσταλλογράφος που πρώτος περιέγραψε τη συνάρτηση αυτοπεριστροφής ήταν, επίσης, και το πρώτο (δημόσιο) θύμα της.

Αρκετά βασανίσαμε και τη συνάρτηση Patterson, είναι ώρα να την αφήσουμε στην ησυχία της και να κλείσουμε επιτέλους αυτό το βιβλίο. Για όσους σκέφτονται να πάνε παρακάτω με την κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών το επόμενο κεφάλαιο έχει μία (άντε δύο) ιδέες για το τι άλλο να διαβάσετε. Καλή συνέχεια.

24 Αντί βιβλιογραφίας

Φαίνεται να υπάρχει ένας δημόσιος ανοικτός διαγωνισμός για το ποιο σύγγραμμα θα έχει τις περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές στο τέλος του. Η αλήθεια είναι ότι και ο υποφαινόμενος θα ήθελε να αναφέρει (και με αυτόν τον τρόπο να τιμήσει) τις δημοσιεύσεις εκατοντάδων ανθρώπων που με τη δουλειά τους τον βοήθησαν να καταλάβει αυτά που –μάλλον εσφαλμένα– νομίζει ότι έχει καταλάβει. Το πρόβλημα είναι ότι για ένα τόσο εισαγωγικό βιβλίο, ένα τεράστιο κατεβατό με αναφορές μάλλον αποσυντονίζει παρά βοηθάει τους αναγνώστες να πάνε παρακάτω. Αντί βιβλιογραφίας, λοιπόν, θα παραθέσω την προσωπική μου απάντηση στο ακόλουθο ερώτημα : «Εάν μπορούσα να διαβάσω ένα και μόνο ένα βιβλίο για τη θεωρία της κρυσταλλογραφίας πρωτεϊνών, ποιο βιβλίο θα διάβαζα;».

Εύκολο. Το «Crystals, X-rays and Proteins» των Sherwood και Cooper. Εάν δεν είχα ήδη υποσχεθεί ότι

θα διάλεγα μόνο ένα σύγγραμμα, μάλλον θα ήθελα να αναφέρω και το βιβλίο του Bernhard Rupp «Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology» αλλά δεν μπορώ να αναιρέσω αυτό που υποσχέθηκα και δε θα πω, βέβαια, τίποτα.