

# Κρυσταλλογραφία

Μέρος 5ο

Μέθοδοι επίλυσης του προβλήματος των φάσεων.

# Παράγοντας δομής

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

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

# Το πρόβλημα των φάσεων

---

Από το πείραμα γνωρίζουμε τις διευθύνσεις των περιθλώμενων κυμάτων  $(h, k, l)$  και τα πλάτη τους  $|F_{hkl}|$ . Εάν προσδιοριστούν και οι φάσεις τους  $\varphi(hkl)$ , τότε μπορούμε να υπολογίσουμε την συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας και από αυτή, να προσδιορίσουμε την δομή.

Για τους λόγους που έχουν ήδη αναφερθεί, οι φάσεις των περιθλώμενων κυμάτων δεν μπορούν να μετρηθούν άμεσα. Οι έμμεσες μέθοδοι προσδιορισμού των φάσεων είναι ο πυρήνας της πρακτικής εφαρμογής των κρυσταλλογραφικών μεθόδων στον προσδιορισμό μακρομοριακών δομών.

# Το πρόβλημα των φάσεων

---

Για τα πλαίσια αυτής της διάλεξης θα αναφερθούν σε απλουστευμένη μορφή μόνο δύο από τις υπάρχουσες μεθόδους προσδιορισμού φάσεων. Αυτές είναι :

- Η μέθοδος πολλαπλής ισόμορφης αντικατάστασης (MIR για multiple isomorphous replacement) η οποία καλύπτει και τις βασικές αρχές άλλων μεθόδων (όπως MIRAS, SIR, SIRAS, MAD, SAD).
- Η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης (molecular replacement) η οποία είναι χρήσιμη για τις περιπτώσεις εκείνες που για το υπό μελέτη μόριο υπάρχει κάποιο ομόλογό του γνωστής δομής.

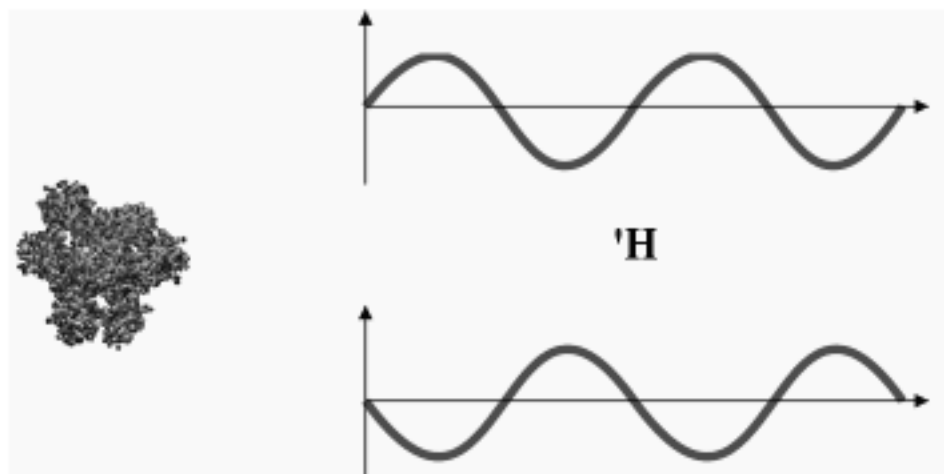
# MIR

---

Η βασική ιδέα της μεθόδου έχει ήδη αναφερθεί : εάν μπορούμε να προσθέσουμε κάποιο ή κάποια (συνήθως βαριά) άτομα σε συγκεκριμένες και σταθερές θέσεις κάθε μορίου του κρυστάλλου, και μετρήσουμε δεδομένα τόσο από τους φυσικούς κρυστάλλους, όσο και τους τροποποιημένους, τότε το πρόβλημα του προσδιορισμού των φάσεων απλοποιείται : εάν μπορούμε να προσδιορίσουμε τη δομή (δηλαδή τις θέσεις στη στοιχειώδη κυψελίδα) των βαρέων ατόμων μόνο, μπορούμε να υπολογίσουμε τις φάσεις των κυμάτων που περιθλώνται από τους φυσικούς κρυστάλλους.

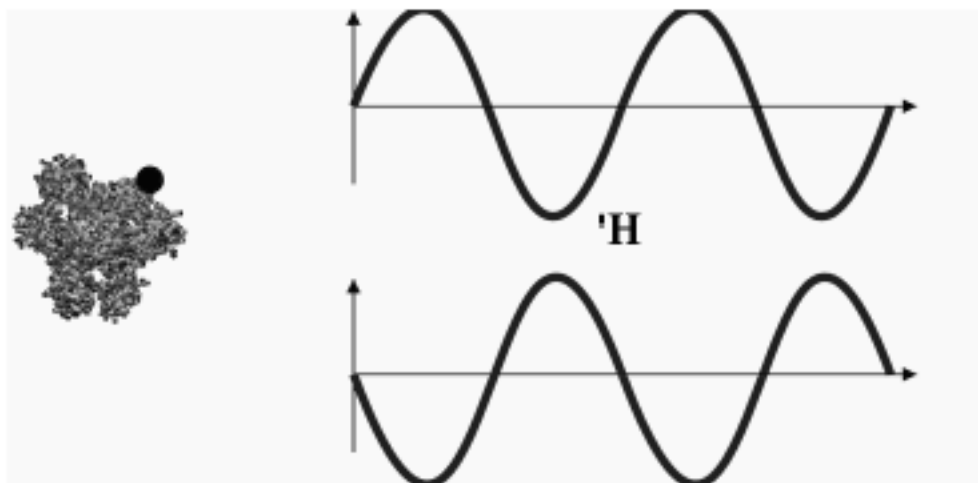
# Επανάληψη

Προσδιορισμός φάσεων, ένα παράδειγμα.



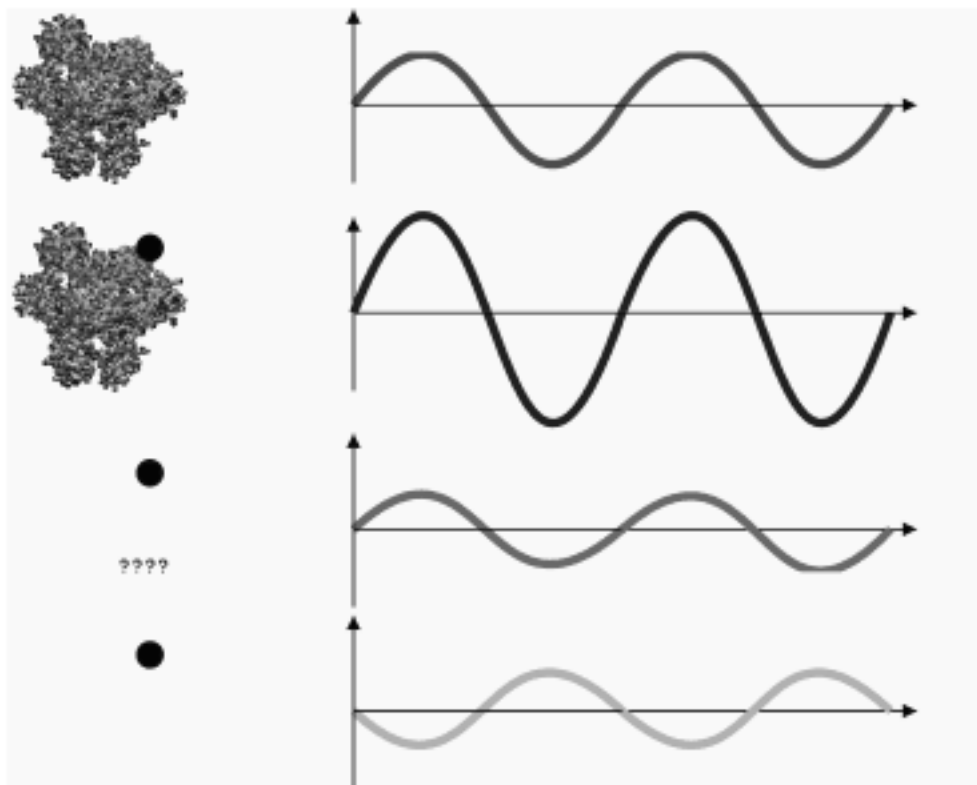
# Επανάληψη

Προσδιορισμός φάσεων, ένα παράδειγμα.



# Επανάληψη

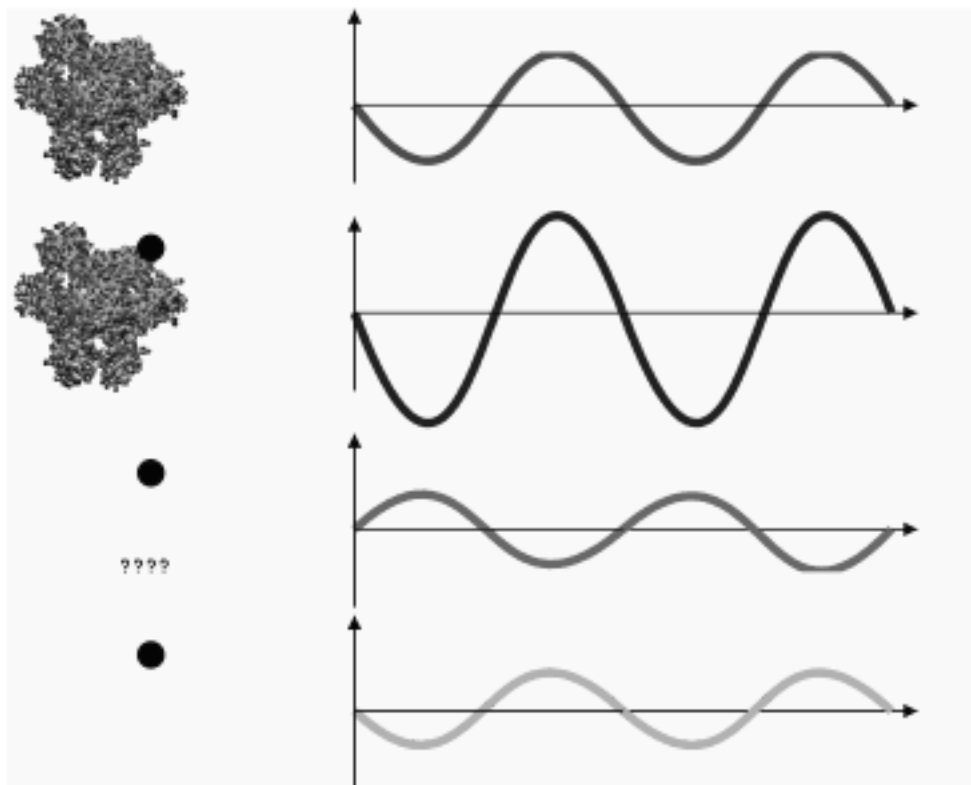
Προσδιορισμός φάσεων, ένα παράδειγμα.





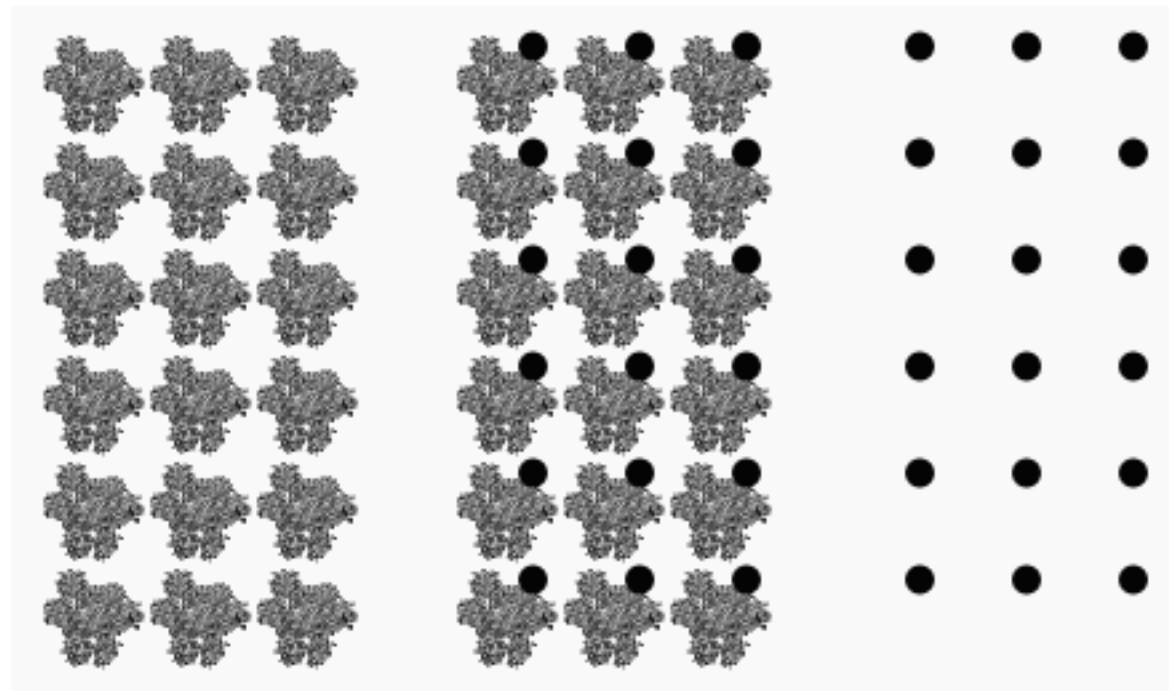
# Επανάληψη

Προσδιορισμός φάσεων, ένα παράδειγμα.



# Επανάληψη

Προσδιορισμός φάσεων, ένα παράδειγμα.



# MIR

---

Αυτό είναι ένα ρεαλιστικό παράδειγμα της μεθόδου προσδιορισμού φάσεων με το MIR μόνο όταν οι παράγοντες δομής είναι πραγματικοί αριθμοί (λόγω της ύπαρξης ενός κέντρου συμμετρίας). Στη γενική περίπτωση που οι παράγοντες δομής έχουν αυθαίρετες φάσεις, τότε μια μόνο τροποποίηση των φυσικών κρυστάλλων (δηλ. ένα μόνο παράγωγο βαρέων μετάλλων) δεν αρκεί : χρειάζονται κατ'ελάχιστον δύο ή περισσότερα παράγωγα (εξ ου και το "multiple" στο MIR). Η πλέον εύκολη μέθοδος για την κατανόηση της μεθόδου προσδιορισμού των φάσεων είναι γραφική, μέσω του λεγόμενου διαγράμματος Argand.

# MIR

## Διάγραμμα Argand

Εάν

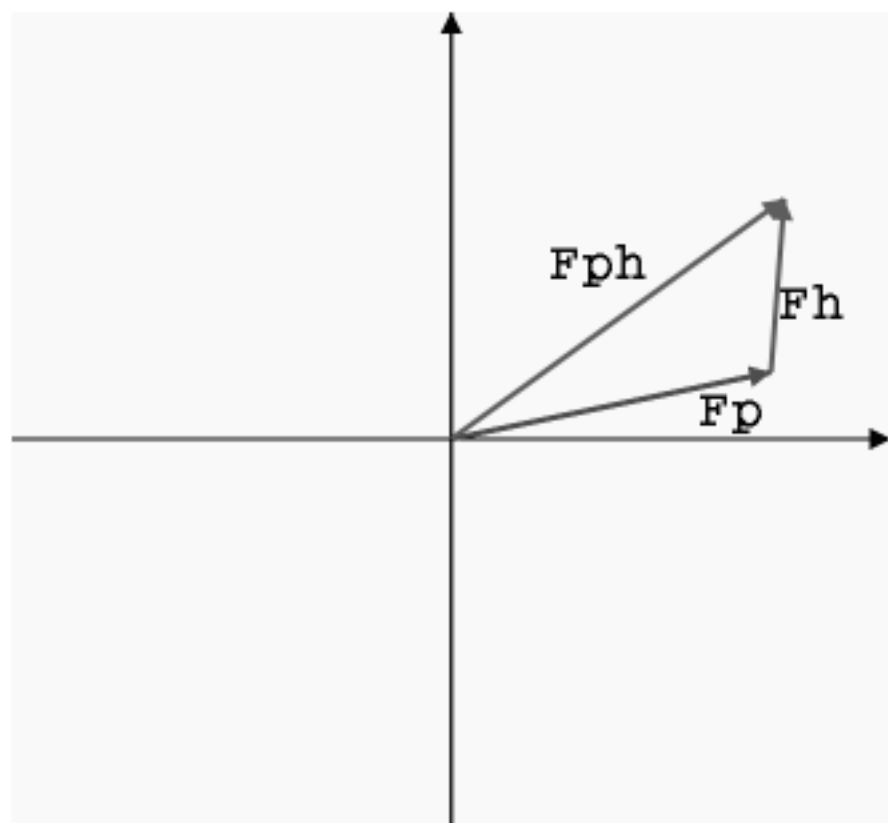
- $F_p$  είναι ο παράγοντας δομής των φυσικών κρυστάλλων,
- $F_h$  ο παράγοντας δομής των βαρέων ατόμων, και
- $F_{ph}$  ο παράγοντας δομής των παραγώγων (τροποποιημένων κρυστάλλων),

τότε, για κάθε ένα από τα περιθλώμενα κύματα ισχύει

$$F_{ph} = F_p + F_h \text{ (ανυσματικό άθροισμα)}$$

# MIR

Διάγραμμα Argand



# MIR

## Διάγραμμα Argand

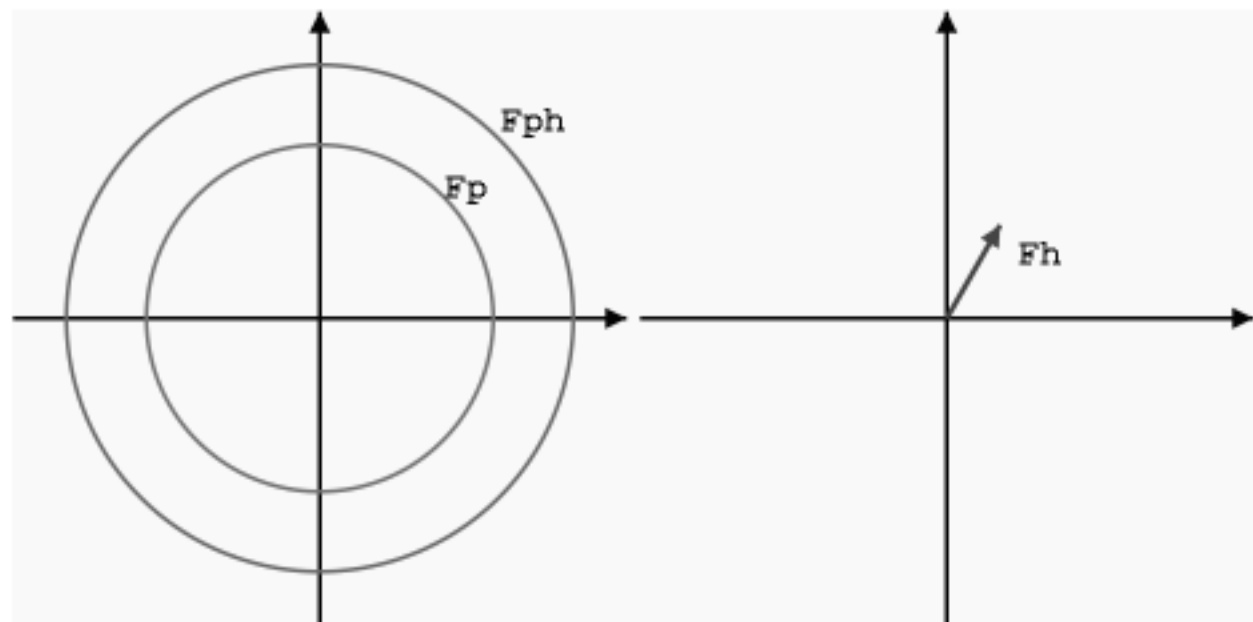
Αλλά από το πείραμα γνωρίζουμε μόνο τα πλάτη των  $F_r$  και  $F_{rh}$  και (εάν μπορούμε να προσδιορίσουμε τις θέσεις των βαρέων ατόμων) το  $F_h$  (πλάτος και φάση).

Άρα, το πρόβλημα γίνεται : με δεδομένα τα  $|F_r|$ ,  $|F_{rh}|$  και τον παράγοντα δομής των βαρέων ατόμων  $F_h$ , μπορούμε να προσδιορίσουμε την φάση του  $F_r$  ;

Η γραφική αναπαράσταση των δεδομένων του προβλήματος και η γεωμετρική του λύση είναι :

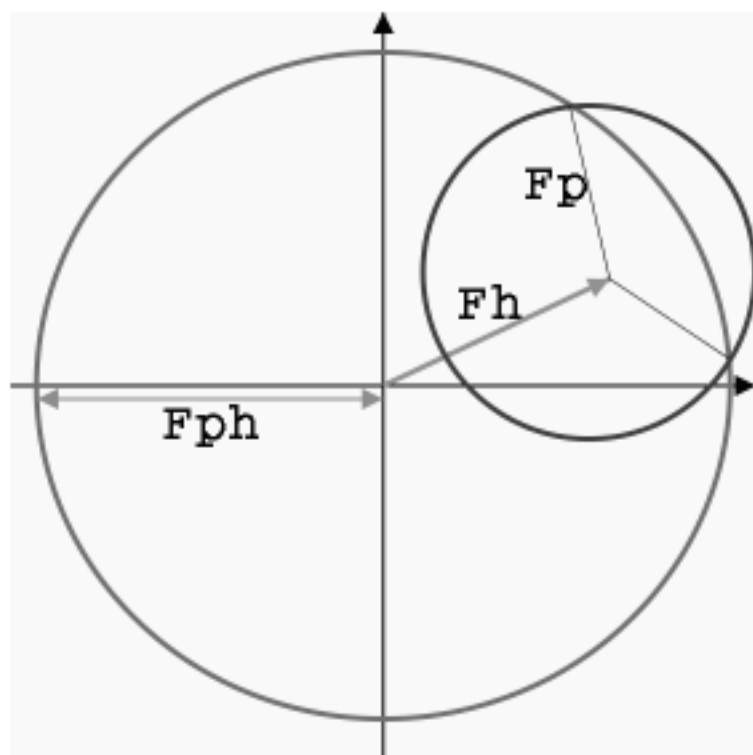
# MIR

## Διάγραμμα Argand



# MIR

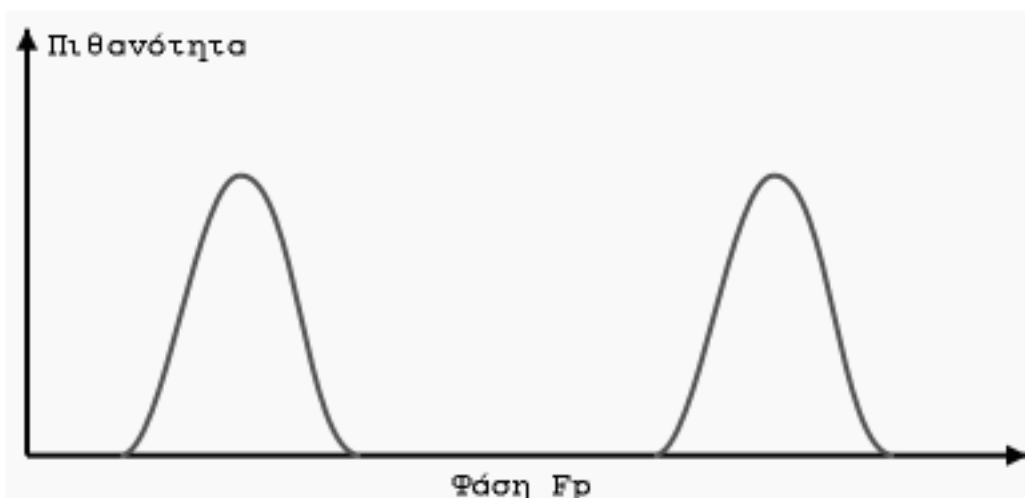
## Διάγραμμα Argand





# MIR

Η κατανομή των πιθανών φάσεων του  $F_p$  από ένα μόνο παράγωγο βαρέως μετάλλου είναι λοιπόν :



με τις δύο αποδεκτές λύσεις να έχουν την ίδια μεταξύ τους πιθανότητα.

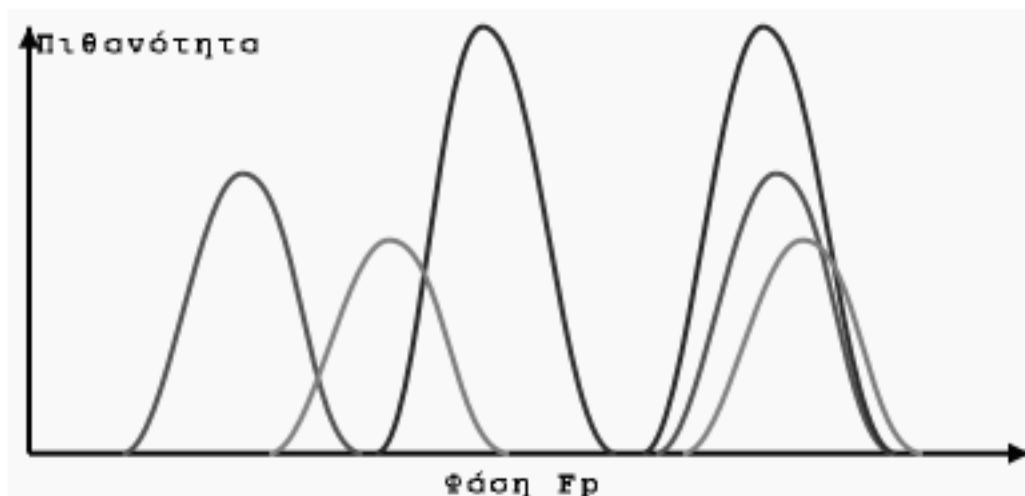
# MIR

---

Η αμφισημία λύνεται με την συλλογή δεδομένων από κρυστάλλους τροποποιημένους με ένα άλλο βαρύ άτομο.

Εάν οι θέσεις των βαρέων ατόμων σε αυτό το δεύτερο παράγωγο διαφέρουν, τότε τα δύο ζεύγη πιθανών φάσεων για το  $F_r$  θα συμπίπτουν μόνο σε μια τιμή, την σωστή. Αρκετά συχνά απαιτείται η μέτρηση δεδομένων από περισσότερα των δύο παραγώγων βαρέων μετάλλων. Γραφικά :

# MIR



# Ανώμαλη σκέδαση

Τα ηλεκτρόνια των εσωτερικών στοιβάδων των ατόμων λόγω της ισχυρής αλληλεπίδρασης τους με τους πυρήνες δε συμπεριφέρονται ως ελεύθερα ηλεκτρόνια όπως υποθέταμε έως τώρα. Για συγκεκριμένα (και χαρακτηριστικά για κάθε τύπο ατόμου) μήκη κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, τα εσωτερικά αυτά ηλεκτρόνια σκεδάζουν με διαφορά φάσης σε σχέση με τα υπόλοιπα (ελεύθερα) ηλεκτρόνια. Χωρίς να υπεισέλθουμε σε λεπτομέρειες, αρκεί να πούμε πως με την επιλογή κατάλληλων ατόμων και μήκους κύματος, η ανώμαλη σκέδαση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένα επιπλέον παράγωγο (με τα εσωτερικά ηλεκτρόνια να παίζουν το ρόλο των βαρέων ατόμων).

# Ανώμαλη σκέδαση

---

MAD, SAD, κλπ.

Το αντίστοιχο του MIR για την περίπτωση της ανώμαλης σκέδασης είναι το MAD (για Multiwavelength Anomalous Dispersion). Ο συνδυασμός του MIR με την ανώμαλη σκέδαση (από τα βαριά άτομα) δίνει την μέθοδο MIRAS (... with Anomalous Scattering).

Άλλες εκδοχές αντίστοιχων πειραματικών προσεγγίσεων είναι τα

- SIR : Single Isomorphous Replacement, και
- SAD : Single-wavelength Anomalous Dispersion

# Η συνάρτηση Patterson

---

Το μόνο που μένει να διευκρινιστεί είναι το πως μπορεί να λυθεί το μηδενικό πρόβλημα : Πως δηλαδή γνωρίζοντας μόνο τα πλάτη  $|F_p|$  και  $|F_{ph}|$  (των φυσικών και παραγώγων κρυστάλλων αντίστοιχα) μπορούν να προσδιοριστούν οι θέσεις των βαρέων ατόμων στην στοιχειώδη κυψελίδα. Αυτό θα είναι το αντικείμενο της επόμενης διάλεξης.

# Μοριακή αντικατάσταση

---

Η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης (MR για Molecular Replacement) μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν υπάρχει υπάρχει μια γνωστή μακρομοριακή δομή (π.χ. από την PDB) η οποία να έχουμε λόγους να πιστεύουμε ότι είναι παρόμοια με τη δομή του μακρομορίου από το οποίο αποτελούνται οι υπό μελέτη κρύσταλλοι. Η πλέον συνηθισμένη περίπτωση είναι να μελετάμε μια πρωτεΐνη για την οποία υπάρχει κάποια ομόλογη γνωστής δομής.

# Μοριακή αντικατάσταση

---

Η βασική υπόθεση του MR είναι ότι η γνωστή δομή είναι τόσο όμοια με την άγνωστη (υπό μελέτη) δομή, ώστε εάν βάζαμε στην θέση της άγνωστης δομής την γνωστή, οι φάσεις που θα υπολογίζαμε θα είναι τόσο κοντά στις πραγματικές ώστε να έχουμε λύσει το πρόβλημα των φάσεων.

Στην περίπτωση του MR δεν απαιτείται τροποποίηση των φυσικών κρυστάλλων : το μόνο που χρειάζεται είναι τα πλάτη των φυσικών κρυστάλλων  $|F_p|$  και οι συντεταγμένες (π.χ. από την PDB) της γνωστής δομής.



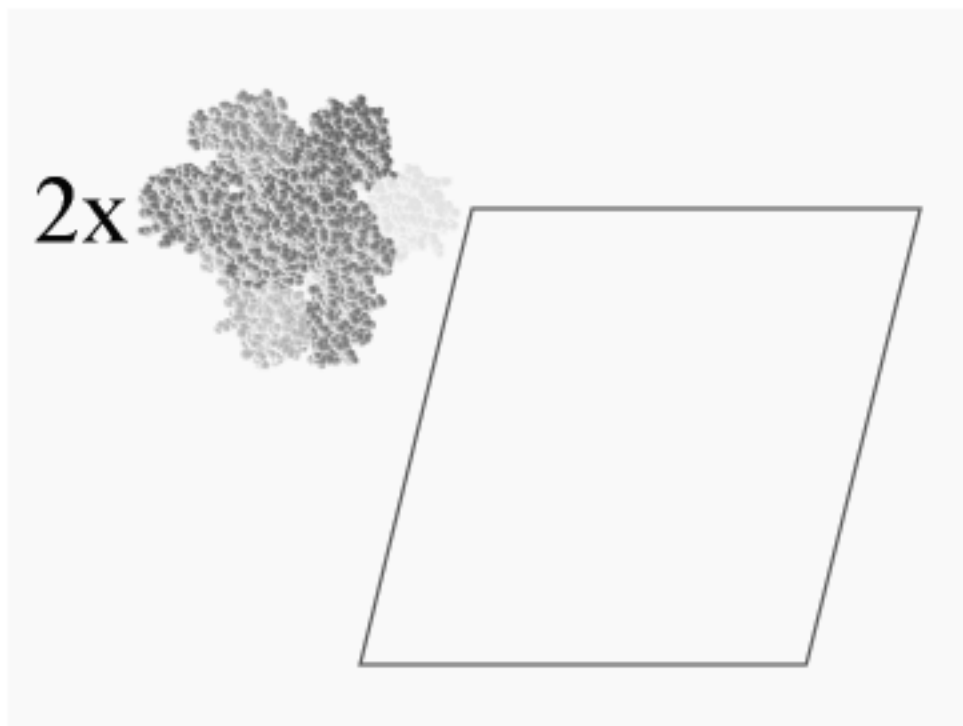
# Μοριακή αντικατάσταση

---

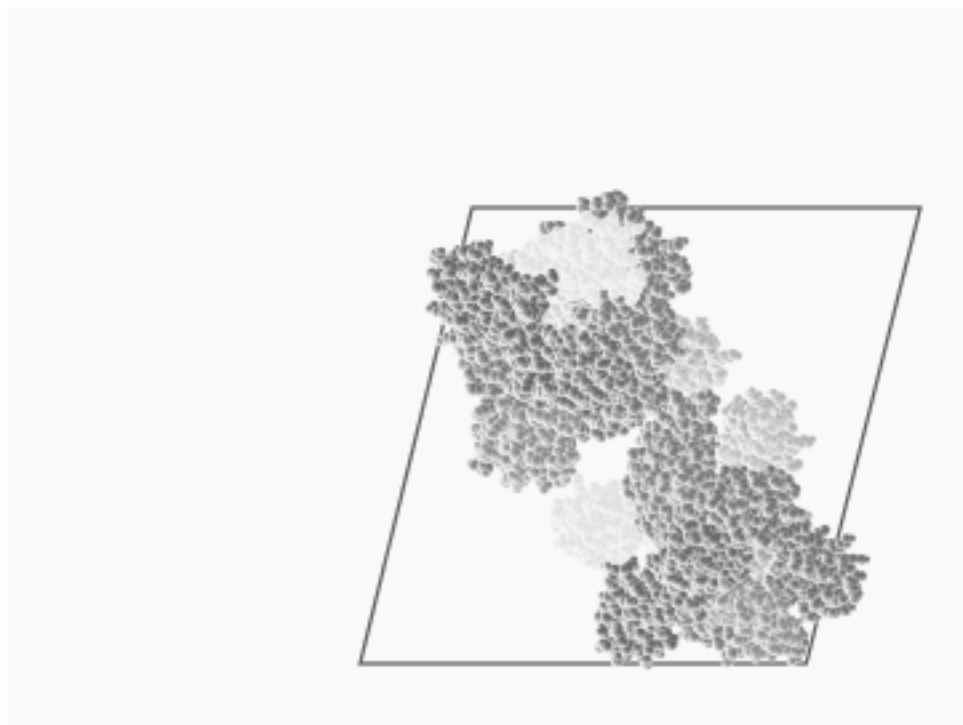
Το θεμελιώδες πρόβλημα του MR είναι το εξής :  
Με βάση τα  $|F_p|$  και την γνωστή δομή, πως μπορούμε να υπολογίσουμε τη θέση και τον προσανατολισμό του που έχουν τα μόρια στη στοιχειώδη κυψελίδα των υπό μελέτη κρυστάλλων ;

Γραφικά :

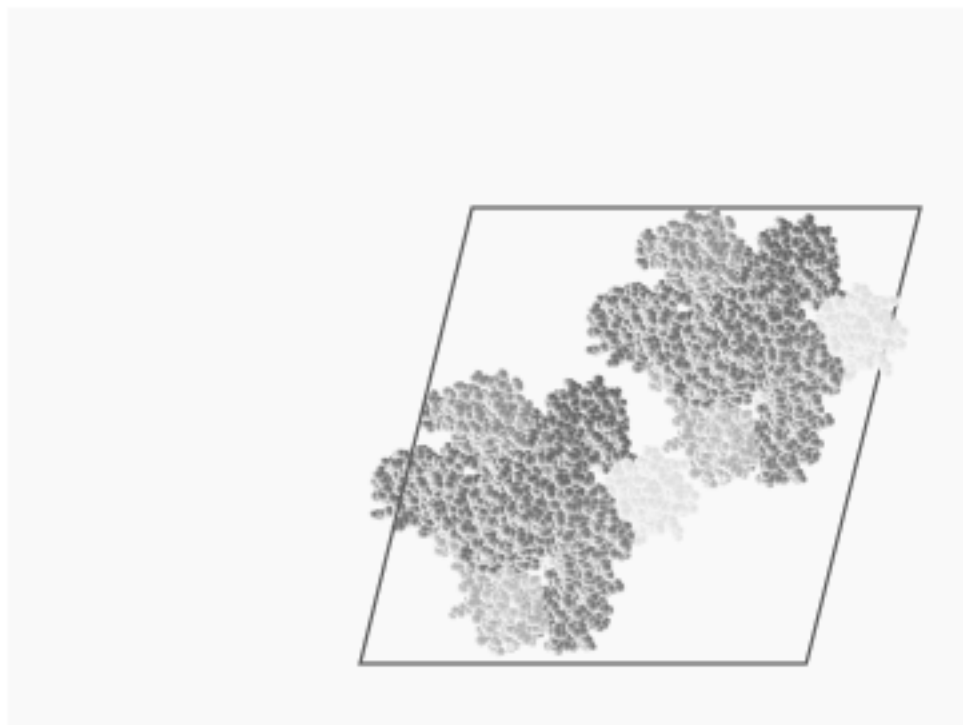
# Μοριακή αντικατάσταση



# Μοριακή αντικατάσταση



# Μοριακή αντικατάσταση



# Μοριακή αντικατάσταση

---

Οι μέθοδοι με τις οποίες μπορούν να προσδιοριστούν οι θέσεις και οι προσανατολισμοί των γνωστών δομών στη στοιχειώδη κυψελίδα των υπό μελέτη κρυστάλλων ξεφεύγουν από τα πλαίσια του μαθήματος. Μερικά στοιχεία θα δωθούν στην επόμενη διάλεξη (μετά τον ορισμό και τις ιδιότητες της συνάρτησης Patterson). Για τα πλαίσια αυτής της διάλεξης μπορεί να αναφερθεί μια διαισθητικά προφανής μέθοδος η οποία στηρίζεται στη συστηματική έρευνα όλων των πιθανών θέσεων και προσανατολισμών της γνωστής δομής στην στοιχειώδη κυψελίδα των κρυστάλλων άγνωστης δομής.

# Μοριακή αντικατάσταση

## Συστηματική πολυδιάστατη έρευνα

Ο προσανατολισμός ενός αντικειμένου (ως προς ένα σταθερό σύστημα αναφοράς) μπορεί να περιγραφεί με τον ορισμό τριών γωνιών. Σημειώστε ότι υπάρχουν αρκετοί εναλλακτικοί τρόποι ορισμού αυτών των γωνιών όπως π.χ. Eulerian angles, polar angles, κλπ. Η θέση του αντικειμένου μπορεί να περιγραφεί με τον ορισμό τριών συντεταγμένων (π.χ. του κέντρου μάζας του μορίου) στο δεδομένο σύστημα αναφοράς. Έτσι, η θέση και ο προσανατολισμός ενός μορίου μπορεί να περιγραφεί με 6 μεταβλητές, τρεις γωνιακές ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) και τρεις θέσεως ( $x, y, z$ ).

# Μοριακή αντικατάσταση

## Συστηματική πολυδιάστατη έρευνα

Με δεδομένες κάποιες τιμές για τα  $\alpha, \beta, \gamma, \chi, \psi, \zeta$  μπορούμε να υπολογίσουμε τις συντεταγμένες όλων των ατόμων της γνωστής δομής στην κυψελίδα των αγνώστων κρυστάλλων. Για αυτή (την υποθετική) δομή μπορούμε λοιπόν να υπολογίσουμε τα πλάτη των παραγόντων δομής που θα παρατηρούσαμε εάν το μόριο όντως ήταν στη θέση που αντιστοιχεί στα  $\alpha, \beta, \gamma, \chi, \psi, \zeta$ , και να τα συγκρίνουμε (τα υπολογιζόμενα πλάτη) με τα πειραματικά προσδιορισμένα.

Η βασική υπόθεση της μεθόδου είναι ότι η συμφωνία ανάμεσα στα παρατηρούμενα και υπολογιζόμενα πλάτη θα μεγιστοποιείται όταν τα  $\alpha, \beta, \gamma, \chi, \psi, \zeta$  είναι τα σωστά.

# Μοριακή αντικατάσταση

## Συστηματική πολυδιάστατη έρευνα

Ο αλγόριθμος είναι :

- Θέτουμε  $\alpha=\beta=\gamma=\chi=y=z=0$
- Υπολογίζουμε τις συντεταγμένες των ατόμων της γνωστής δομής για τα  $(\alpha,\beta,\gamma,\chi,y,z)$ .
  - Από τις ατομικές συντεταγμένες υπολογίζουμε τα πλάτη  $|F_p,calc|$  και τα συγκρίνουμε με τα πειραματικά  $|F_p,obs|$  (χρησιμοποιώντας για παράδειγμα το γραμμικό συντελεστή συσχέτισης).
  - Αυξάνουμε το  $\alpha$  κατά π.χ. 5 μοίρες και επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία μέχρι το  $\alpha$  να γίνει ίσο με 360 μοίρες.



# Μοριακή αντικατάσταση

## Συστηματική πολυδιάστατη έρευνα

- Όταν το  $\alpha$  γίνει 360 μοίρες, θέτουμε  $\alpha=0$ , αυξάνουμε το  $\beta$  κατά 5 μοίρες και επαναλαμβάνουμε.
- Το ίδιο διαδοχικά για το  $\gamma$ .
- Αφού εξετάσουμε όλους τους συνδυασμούς των  $\alpha, \beta, \gamma$  για  $x=y=z=0.0$ , αυξάνουμε διαδοχικά τα  $x, y, z$  και επαναλαμβάνουμε.

Η λύση της μεθόδου είναι εκείνος ο συνδυασμός των  $(\alpha, \beta, \gamma, x, y, z)$  για τον οποίο ο π.χ. συντελεστής συσχέτισης παίρνει τη μέγιστη τιμή του.