



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»

Βλέποντας τα πράγματα με ένα διαφορετικό φως. Πως η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ αποκαλύπτει τη δομή βιολογικών μορίων.

Δημήτριος Δ. Λεωνίδας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Εάν μια εικόνα αξίζει χίλιες λέξεις, τότε μία λεπτομερής τρισδιάστατη μακρομοριακή δομή είναι ανεκτίμητη σε έναν επιστήμονα. Δεν υπάρχει καλύτερος τρόπος για την κατανόηση της μακρομοριακής λειτουργίας σε ένα κύτταρο, από το να διαθέτουμε μία οπτική εικόνα των μερών του και του πως αλληλεπιδρούν. Η πρώτη επαφή μας με τα συστατικά ενός ζωντανού κυττάρου συνήθως προέρχεται από την παρατήρηση μέσω ενός μικροσκοπίου, όπου το φως είτε σκεδάζεται από μία επιφάνεια, είτε διέρχεται μέσω ενός αντικειμένου (Διαφάνεια 2). Ένα μικροσκόπιο σχηματίζει το είδωλο εστιάζοντας το φως που σκεδάζεται από ένα δείγμα (π.χ. ένα μελανηφόρο σε μια αντικειμενοφόρο), μέσω μιας σειράς φακών. Το είδωλο μπορεί να μεγεθυνθεί απεριόριστα, αλλά η ευκρίνεια του περιορίζεται από το μήκος κύματος του ορατού φωτός σε περίπου 0.2 μm. Στη διάλεξη αυτή θα συζητήσουμε τις μεθόδους απεικόνισης των ατόμων ενός μακρομορίου, οι οποίες αξιοποιούν την περίθλαση των ακτίνων Χ. Αυτή η μέθοδος είναι ανάλογη από πολλές απόψεις με την οπτική μικροσκοπία, δεδομένου ότι και οι ακτίνες Χ σκεδάζονται από τα άτομα του μακρομορίου. Εντούτοις, οι ακτίνες Χ δεν μπορούν να εστιαστούν από φακούς για να διαμορφώσουν μια εικόνα ενός μορίου. Αντ' αυτού, οι ακτίνες Χ σκεδάζονται από μια κανονική, επαναλαμβανόμενη διάταξη μορίων (δηλαδή από έναν κρύσταλλο), για να δώσουν ένα σχέδιο περίθλασης (περιθλασίγραμμα) που αντιπροσωπεύει τη μακρομοριακή τάξη και δομή. Τον ρόλο των φακών παίζουν μαθηματικές διεργασίες που μετασχηματίζουν το περιθλασίγραμμα για να ανακτηθεί η αρχική

δομή. Δεδομένου ότι οι κρύσταλλοι είναι ατελείς και μέρος της πληροφορίας χάνεται κατά τον μετασχηματισμό, η δομή που παίρνουμε δεν είναι μία εικόνα, όπως στη μικροσκοπία αλλά ένα μοντέλο της. Η κατασκευή ενός μοντέλου που ταιριάζει όσο γίνεται καλύτερα με τα πειραματικά δεδομένα, είναι παρόμοια με την επίλυση ενός συστήματος εξισώσεων. Αρχικά, θα ασχοληθούμε με τις απαραίτητες προϋποθέσεις για τον προσδιορισμό της δομής ενός μακρομορίου σε ατομικό επίπεδο (σε ατομική ευκρίνεια ή διακριτική ικανότητα). Αυτό ακολουθείται από μια περιγραφή του τι είναι οι κρύσταλλοι και πως αναπτύσσονται, καθώς και πώς η περίθλαση των ακτίνων Χ από τους κρυστάλλους χρησιμοποιείται για να επιλύσει τις δομές των μακρομορίων σε ατομική ευκρίνεια.

Αν και έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τύποι νέων μικροσκοπίων υψηλής ευκρίνειας, η μόνη μέθοδος, που παράγει αξιόπιστες δομές μακρομορίων σε ατομική ανάλυση, είναι αυτή της περίθλασης των ακτίνων Χ από μονοκρυστάλλους. Αυτή η τεχνική απαιτεί τρία διακριτά βήματα: (1) την ανάπτυξη μονοκρυστάλλων, (2) τη συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ από τον κρύσταλλο, και (3) την κατασκευή και βελτιστοποίηση ενός δομικού μοντέλου που θα ταιριάζει με τα δεδομένα της περίθλασης των ακτίνων Χ. Κανένα βήμα δεν είναι περισσότερο σημαντικό από το άλλο, αλλά και τα τρία βήματα πρέπει να ολοκληρωθούν, για να καθοριστεί η δομή ενός μακρομορίου.

Η κοντινότερη απόσταση μεταξύ δύο ατόμων στον χώρο είναι το μήκος ενός ομοιοπολικού δεσμού. Δεδομένου, ότι ο χαρακτηριστικός ομοιοπολικός δεσμός είναι περίπου 0.12 nm, θα πρέπει να μπορούμε να «δούμε» δύο άτομα που χωρίζονται από αυτήν την απόσταση ως ευδιάκριτα σωματίδια (Διαφάνεια 3). Το περιεχόμενο της δομικής πληροφορίας αυξάνεται, όσο οι δομές προσδιορίζονται σε υψηλότερη ευκρίνεια (σε αυτήν την περίπτωση, οι μικρότεροι αριθμοί εκφράζουν καλύτερη

ευκρίνεια). Στην ευκρίνεια των 0.1 nm η δομή ενός ζεύγους νουκλεοτιδικών βάσεων dG-dC σε έναν κρύσταλλο ενός τμήματος DNA εμφανίζει τις λεπτομέρειες κάθε ατόμου στο μόριο, καθώς επίσης και τη δομή του διαλύτη που περιβάλλει το μόριο. Σε ευκρίνεια 0.2 nm και 0.3 nm, η δομή των νουκλεοτιδίων είναι ακόμα διακριτή, αλλά στην ευκρίνεια των 0.5 nm, μόνο η παρουσία των έντονα περιθλώντων φωσφορικών ομάδων του σκελετού των νουκλεοτιδίων μπορεί να διακριθεί σαφώς (Διαφάνεια 3). Υπάρχουν θεωρητικοί και πρακτικοί περιορισμοί στην επίλυση μιας δομής σε ένα τόσο λεπτομερές επίπεδο. Αφ' ενός τα άτομα των μορίων πρέπει να διατηρούν τις σχετικές τους θέσεις, και αφ' ετέρου κάθε μόριο ή ομάδα μορίων στο σύστημα πρέπει να έχει την ίδια διαμόρφωση. Οποιαδήποτε διακύμανση στις θέσεις των ατόμων στο μόριο, ή οποιαδήποτε σημαντική απόκλιση των μορίων από μια ενιαία διαμόρφωση, θα οδηγούσε σε μια μέση δομή (θολό «είδωλο»), και με αυτό τον τρόπο θα μειώνε την ευκρίνεια της τεχνικής. Όπως θα δούμε μόνο ένας μονοκρύσταλλος του μορίου έχει τη δυνατότητα να ικανοποιεί και τις δύο απαιτήσεις.

Πρέπει να βρούμε μία πηγή ακτινοβολίας, που να μας επιτρέπει να διακρίνουμε δύο άτομα που χωρίζονται από μόλις 0.12 nm. Το όριο της ευκρίνειας (LR) οποιασδήποτε οπτικής μεθόδου καθορίζεται από το μήκος κύματος λ της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

$$LR \cong \frac{\lambda}{2}$$

Αυτό είναι μία συνέπεια των κυματικών ιδιοτήτων του φωτός. Μία επέκταση της αρχής της αβεβαιότητας του Heisenberg, που προκύπτει από την απεικόνιση του φωτός ως κύμα, δηλώνει, ότι η θέση ενός σωματιδίου δεν μπορεί να προσδιοριστεί καλύτερα από το μισό του μήκους κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται για να εξεταστεί το σωματίδιο. Η διακριτική ικανότητα ενός οπτικού μικροσκοπίου, για παράδειγμα, περιορίζεται από το μήκος κύματος τους ορατού φωτός (λ = από

400 nm έως 800 nm) σε περίπου 200 nm, ή 0.2 μm (περίπου το μέγεθος των οργανιδίων σε ένα κύτταρο). Εάν απαιτούμε, η διακριτική ικανότητα της τεχνικής να είναι περίπου 0.12 nm, για να διακρίνουμε τα άτομα ενός μορίου, το μήκος κύματος του φωτός που απαιτείται για το ατομικό μας μικροσκόπιο θα είναι απαραίτητα <0.24 nm. Αυτό εμπίπτει στην περιοχή των ακτίνων X του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (Διαφάνεια 4). Ωστόσο, όπως αναφέραμε οι ακτίνες X δεν μπορούν να εστιαστούν και έτσι δεν μπορούν να σχηματίσουν το είδωλο ενός αντικειμένου με τον ίδιο τρόπο όπως ένα οπτικό μικροσκόπιο. Για τον προσδιορισμό της δομής των μορίων στηρίζομαστε στην ενισχυτική και αναιρετική συμβολή, που υφίσταται η σκεδαζόμενη από το κανονικό και επαναλαμβανόμενο πλέγμα ενός μονοκρυστάλλου ακτινοβολία. Επομένως πρέπει πρώτα να αποκτήσουμε έναν κρύσταλλο του μορίου.

Τι είναι ένας κρύσταλλος;

Οι κρύσταλλοι είναι στερεά σώματα που είναι ακριβείς επαναλήψεις ενός συμμετρικού μοτίβου (Διαφάνεια 5). Τι είναι αυτό που καθιστά τον κρυσταλλικό χαλαζία διαφορετικό από το μη κρυσταλλικό γυαλί; Και οι δύο έχουν ουσιαστικά την ίδια χημική σύνθεση. Η κυριότερη διαφορά του είναι, ότι τα μόρια σε έναν κρύσταλλο τοποθετούνται με τάξη, ενώ τα μόρια ενός άμορφου στερεού, όπως το γυαλί, δεν έχουν τάξη. Με τη λέξη τάξη, εννοούμε κανονικά, συμμετρικά, και επαναλαμβανόμενα. Αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές, όταν συγκρίνουμε σπασμένα τεμάχια γυαλιού με τα τεμάχια ενός κρυστάλλου. Τα θραύσματα ενός γυαλιού έχουν τυχαίο σχήμα, χωρίς καμία ομοιότητα μεταξύ της μορφής των άθικτων και σπασμένων κομματιών. Ένας κρύσταλλος, όμως, μπορεί να διασπαστεί με συγκεκριμένο τρόπο, ώστε να δώσει τεμάχια που είναι μικρότερες εκδοχές του αρχικού κρυστάλλου. Αυτό μπορεί να συνεχισθεί, έως ότου φθάσουμε στη βασική μονάδα που περιγράφει έναν κρύσταλλο, η οποία ονομάζεται

στοιχειώδης ή μοναδιαία κυψελίδα (Διαφάνεια 6). Κατά συνέπεια, ένας κρύσταλλος μπορεί να παραχθεί από ένα μόριο, επαναλαμβάνοντας "επ' άπειρο" την εφαρμογή ενός συνόλου τελεστών συμμετρίας (μετατόπισης ή στροφής). Αυτή η ιδιότητα οδηγεί στο, ότι για τον προσδιορισμό της δομής ενός κρυστάλλου, χρειάζεται να προσδιορίσουμε μόνο τη δομή του λιγότερου συμμετρικού συστατικού της στοιχειώδους κυψελίδας. Κατά συνέπεια, στην περιγραφή ενός κρυστάλλου, χρειάζεται να περιγράψουμε μόνο τη λιγότερο συμμετρική μονάδα καθώς και τη συμμετρία που μας δίνει ένα κρύσταλλο.

Το μοτίβο του κρυσταλλικού πλέγματος μετατοπίζεται και προς τις τρεις διαστάσεις, σχηματίζοντας μία κανονική και επαναλαμβανόμενη διάταξη, που αποκαλείται *κρυσταλλικό πλέγμα*. Κάθε επαναλαμβανόμενο μοτίβο καταλαμβάνει ένα σημείο μέσα στο κρυσταλλικό πλέγμα. Τα γειτονικά σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους για να αποτελέσουν τις κορυφές των τρισδιάστατων κουτιών, τα οποία είναι οι *μοναδιαίες ή στοιχειώδεις κυψελίδες*. Κάθε μοναδιαία κυψελίδα περιλαμβάνει όλα τα άτομα των μοτίβων του κρυσταλλικού πλέγματος και της ασύμμετρης μονάδας. Οι ακμές αυτού του κουτιού σχηματίζουν τους άξονες του κρυσταλλικού συστήματος και οι διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας απεικονίζονται από τα αντίστοιχα μήκη τους, a , b , και c ενώ οι γωνίες μεταξύ τους ορίζονται ως α μεταξύ των b και c , β μεταξύ των a και c , και γ μεταξύ των a και b . Η σχέση μεταξύ των μηκών a , b , και c και των γωνιών α , β , και γ των μοναδιαίων κυψελίδων καθορίζει μοναδικά τη μορφή και το μέγεθος της μοναδιαίας κυψελίδας. Ο τύπος του κρυσταλλικού πλέγματος μαζί με τη συμμετρία της μοναδιαίας κυψελίδας καθορίζουν την ομάδα συμμετρίας χώρου της μοναδιαίας κυψελίδας. Τα μήκη και οι γωνίες της μοναδιαίας κυψελίδας καθορίζουν τις παραμέτρους της μοναδιαίας κυψελίδας, και η ομάδα χώρου μαζί

με τις παραμέτρους αυτές καθορίζουν τη μορφολογία του κρυστάλλου.

Τι είναι οι ακτίνες X και πως αλληλεπιδρούν με τα άτομα.

Προς το τέλος του 19ου αιώνα ο Γερμανός φυσικός W. Röntgen μελετούσε τις ιδιότητες των ηλεκτρονίων που επιταχύνονταν, μέσα σε σωλήνα χαμηλής πίεσης, από ηλεκτρικό πεδίο και έπεφταν σε μεταλλικό στόχο. Ένα βράδυ, στις 8 Νοεμβρίου 1895, προκάλεσε ηλεκτρική εκκένωση σε μια καθοδική λυχνία στην οποία είχε ανοίξει ένα παραθυράκι στο πλάι, που το είχε σκεπάσει με φύλλο αλουμινίου, και από πάνω με μαύρο χαρτόνι. Είχε χαμηλώσει πολύ το φωτισμό στο δωμάτιο για να ελέγξει μήπως ξέφευγε καθόλου φως από το παραθυράκι της λυχνίας. Όντως, δεν έβγαινε καθόλου φως από εκεί, αλλά με έκπληξη παρατήρησε ότι ένα φιλμ από πλατινοκυανίδιο του βαρίου, που έτυχε να βρίσκεται εκεί κοντά, φωσφόριζε μέσα στο σκοτάδι. Τις επόμενες μέρες πειραματίστηκε εξετάζοντας διεξοδικά τις μυστηριώδεις ακτίνες που ξέφευγαν από τη λυχνία, τις οποίες ονόμασε "ακτίνες X" (δανειζόμενος την έννοια "άγνωστος X" από τα μαθηματικά). Διαπίστωσε ότι οι ακτίνες διαπερνούσαν πολλά αδιαφανή αντικείμενα, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου σώματος. Χρησιμοποιώντας το χέρι της συζύγου-του, Anna Bertha Röntgen, αποτύπωσε σε φωτογραφική πλάκα την πρώτη ακτινογραφία στην ιστορία της ανθρωπότητας (Διαφάνεια 7, όπου το σκούρο αντικείμενο στο δάχτυλο είναι ένα δαχτυλίδι). Όταν η Anna Bertha κοίταξε την πλάκα, αναφώνησε: «Είδα πλέον το θάνατό μου!» Ο Röntgen παρατήρησε ότι, όταν πλησίαζε στο σωλήνα μία φθορίζουσα ουσία, τότε η ουσία, ακτινοβολούσε φως, ενώ, όταν πλησίαζε ένα φωτογραφικό φιλμ, τότε αυτό μαύριζε. Υποστήριξε λοιπόν ότι τα φαινόμενα αυτά οφείλονταν σε ένα νέο άγνωστο και μυστηριώδη τύπο ακτινών, τις οποίες ονόμασε ακτίνες X. Το σύμβολο X χρησιμοποιήθηκε από το Röntgen για να δηλώσει την άγνωστη μέχρι τότε φύση των ακτινών, όπως στην Άλγεβρα το

σύμβολο X χρησιμοποιείται για να συμβολίσει μία άγνωστη ποσότητα. Οι ακτίνες X ονομάζονται και ακτίνες Röntgen. Η σπουδαιότητα των ακτίνων X για την εξέταση των οστών του ανθρώπινου σώματος έγινε αμέσως αντιληπτή, και το 1901 ο Röntgen έλαβε το πρώτο βραβείο Νόμπελ φυσικής, καθώς ο θεσμός των Νόμπελ ξεκίνησε μόλις τότε. Το 2004, το χημικό στοιχείο υπ' αριθ. 111 ονομάστηκε Ρεντγκένιο (Roentgenium), προς τιμήν του.

Αρχικά οι ακτίνες X θεωρούνταν ένα “νέο είδος ακτίνων”. Δεκαεπτά χρόνια μετά την ανακάλυψη, το έτος δηλαδή 1912, ο νεαρός τότε καθηγητής στο πανεπιστήμιο του Μονάχου Max von Laue συνέλαβε την ιδέα να αξιοποιήσει τις ακτίνες X για να ερευνήσει τη διάταξη των ατόμων στο εσωτερικό των μετάλλων. Η ερευνητική του δραστηριότητα είχε διπλή επιτυχία. Έδειξε ότι οι ακτίνες X δεν είναι παρά φως ή σωστότερα, ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με συχνότητα σημαντικά μεγαλύτερη από τις συχνότητες που αντιλαμβανόμαστε σαν ορατό φως και με μήκος κύματος πολύ μικρότερο από το φως (Διαφάνεια 9). Οι ακτίνες X ανήκουν στο τμήμα του φάσματος με συχνότητες πολύ μεγαλύτερες του ιώδους χρώματος. Παράλληλα αποκάλυψε ότι στο εσωτερικό των στερεών η συγκρότηση των δομικών μονάδων παρουσιάζει μία εκπληκτική αρχιτεκτονική, αυτό που από τότε ονομάζουμε κρυσταλλική δομή. Η συγκεκριμένη ερευνητική τεχνική επέτρεψε στην επιστήμη να ερευνήσει την ενδοχώρα της ύλης. Σαράντα περίπου χρόνια αργότερα με ανάλογη μέθοδο ανακαλύφθηκε και η δομή του DNA.

Στην πρώτη ακτινογραφία του χεριού της κ. Röntgen τα οστά φαίνονται ως σκούρες σκιές γιατί περιέχουν μεγάλες και συγκεντρωμένες ποσότητες ασβεστίου (ατομικός αριθμός 20) που περιθλά ισχυρά τις ακτίνες X ενώ το δαχτυλίδι περιέχει χρυσό, ο οποίος με ατομικό αριθμό 79 περιθλά πολύ ισχυρότερα τις ακτίνες X. Αυτό λοιπόν που συνέβη στην πρώτη ακτινογραφία αλλά και σε όλες τις ακτινογραφίες

είναι πως τα ηλεκτρόνια των ατόμων σκεδάζουν τις ακτίνες X, περιορίζοντας την διέλευση τους. Όσο περισσότερα ηλεκτρόνια υπάρχουν σε ένα άτομο (όσο μεγαλύτερος είναι ο ατομικός αριθμός του στοιχείου) τόσο μεγαλύτερη η σκέδαση και έτσι τόσο πιο έντονη είναι η «σκιά» που βλέπουμε στις ακτινογραφίες (Διαφάνεια 7). Έτσι όταν ένα κύμα ακτίνας X κτυπά ένα ηλεκτρόνιο το διεγείρει και αυτό ταλαντώνεται εκπέμποντας (σκεδάζοντας) ακτίνες X ίδιας συχνότητας και μήκους κύματος με την προσπίπτουσα ακτινοβολία προς όλες τις κατευθύνσεις (Διαφάνεια 8). Το ίδιο συμβαίνει και κατά την πρόσπτωση ακτίνων X σε ένα άτομο που έχει ηλεκτρόνια, ένα μέρος της διέρχεται αλλά ένα σημαντικό μέρος τους σκεδάζεται ή περιθλάται από αυτήν (Διαφάνεια 8). Σε μία ιατρική ακτινογραφία καταγράφεται μόνο η διερχόμενη ακτινοβολία και όχι η σκεδαζόμενη. Στην κρυσταλλογραφία ακτίνων X όμως ασχολούμαστε μόνο με την περιθλώμενη ακτινοβολία γιατί αυτή περιέχει πληροφορίες για τη δομή του αντικειμένου που περιθλά. Αυτό το φαινόμενο περίθλασης αποτελεί τη βάση της τεχνικής της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X.

Στη Γερμανία ο Max Von Laue μάλιστα, ανακάλυψε ότι ένα κρύσταλλος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φράγμα περίθλασης για τις ακτίνες X λόγω της εξαιρετικής εσωτερικής τους συμμετρίας που περιγράψαμε. Ο Max von Laue σκέφτηκε λοιπόν, πως αφού οι κρύσταλλοι αποτελούνται από μόρια, συμμετρικά τοποθετημένα, και υποθέτοντας πως το μήκος κύματος των ακτίνων X είναι ίδιου μεγέθους με τις διαστάσεις των ατόμων υπέθεσε πως οι κρύσταλλοι θα έπρεπε να περιθλούν τις ακτίνες X. Ο Max von Laue ζήτησε από τους Walter Friedrich και Paul Knipping να εκτελέσουν ένα πείραμα με κρυστάλλους θειικού χαλκού (Διαφάνεια 10). Αυτοί πήραν έναν καθοδικό σωλήνα που παράγει ακτίνες X τις οποίες πέρασαν από δύο μικρές σχισμές για να είναι η ακτινοβολία εστιασμένη και στη συνέχεια την κατεύθυναν έναντι κρυστάλλου θειικού χαλκού. Πίσω από τον κρύσταλλο έβαλαν μία

φωτογραφική πλάκα την οποία εξέθεσαν για αρκετές ώρες στις ακτίνες X και το αποτέλεσμα ήταν το πρώτο περιθλασίγραμμα από κρύσταλλο (Διαφάνεια 11). Παρόλο που η εικόνα του δεν φαίνεται να προσφέρει κάποια πληροφορία αποκάλυψε δύο σημαντικά πράγματα. Πρώτον, πως υπάρχει περίθλαση μιας και φαίνεται πως η δέσμη της ακτίνας X έχει διασπαρθεί σε διάφορα σημεία αποδεικνύοντας πως η υπόθεση του von Laue πως οι κρύσταλλοι θα περιθλούν τις ακτίνες X ήταν σωστή. Δεύτερον, είναι προφανές πως υπάρχει κάποιο μοτίβο στην περίθλαση το οποίο συνδέεται με κάποιον τρόπο με τη δομή του κρυστάλλου. Όταν μετακίνησαν το φωτογραφικό φιλμ λίγο μακρύτερα από τον κρύσταλλο είχαν μία πιο καλή εικόνα (Διαφάνεια 12) που έδειχνε πιο ξεκάθαρα πως υπάρχει κάποιο κανονικό μοτίβο. Στη συνέχεια, δοκίμασαν έναν διαφορετικό κρύσταλλο θεικού ψευδαργύρου που έχει κυβικό σχήμα (Διαφάνεια 13). Το μοτίβο της περίθλασης που είδαν αυτή τη φορά ήταν πολύ καλύτερο και μπορεί κανείς να δει το χαρακτηριστικό τετραγωνικό μοτίβο που σχηματίζουν οι περιθλάσεις (Διαφάνεια 14) υπακούοντας σε τετραδική συμμετρία. Εν τούτοις ο von Laue και οι συνεργάτες του δεν κατάφεραν να ανακαλύψουν πως θα μπορούσαν από το περιθλασίγραμμα και τη συμμετρία των αμαυρώσεων να οδηγηθούν στη μοριακή δομή των κρυστάλλων.

Την εποχή εκείνη ο W. H. Bragg ήταν ένας αξιολύβαστος καθηγητής Φυσικής που είχε δουλέψει για περίπου 10 έτη με τις ακτίνες X ενώ ο υιός του W.L Bragg, μόλις είχε πάρει το πτυχίο του στα μαθηματικά και βρισκόταν στο δεύτερο έτος των σπουδών του για ένα δεύτερο πτυχίο στη Φυσική. Ένας νορβηγός συνάδελφος του ο Lars Vegards, του έστειλε μία επιστολή όπου του ανέφερε λεπτομέρειες για την αλληλεπίδραση των ακτίνων X με τους κρυστάλλους που είχαν βρει ο von Laue και οι συνεργάτες του (Διαφάνεια 15). Ο von Laue έδωσε μάλιστα και μία φωτογραφία με ένα περιθλασίγραμμα από κρυστάλλους στον Lars Vegards που την έστειλε στους Bragg. Έτσι ο W.H. Bragg σε συνεργασία με

τον γιο του, αποφάσισαν να εξετάσουν καλύτερα την αντανάκλαση των ακτίνων αυτών από τους κρυστάλλους. Στην πραγματικότητα ήταν ο Bragg ο νεώτερος αυτός που την εκπαίδευση του ως μαθηματικός σκέφτηκε πως το περιθλασίγραμμα θα έπρεπε να προέρχεται από την ανάκλαση των ακτίνων X από ένα στρώμα ατόμων μέσα στον κρύσταλλο ανάλογη με εκείνη της ανάκλασης του φωτός από ένα κάτοπτρο (Διαφάνεια 16). Θα πρέπει όμως να θυμηθούμε εδώ, πως μιλούμε για ακτίνες X οι οποίες διαπερνούν και την ύλη άρα θα πρέπει να θεωρήσουμε το στρώμα των ατόμων όχι ακριβώς ως κάτοπτρο αλλά ως ένα ημιπερατό στρώμα που και ανακλά αλλά και αφήνει ένα μεγάλο μέρος της ακτινοβολίας να διέλθει (Διαφάνεια 17). Στην πραγματικότητα μόνο ένα 10% της ακτινοβολίας ανακλάται από το στρώμα ενώ το 90% το διαπερνά και από εκεί ανακλάται από ένα άλλο, δεύτερο στρώμα πάλι το 10% της προσπίπτουσας, και στη συνέχεια η ακτινοβολία που διαπερνά και το δεύτερο στρώμα ανακλάται από ένα τρίτο κ.ο.κ. (Διαφάνεια 18). Έτσι ο Lawrence Bragg κατάλαβε πως για να βρει την ανάκλαση από τον κρύσταλλο θα έπρεπε να προσθέσει όλες τις ανακλάσεις. Αυτό θα ήταν αρκετά δύσκολο μιας και δεν μπορούσε να γνωρίζει πόσα στρώματα ατόμων υπήρχαν μέσα στον κρύσταλλο και έτσι αποφάσισε να απλοποιήσει λίγο τα πράγματα. Ας θεωρήσουμε πως έχουμε μόνο μία προσπίπτουσα ακτίνα X (Διαφάνεια 19), η οποία όπως έχουμε ήδη αναφέρει δεν είναι ευθεία αλλά κύμα οπότε τα κύματα όταν βρίσκονται στην ίδια *φάση* προστίθενται και δίνουν ένα μεγάλο κύμα που δημιουργεί την αμαύρωση που είδαμε στο φωτογραφικό φιλμ (Διαφάνεια 20). Ας απλοποιήσουμε όμως τα πράγματα λίγο περισσότερο, και ας θεωρήσουμε πως έχουμε μόνο δύο ανακλώμενες ακτίνες (Διαφάνεια 21). Εκείνο που παρατηρούμε είναι πως η ανακλώμενη ακτίνα από το δεύτερο στρώμα θα πρέπει να διασχίσει λίγο περισσότερο διάστημα από την ανακλώμενη ακτίνα από το πρώτο στρώμα. Αν αυτή η επιπλέον απόσταση, που είναι ίση με $2d\sin\theta$, είναι ίση ή ακέραια

πολλαπλάσια του μήκους κύματος λ τότε τα δύο ανακλώμενα κύματα είναι σε ίδια φάση οπότε θα έχουμε θετική συμβολή και άρα ισχυρή περίθλαση. Αυτή η σχέση αποτελεί τον περίφημο νόμο των Bragg, πάνω στον οποίο βασίζεται όλη η τεχνική της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X (Διαφάνεια 22). Αν δεν ισχύει ο νόμος των Bragg, και έχουμε ανάκλαση υπό διαφορετική γωνία, τότε έχουμε αρνητική συμβολή, όπου η μία ανάκλαση αναιρεί την άλλη και έτσι δεν έχουμε περίθλαση (Διαφάνεια 23). Η σχέση αυτή ισχύει για όλα τα στρώματα μέσα στον κρύσταλλο. Αυτό που ουσιαστικά μας φανερώνει ο νόμος των Bragg είναι πως η περίθλαση των ακτίνων X από έναν κρύσταλλο εξαρτάται από τη γωνία πρόσπτωσης (που είναι ίση με τη γωνία ανάκλασης) και από το διάστημα μεταξύ των στρωμάτων των ατόμων στον κρύσταλλο. Ας δούμε τώρα ένα πιο περίπλοκο παράδειγμα. Ας θεωρήσουμε έναν κρύσταλλο που η απόσταση γειτονικών στρωμάτων των ατόμων είναι τέτοια που η διαφορά βήματος της δεύτερης ανακλώμενης ακτίνας (pd) είναι μόλις 1.01 λ , οπότε αυτή η ανακλώμενη ακτίνα ή το ανακλώμενο κύμα είναι σχεδόν στην ίδια φάση με το προηγούμενο (Διαφάνεια 24). Στη συνέχεια αν δούμε το επόμενο ανακλώμενο κύμα τότε σε αυτό η διαφορά βήματος θα είναι διπλάσια από την πρώτη, δηλαδή 2.02 λ (Διαφάνεια 25) που επίσης είναι σχεδόν στην ίδια φάση οπότε θα προστεθεί και αυτό. Το ίδιο ισχύει και για το τρίτο, όπου η διαφορά βήματος θα είναι τριπλάσια, δηλαδή 3.03 λ (Διαφάνεια 26) και κανείς μπορεί να φανταστεί πως και αυτό επίσης θα αθροιστεί στα δύο προηγούμενα. Όταν όμως φτάσουμε στα επάνω στρώματα, π.χ. στο στρώμα 51 (Διαφάνεια 27) τότε η διαφορά βήματος θα είναι 50.5 λ οπότε σε αυτό το κύμα η φάση του είναι μισό μήκος κύματος μακριά από το πρώτο και άρα τα δύο αυτά κύματα θα αναιρέσουν το ένα το άλλο. Μπορεί στο σχήμα τα δύο στρώματα αυτά να φαίνονται απομακρυσμένα το ένα από το άλλο, στον κρύσταλλο όμως είναι αρκετά κοντά ώστε να έχουμε αλληλεπίδραση των κυμάτων και

αλληλοαναιρέση. Έτσι μπορούμε να σκεφτούμε και πως η ανάκλαση από το στρώμα 52 (Διαφάνεια 28) θα αναιρέσει εκείνη από το στρώμα 2 κ.ο.κ. Συνεπώς μόνο στην περίπτωση που ο νόμος του Bragg ικανοποιείται επακριβώς έχουμε ενισχυτική συμβολή των ανακλώμενων κυμάτων και παρατηρούμε περίθλαση των ακτίνων X από τον κρύσταλλο. Μέχρι τώρα έχουμε παρατηρήσει μόνο τα οριζόντια στρώματα των ατόμων στον κρύσταλλο, θα πρέπει όμως να γνωρίζουμε πως υπάρχουν και άλλα διαγώνια στρώματα (Διαφάνεια 29). Με τη θεώρηση αυτή ο Bragg κατάλαβε πως οι διάφορες αμαυρώσεις που παρατηρούσε στο περιθλασίγραμμα είναι οι περιθλάσεις που προέρχονταν από τα διάφορα στρώματα ατόμων μέσα στον κρύσταλλο. Αν επίσης σκεφτούμε πως κάθε κρύσταλλος είναι ένα τρισδιάστατο σώμα και όχι δισδιάστατο όπως έχουμε θεωρήσει μέχρι τώρα, τότε μπορούμε να φανταστούμε πόσα πολλά επίπεδα ανάκλασης υπάρχουν και άρα πόσα περιθλώμενα κύματα θα πάρουμε από έναν κρύσταλλο (Διαφάνεια 30). Όταν ο Lawrence Bragg είδε το περιθλασίγραμμα κατάλαβε πως κάθε αμαύρωση που έβλεπε προέρχονταν από ένα σετ επιπέδων ατόμων (Διαφάνεια 31). Επίσης οι σχετικές τους θέσεις του παρείχαν πληροφορίες για την απόσταση ανάμεσα στα επίπεδα αλλά και για τη γωνία που σχηματίζουν μεταξύ τους. Έτσι κατάλαβε πως αν μπορούσε να υπολογίσει που βρίσκονταν τα επίπεδα τότε τα άτομα θα βρίσκονταν στο σημείο τομής των επιπέδων. Με τον τρόπο αυτό θα μπορούσε στη συνέχεια να προσδιορίσει τις θέσεις όλων των ατόμων στον κρύσταλλο χαρτογραφώντας την ατομική του δομή. Δουλεύοντας αντίστροφα, θεωρώντας δηλαδή μια συγκεκριμένη ατομική δομή μπόρεσε να υπολογίσει τη μορφή του περιθλασιγράμματος (Διαφάνεια 32). Ενθουσιασμένος από την ανακάλυψη αυτή ο Lawrence Bragg έστειλε ένα γράμμα στον πατέρα του (Διαφάνεια 33) όπου εξηγούσε την ανακάλυψη του. Οι Bragg συνέχισαν να εργάζονται στην περίθλαση ακτίνων X από διάφορους κρυστάλλους όπως

του χλωριούχου καλίου (KCl, Διαφάνεια 34) και μπόρεσαν να αποκαλύψουν την ατομική του δομή (Διαφάνεια 35) όπως επίσης και εκείνη του κοινού άλατος, χλωριούχου νατρίου (Διαφάνεια 36) η οποία διαφέρει από αυτή του χλωριούχου καλίου. Μπορούμε να παρατηρήσουμε επίσης πως και η ένταση των αμαυρώσεων είναι διαφορετική υποδηλώνοντας πως και η φύση των ατόμων εκτός από την σχετική τους θέση επιδρά στο περιθλασίγραμμα. Δημοσίευσαν λοιπόν τη δομή του NaCl (Διαφάνεια 37) το 1913. Οι ανακαλύψεις αυτές ήταν πρωτόγνωρες και πολύ σημαντικές για την εποχή τους αν αναλογιστούμε πως για πρώτη φορά ο άνθρωπος μπορούσε να δει αυτό που ο Αριστοτέλης είχε ονομάσει *άτομο*. Εν τούτοις δεν ήταν όλοι τόσο ενθουσιασμένοι και ιδιαίτερα οι χημικοί της εποχής οι οποίοι εμφανίστηκαν αρκετά σκωπτικοί με τις ανακαλύψεις των Bragg (Διαφάνεια 38) μιας και η δομή που περιέγραφε ο William Bragg δεν συμφωνούσε με τη δική τους θεώρηση για τα μόρια και την ατομική τους δομή. Οι Bragg δεν πτοήθηκαν από αυτές τις αντιδράσεις και συνέχισαν να προσδιορίζουν τις ατομικές δομές διαφόρων κρυστάλλων όπως του αδάμαντα και του γραφίτη (Διαφάνεια 39). Και οι δύο κρύσταλλοι αποτελούν πολυμορφικές μορφές του άνθρακα και οι διαφορές που εμφανίζουν οφείλονται στο διαφορετικό τρόπο με τον οποίο συνδέονται τα άτομα άνθρακα μεταξύ τους. Στο διαμάντι κάθε άτομο άνθρακα συνδέεται με τέσσερα γειτονικά άτομα άνθρακα ενώ στο γραφίτη τα άτομα άνθρακα σχηματίζουν κανονικά εξάγωνα (Διαφάνεια 39). Γνωρίζοντας λοιπόν την ατομική δομή των διαφόρων υλικών μπορούμε να τη συσχετίσουμε και με τις φυσικές τους ιδιότητες. Οι Bragg συνέχισαν να εργάζονται στην ατομική δομή διαφόρων δομών κυρίως από κρυστάλλους που βρίσκονται στη φύση, όπως του σιδηροπυρίτη, του ανθρακικού ασβεστίου, και του χαλαζία (Διαφάνεια 40) αναφέροντας πως τα πειράματα του Laue οδήγησαν στην ανάπτυξη μιας νέας επιστήμης, της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ.

Μέχρι τώρα έχουμε δει κρυστάλλους που εμφανίζονται στη φύση και έχουν σχετικά απλή ατομική δομή. Οι Bragg όμως από το 1915 γνώριζαν πως «Στις απλές περιπτώσεις που έχουμε δουλέψει, οι εκτιμήσεις για τη συμμετρία των κρυστάλλων, αν και δεν μπορούν από μόνες τους να καθορίσουν την κρυσταλλική δομή, είναι τόσο επαρκή ώστε με μικρή βοήθεια από τις νέες μεθόδους να είναι δυνατή η ολοκλήρωση του έργου και να προσδιορίζονται οι επακριβείς θέσεις των ατόμων να γνωστή τότε. Εντούτοις με πιο πολύπλοκους κρυστάλλους αυτό δεν είναι δυνατόν.» (Διαφάνεια 41). Γνώριζαν λοιπόν πως πιο πολύπλοκες μαθηματικές διεργασίες ήταν απαραίτητες για πιο πολύπλοκες δομές.

Ας δούμε λοιπόν πολύ πιο πολύπλοκες κρυσταλλικές δομές όπως αυτές των πρωτεϊνών (Διαφάνεια 42). Αυτό πλέγμα που φαίνεται (Διαφάνεια 42) είναι ένας χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας που φανερώνει τις θέσεις των ηλεκτρονίων. Όπως είδαμε και προηγουμένως όταν προσπίπτει μία ακτίνα Χ πάνω στο μόριο τότε έχουμε διέγερση των ηλεκτρονίων και περίθλαση ακτίνων Χ προς κάθε κατεύθυνση κατά την αποδιέγερση (Διαφάνεια 43). Όπως παρατηρούμε μερικές περιθλάσεις είναι πιο ισχυρές από άλλες και αυτό υποδηλώνει πως από περιοχές που έχουμε υψηλή συγκέντρωση ηλεκτρονίων έχουμε εντονότερη περίθλαση από άλλες που δεν έχουν καθόλου ή χαμηλή συγκέντρωση ηλεκτρονίων (Διαφάνεια 43). Παρατηρούμε λοιπόν πως κάθε περίθλαση φέρει διάφορες πληροφορίες για το σημείο από το οποίο ξεκίνησε. Ας απλοποιήσουμε και πάλι το πρόβλημα και ας θεωρήσουμε τις περιθλώμενες ακτίνες προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση (Διαφάνεια 45). Το πλάτος της ταλάντωσης των ηλεκτρονίων θα διαφέρει ανάλογα με τη θέση τους (π.χ. στη θέση r) και κάθε ένα από αυτά τα περιθλώμενα κύματα μπορεί να περιγραφεί ως ένα διανυσματικό μέγεθος στις τρεις διαστάσεις με τη μαθηματική σχέση:

$$[\rho(r)dxdydz]e^{i2\pi r \cdot S}$$

Η σχέση αυτή αν και φαίνεται πολύπλοκη ουσιαστικά μας δίνει την ηλεκτρονική πυκνότητα (ρ) στη θέση r του κρυστάλλου. Ο παράγοντας S εξαρτάται από τη γωνία περίθλασης ενώ το i και ο αριθμός π υποδηλώνει την κυματική φύση της παράστασης. Μας δίνει επίσης πληροφορίες και για τη φάση του κύματος που εξαρτάται από τον παράγοντα r . Να θυμίσουμε πως η φάση αναφέρεται πάντοτε σε σχέση με ένα αυθαίρετα οριζόμενο σημείο που αποτελεί την αρχή των συντεταγμένων (Διαφάνεια 44). Για να βρούμε τη συνολική περίθλαση προς μία κατεύθυνση θα πρέπει να προσθέσουμε όλες τις αντίστοιχες περιθλάσεις προς αυτή την κατεύθυνση λαμβάνοντας ένα και μόνο κύμα το οποίο θα περιγράφεται από μία μαθηματική παράσταση με τριπλό ολοκλήρωμα της παραπάνω παράστασης και στις τρεις διαστάσεις (Διαφάνεια 45). Αν τοποθετήσουμε έναν ανιχνευτή ακτίνων X πίσω από το μόριο (Διαφάνεια 46) θα πάρουμε ένα περιθλασίγραμμα (Διαφάνεια 47). Μπορεί να φαίνεται μια αρκετά πολύπλοκη εικόνα αλλά παρουσιάζει ένα μοτίβο και κάποιες έντονα χρωματισμένες περιοχές που δείχνουν περιοχές με έντονη περίθλαση. Εν τούτοις περιέχει πληροφορίες για τη δομή του μορίου. Ο μαθηματικός τύπος που περιγράψαμε (Διαφάνεια 47) είναι γνωστός ως τύπος Fourier από το Γάλλο μαθηματικό Jean Baptiste Fourier (Διαφάνεια 48) ο οποίος παρόλο που δεν ζούσε όταν ανακαλύφθηκαν οι ακτίνες X βοήθησε με τις μαθηματικές του εξισώσεις στην επίλυση των κρυσταλλικών δομών με περίθλαση ακτίνων X . Να σημειωθεί πως στην εποχή του αν και του απονεμήθηκε βραβείο από την Γαλλική Ακαδημία Επιστημών οι εξισώσεις του δεν έτυχαν ευρύτερης αναγνώρισης μιας και δεν υπήρχε κάποια γνωστή τους χρήση. Η σημαντικότητα τους στην κρυσταλλογραφία ακτίνων X έγκειται στο γεγονός πως μπορείς να τις αντιστρέψεις και να τις επιλύσεις ως προς $\rho(r)$, που είναι η ηλεκτρονική πυκνότητα και έτσι να δημιουργηθεί ο χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας σε έναν κρύσταλλο (Διαφάνεια 48), ο

οποίος αποτελεί ουσιαστικά το σχήμα της ατομικής δομής των κρυστάλλων. Με άλλα λόγια η αντίστροφη εξίσωση Fourier (Διαφάνεια 48) είναι η εξίσωση που περιγράφει την ατομική δομή. Η εξίσωση αυτή αποτελεί σήμερα το θεμέλιο λίθο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X και χρησιμοποιείται ευρέως στην επίλυση δομών κάθε μεγέθους αν και οι υπολογισμοί γίνονται από ηλεκτρονικούς υπολογιστές. Είδαμε λοιπόν πως μπορούμε με απλούς σχετικά μαθηματικούς υπολογισμούς να βρούμε τη δομή ενός μεμονωμένου μορίου.

Στην πραγματικότητα όμως αυτό είναι πολύ δύσκολο αν όχι αδύνατον, μιας και τα μεμονωμένα μόρια είναι πολύ μικρά και δεν μπορούμε να τα διαχειρισθούμε εύκολα (να τοποθετηθεί π.χ. στην πορεία μιας ακτίνας X). Ακόμα όμως και στην περίπτωση που θα μπορούσαμε να το τοποθετήσουμε στην πορεία μιας ακτίνας X , η περίθλαση που θα παρουσίαζαν είναι τόσο αδύναμη που δεν είναι δυνατό να καταγραφεί ακόμα και με την χρήση των πλέον ευαίσθητων καταγραφικών μηχανημάτων. Το «κόλπο» στην περίπτωση αυτή είναι να χρησιμοποιήσουμε έναν κρύσταλλο. Έτσι προσπαθούμε να αναπτύξουμε κρυστάλλους βιολογικών μακρομορίων μιας και τις περισσότερες φορές δεν εμφανίζονται στη φύση και απαιτείται η χρήση διάφορων τεχνικών για την κρυστάλλωση ενός μακρομορίου (Διαφάνεια 50). Αν λοιπόν εξετάσουμε έναν κρύσταλλο βιολογικών μακρομορίων θα δούμε πως συμπεριφέρεται ακριβώς όπως ένας κρύσταλλος NaCl . Υπάρχουν κανονικές περιθλάσεις των ακτίνων X , όχι από άτομα όπως στο NaCl αλλά από μόρια, και μπορούμε να αναγνωρίσουμε τα διάφορα επίπεδα (Διαφάνεια 51). Ο νόμος των Bragg λοιπόν, ισχύει και θα έχουμε ενισχυτική συμβολή των κυμάτων εκεί που η διαδρομή του βήματος είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος. Επίσης αντί να έχουμε λίγες μόνο αμαυρώσεις στο περιθλασίγραμμα έχουμε πολύ περισσότερες και εντονότερες μιας και ο κρύσταλλος λειτουργεί ως *πολλαπλασιαστής* της περίθλασης των μορίων.

Το συμπέρασμα λοιπόν είναι πως αν κανείς μπορεί να κρυσταλλώσει ένα βιολογικό μακρομόριο τότε με την τεχνική της περίθλασης ακτίνων Χ μπορεί να προσδιορίσει και τη δομή του και αυτό ήταν και το συμπέρασμα των Bragg. Έτσι η εφαρμογή αυτής της τεχνικής επέτρεψε στους Bragg αρχικά και έκτοτε σε όλους τους κρυσταλλογράφους να χρησιμοποιήσουν την πληροφορία από τη θέση των αμαυρώσεων στο περιθλασίγραμμα και το γεγονός πως η ένταση της αμαύρωσης διαφέρει ανάλογα με την κατεύθυνση και με τη βοήθεια των εξισώσεων Fourier να υπολογίσουν τους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Στη Διαφάνεια 52 βλέπουμε έναν τέτοιο χάρτη, που υπολόγισε ο W. Bragg, από κρυστάλλους διοψίδη, το 1929. Είναι μία πολύ απλή δομή αλλά αρκετά πολυπλοκότερη από εκείνη του NaCl. Αυτό που βλέπουμε είναι μία εγκάρσια τομή του τρισδιάστατου χάρτη και μπορεί κανείς να παρατηρήσει τα διάφορα επίπεδα όπου πολλά επίπεδα υποδηλώνουν τη θέση των ατόμων. Ο W. Bragg μπόρεσε από τον χάρτη αυτό να εντοπίσει τα άτομα και προσδιόρισε τη δομή του διοψίδη (Διαφάνεια 53). Μετά τους Bragg αρκετά εργαστήρια άρχισαν να εφαρμόζουν την τεχνική αυτή και προσδιορίζουν όλο και περισσότερο πιο πολύπλοκες δομές αλλά και να κατασκευάζουν μοντέλα των δομών για καλύτερη απεικόνιση, όπως η δομή της πενικιλίνης που προσδιορίστηκε από την Dorothy Hodgkin Crowfoot το 1945 (Διαφάνεια 54). Η διεθνής μηχανή αναζήτησης τίμησε τη Dorothy Hodgkin αφιερώνοντας το λογότυπο της 12^{ης} Μαΐου 2014 στην 104^η επέτειο από τη γέννηση της (Διαφάνεια 55). Η ίδια προσδιόρισε και τη δομή της βιταμίνης B12 (Διαφάνεια 56) το 1954, ένα πολύ μεγάλο μόριο που τότε ήταν και η μεγαλύτερη δομή που είχε προσδιοριστεί μιας και αποτελούνταν από 100 άτομα. Για το έργο αυτό η Dorothy Hodgkin Crowfoot έλαβε το βραβείο Nobel χημείας το 1964. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ σήμερα αποτελεί ένα σημαντικό επιστημονικό πεδίο της χημείας και η εφαρμογή της αποτελεί πάγια μέθοδο για

τον προσδιορισμό της δομής κάθε χημικής ένωσης. Έχει δημιουργηθεί μία τράπεζα δεδομένων στην οποία κατατίθεται πλέον η δομή κάθε νέας χημικής ένωσης και η οποία σήμερα έχει περισσότερες από 500.000 κρυσταλλικές δομές (Διαφάνεια 57).

Ας αφήσουμε όμως τη χημεία και ας επανέλθουμε στην βιοχημεία. Η τεχνική της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ ξεκίνησε να εφαρμόζεται στο χώρο της βιοχημείας περίπου την ίδια εποχή και οι επιστήμονες άρχισαν να σκέφτονται πως θα μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν την κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ για να δώσουν απαντήσεις σε βιολογικά προβλήματα. Το κυρίως πρόβλημα βέβαια ήταν πως τόσο οι πρωτεΐνες όσο και τα υπόλοιπα βιομόρια έχουν πολύ μεγαλύτερο μέγεθος από τις απλές χημικές ενώσεις. Ένας από τους πρώτους που εργάστηκε στο πεδίο αυτό ήταν ο Bill Astbury με μία από τις διδακτορικές του φοιτήτριες την Florence Bell που πήρε ένα από τα πρώτα περιθλασιγράμματα από DNA (Διαφάνεια 58). Εδώ δεν βλέπουμε διακριτές αμαυρώσεις μιας και δεν πρόκειται για κρύσταλλο αλλά για μια ίνα DNA. Επειδή όμως το DNA έχει μία πολύ κανονική δομή μοιάζει πολύ με την κρυσταλλική δομή. Ακόμα όμως και σε αυτό το πολύ πρώιμο περιθλασίγραμμα είναι εμφανές το μοτίβο Χ που είναι χαρακτηριστικό της διπλής έλικας (Διαφάνεια 58). Η ιστορία της ανακάλυψης της δομής του DNA είναι μία πολύ ωραία και ενδιαφέρουσα ιστορία αλλά εμείς θα επικεντρώσουμε την προσοχή μας στη συμβολή της κρυσταλλογραφίας στην ανακάλυψη αυτή. Ο J.D. Bernal ήταν ένας από τους πρώτους φοιτητές της Dorothy Hodgkin Crowfoot που δούλεψε πολύ μεθοδικά πάνω στους μαθηματικούς υπολογισμούς για τον προσδιορισμό των κρυσταλλικών δομών, περίπου σαν τον W. Bragg, αποκτώντας σχετικά γρήγορα τη φήμη του καλού κρυσταλλογράφου. Τόση ήταν φήμη του που διάφοροι επιστήμονες από όλο τον κόσμο του έστελναν κρυστάλλους τους για να τους μελετήσει και έτσι το 1954 ο σουηδός καθηγητής Svedberg του έστειλε κρυστάλλους πεψίνης που

είχε αναπτύξει ένας συνεργάτης του στο εργαστήριο του (Διαφάνεια 59). Ο Bernal τους ακτινοβόλησε με ακτίνες Χ και έλαβε το πρώτο περιθλασίγραμμα πρωτεϊνικών κρυστάλλων από ακτίνες Χ, το οποίο όμως δυστυχώς δεν διασώζεται. Εν τούτοις θα έμοιαζε με εκείνο που πήρε ο Max Perutz (Διαφάνεια 60) τέσσερα χρόνια αργότερα από κρυστάλλους αιμοσφαιρίνης. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε το περιθλασίγραμμα αυτό έχει πολλές αμαυρώσεις γιατί το μόριο είναι πολύ μεγαλύτερο. Εκείνη την εποχή δεν μπορούσαν να προσδιορίσουν τη δομή γιατί δεν μπορούσαν να κάνουν όλους τους απαραίτητους υπολογισμούς λόγω των τεχνικών μέσων που είχαν. Εντούτοις κατάλαβαν πως τα άτομα μέσα στην πρωτεΐνη υπακούουν σε κάποια κανονικότητα ανάλογη με εκείνη των ατόμων στις μικρές χημικές ενώσεις και άρα κάποια κανονική δομή (μέχρι τότε η επικρατούσα άποψη ήταν πως οι πρωτεΐνες και τα βιολογικά μόρια γενικά δεν είχαν κάποια κανονική δομή αλλά είχαν κάποιο εντελώς αποδιαταγμένο σχήμα) πως η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ μπορούσε να οδηγήσει στον προσδιορισμό της ατομικής δομής των πρωτεϊνών (Διαφάνεια 60). Το 1959, προσδιορίστηκε από τον John Kendrew (Διαφάνεια 62) η πρώτη δομή πρωτεΐνης, της μυοσφαιρίνης (μία σχετικά μικρή πρωτεΐνη που περιέχει σίδηρο και αποστολή της είναι να συνδέεται με το οξυγόνο το οποίο μεταφέρει στους σκελετικούς μύες και τις λείες μυϊκές ίνες, διαμέσου των μυϊκών κυττάρων). Ο Max Perutz που εργαζόταν στο ίδιο εργαστήριο, δεν ήταν και πολύ ενθουσιασμένος από την εικόνα της δομής. Η αρκετά «χοντροκομμένη» δομή η οποία αποκαλύφθηκε δεν είχε καμία ομορφιά και απουσίαζαν πολλές λεπτομέρειες. Αυτό όμως οφειλόταν κυρίως στην διάταξη που χρησιμοποιούσαν και την γωνία πρόσπτωσης των ακτίνων Χ που οδηγούσε σε δεδομένα χαμηλής ευκρίνειας αλλά και στην ποιότητα των κρυστάλλων. Έτσι η μονή πληροφορία που μπόρεσαν να έχουν από τη δομή αυτή ήταν ο τρόπος με τον οποίο η πολυπεπτιδική αλυσίδα

διπλώνει στο χώρο. Αντίθετα η δομή του DNA (Διαφάνεια 63) αν και προσδιορίστηκε από πολύ λιγότερα κρυσταλλογραφικά δεδομένα παρείχε πολλές περισσότερες πληροφορίες και ήταν μία πολύ πιο όμορφη δομή. Η δομή αυτή, η διπλή έλικα, ήταν πιο απλή και παρείχε σχεδόν αμέσως πληροφορίες τόσο για την λειτουργία του DNA όσο και για το γενετικό κώδικα. Σύντομα όμως κατάφεραν να αναπτύξουν καλύτερους κρυστάλλους και να επιλύσουν όλα τα τεχνικά προβλήματα και απεκάλυψαν πλέον τη δομή της μυοσφαιρίνης στο επίπεδο της δευτεροταγούς δομής (Διαφάνεια 64) αλλά και σε ατομικό επίπεδο (Διαφάνεια 65). Αμέσως μετά ο Max Perutz προσδιόρισε τη δομή της αιμοσφαιρίνης (Διαφάνεια 66) και εκείνο που παρατήρησε αμέσως ήταν πόσο εκπληκτικά παρόμοιες ήταν οι δομές της μυοσφαιρίνης και της αιμοσφαιρίνης στη μία πολυπεπτιδική αλυσίδα (Διαφάνεια 67). Να σημειώσουμε πως ενώ η μυοσφαιρίνη ήταν από φάλαινα, η αιμοσφαιρίνη ήταν από άλογο, η ομοιότητα όμως των δομών και το γεγονός πως και οι δύο πρωτεΐνες δεσμεύουν οξυγόνο και το μεταφέρουν στους μύς και στου διάφορους ιστούς αντίστοιχα, φανέρωνε με πολύ emphaticό τρόπο αυτό που σήμερα αποτελεί κεντρικό δόγμα της βιοχημείας, πως η δομή καθορίζει τη δράση κάθε βιολογικού μορίου. Η ομοιότητα αυτή επίσης παρείχε απτές αποδείξεις για τη θεωρία της εξέλιξης και μάλιστα ήταν η πρώτη φορά που οι επιστήμονες έβλεπαν την θεωρία της εξέλιξης σε ατομικό επίπεδο. Έτσι πλέον ήταν δυνατόν να μελετηθεί η θεωρία της εξέλιξης των ειδών όχι μόνο με μακροσκοπικές παρατηρήσεις διαφόρων μορφών ζωής αλλά σε μοριακό επίπεδο αποδεικνύοντας για μία ακόμη φορά τη δυναμική της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ. το 1965 προσδιορίστηκε η πρώτη δομή ενζύμου, της λυσοζύμης (ένζυμο της ομάδας των υδρολασών που καταστρέφει το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων και προκαλεί έτσι τη λύση των κυττάρων) από τον David C. Phillips που εργαζόταν στο εργαστήριο του W. Bragg (Διαφάνεια 68). Έτσι 50 χρόνια μετά τον

προσδιορισμό δομών με δύο-τρία άτομα από τον W. Bragg και τον πατέρα του, χάρη στους υπολογισμούς του προσδιορίζονταν δομές με περισσότερα από 1000 άτομα (Διαφάνεια 69). Χάρη στην τεχνική κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ μπορούμε να δούμε πλέον πως δουλεύουν τα ένζυμα, πως καταλύουν τις διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις σε ατομικό επίπεδο, μέσω των αλληλεπιδράσεων τους με μόρια υποστρώματος ή αναστολείς της δράσης του (Διαφάνεια 70). Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ και ιδιαίτερα εκείνη που ασχολείται με βιολογικά μακρομόρια έχει εξελιχθεί με αξιοζήλευτο ρυθμό από τη δεκαετία του 1960, και αν και ακόμα συνεχίζει να βασίζεται στο νόμο των Bragg και στην ανάπτυξη κρυστάλλων, η παραγωγή ακτίνων Χ πλέον γίνεται από μεγάλες εγκαταστάσεις συγχροτρονικής ακτινοβολίας που παράγουν πανίσχυρες ακτίνες Χ, όπως η εγκατάσταση Diamond στην Οξφόρδη (Διαφάνεια 71) ή εγκαταστάσεις στην Grenoble και στην Trieste (Διαφάνεια 72). Εκεί παράγονται ακτίνες Χ όταν ένα συνεχές ρεύμα ηλεκτρονίων αναγκάζεται από μαγνήτες να στραφεί (Διαφάνειες 73 και 74). Σήμερα οι επιστήμονες αναπτύσσουν κρυστάλλους και αντί να τους ακτινοβολούν με ακτίνες Χ όπως την αιμοσφαιρίνη και να καταγράφουν περιθλασιγράμματα (Διαφάνεια 75) τους πηγαίνουν σε εγκαταστάσεις όπως τα synchrotron όπου ο κρύσταλλος περιστρέφεται είτε σε βήματα είτε συνεχόμενα κατά την έκθεση του στην ακτινοβολία και για κάθε βήμα περιστροφής ή εύρος συνεχόμενης περιστροφής καταγράφονται ψηφιακά τα περιθλασιγράμματα (Διαφάνεια 76). Η τεχνική έχει πλέον προχωρήσει σημαντικά και προσδιορίζονται ολοένα και πιο πολύπλοκες και μεγαλύτερες δομές μορίων. Βλέπουμε λοιπόν, πως από την αρχική δομή του χλωριούχου νατρίου, πήγαμε στη λυσοζύμη με 1000 άτομα περίπου στην αντλία νατρίου καλίου (Διαφάνεια 77) και στη συνέχεια έχει προσδιοριστεί τόσο η δομή του ριβοσώματος (ένα μικρό κυτταρικό οργανίδιο που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και το οποίο διαβάζει το γενετικό κώδικα και συνθέτει όλες τις πρωτεΐνες)

(Διαφάνεια 77), όσο και ολόκληρων ιών (Διαφάνεια 79). Αυτό που πρακτικά γίνεται είναι να υπολογίζεται αρχικά ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας και στη συνέχεια με διάφορα προγράμματα ο χάρτης ερμηνεύεται και χτίζεται το μοντέλο του βιομορίου (Διαφάνεια 80). Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ μας βοηθά να μαθαίνουμε όλο και περισσότερα πράγματα για τον έμβιο κόσμο μιας και πλέον μπορούμε να συνθέσουμε όλα τα κομμάτια του πάζλ και να δούμε τη θέση του ριβόσωματος μέσα στον οργανισμό, όπως βλέπουμε στη Διαφάνεια 81, όπου παρουσιάζεται μία απεικόνιση του κυττάρου. Δεν έχουμε ακόμα προσδιορίσει όλες τις δομές των συστατικών του αλλά όσο περισσότερες δομές προσδιορίζονται τόσο πλησιάζουμε στον στόχο της τρισδιάστατης απεικόνισης ενός ζωντανού κυττάρου σε ατομικό επίπεδο. Οι δυνατότητες της τεχνικής είναι τόσο μεγάλες που οδήγησαν και την NASA να συμπεριλάβει μία συσκευή περίθλασης ακτίνων Χ στην τελευταία της αποστολή στον Άρη (Διαφάνεια 82). Τελειώνοντας να αναφέρουμε πως μόλις πέρσι προσδιορίστηκε η δομή της πολυμεράσης Ι ένα ένζυμο που επικουρεί το ριβόσωμα μιας και είναι υπεύθυνο για την αντιγραφή μιας ακολουθίας DNA ή RNA σε RNA (Διαφάνεια 83). Σήμερα, υπάρχουν κατατιθέμενες περίπου 90000 κρυσταλλικές δομές στη διεθνή τράπεζα δομών βιολογικών μορίων (Διαφάνεια 84).

Πως αναπτύσσονται οι κρύσταλλοι βιολογικών μορίων;

Η κρυστάλλωση πρωτεϊνών είναι βιοχημική τεχνική που αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και τον έλεγχο καθαρότητας των πρωτεϊνών, καθώς η μικροκρυσταλλικότητα των μορίων είναι ένδειξη καθαρότητάς τους. Η μέθοδος της κρυστάλλωσης των πρωτεϊνών ξεκίνησε εδώ και 100 χρόνια όταν οι Funke, Hunefeld, Lehman και Teichman ανέφεραν την κρυστάλλωση της αιμοσφαιρίνης, και προέβλεψαν τότε, πως η μελέτη των κρυστάλλων θα αποτελούσε το πιο βασικό εργαλείο στο

μέλλον, για τη διερεύνηση της φύσης των πρωτεϊνών. Ακολούθησε η κρυστάλλωση της αλβουμίνης από αυγό καθώς και μιας σειράς φυτικών πρωτεϊνών (Διαφάνεια 86). Η ομορφιά των κρυστάλλων γοήτευσε τους επιστήμονες εκείνης της εποχής αφού μάλιστα το 1903 εκδόθηκε και ένας Άτλας με λεπτομερείς περιγραφές της μορφολογίας των κρυστάλλων της αιμοσφαιρίνης (Reichert & Brown, 1909). Το 1926 ο Sumner ανέφερε την κρυστάλλωση της ουρεάσης από φασόλια και ακολούθησε ο Northrop που κρυστάλλωσε την πεψίνη καθώς και άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα. Μια ακόμα σημαντική ανακάλυψη έγινε το 1935, όταν ο Stanley κρυστάλλωσε τον ιό της μωσαϊκής του καπνού, επηρεασμένος από τις μελέτες του Northrop, ακολουθώντας μεθόδους κρυστάλλωσης που είχαν ήδη αναπτυχθεί για την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών, αφού πίστευε, πως ο ιός δεν ήταν παρά μια αυτοκαταλυτική πρωτεΐνη και έδειξε ότι διατηρούσε τη μολυσματικότητα του μετά από μερικές ανακρυσταλλώσεις (ανασκόπηση στον Kay, 1986). Σήμερα, κρύσταλλοι κατάλληλοι για μελέτες με περίθλαση ακτινών Χ έχουν αναπτυχθεί για τις περισσότερες κατηγορίες πρωτεϊνών και περιλαμβάνουν ενζυμα, ορμόνες, τοξίνες, δομικές πρωτεΐνες και αντισώματα. Ωστόσο, δεν υπάρχει σχέση μεταξύ του μεγέθους της πρωτεΐνης και της ποιότητας των κρυστάλλων της. Αντίθετα, φαίνεται πως υπάρχει σχέση ανάμεσα στη δομική σταθερότητα της πρωτεΐνης στο διάλυμα και στην ποιότητα των κρυστάλλων καθώς και στην ικανότητα των πρωτεϊνών αυτών να κρυσταλλώνονται.

Οι κρύσταλλοι, όπως έχουμε αναφέρει αποτελούνται από τριπλή κανονική επαναληπτική (περιοδική) διευθέτηση ατόμων ή μορίων. Η κανονική διευθέτηση των μορίων δημιουργεί ένα «σχήμα» που επαναλαμβάνεται στις τρεις διαστάσεις (Διαφάνεια 88). Αν θεωρήσουμε ένα οποιοδήποτε σημείο μέσα στον κρύσταλλο υπάρχουν σ' αυτόν άλλα σημεία με το ίδιο ακριβώς περιβάλλον (λόγω της τριπλής περιοδικότητας). Αυτή η διευθέτηση σημείων

αποτελεί ένα πλέγμα που ονομάζεται κρυσταλλικό πλέγμα.

Γενικά για αναγκάσουμε μία ουσία να κρυσταλλωθεί σε ένα διάλυμα, είναι αναγκαίο να ελαττώσουμε τη διαλυτότητα της με έναν ελεγχόμενο τρόπο. Η γρήγορη ελάττωση της διαλυτότητας οδηγεί σε ένα άμορφο ίζημα, γιατί, για να αναπτυχθεί ένας κρύσταλλος τα μεμονωμένα μόρια πρέπει να έχουν την ευκαιρία να αποτεθούν κανονικά στην επιφάνεια ανάπτυξης του κρυστάλλου (Διαφάνεια 89). Ο σχηματισμός ενός κανονικού πλέγματος περιλαμβάνει ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ επιφανειακών ομάδων γειτονικών μορίων με συγγένεια μεταξύ τους (π.χ. αντίθετα φορτισμένων ομάδων ή υδροφοβικών ομάδων). Συνηθισμένες μέθοδοι κρυστάλλωσης μικρών μορίων είναι η αργή εξάτμιση, η αργή ψύξη και η διάχυση. Για την κρυστάλλωση πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται οι εξής μέθοδοι (Διαφάνεια 90):

α) *“salting out”*. Ένα πολύ διαλυτό άλας, όπως το θειικό αμμώνιο, προστίθεται στο διάλυμα της πρωτεΐνης. Η διαλυτότητα του είναι μεγαλύτερη από τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης και έτσι, η προσθήκη του ελαττώνει την ικανότητα του διαλύτη να διαλύει την πρωτεΐνη

β) *“salting in”*. Μερικές πρωτεΐνες είναι περισσότερο διαλυτές παρουσία αλάτων, επειδή τα ιόντα των αλάτων δεσμεύονται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και αυξάνουν την υδροφιλικότητα της. Σε αυτή την περίπτωση, η πρωτεΐνη μπορεί να κρυσταλλωθεί ελαττώνοντας τη συγκέντρωση του άλατος.

γ) *μη πολικοί διαλύτες*. Μη πολικοί διαλύτες, όπως η αιθανόλη, η πεντανοδιόλη ή πολυαιθυλενογλυκόλες ποικίλου μοριακού βάρους μπορούν να αναμιχθούν με το υδατικό διάλυμα και να ελαττώσουν τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Υποθέτουμε ότι δεσμεύονται σε πολικές ομάδες της επιφάνειας της πρωτεΐνης, κάνοντας την να φαίνεται λιγότερο πολική, ή

απλώς ελαττώνουν τον αποτελεσματικό αριθμό πολικών ομάδων του διαλύτη.

Οι μέθοδοι που συνήθως χρησιμοποιούνται παρατίθενται στη Διαφάνεια 91. Οι παράμετροι που επηρεάζουν την κρυστάλλωση πρωτεϊνών είναι τόσες πολλές που η συστηματική εξέταση όλων των συνδυασμών τους καθιστά τη διαδικασία της κρυστάλλωσης πρακτικά αδύνατη (Διαφάνεια 92). Σήμερα έχουν αναπτυχθεί εμπορικά διαθέσιμες συλλογές από διαλύματα που περιέχουν διάφορους χημικούς παράγοντες και βασίζονται σε συνθήκες που έχουν οδηγήσει σε κρυστάλλωση πρωτεϊνών στο παρελθόν (Διαφάνεια 93). Για να επιταχύνουμε τη διαδικασία χρησιμοποιούμε αυτοματοποιημένες συσκευές (ρομπότ) που εκτός από το πλεονέκτημα της επαναληψιμότητας κάθε συνθήκης έχουν και το πλεονέκτημα της χρήσης πολύ μικρών ποσοτήτων πρωτεϊνικού δείγματος (nL) (Διαφάνεια 94). Με αυτόν τον τρόπο μπορούμε να παρακολουθούμε την ανάπτυξη κρυστάλλων (Διαφάνεια 95) αν και τις περισσότερες φορές οι εικόνες που βλέπουμε είναι συνήθως όπως αυτές στη Διαφάνεια 96.

Τελειώνοντας να αναφέρουμε πως η συμβολή της τεχνικής της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ έχει αναγνωριστεί από τη διεθνή κοινότητα και το 2014 έχει ανακηρυχτεί από τον Ο.Η.Ε. ως διεθνές έτος κρυσταλλογραφίας (Διαφάνεια 97).