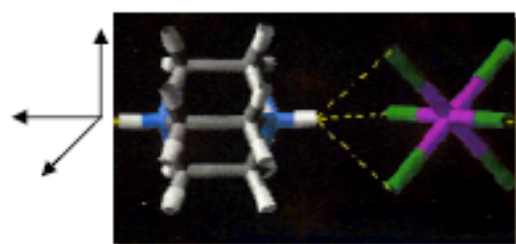
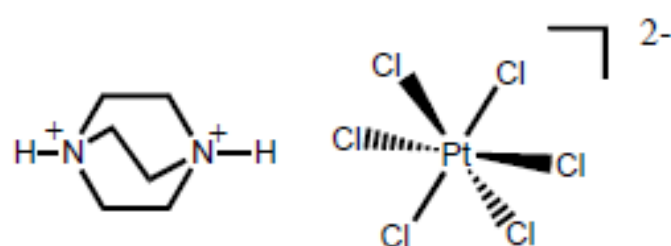


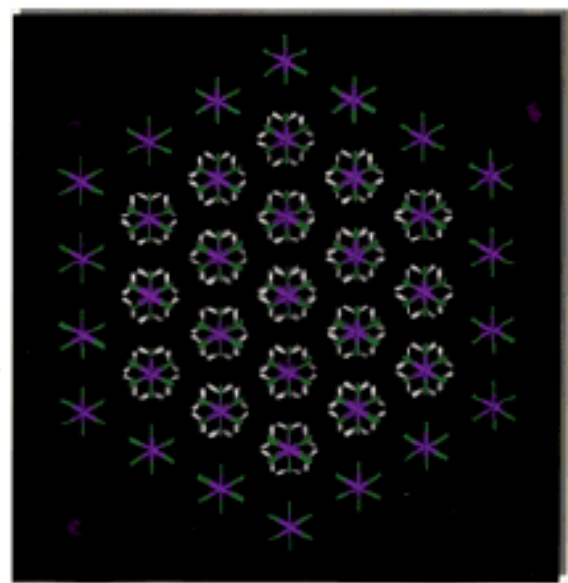
- **Liquids, solids, crystals:**

- *Crystal:* A crystal is a supramolecular entity formed by **millions of molecules in a periodic arrangement** as the result of a delicate balance of intermolecular interactions.

- Example:



Molecular Structure of  $[\text{DABCOH}_2][\text{PtCl}_6]$



Crystal Structure of  $[\text{DABCOH}_2][\text{PtCl}_6]$

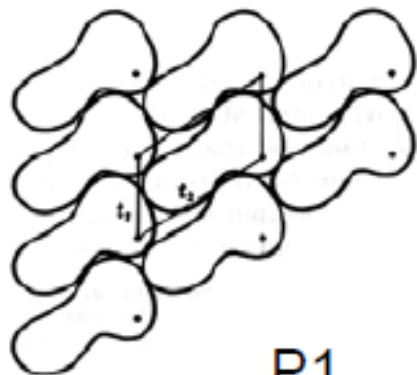
**A crystal is a supermolecule self-crafted by balancing close-packing effects (geometrically dictated) and the directional requirements of intermolecular interactions.**

---

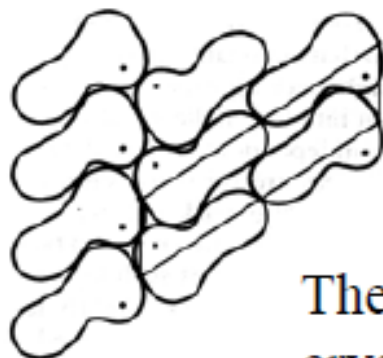
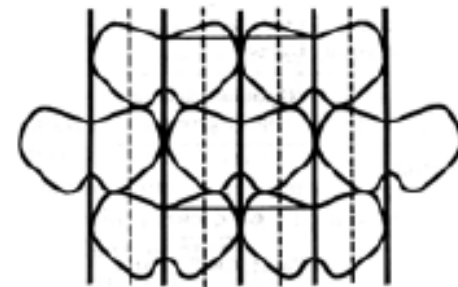
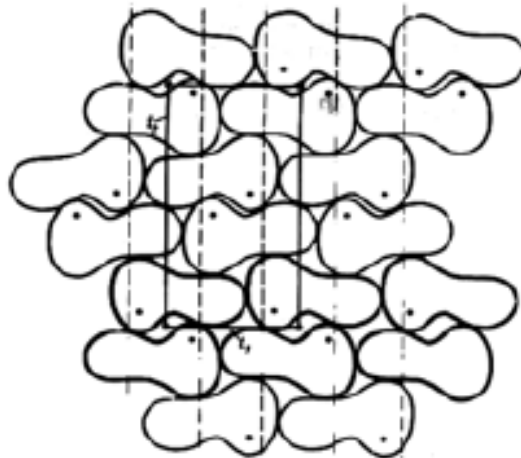
- The overall ambitious goal in this field is to **design crystals**. That is, to be able to establish the connection between molecular and supramolecular or crystal structure. It involves a precise use of intermolecular interactions and is based on the identification of robust motifs that can be carried over from crystal to crystal.
- Crystallisation is a type of molecular recognition phenomena and/or a self-assembly process in that; the component molecules must find and recognise one another in solution and find their optimum relative orientation in a given time and under specific conditions. Then, these aggregates seek out further synthons to ultimately form an ordered nucleus which can grow.
- Crystal engineering depends on the ability to multiple matching of functionalities among molecular components so as to optimise a number of intermolecular interactions that may be of different strengths, directionalities and distance dependence properties. This is something very difficult.
- Important Tools:
  - CSD:
  - Computational Methods

## Important determinants of a crystal structure: Molecular Packing Arrangements

---

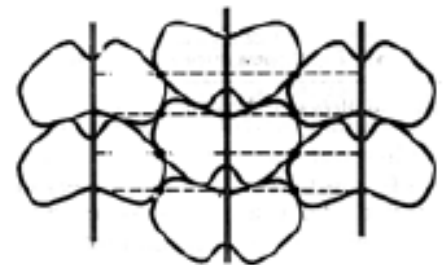


P1

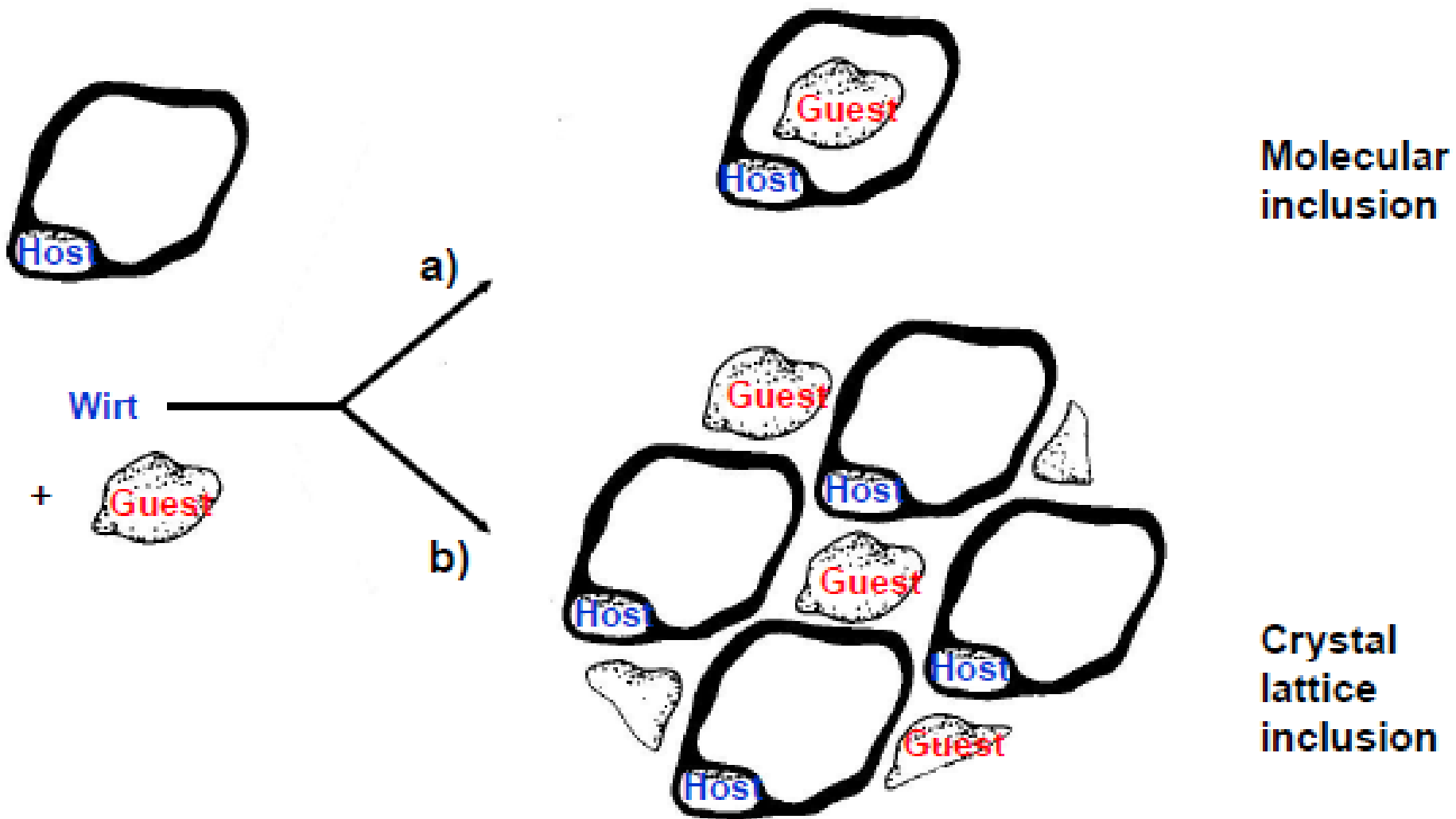


### **Kitaigorodskii's close packing principles**

The packing coefficient in molecular crystals is high and this is only possible if “bumps” of one molecule fit into the “holes” of another.



# Classification of Supramolecular Host – Guest Compounds

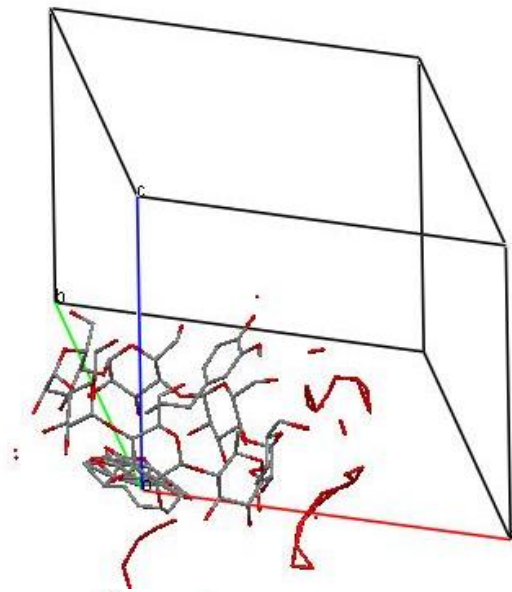


1.4 Difference between a cavity and a clathrate. a) Inclusion of a guest into the cavity of the host; b) Inclusion of guest molecules in the lattice, converting clathrands into clathrates. (from F. Vögtle, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1985).

# Ο Μονοκρύσταλλος ως υπερμοριακό σύστημα\*

## ✓ 1ο επίπεδο οργάνωσης:

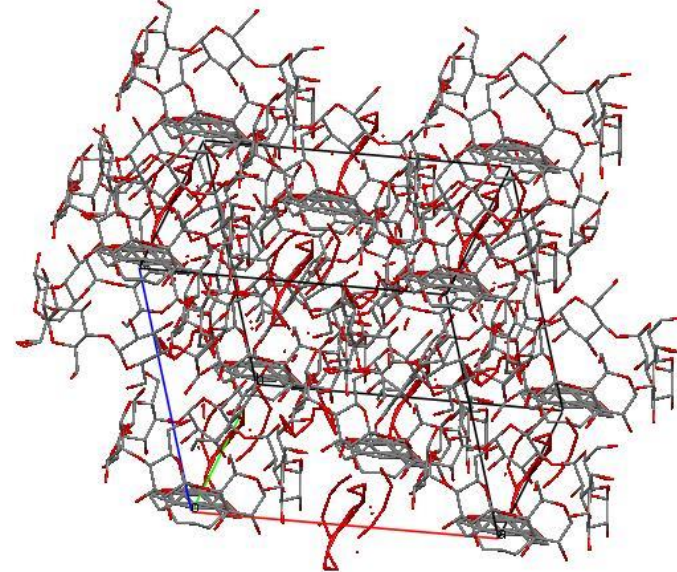
συναρμόζονται σε ένα αρχικό πυρήνα τα στοιχεία που αποτελούν τα περιεχόμενα της **ασύμμετρης μονάδας**. Τέτοια μπορεί να είναι άτομα (ιόντα), τμήμα μορίου, ολόκληρα ένα ή περισσότερα μόρια.



## ✓ 2ο επίπεδο οργάνωσης:

ο πυρήνας αυτός επαναλαμβάνεται στις τρεις διαστάσεις ακολουθώντας συγκεκριμένες πράξεις συμμετρίας και σχηματίζοντας, έτσι, **ένα κανονικό τρισδιάστατο μοτίβο**.

Στην ασύμμετρη μονάδα, τα μέρη που αποτελούν το υπερμοριακό σύστημα συνδέονται με μη-ομοιοπολικούς δεσμούς.

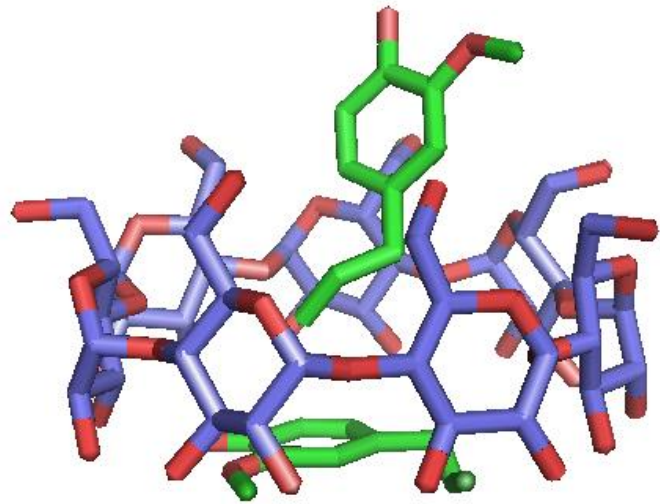


\*CLAUDINE PASCARD, "THE SINGLE CRYSTAL AS A SUPER MOLECULE" Crystallography of Supramolecular Compounds. Edited by Georges Tsoucaris, Jerry L. Atwood and Janusz Lipkowski, 1996 Kluwer Academic Publishers. Printed in Netherlands.

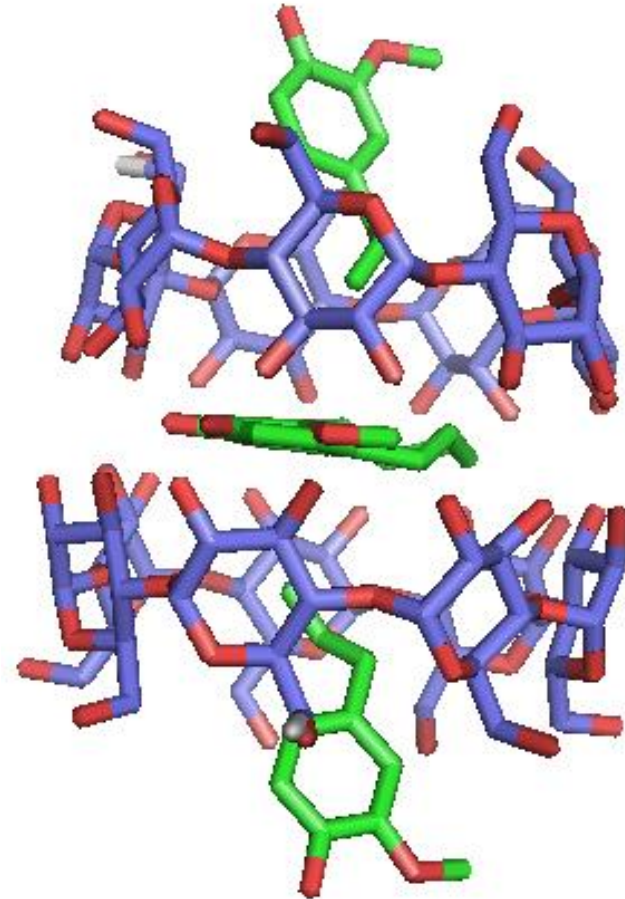
- Ο κρύσταλλος είναι μία σταθερή και **περιοδική διάταξη** μονάδων στις 3 διαστάσεις του χώρου
- Μονάδα = μόριο (ή σύμπλοκο, ολιγομερές...)  
= **ασύμμετρη μονάδα** (γενικότερα)
- Η ασύμμετρη μονάδα επαναλαμβάνεται στον χώρο, σύμφωνα με τις ιδιότητες συμμετρίας του κρυστάλλου. Επειδή η ίδια δεν έχει συμμετρικά μέρη, είναι το μικρότερο αδιαίρετο στοιχείο που, επαναλαμβανόμενο με περιοδικότητα στον χώρο, σχηματίζει τον κρύσταλλο.

## Κρυσταλλογραφική Συμμετρία

Η ασύμμετρη μονάδα επαναλαμβάνεται με ακρίβεια σύμφωνα με τις πράξεις συμμετρίας που ορίζει η κρυσταλλική ομάδα χώρου στην οποία ανήκει ο κρύσταλλος.



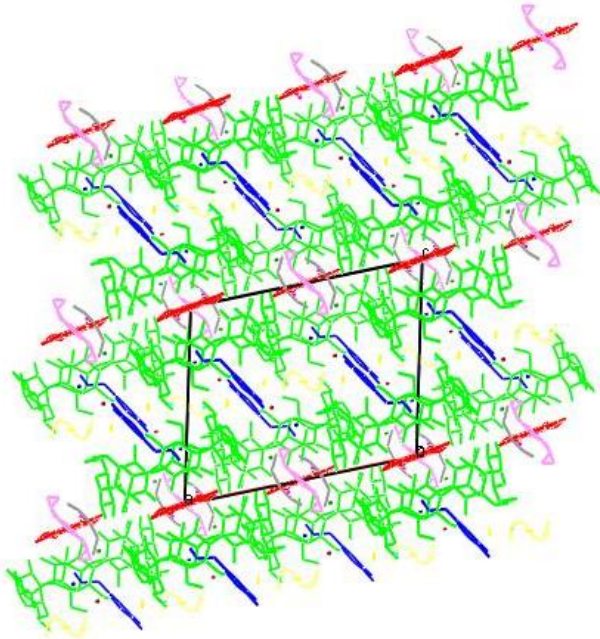
Ασύμμετρη μονάδα κρυσταλλικής δομής συμπλόκου ευγενόλης σε  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη.



Σχηματισμός διμερούς από τις ισοδύναμες συμμετρικές θέσεις της ασύμμετρης μονάδας σύμφωνα με την πράξη συμμετρίας που ορίζει η κρυσταλλογραφική συμμετρία ( $C_2$ ). Το σύμπλοκο εμφανίζει τελικώς στοιχειομετρία ξενιστή ξενιζομένου 2:3.

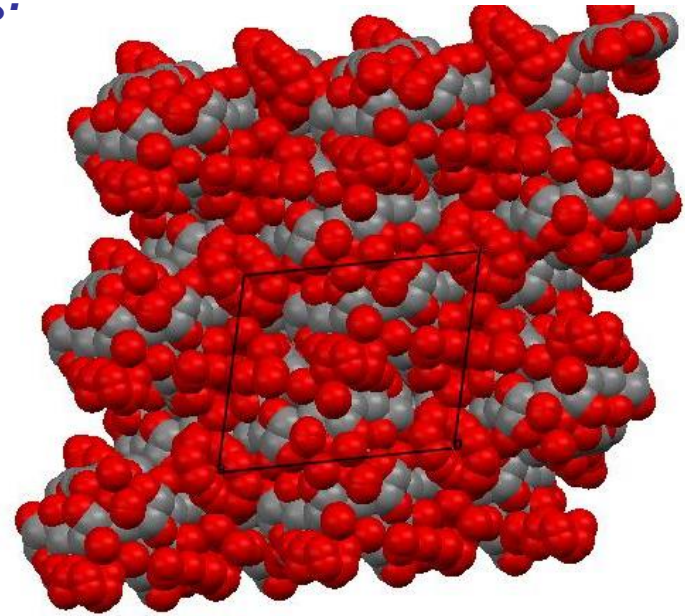
Για την καθαρότητα των εικόνων δεν συμπεριλαμβάνονται τα μόρια νερού.

# Αναπαράσταση ενός τμήματος του σχηματιζόμενου κρυστάλλου από τις πράξεις συμμετρίας.

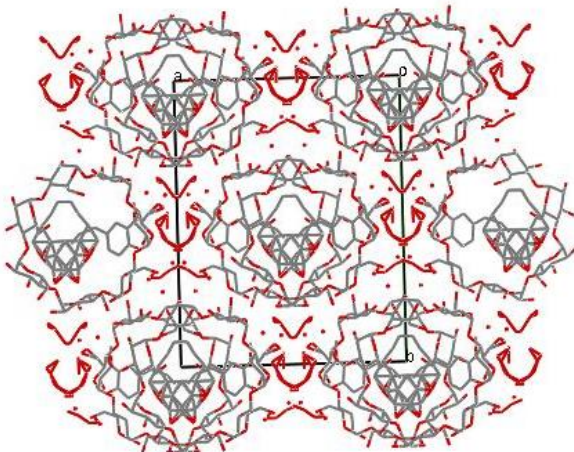


**επίπεδο *ac***

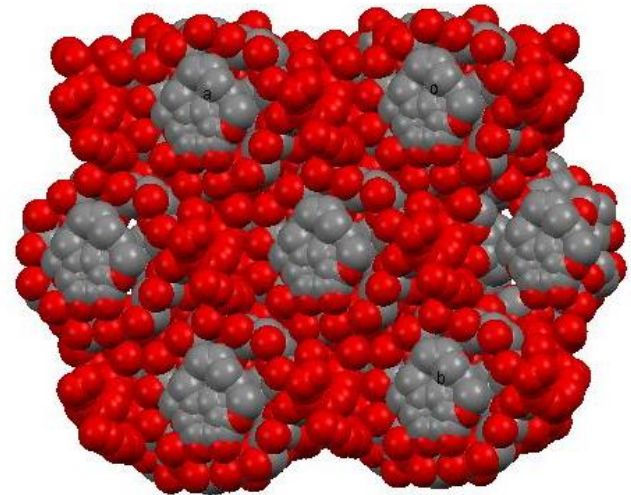
Τα συμμετρικά μόρια αναπαρίστανται με ίδιο χρώμα.



Χωροπληροματικό μοντέλο



**επίπεδο *ab***

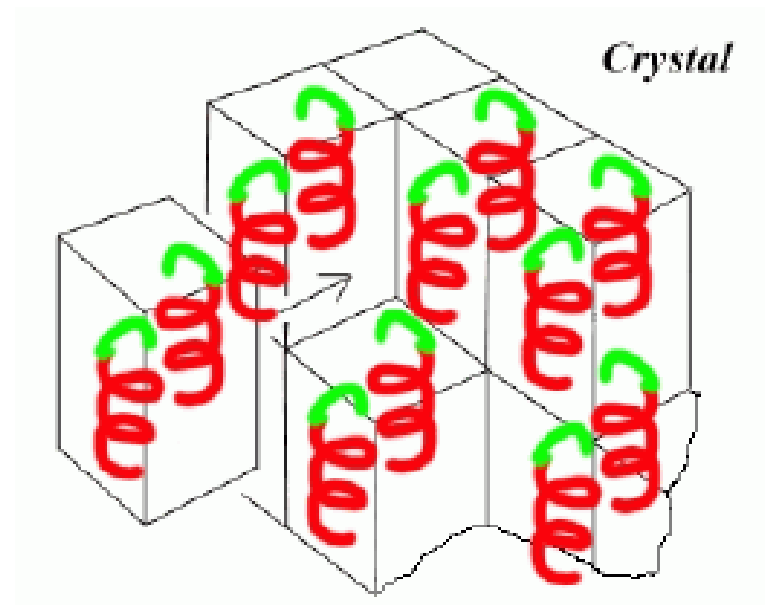
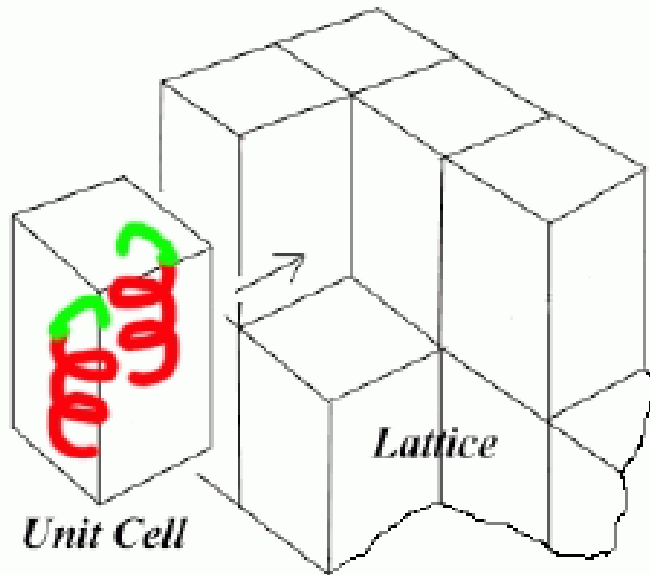
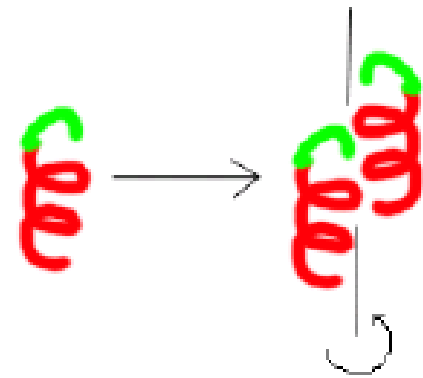






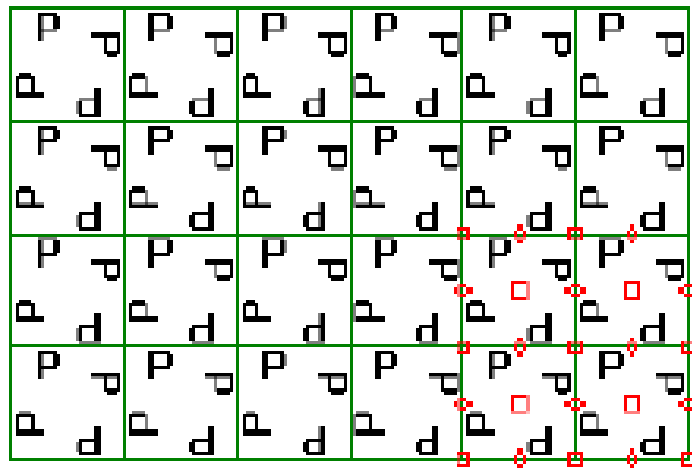
*Motif*

yielding differently oriented copies. Let's just use a 2-fold axis for now :

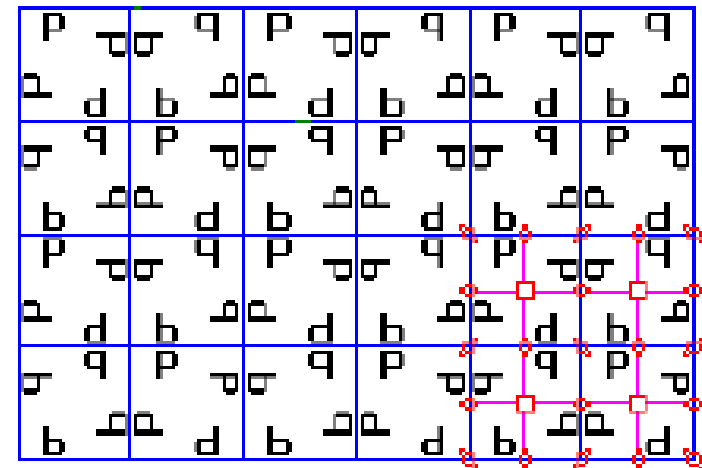


# Κρυσταλλική συμμετρία

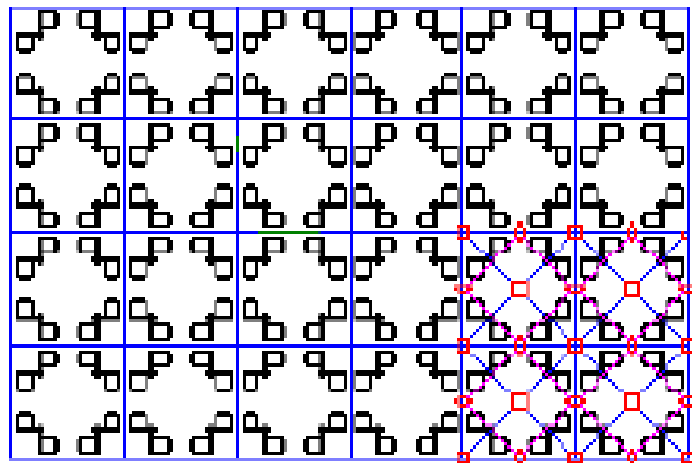
P4



P4g



P4m

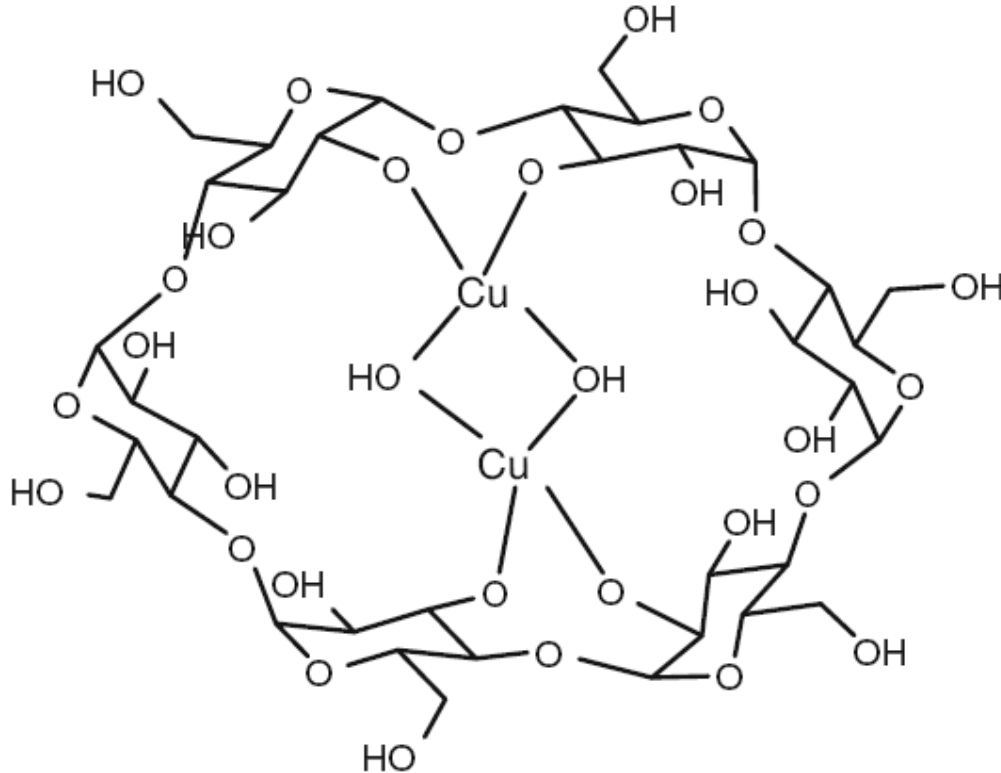


Symmetry Elements  
(Complete symmetry shown in lower right of pattern)

- Unit cell edge ———
- 4-fold axis ◻
- 2-fold axis ◊
- mirror plane ———
- glide plane ———

## Ψεύδο- ή μη κρυσταλλογραφική συμμετρία

είναι η συμμετρία που παρατηρείται μέσα στην ασύμμετρη μονάδα. Οι συμμετρικά ισοδύναμες θέσεις προκύπτουν από την εφαρμογή (όχι με απόλυτη ακρίβεια) πράξεων συμμετρίας οι οποίες δεν προκύπτουν από την κρυσταλλική τάξη του κρυστάλλου.



Ασύμμετρη μονάδα που περιέχει κρυσταλλικής δομής συμπλόκου Cu(II) με α-κυκλοδεξτρίνη (2:1). Η ασύμμετρη μονάδα εμφανίζει ψευδοσυμμετρία με άξονα 2ης τάξης.

[Eugenijus Norkus, “Metal ion complexes with native cyclodextrins. An overview”, J Incl Phenom Macrocycl Chem (2009) 65:237–248]

## ***Πως συγκρατούνται τα μόρια σε ένα κρύσταλλο;***

Μόριο – Μέσο – Μόριο     ή     Μόριο – Μόριο  
(διαλύτης-ιόντα)

Οι δυνάμεις που συγκροτούν τα περιεχόμενα του κρυστάλλου είναι: *ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου, π-π και υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις.*

Οι αλληλεπιδράσεις αυτές εμφανίζονται μεταξύ των μερών της ασύμμετρης μονάδας αλλά και συνδέουν τις ασύμμετρες μονάδες οι οποίες επαναλαμβάνονται σύμφωνα με την κρυσταλλογραφική συμμετρία.

Το μοτίβο που προκύπτει είναι μια τρισδιάστατη, εκτεινόμενη στο άπειρο διάταξη μορίων συνδεδεμένων με τέτοιες αλληλεπιδράσεις

Στην περίπτωση των μακρομορίων αναφερόμαστε σε δευτεροταγή, τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή.

Η δευτεροταγής δομή αφορά στις έλικές και στις β-πτυχωτές επιφάνειες των πεπτιδικών αλυσίδων ενώ η τριτοταγής δομή στην αναδίπλωση αυτών.

Η τεταρτοταγής δομή αναφέρεται στη συναρμογή (χωροδιάταξη και είδη αλληλεπιδράσεων) των δομικών περιοχών (domains) πρωτεϊνών ώστε να σχηματίζεται ένα σταθερό τρισδιάστατο σχήμα.

***Μπορούμε να φανταστούμε τον μονοκρύσταλλο ως μια τεταρτοταγή κατασκευή, μια συναρμογή μορίων συνδεδεμένων με τις γνωστές αλληλεπιδράσεις που εκτείνεται στο άπειρο.***

Η οργάνωση τους βασίζεται στη διαδικασία της μοριακής αναγνώρισης η οποία οδηγεί αρχικά στο σχηματισμό **κρυσταλλοπυρήνων** και στη συνέχεια σε ανάπτυξη μονοκρυστάλλου. Για να αναπτυχθεί ένας μονοκρύσταλλος νέα μόρια προσδένονται στον αρχικό πυρήνα μέσω ενός δικτύου αλληλεπιδράσεων μακράς εμβέλειας και η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως το άπειρο.

Τα μόρια που προσεγγίζουν κάθε φορά αυτά που ήδη συμμετέχουν στον κρύσταλλο θα πρέπει στο κρυσταλλικό μέσο να φτιάχνουν π.χ. τους ίδιους δεσμούς υδρογόνου με τα κρυσταλλωμένα μόρια ώστε να γίνουν δεκτά. Εάν ένα μόριο παρόμοιου σχήματος αλλά με διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης σε σχέση με τα μόρια του κρυστάλλου, που βρίσκεται ως **ακαθαρσία** (impurity) στο διάλυμα, προσδεθεί σε μια αναπτυσσόμενη κρυσταλλική επιφάνεια, η ισορροπία του δικτύου των δεσμών υδρογόνου θα διαταραχθεί, η πρόσδεση θα είναι λιγότερο σταθερή και η κρυσταλλική αυτή επιφάνεια θα αναπτυχθεί βραδύτερα.

# Crystal Growth and Morphology (by design)

- Molecules in a supersaturated solution cluster to form some transient species that once they reach a critical size grow to form a macroscopic crystal.
- The morphology of a crystal is determined by the rate at which each of the faces grows. Slow growing faces dominate crystal morphology.** The morphology of a crystal can be engineered by selection of appropriate crystallisation conditions and/or addition of dopants.

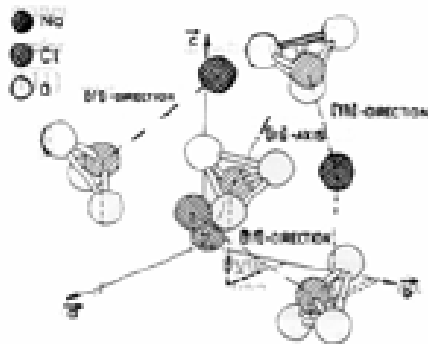
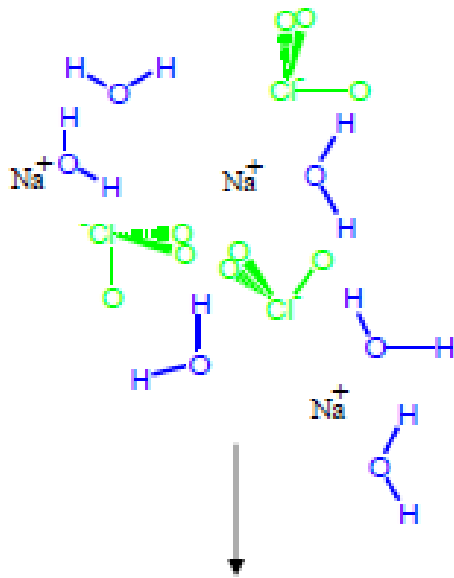


Figure 5.5: Arrangement of  $\text{Na}^+$  and  $\text{ClO}_3^-$  ions in the structure of sodium chlorate.

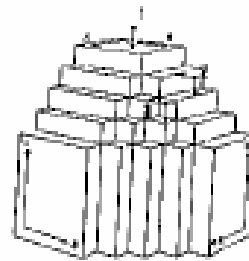
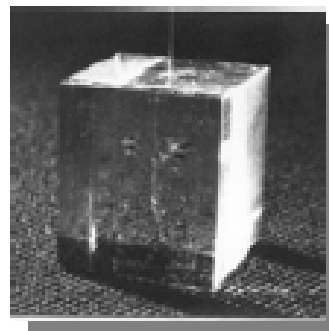
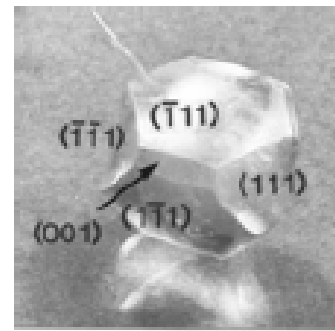


Figure 3.1: Hartman and Perdok model showing entities approaching the (100) P-face (1), the (110) S-face (2) and the (111) K-face (3)

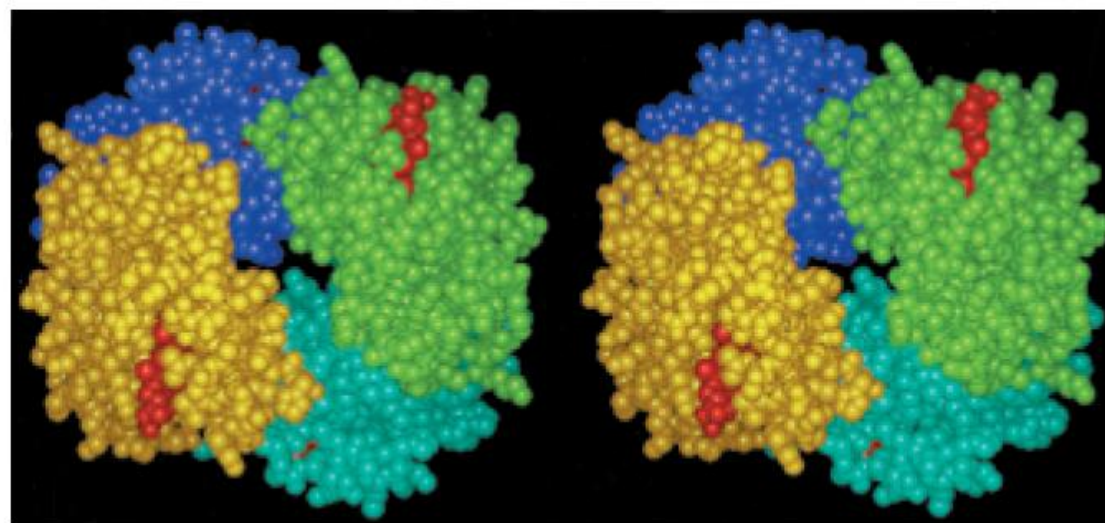
150ppm of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_6$



210ppm of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_6$



**FIGURE 8-63** The quaternary structure of hemoglobin. The  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ , and  $\beta_2$  subunits in this stereo, space-filling drawing are colored yellow, green, cyan, and magenta, respectively. Heme groups are red. The protein is viewed along its molecular 2-fold rotation axis, which relates the  $\alpha_1\beta_1$  protomer to the  $\alpha_2\beta_2$  protomer. Instructions for viewing stereo drawings are given in the appendix to this chapter. [Based on an X-ray structure by Max Perutz, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, U.K. PDBid 2DHB. Illustration, Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission.]

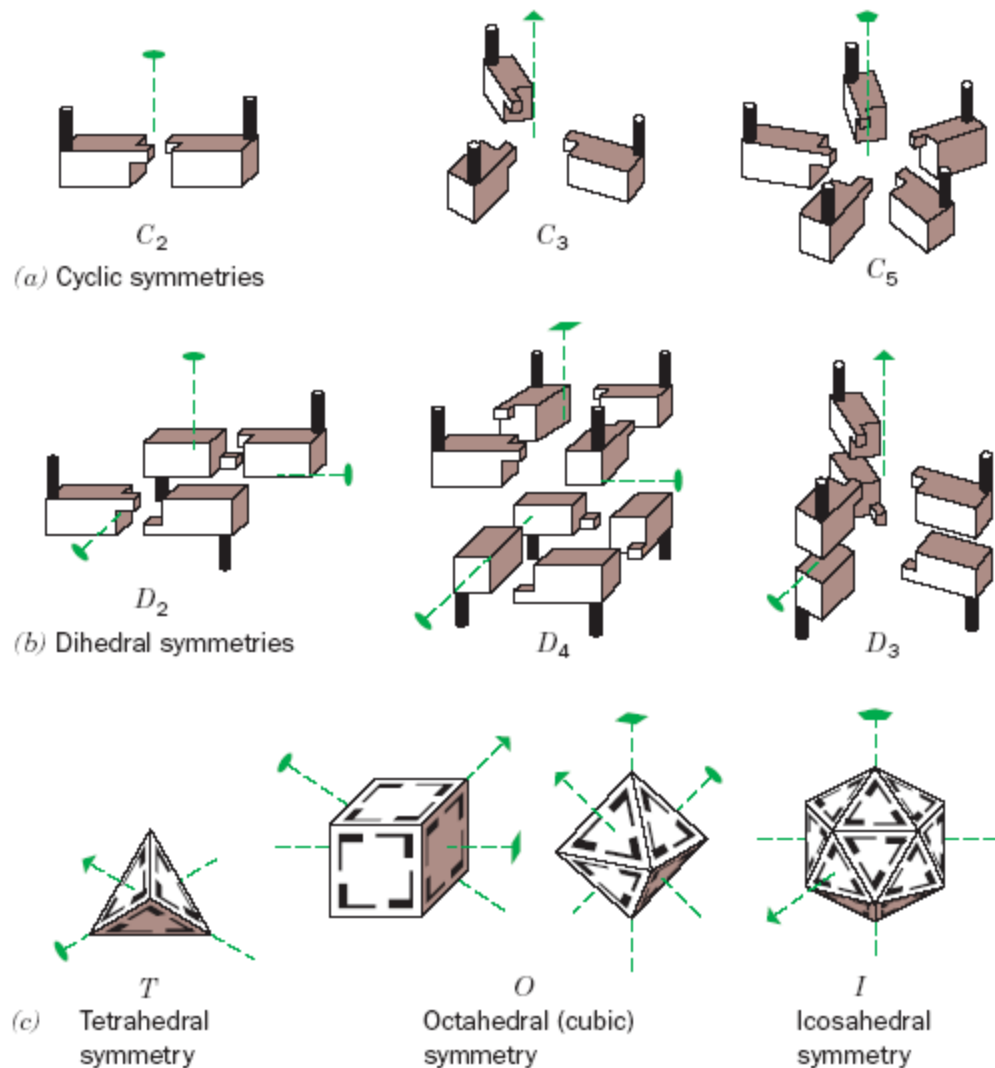


## B. Symmetry in Proteins

*In the vast majority of oligomeric proteins, the protomers are symmetrically arranged; that is, the protomers occupy geometrically equivalent positions in the oligomer. This implies that each protomer has exhausted its capacity to bind to other protomers; otherwise, higher oligomers would form. As a result of this limited binding capacity, protomers pack about a single point to form a closed shell, a phenomenon known as **point symmetry**. Proteins cannot have inversion or mirror symmetry, however, because such symmetry operations convert chiral L-residues to D-residues. Thus, *proteins can only have rotational symmetry*.*

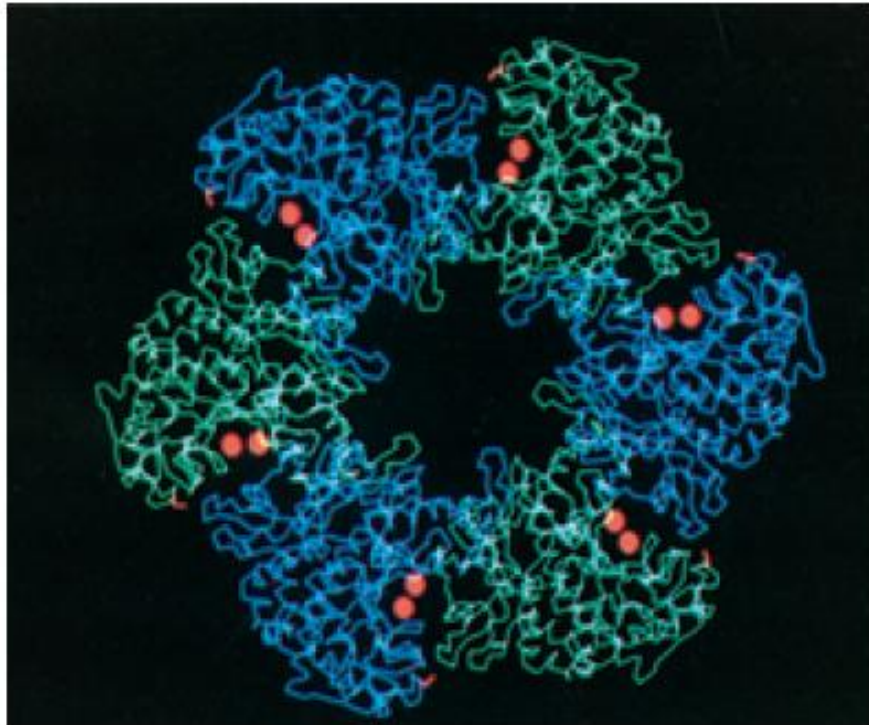
Various types of rotational symmetry occur in proteins, as X-ray crystal structure determinations have shown:





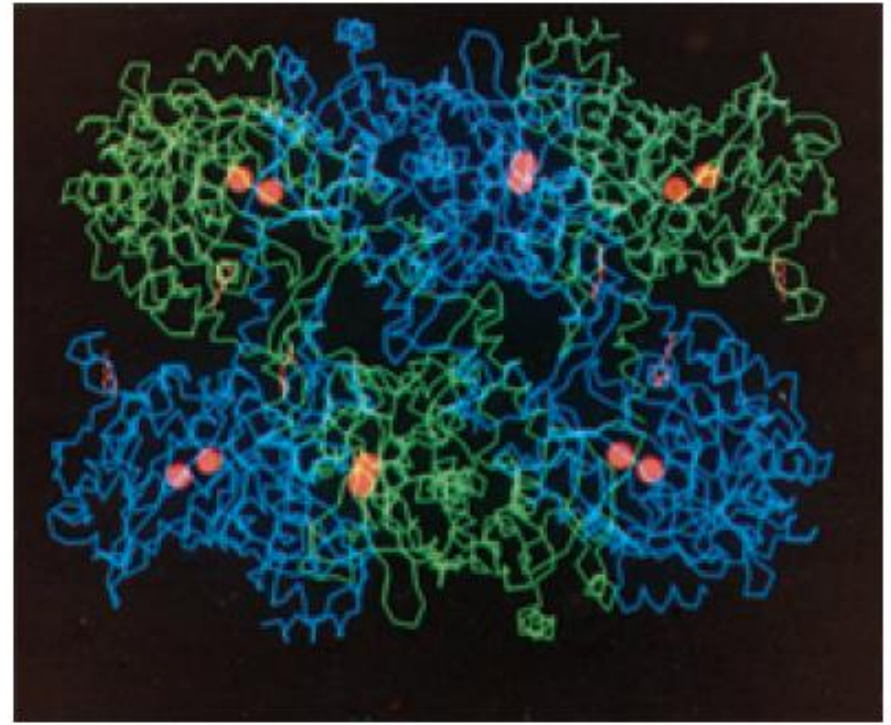
**FIGURE 8-64** Some possible symmetries of proteins with identical protomers. The lenticular shape, the triangle, the square, and the pentagon at the ends of the dashed lines indicate, respectively, the unique 2-fold, 3-fold, 4-fold, and 5-fold rotational axes of the objects shown. (a) Assemblies with the cyclic symmetries  $C_2$ ,  $C_3$ , and  $C_5$ . (b) Assemblies with the dihedral symmetries  $D_2$ ,  $D_4$ , and  $D_3$ . In these objects, a twofold

axis is perpendicular to the vertical 2-, 4-, and 3-fold axes. (c) Assemblies with  $T$ ,  $O$ , and  $I$  symmetry. Note that the tetrahedron has some but not all of the symmetry elements of the cube, and that the cube and the octahedron have the same symmetry. [Illustration, Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission.] [See the Animated Figures](#)



(a)

**FIGURE 8-66** X-Ray structure of glutamine synthetase from *Salmonella typhimurium*. The enzyme consists of 12 identical subunits, here represented by their C<sub>α</sub> backbones, arranged with D<sub>6</sub> symmetry. (a) View down the 6-fold axis of symmetry showing only the six subunits of the upper ring in alternating blue and green. The subunits of the lower ring are roughly directly below those of the upper ring. The protein, including



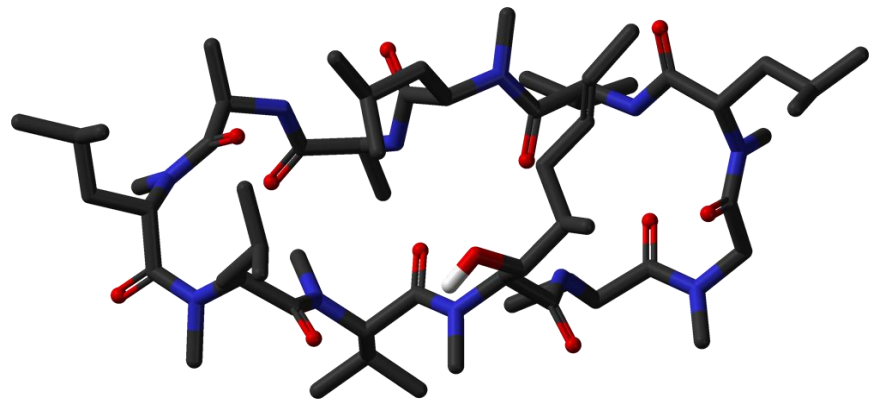
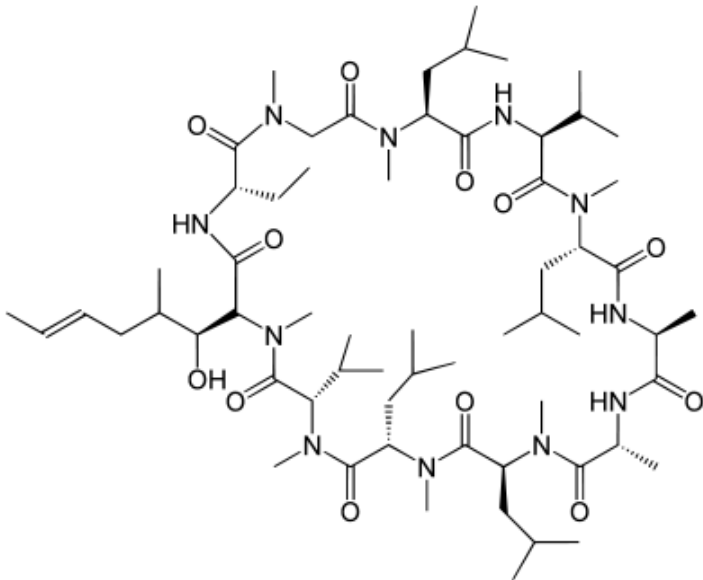
(b)

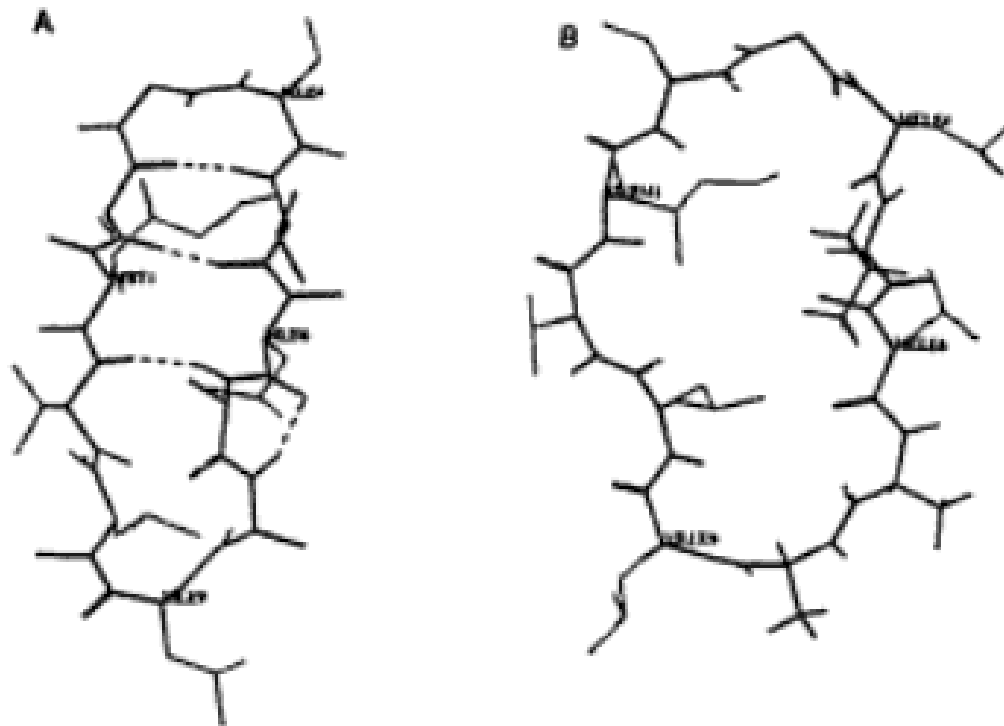
its side chains (*not shown*), has a diameter of 143 Å. The six active sites shown are marked by pairs of bound Mn<sup>2+</sup> ions (*red spheres*). (b) Side view along one of the protein's twofold axes showing only its six nearest subunits. The molecule extends 103 Å along the sixfold axis, which is vertical in this view. [Courtesy of David Eisenberg, UCLA. PDBid 2GLS.]

## Η σημασία του μέσου

Η συνεκτικότητα μιας μοριακής διάταξης συχνά οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις με τα μόρια του διαλύτη. Το σχήμα και η διαμόρφωση ευέλικτων αμφιφιλών μορίων επηρεάζεται από το περιβάλλον τους. Εάν είναι δυνατή η πρόσδεση τους με πολικά μόρια διαλύτη τότε προσαρμόζονται έτσι ώστε οι πολικές περιοχές τους να στρέφονται προς το περιβάλλον τους. Εάν το περιβάλλον είναι υδροφοβικό, τα μόρια στρέφουν τις υδροφοβικές περιοχές τους προς το μέσο.

**Παράδειγμα:** Κυκλοσπορίνη, κυκλικό μη-ριβοσωμικό πεπτιδίο αποτελούμενο από 11 αμινοξέα





(A) Η διαμόρφωση της όπως βρέθηκε στη στερεή κατάσταση (Petcher, T. J. *et al*, 1976) αλλά και στο διάλυμα με μελέτες NMR (Loosli, H.-R. *et al*, 1985) (διαμόρφωση A). Τέσσερις δεσμοί υδρογόνου δένουν και επιμηκύνουν το κυκλικό αυτό μόριο. Επίσης, στη διαμόρφωση αυτή παρατηρείται ένας *cis* πεπτιδικός δεσμός.

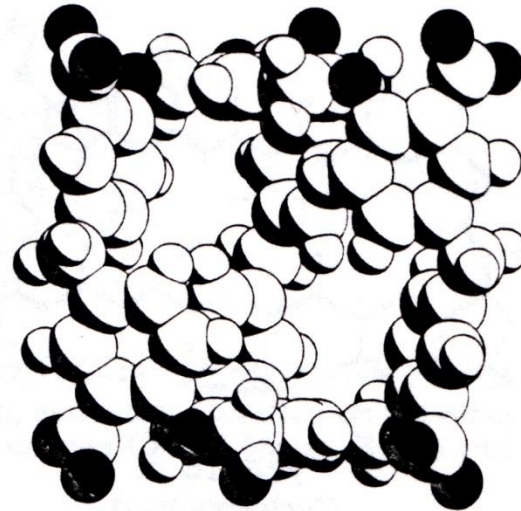
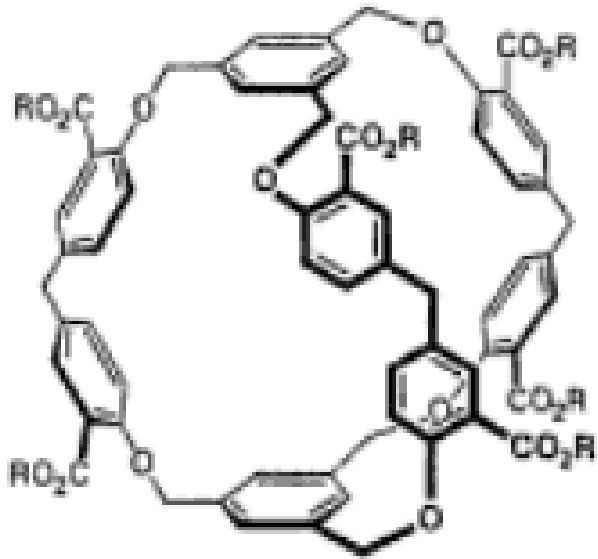
(B) NMR μελέτες του συμπλόκου κυκλοσπορίνης-κυκλοφιλίνης (Weber *et al.*, 1991) και η ανάλυση δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X του συμπλόκου της κυκλοσπορίνης με ένα τμήμα A-Fab (Altschuh *et al.*, 1992) έδειξαν ότι η κυκλοσπορίνη μπορεί να αποκτήσει και τη διαμόρφωση B (εικόνα 5B) στην οποία όλοι οι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται εξωτερικά με τον υποδοχέα και ο πρώην *cis* πεπτιδικός δεσμός παρατηρείται ως *trans*.

Η διαμόρφωση A παρουσιάζεται σε μη-πολικό περιβάλλον (ακετόνη,  $\text{CDCl}_3$ ), ενώ η παρουσία δοτών και αποδεκτών δεσμών υδρογόνου προκαλεί το αναποδογύρισμα των δραστικών ομάδων (διαμόρφωση B) ώστε να προσδεθούν στο δεκτικό περιβάλλον.

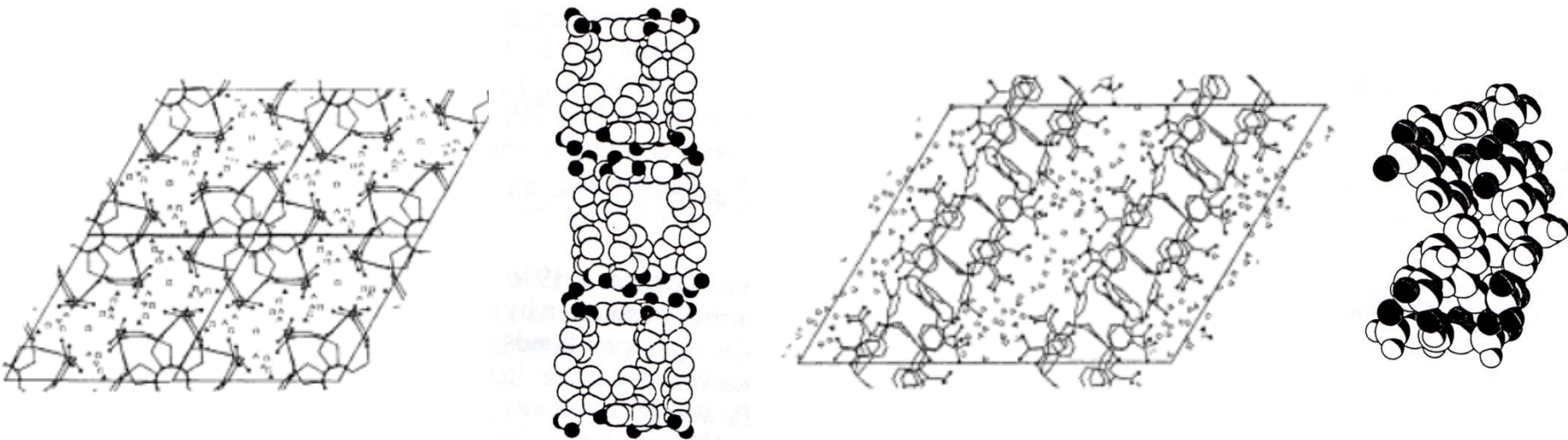
## Οργάνωση του μέσου

Η οργάνωση του μέσου επηρεάζει τον τρόπο σύνδεσης των μορίων.

μακρο-δι-κυκλικό (macrobicycle) μόριο που φέρει carboxylate ομάδες σε υδροφοβικό σκελετό αρκετά ευέλικτο ώστε να μπορεί να προσαρμόζει το σχήμα ΤΟΥ.



Το άλας νατρίου παράγωγο του κρυσταλλώνει σε υδατικό διάλυμα σε δύο μορφές με 14 και 18% υδατικό περιεχόμενο αντίστοιχα (Cesario *et al.*, 1993). Παρατηρούμε δύο τύπους μοριακών διευθετήσεων:



λευκά τετράγωνα =  $\text{Na}^+$ , λευκά τρίγωνα = νερά, μαύρα τρίγωνα = μεθανόλη ( $\text{MeOH}$ )

- **Κρυσταλλική δομή μορφής I:** κάθετη προβολή στον εξαγωνικό άξονα  
 - στον κρύσταλλο I (ομάδα χώρου P63) το μακροδικυκλικό μόριο έχει κυλινδρικό σχήμα (βαρέλι) με τις όξινες ομάδες να δείχνουν προς τα έξω και να σχηματίζουν δύο αρνητικά φορτισμένες κορώνες γύρω από κάθε σκέπασμα του βαρελιού. Αυτά τα βαρέλια στοιβάζονται το ένα πάνω στο άλλο κατά μήκος του  $c$  άξονα με π-αλληλεπιδράσεις. Προκύπτουν έτσι εκτεταμένοι κύλινδροι, εμβαπτισμένοι στο διάλυμα που περιέχει  $\text{Na}^+$ , οι οποίοι σχηματίζουν εξαγωνική κρυσταλλική διάταξη.

- **Κρυσταλλική δομή μορφής II:** μονοκλινική προβολή  
 - Στον κρύσταλλο II (ομάδα χώρου Cc) το μόριο διαμορφώνεται σε ένα πιο επίπεδο σχήμα ώστε να διατηρήσει τις φορτισμένες ομάδες του προσανατολισμένες προς το μέσο. Διατάσσεται έτσι σε στοιβάδες (layers) και οι σκελετοί κυκλοφανίων σχηματίζουν μονομοριακό υδροφοβικό στρώμα επικαλυμμένο σε κάθε πλευρά με στρώμα ανιόντων οξυγόνου που πλαισιώνουν το στρώμα του διαλύτη. Αυτή είναι μια τυπική συμπεριφορά των αμφίφιλων μορίων

## Ο σημαντικός ρόλος του διαλύτη – Ο διαλύτης ως αντιδραστήριο σταθεροποίησης της αυτο-συναρμολόγησης

Σε συνάρτηση, πάντα, με τις δυνατότητες πρόσδεσης που έχει ο διαλύτης συνδέεται με τα γειτονικά μόρια και τα φέρνει εγγύτερα το ένα προς το άλλο σταθεροποιώντας, έτσι, τη μοριακή συναρμολόγηση.

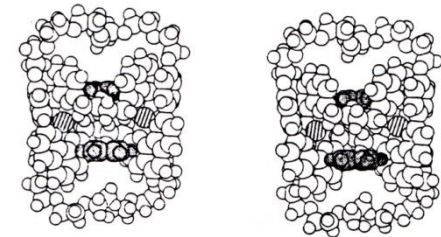
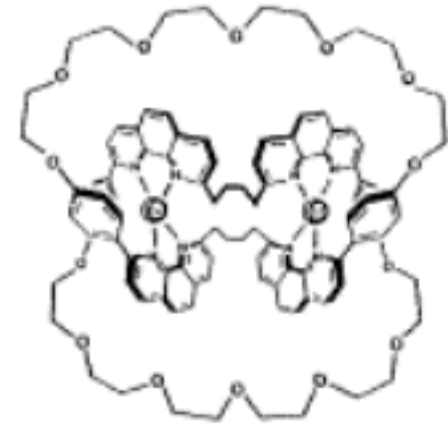
**Παράδειγμα:** δομή του διπύρηνου συμπλόκου χαλκού (I) (Luzzati, 1968). Στο σύμπλοκο αυτό η υπέρθεση δύο μοριακών δακτύλιων εγκλείει ως «σάντουιτς» δύο κατιόντα χαλκού.

Το σύμπλοκο αυτό δεν είχε παρατηρηθεί σε υδατικό διάλυμα παρόλο ότι είχε κρυσταλλωθεί καλά. Το στοιχείο που βοήθησε στη δημιουργία του είναι η παρουσία των δύο μορίων βενζολίου τα οποία προσφέρουν σημαντικές αρωματικές αλληλεπιδράσεις:

α) οι βενζολικοί δακτύλιοι είναι παράλληλοι στις κεντρικές αλκυλικές αλυσίδες (βραχείες επαφές:  $3,6\text{\AA}$ )

β) οι βενζολικοί δακτύλιοι προσανατολίζουν δύο απέναντι υδρογόνα τους προς τα κέντρα των φαινανθρολίνων που είναι κάθετες σε αυτούς και σε απόσταση  $3,6\text{\AA}$  (= απόσταση άνθρακα από το κέντρο φαινανθρολίνης)

Μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων τα μόρια του διαλύτη γίνονται οι συνδετικοί κρίκοι αυτού του υπερμοριακού συστήματος.



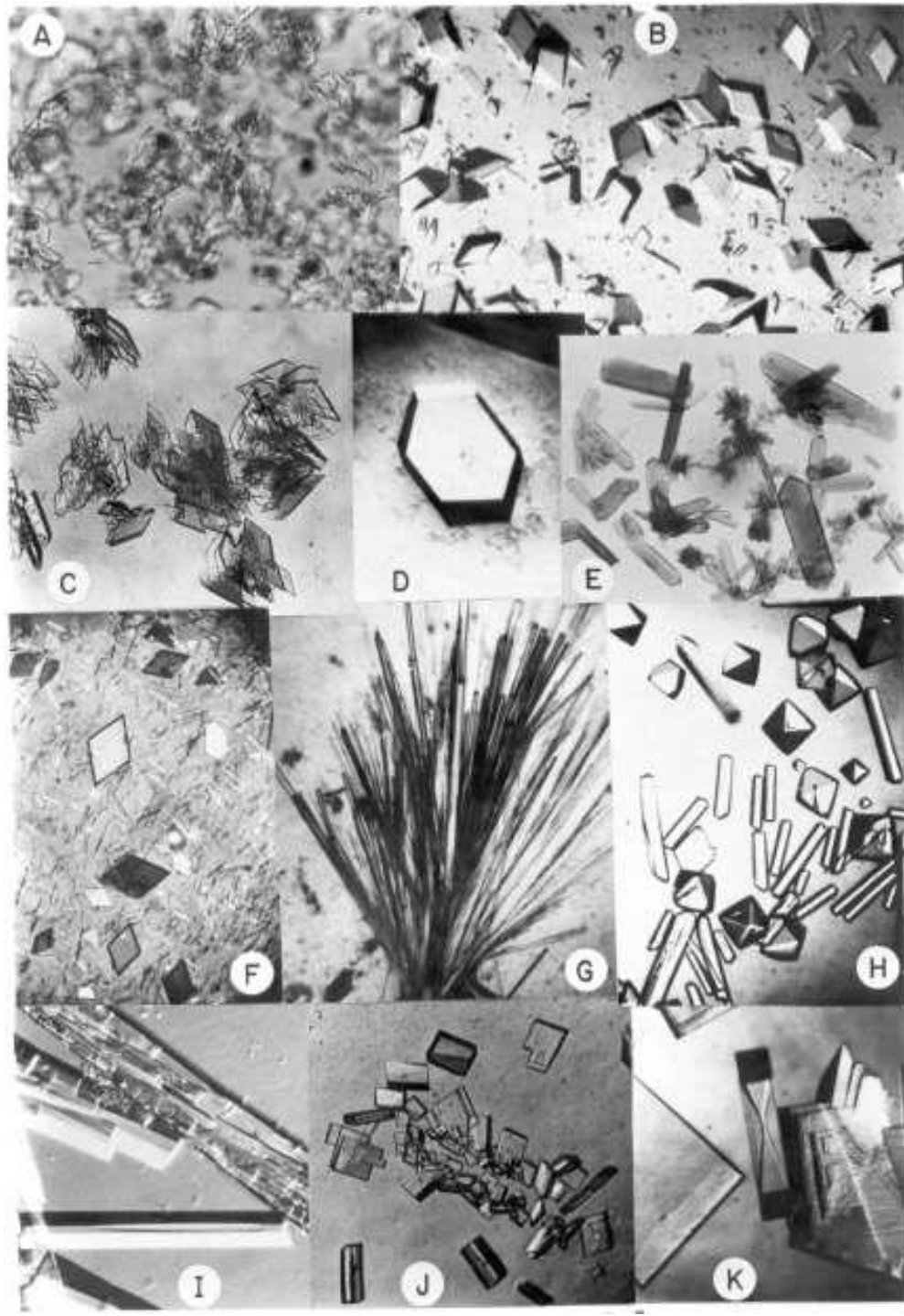
## ***Διαλύτης, δότης ή αποδέκτης υδρογονικών δεσμών δρα ως αντιδραστήριο κρυστάλλωσης***

Όταν το μοριακό σχήμα δεν είναι κατάλληλο για πυκνή διευθέτηση (close packing) ή όταν δεν μπορούν να πληρωθούν όλες οι περιοχές πρόσδεσης, τα μόρια του διαλύτη μπορούν να αναπληρώσουν τα κενά κατά τη διαδικασία σύνδεσης.

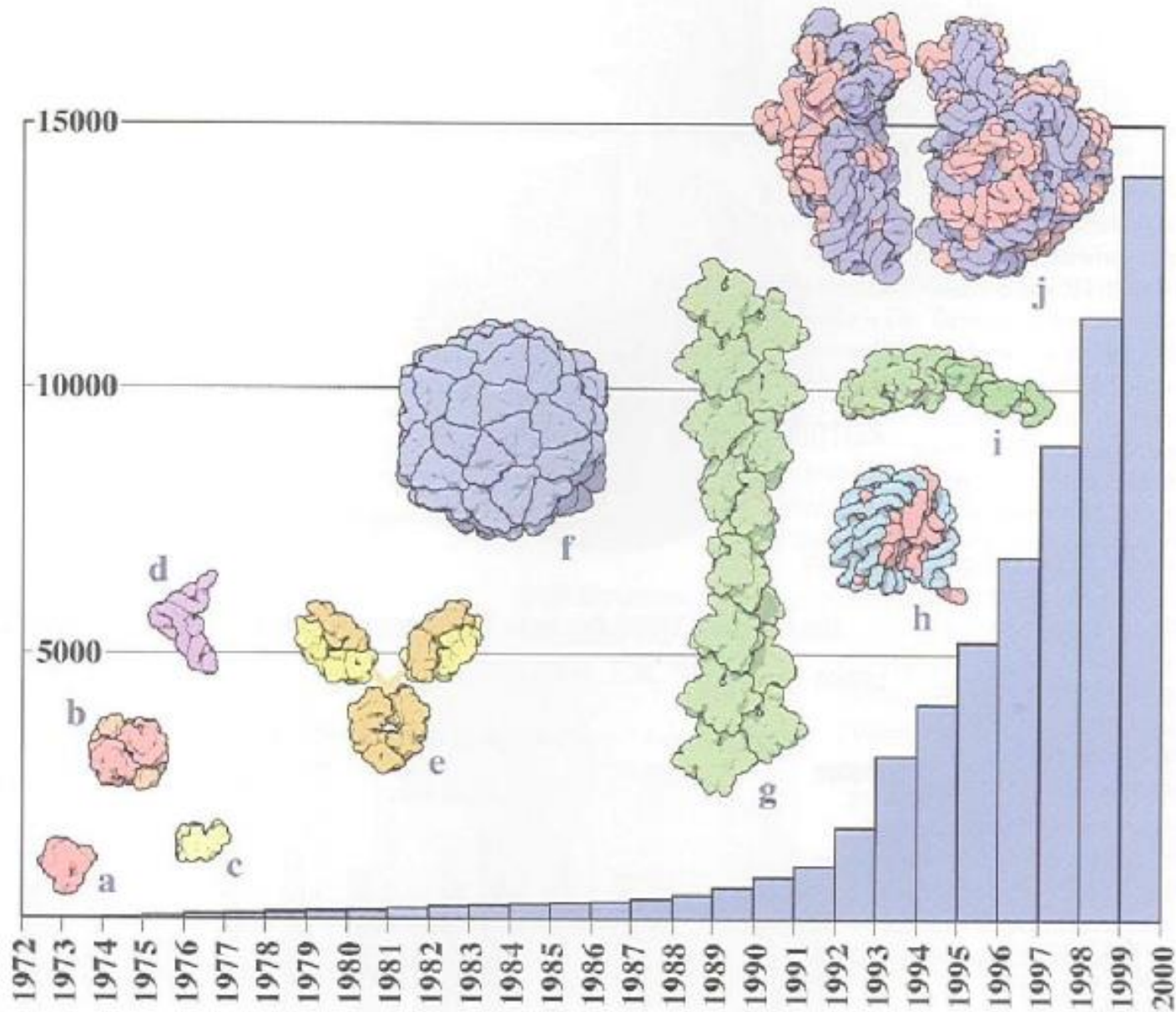
## ***Ο ρόλος των μορίων νερού***

Το νερό παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στα βιολογικά μακρομόρια. Επηρεάζει την τεταρτοταγή τους δομή (πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων) και επιπλέον, περιστοιχίζει και γεμίζει τις επιφανειακές τους ατέλειες δημιουργώντας γέφυρες μεταξύ τους και κάνοντας, έτσι, δυνατή την κρυσταλλική διευθέτηση τους.





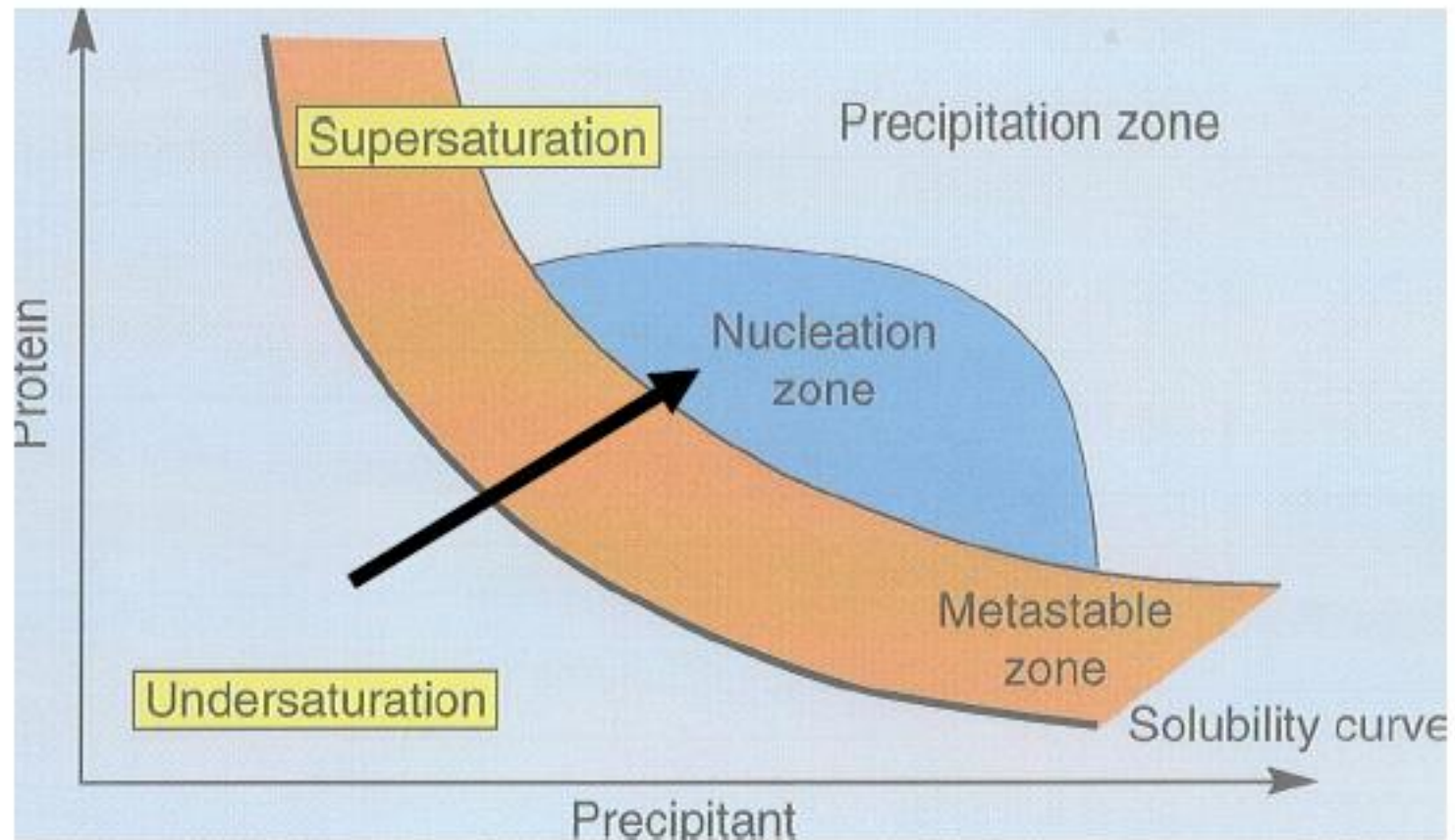
# Η κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών στον χρόνο:



■ Η αρχική συσσωμάτωση οφείλεται σε τυχαίες συγκρούσεις και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μορίων στο διάλυμα, αρχικώς τοπικές και παροδικές.

■ Δημιουργία κρίσιμης μάζας: στοχαστικό φαινόμενο, του οποίου όμως η πιθανότητα αυξάνει όσο αυξάνει ο λόγος υπερκορεσμού.

# ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ



Χρειαζόμαστε:

Ένα χημικώς και δομικώς καθαρό, πληθυσμιακώς ομοιογενές υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης, συμπυκνωμένο στα 5-20 mg/ml.

## Οι παράμετροι (τι άλλο χρειαζόμαστε)

- **Κατακρημνιστικοί παράγοντες**  
Ο,τιδήποτε μειώνει τη διαλυτότητα (συγκέντρωση κορεσμού) του μακρομορίου στο διάλυμα
  - (1) **Άλατα** – τα ιόντα ενυδατώνονται αφαιρώντας έτσι νερό από τη επιφάνεια των πρωτεϊνικών μορίων (**εξαλάτωση**)  
top 6: θειικό αμμώνιο, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, φωσφορικό αμμώνιο, φωσφορικό K/Na

(2) **Οργανικοί διαλύτες** – μειώνουν τη διηλεκτρική σταθερά του νερού, ευνοώντας τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων

top 4: MPD (2-μεθυλο-2,4-πεντανοδιόλη), αιθανόλη, μεθανόλη, ισοπροπανόλη

(3) **PEG (πολυαιθυλενογλυκόλες)** – οι γνώμες δίστανται. Φαινόμενα εξαλάτωσης + μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς + πρόκληση θερμοδυναμικής αστάθειας στο διάλυμα λόγω πολλαπλών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων

Πρόσθετα μόρια: ο,τιδήποτε – **υποστρώματα, αναστολείς, ιόντα** μεταλλοπρωτεϊνών κ.ά. μυστηριώδους δραστηριότητας μόρια.

Άλλες μεταβλητές – **pH** (4-9) και είδος ρυθμιστή (MES, Tris, HEPES, οξικά), **θερμοκρασία** (4-35°C).

# ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ

## Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση

Η δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης και η αύξηση των κρυστάλλων εξαρτάται από πολλές παραμέτρους που αναφέρονται παρακάτω:

### **Ενδογενείς φυσικοχημικές παράμετροι**

- Υπερκορεσμός (συγκέντρωση πρωτεΐνης και παραγόντων κατακρήμνισης)
- Θερμοκρασία, pH (μεταβολές)
- Χρόνος (ρυθμοί εξισορρόπησης και αύξησης)
- Ιοντική ισχύς και καθαρότητα των χημικών (φύση των παραγόντων κατακρήμνισης, ρυθμιστικά διαλύματα, επιπρόσθετες χημικές ουσίες)
- Διάχυση και μεταφορά (πηκτώματα, μικροβαρύτητα)
- Όγκος και γεωμετρία του δείγματος και των πειραματικών συσκευών (επιφάνεια των συσκευών κρυστάλλωσης)
- Στερεά σωματίδια, αλληλεπιδράσεις με τα τοιχώματα και με τις διάμεσες επιφάνειες (ομοιογενής, ετερογενής πυρήνωση)
- Φαινόμενα εξαρτημένα από την πυκνότητα ή το ιξώδες (διαφορές μεταξύ κρυστάλλου και μητρικού υγρού)
- Πίεση, ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία
- Δονήσεις και ήχος (ακουστικά κύματα)
- Σειρά των γεγονότων, επαναληψιμότητα (ερευνητής ή ρομπότ)

# **ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ** - Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση

## **Βιοχημικές και βιοφυσικές παράμετροι**

Ευαισθησία της δομής της πρωτεΐνης σε φυσικές παραμέτρους (θερμοκρασία, pH, ιοντική ισχύς, διαλύτες).

Δέσμευση άλλων υποκαταστατών (υποστρώματα, συνπαράγοντες, μεταλλικά ιόντα, άλλα ιόντα)

Ειδικές πρόσθετες ουσίες (ανταγωνιστικές ουσίες, μη ιοντικά απορρυπαντικά, πολυαμίνες)

Ιδιότητες των πρωτεϊνών (οξειδωση, υδροφοβικότητα, υδροφιλικότητα )

Γήρανση του δείγματος (οξειδοαναγωγικές μεταβολές, αποδιάταξη, αποικοδόμηση)

## **Βιολογικοί παράμετροι**

Πολύ μικρές ποσότητες των περισσοτέρων πρωτεϊνών στην φύση

Βιολογικές πηγές και φυσιολογική κατάσταση των οργανισμών ή των κυττάρων που περιέχουν τις πρωτεΐνες (θερμόφιλοι, ψυχρόφιλοι, αλλόφιλοι, μεσόφιλοι οργανισμοί, στατική ή αναπτυσσόμενη φάση κυττάρων)

Βακτηριακές μολύνσεις

## **Καθαρότητα των μακρομορίων**

Μακρομοριακές επιμολύνσεις (με άλλα μακρομόρια ή άλλα μικρά μόρια)

(Μικρο)ετερογένεια της ακολουθίας (κοψίματα από πρωτεάσες ή νουκλεάσες, μερικές ή ετερογενείς μεταφραστικές τροποποιήσεις

Δομική (μικρο)ετερογένεια (βαθμός και τρόπος πολυμερισμού συσσωματώματα, αποδιάταξη)



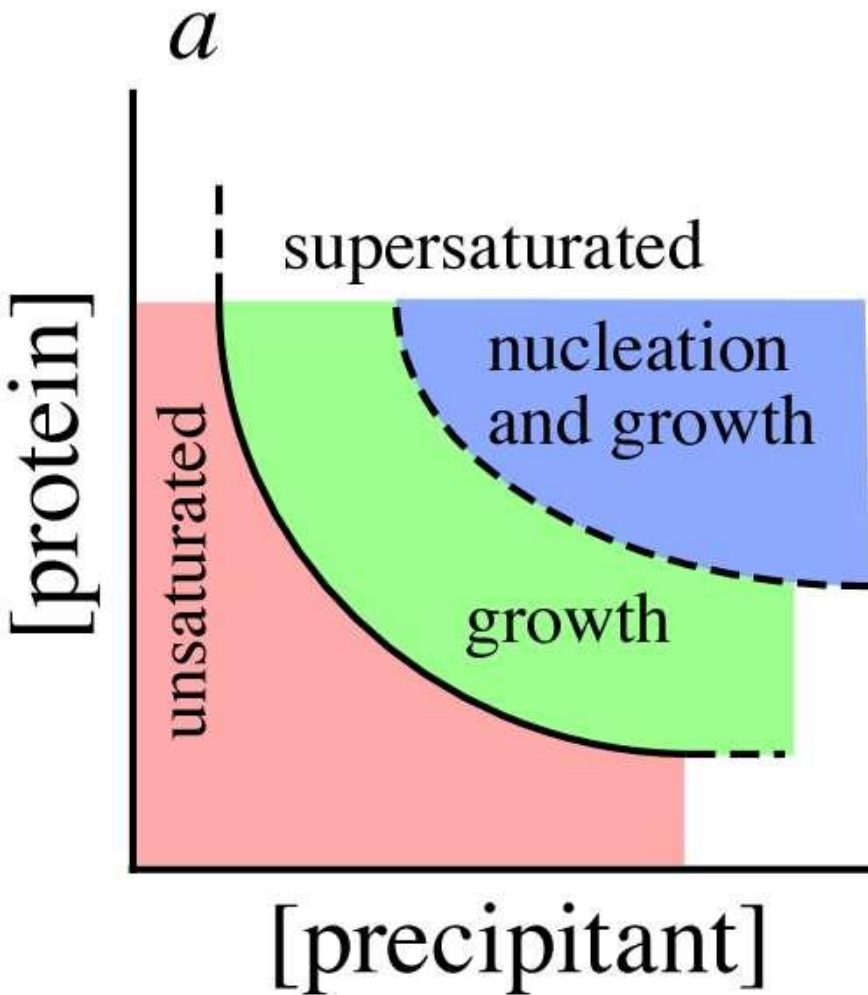
## Διαγράμματα διαλυτότητας

Καθώς η διαλυτότητα των πρωτεϊνών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, (κυριότεροι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, η ιοντική ισχύς, το pH, η θερμοκρασία, η φύση των διαλυτών που χρησιμοποιούνται), ένα δισδιάστατο διάγραμμα διαλυτότητας σε σχέση με μια παράμετρο είναι αντιπροσωπευτικό για κάθε βιομόριο, εφ' όσον οι άλλες παράμετροι παραμένουν σταθεροί.



Η καμπύλη διαλυτότητας (**S**) ορίζει τις **ζώνες υποκορεσμού** και **υπερκορεσμού** και καθορίζει την κατάσταση εξισορρόπησης μεταξύ κορεσμένης πρωτεΐνης και κρυσταλλωμένης πρωτεΐνης στο διάλυμα. Κάτω από την καμπύλη κορεσμού η πρωτεΐνη δεν πρόκειται ποτέ να κρυσταλλωθεί (υποκορεσμός), ενώ πάνω από την καμπύλη διαλυτότητας η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι υψηλότερη από την συγκέντρωση εξισορρόπησης για δεδομένη συγκέντρωση ηλεκτρολύτη (υπερκορεσμός) και υποδιαιρείται σε τρεις άλλες ζώνες:

# Διαγράμματα διαλυτότητας



Πάνω από την καμπύλη διαλυτότητας η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι υψηλότερη από την συγκέντρωση εξισορρόπησης για δεδομένη συγκέντρωση ηλεκτρολύτη (υπερκορεσμός) και υποδιαιρείται σε τρεις άλλες ζώνες:

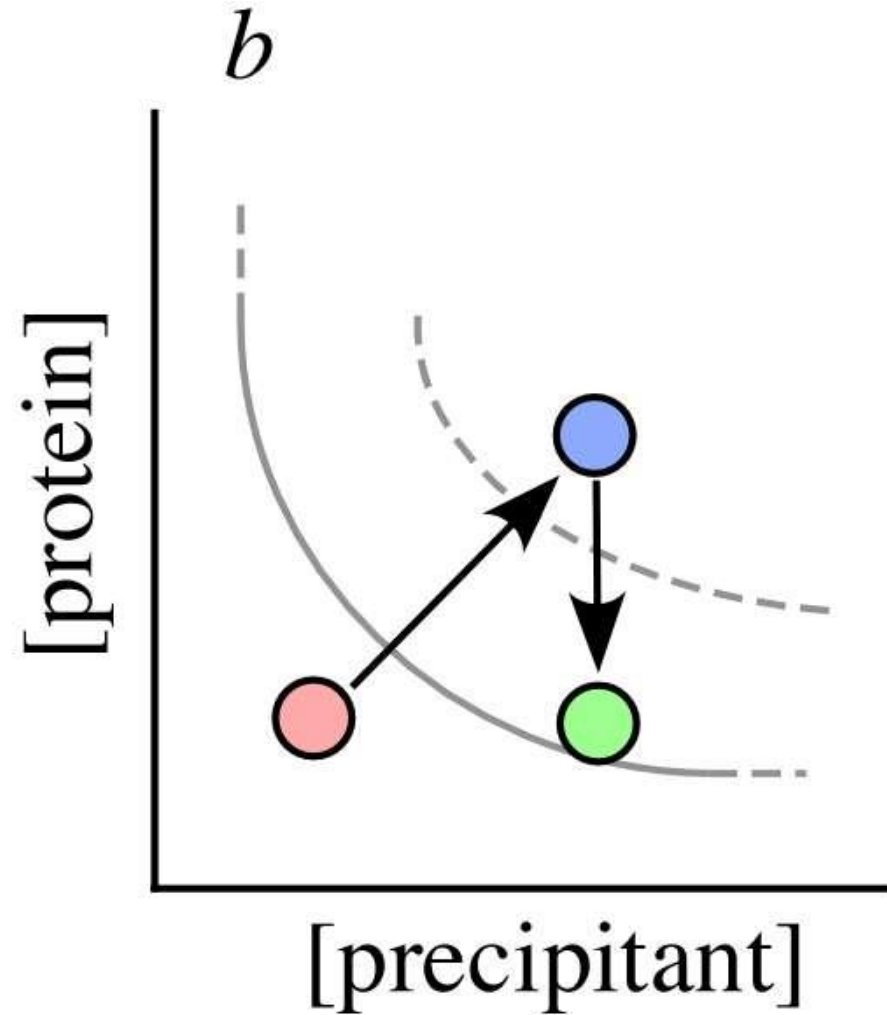
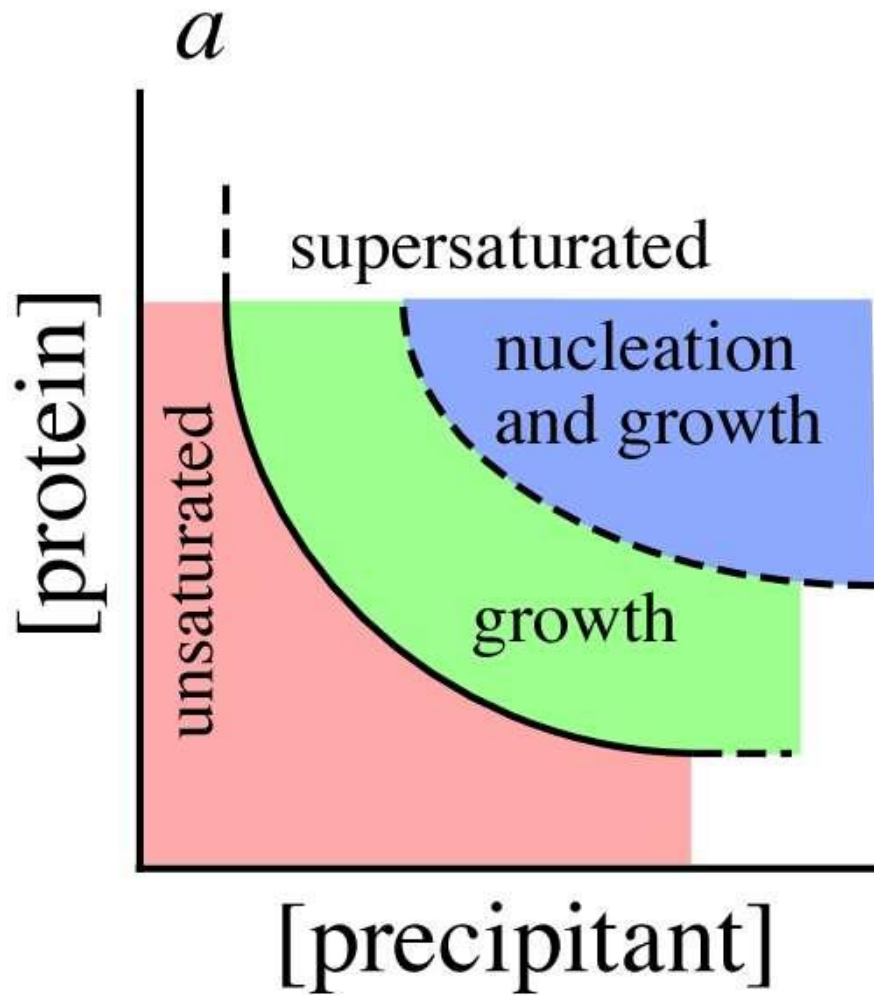
**Ζώνη κατακρήμνισης:** η πρωτεΐνη μετατρέπεται σε άμορφη μάζα.

**Ζώνη πυρήνωσης (πυρήνες κρυστάλλωσης)**

Πυρήνες κρυστάλλωσης ονομάζονται οι πιο μικρές οργανωμένες μορφές πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και σχηματίζονται στην περιοχή όπου η περίσσεια της πρωτεΐνης παίρνει κρυσταλλική μορφή.

Κοντά στην ζώνη κατακρήμνισης βρίσκεται πλήθος μικροκρυστάλλων οι οποίοι μπορούν να μπερδευτούν με το άμορφο ίζημα πρωτεΐνης. Η εύρεση της ζώνης πυρήνωσης αποτελεί πρωταρχικό σκοπό των πειραμάτων κρυστάλλωσης.

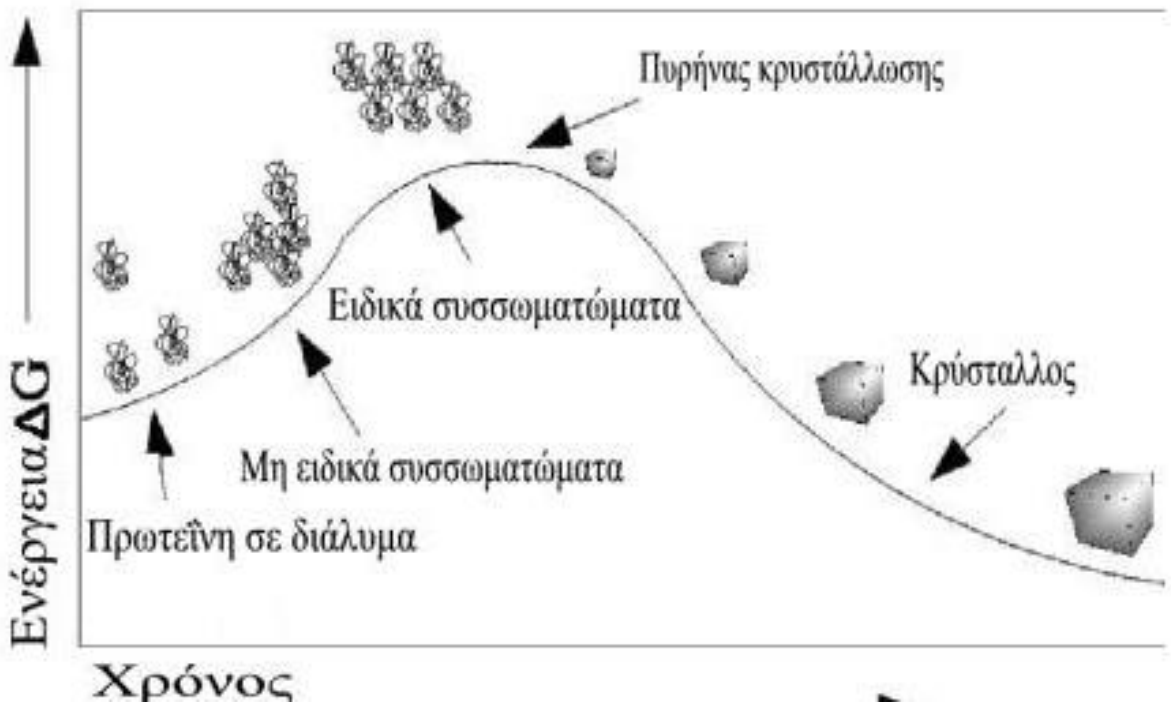
# Διαγράμματα διαλυτότητας



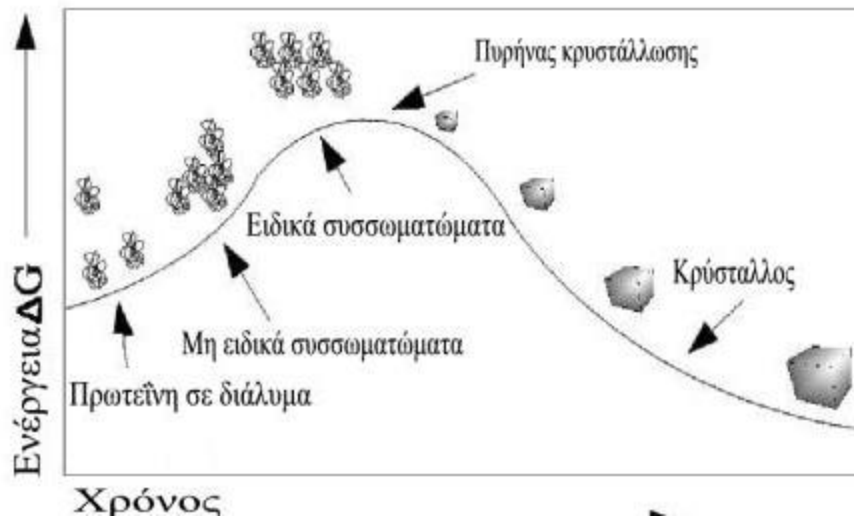
**Μετασταθερή ζώνη (αύξηση κρυστάλλων):** ένα υπέρκορο διάλυμα πρωτεΐνης μπορεί να μην δημιουργεί πυρήνες κρυστάλλωσης για μακρύ χρονικό διάστημα, εκτός αν βοηθηθεί μηχανικά. Η ζώνη αυτή αντιστοιχεί ιδανικά στην αύξηση κρυστάλλων από πυρήνες κρυστάλλωσης που προϋπάρχουν χωρίς την δημιουργία νέων.

# Σχεδιασμός Κρυστάλλωσης

Για την κρυσταλλογραφική μελέτη μίας πρωτεΐνης απαιτούνται μεγάλοι και καλοσχηματισμένοι κρύσταλλοι, γι αυτό σε πρώτη φάση πρέπει να δημιουργηθούν πυρήνες κρυστάλλωσης και να αφεθούν στην μετασταθερή ζώνη για να μεγαλώσουν. Αυτό προϋποθέτει ότι η πρωτεΐνη θα υπερβεί ένα φράγμα ενέργειας προκειμένου να μπορέσει να κρυσταλλώσει, ανάλογο με αυτό των τυπικών χημικών αντιδράσεων, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



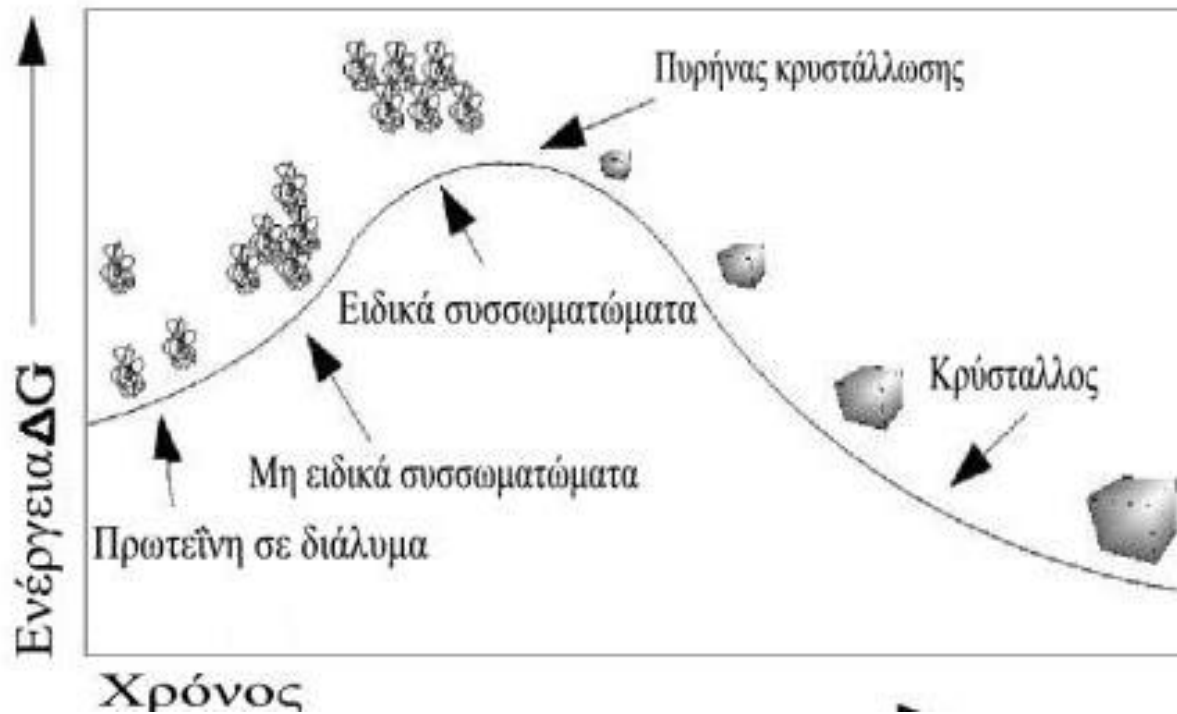
## Σχεδιασμός Κρυστάλλωσης



Δηλαδή το διάλυμα της πρωτεΐνης πρέπει να περάσει **από την διαλυτή φάση στην ζώνη πυρήνωσης και να παραμείνει εκεί για σύντομο χρονικό διάστημα** έτσι ώστε να μην δημιουργηθούν πολλοί πυρήνες κρυστάλλωσης που οδηγούν σε πολλούς και μικρότερου όγκου κρυστάλλους. (Η αύξηση του όγκου των κρυστάλλων σε διάλυμα με πολλούς πυρήνες κρυστάλλωσης οδηγεί σε επικαλύψεις κρυσταλλικών πλεγμάτων, άρα σε κακοσχηματισμένους κρυστάλλους).

Στην συνέχεια, το πρωτεϊνικό διάλυμα όταν μεταπέσει **στην μετασταθερή ζώνη, οι πυρήνες θα συνεχίσουν να μεγαλώνουν και θα δώσουν καλοσχηματισμένους κρυστάλλους**. Όσο οι κρύσταλλοι μεγαλώνουν τόσο η συγκέντρωση της διαλελυμένης πρωτεΐνης μικραίνει, με αποτέλεσμα η μετασταθερή ζώνη να μετατοπίζεται. Έτσι κυριότερο μέλημα στα πειράματα κρυστάλλωσης είναι η δημιουργία συνθηκών συνεχούς παρακολούθησης της μετασταθερής ζώνης.

## Σχεδιασμός Κρυστάλλωσης



Επομένως, ο **τρόπος ελάττωσης της διαλυτότητας της πρωτεΐνης στο διάλυμα, πρέπει να είναι ελεγχόμενος**. Ταχεία ελάττωση της διαλυτότητας οδηγεί σε άμορφα ιζήματα, γι αυτό η προσέγγιση του σημείου υπερκορεσμού γίνεται αργά, αλλάζοντας βαθμιαία παράγοντες όπως η συγκέντρωση, η ιοντική ισχύς, το pH, ή η διηλεκτρική σταθερά του πρωτεϊνικού διαλύματος.

Συγκέντρωση πρωτεΐνης: πολλές πρωτεΐνες έχουν κρυσταλλωθεί από διαλύματα που περιέχουν ένα έως εκατοντάδες mg/ml πρωτεΐνης. Ωστόσο για πειραματικές δοκιμές είναι επιθυμητή συγκέντρωση 10-20 mg/ml, εάν αυτό είναι δυνατόν.

Ιοντική ισχύς: η ιοντική ατμόσφαιρα μεταβάλλει την διαλυτότητα των πρωτεϊνών μέσω των φαινομένων:

Salting in: οι πρωτεΐνες είναι πιο διαλυτές παρουσία μικρής ποσότητας ηλεκτρολύτη παρά σε καθαρό νερό καθώς τα ιόντα του ηλεκτρολύτη δεσμεύονται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και αυξάνουν την υδροφιλικότητά της. Σ' αυτή την περίπτωση η πρωτεΐνη μπορεί να κρυσταλλωθεί ελαττώνοντας την συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη (άλατος).

Salting out: εάν ένας ισχυρός ηλεκτρολύτης (πχ θειικό αμμώνιο) προστεθεί στο διάλυμα της πρωτεΐνης, (όπου η διαλυτότητά του είναι μεγαλύτερη από αυτήν της πρωτεΐνης), αυξάνεται ο ανταγωνισμός των ιόντων για τα μόρια του νερού τόσο μεταξύ τους όσο και με τα μόρια της πρωτεΐνης και έτσι απομακρύνονται μόρια νερού από το διάλυμα της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να μειώνεται η διαλυτότητά της.

pH: Το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης μπορεί να μεταβληθεί με την μεταβολή των πρωτονίων, αλλάζοντας το pH ή με την δέσμευση ιόντων σε πολικές ομάδες της πρωτεΐνης. Όσο μεγαλύτερο καθαρό φορτίο έχει η πρωτεΐνη τόσο πιο ευδιάλυτη είναι, ενώ όταν έχει καθαρό φορτίο μηδέν βρίσκεται στο σημείο ελάχιστης διαλυτότητας. Αυτό συμβαίνει όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στο ισοηλεκτρικό της σημείο (pI). Το pH είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για την κρυστάλλωση και απαιτεί την χρήση κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων.

Θερμοκρασία: η διαλυτότητα της πρωτεΐνης έχει άμεση εξάρτηση από την θερμοκρασία, αλλά ποικίλει σημαντικά από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη σε συνδυασμό με την ιοντική ισχύ, την παρουσία οργανικών διαλυτών και τις ειδικότερες πειραματικές συνθήκες. Οι δοκιμασίες γίνονται σε θερμοκρασία ψυγείου (4-6 °C) είτε σε σταθερή θερμοκρασία δωματίου (17-24 °C).

Οργανικοί-μη πολικοί διαλύτες: διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι η αιθανόλη ή η πεντανοδιόλη σε ανάμειξη με υδατικό διάλυμα και ελαττώνουν την διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Δεσμεύονται σε πολικές ομάδες της επιφάνειας της πρωτεΐνης, έτσι ώστε να φαίνεται λιγότερο πολική, ή απλώς ελαττώνουν τον αποτελεσματικό αριθμό πολικών ομάδων του διαλύτη.

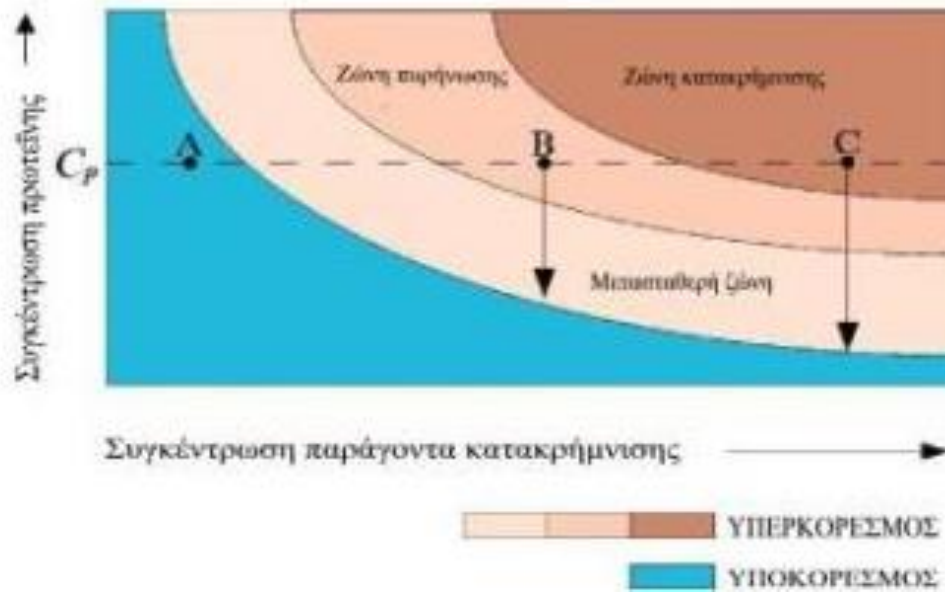
# Τεχνικές Κρυστάλλωσης

## Τεχνική (Batch) ή άμεσης προσθήκης του παράγοντα κατακρήμνιση

Είναι η κλασική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για κρυστάλλωση ενζύμων. (επιτυχής παραγωγή μεγάλων κρυστάλλων λυσοζύμης, ριβονουκλεάσης και ένζυμα της οικογένειας των θρυψινών). Η πρωτεΐνη διαλύεται σε χαμηλή ιοντική ισχύ για να δώσει διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης. Ο παράγοντας κατακρήμνιση (αλάτι ή οργανικός διαλύτης) προστίθεται στην συνέχεια έτσι ώστε να φέρει το διάλυμα σε κατάσταση υπερκορεσμού. Αφού παραμείνει για ώρες ή μέρες εμφανίζονται οι κρύσταλλοι. Όταν οι συνθήκες υπερκορεσμού δεν είναι γνωστές, ο παράγοντας κατακρήμνιση προστίθεται σε μικρές ποσότητες μέρα με την μέρα.

Μειονέκτημα της μεθόδου είναι η μικρή δυνατότητα ελέγχου της ανάπτυξης των κρυστάλλων και η απαίτηση μεγάλων ποσοτήτων πρωτεΐνης, είναι όμως χρήσιμη για πρωτεΐνες των οποίων ο ταχύτητας σχηματισμού πυρήνων και ανάπτυξης κρυστάλλων είναι χαμηλές όταν επιτευχθεί υπερκορεσμός, ή για εκείνες που δίνουν

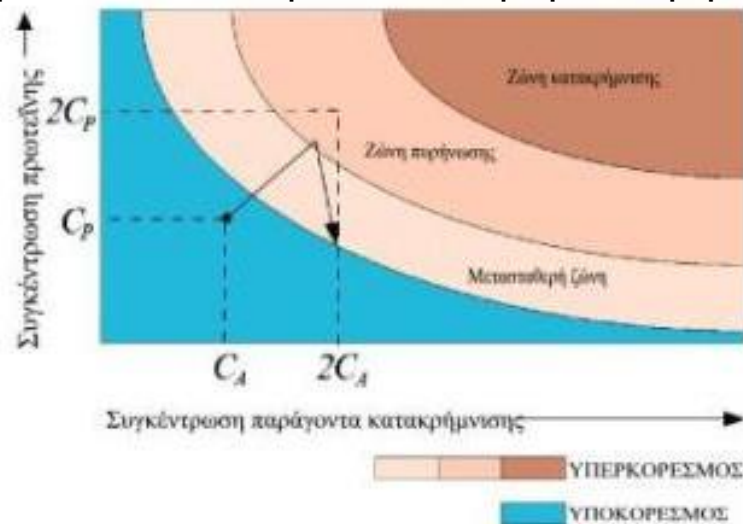
καλά σχηματισμένους κρυστάλλους ακόμα και σε υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης.



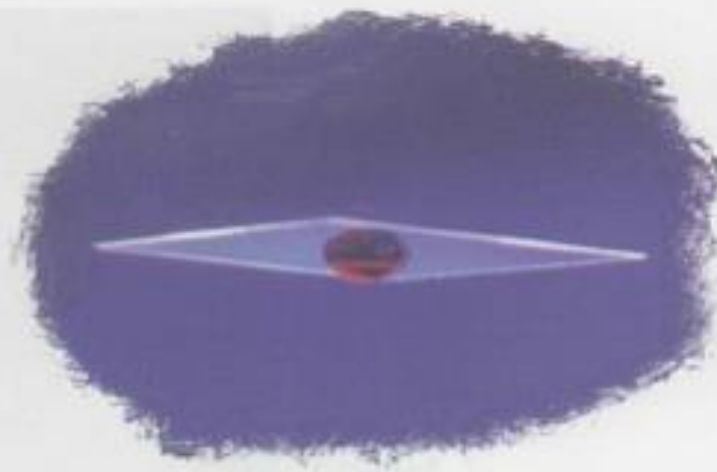


## Τεχνική εξάτμισης και διάχυσης των ατμών (Vapor diffusion)

Κλασσική μέθοδος για την κρυστάλλωση μικρότερων μορίων είναι η επίδραση στην αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος με την εξάτμιση του διαλύτη, αλλά δεν είναι κατάλληλη για πρωτεΐνες καθώς δεν ελέγχεται και προκαλεί κρυστάλλωση των αλάτων. Πιο ευαίσθητη τεχνική είναι ο έλεγχος της εξάτμισης με εξισορρόπηση από ένα πιο συγκεντρωμένο διάλυμα άλατος. Έτσι ένα διάλυμα πρωτεΐνης με συγκέντρωση άλατος 10% μικρότερη από αυτή που απαιτείται για κατακρήμνιση εξισορροπείται με διάχυση ατμών από ένα μεγάλο όγκο διαλύματος άλατος μεγαλύτερης συγκέντρωσης. Τα δύο διαλύματα βρίσκονται σε ανοιχτά δοχεία μέσα σε ένα μεγαλύτερο καλά κλεισμένο δοχείο. Το διάλυμα μεταφέρεται σταδιακά μέσω της φάσης των ατμών από το πρωτεϊνικό διάλυμα στο πιο συγκεντρωμένο διάλυμα άλατος έως ότου επέλθει ισορροπία και οι κρύσταλλοι σχηματίζονται καθώς το πρωτεϊνικό διάλυμα αποκτά μεγαλύτερη συγκέντρωση.



Εναλλακτική μέθοδος διάχυσης των ατμών είναι αυτή της '**κρεμάμενης σταγόνας**' (**hanging drop**). Η αρχή της μεθόδου είναι η ίδια και ο τρόπος εκτέλεσης αναφέρεται στο πρακτικό μέρος. Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι οι μικρές ποσότητες πρωτεΐνης που απαιτούνται, η εύκολη παρακολούθηση της πορείας κρυστάλλωσης, η απλότητα και το χαμηλό κόστος. Είναι ευρέως διαδεδομένη και ιδιαίτερα αποτελεσματική στην παραγωγή κρυστάλλων.

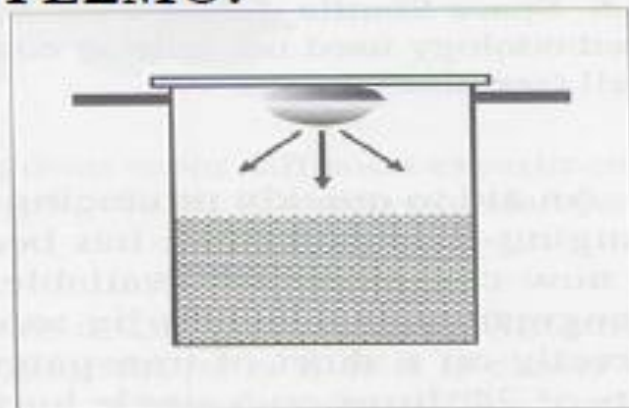
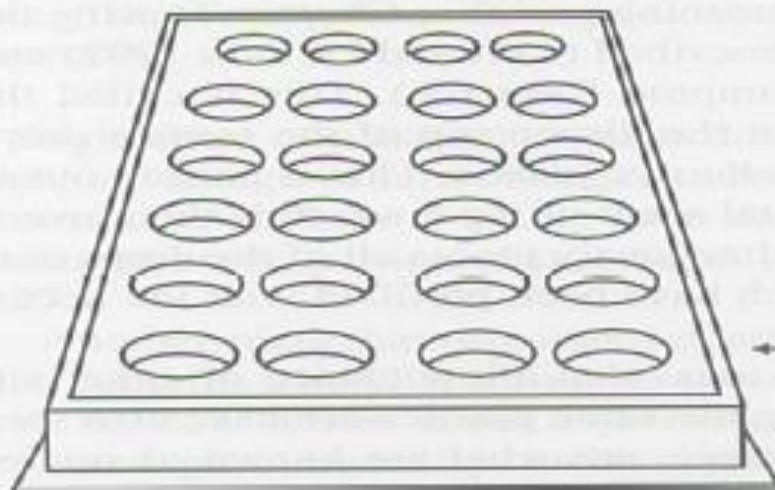


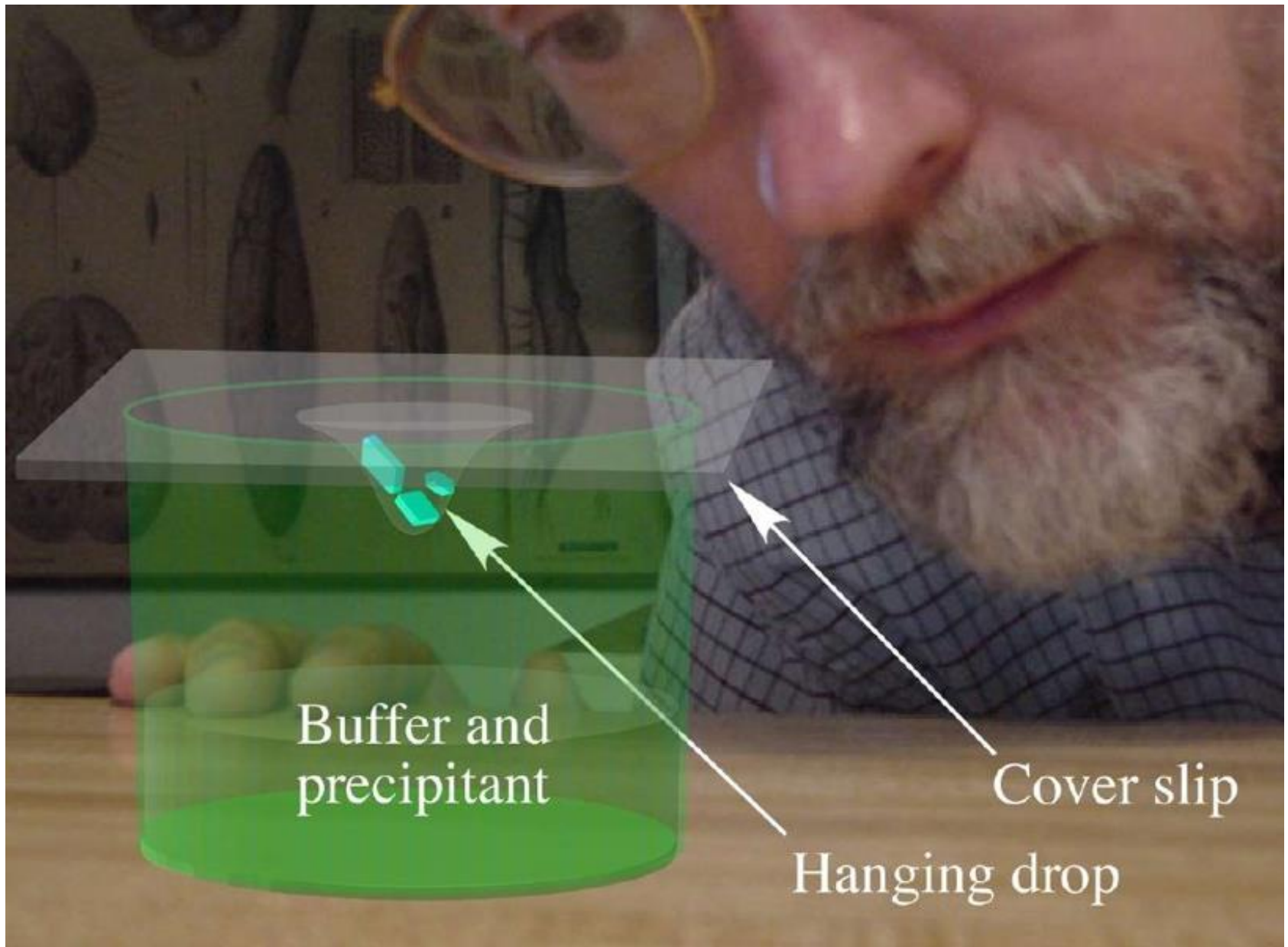
A

B

Figure 5.23. (A) Photograph of a vapor diffusion hanging-drop experiment over the well of a VDX plate. (B) A close-up of the hanging drop on the coverslip. (Courtesy of Hampton Research.)

## ΕΠΙΤΥΓΧΑΝΟΝΤΑΣ ΤΟΝ ΥΠΕΡΚΟΡΕΣΜΟ: ΔΙΑΧΥΣΗ ΑΤΜΩΝ



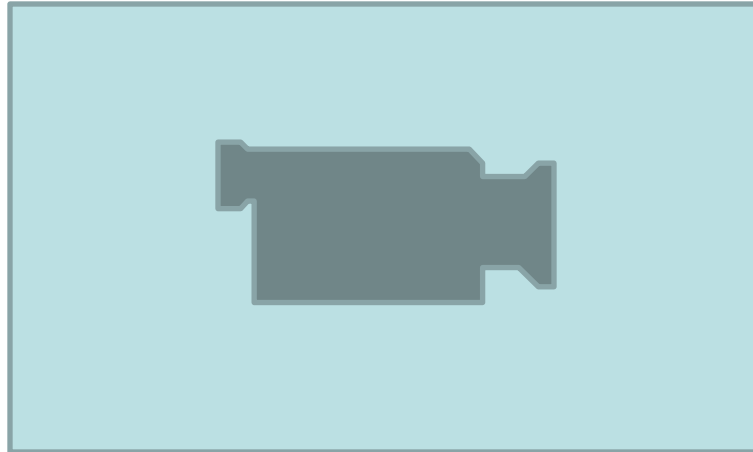


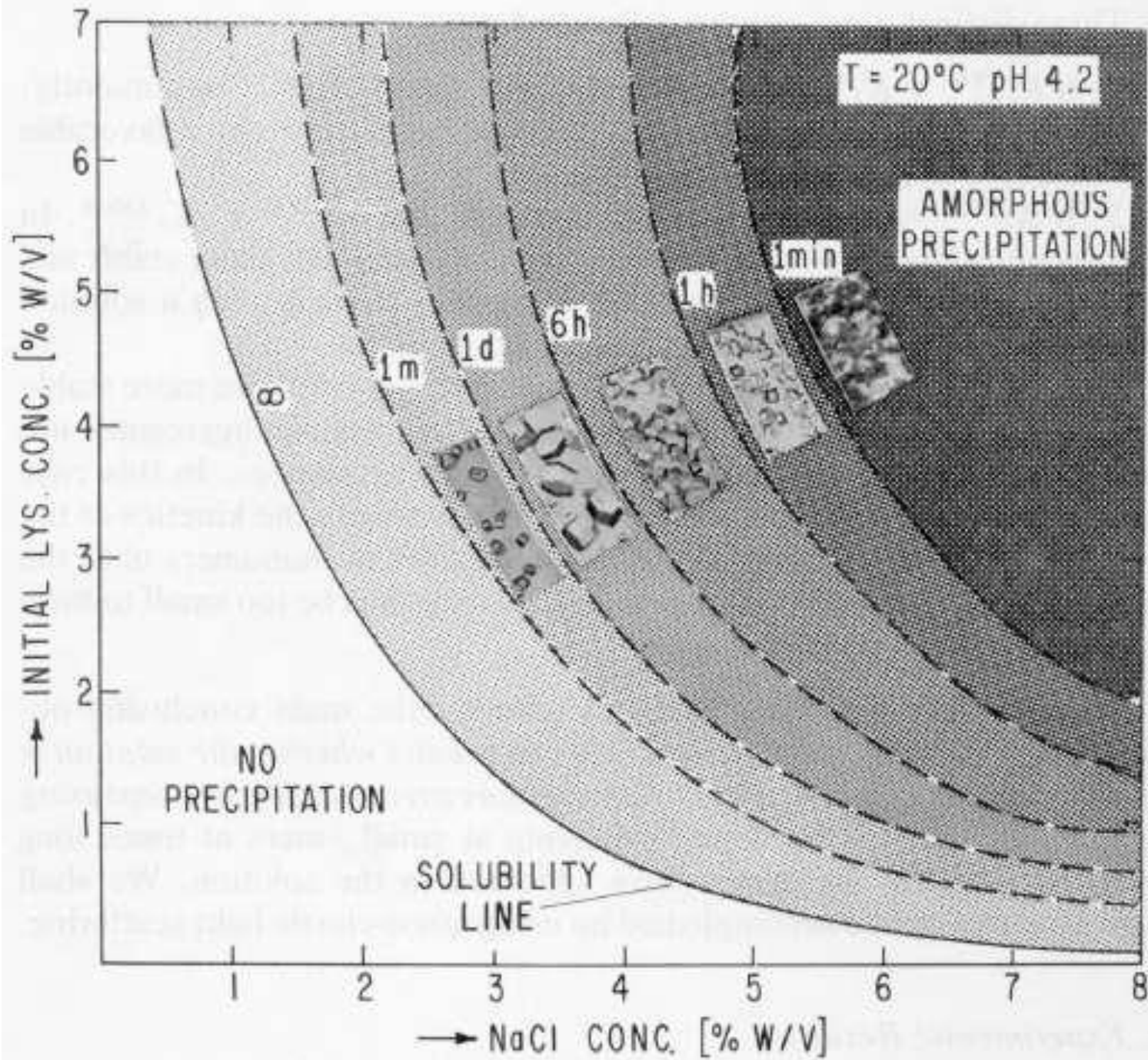
Buffer and  
precipitant

Cover slip

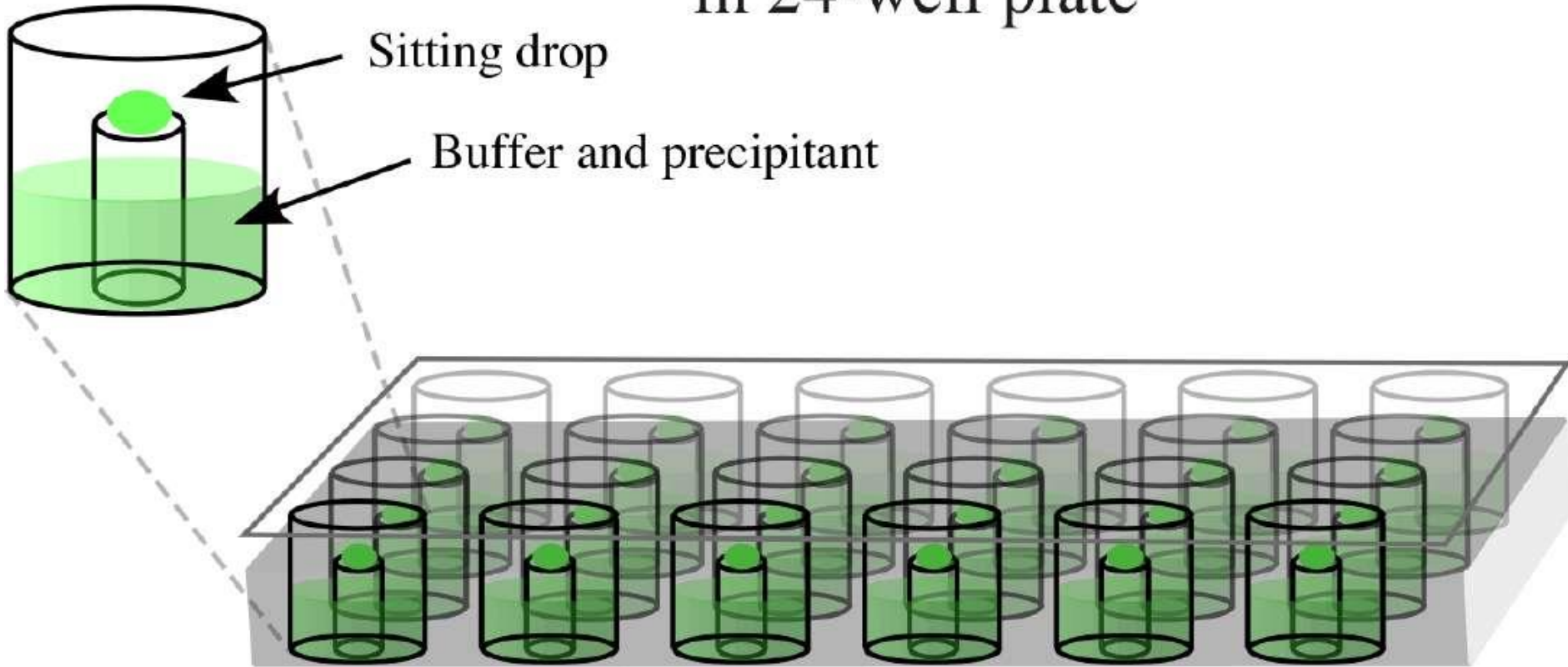
Hanging drop

# Lysozyme crystal growth



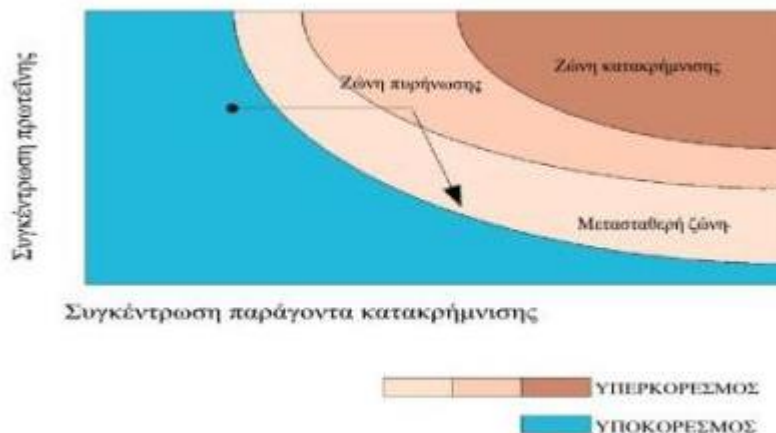


# Sitting drops in 24-well plate



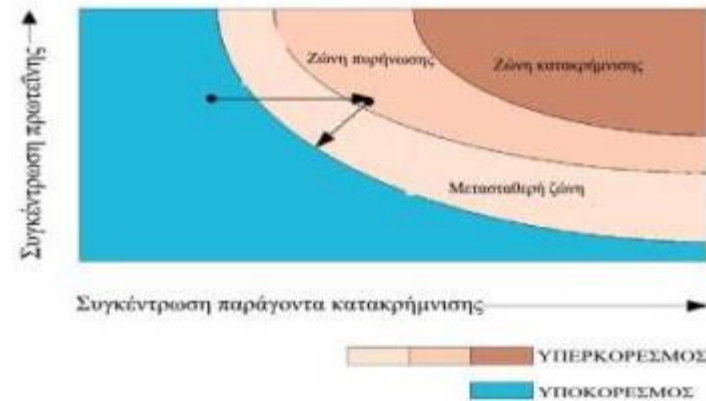
## Διαπίδυση (Dialysis)

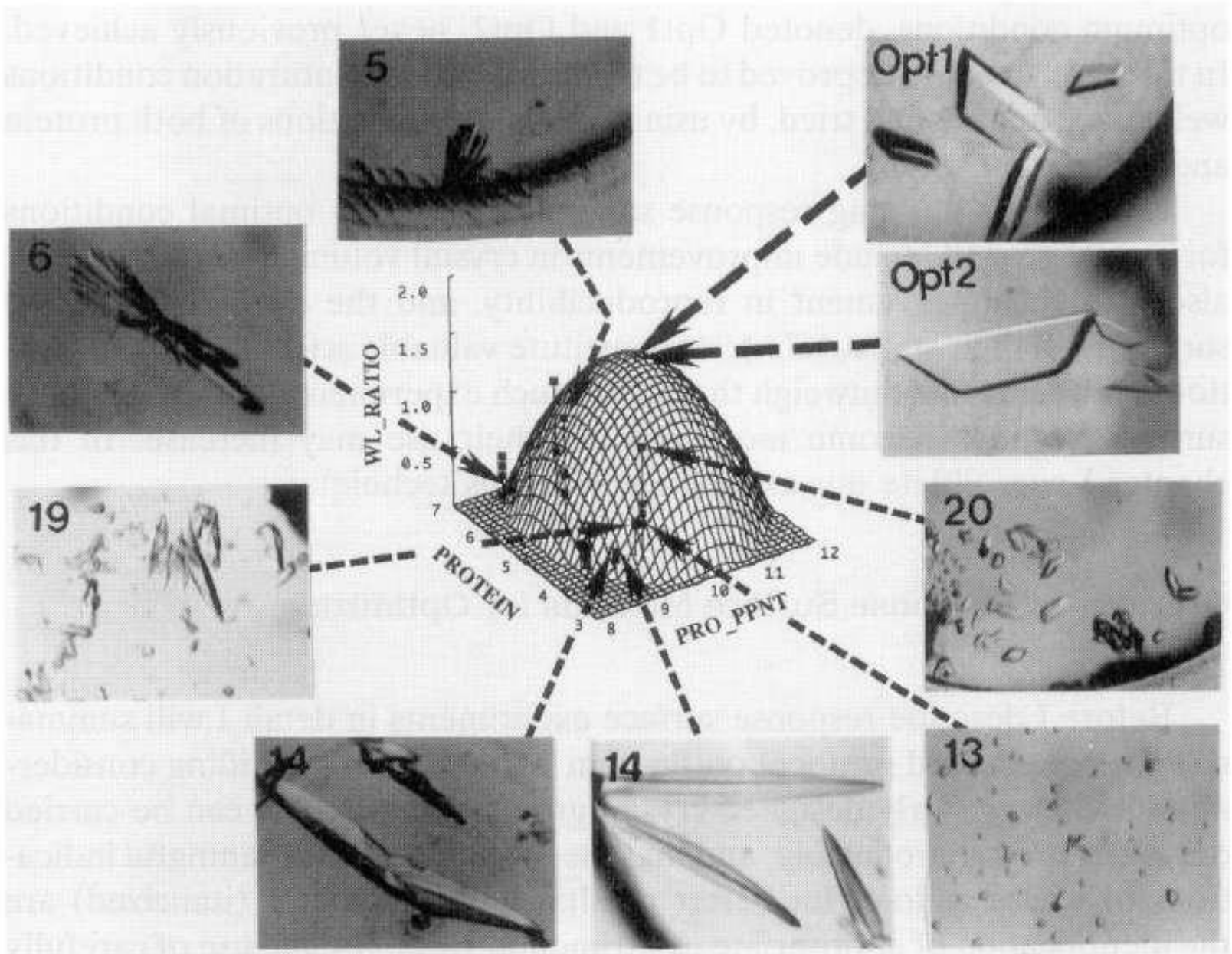
Μια μεμβράνη διαπίδυσης είναι ένα ημιπερατό διάφραγμα που επιτρέπει στον διαλύτη και σε μικρά ιόντα να εξισορροπηθούν, αλλά δεν διαπερνάται από τα μόρια της πρωτεΐνης. Τέτοιες μεμβράνες παράγονται από σελοφάν ή κυτταρίνη και έχουν πόρους διαφορετικών διαστάσεων, που κάθε φορά επιλέγονται με κριτήριο το μέγεθος της πρωτεΐνης που θα διαχωριστεί. Η ιοντική ισχύς και το pH του πρωτεϊνικού διαλύματος που περιέχεται σε μια τέτοια μεμβράνη ρυθμίζεται με εξισορρόπηση έναντι του ελεύθερου πρωτεϊνικού διαλύματος.



Όταν ο όγκος της διαθέσιμης πρωτεΐνης είναι μεγάλος π.χ 1ml, τότε μπορεί να τοποθετηθεί σε σάκο από μεμβράνη διαπίδυσης και να βυθιστεί σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Η κατάσταση υπερκορεσμού προσεγγίζεται αργά μεταβάλλοντας βαθμιαία τις συνθήκες του εξωτερικού ρυθμιστικού διαλύματος, έτσι ώστε ο σχηματισμός πυρήνων και η ανάπτυξη να μπορεί να ρυθμιστεί μέσω διάχυσης. Άμορφα ιζήματα ή μικροκρύσταλλοι μπορούν να επαναδιαλυτοποιηθούν με αλλαγή των εξωτερικών συνθηκών και να επαναληφθεί η δοκιμασία, (όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα διαλυτότητας)

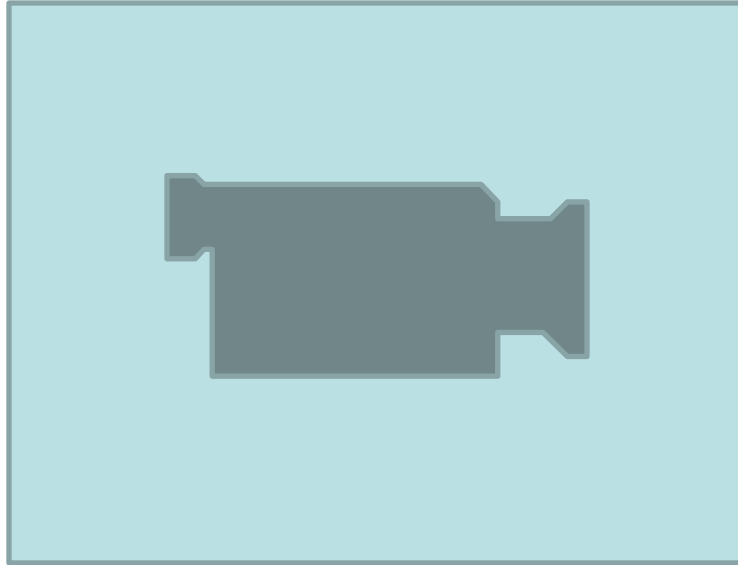
Η μέθοδος μπορεί να προσαρμοστεί για χρήση με μικρές ποσότητες πρωτεΐνης (microdialysis technique). Στην τεχνική της μικροδιαπίδυσης χρησιμοποιείται τριχοειδής σωλήνας αντί του σάκου, μέσα στον οποίο τοποθετείται το διάλυμα της πρωτεΐνης και το ελεύθερο άκρο του καλύπτεται από μικρό κομμάτι μεμβράνης διαπίδυσης. Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η δυσχερής παρατήρηση των κρυστάλλων που σχηματίζονται πάνω στην μεμβράνη και η δυσκολία απομάκρυνσης των κρυστάλλων όταν ο τριχοειδής σωλήνας έχει μικρή διάμετρο.



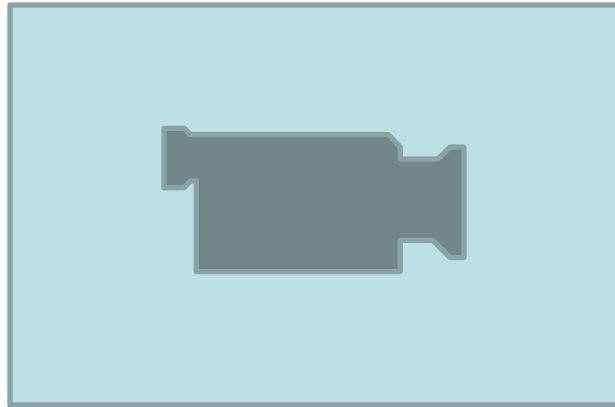




# International Space Station Protein Crystal Growth

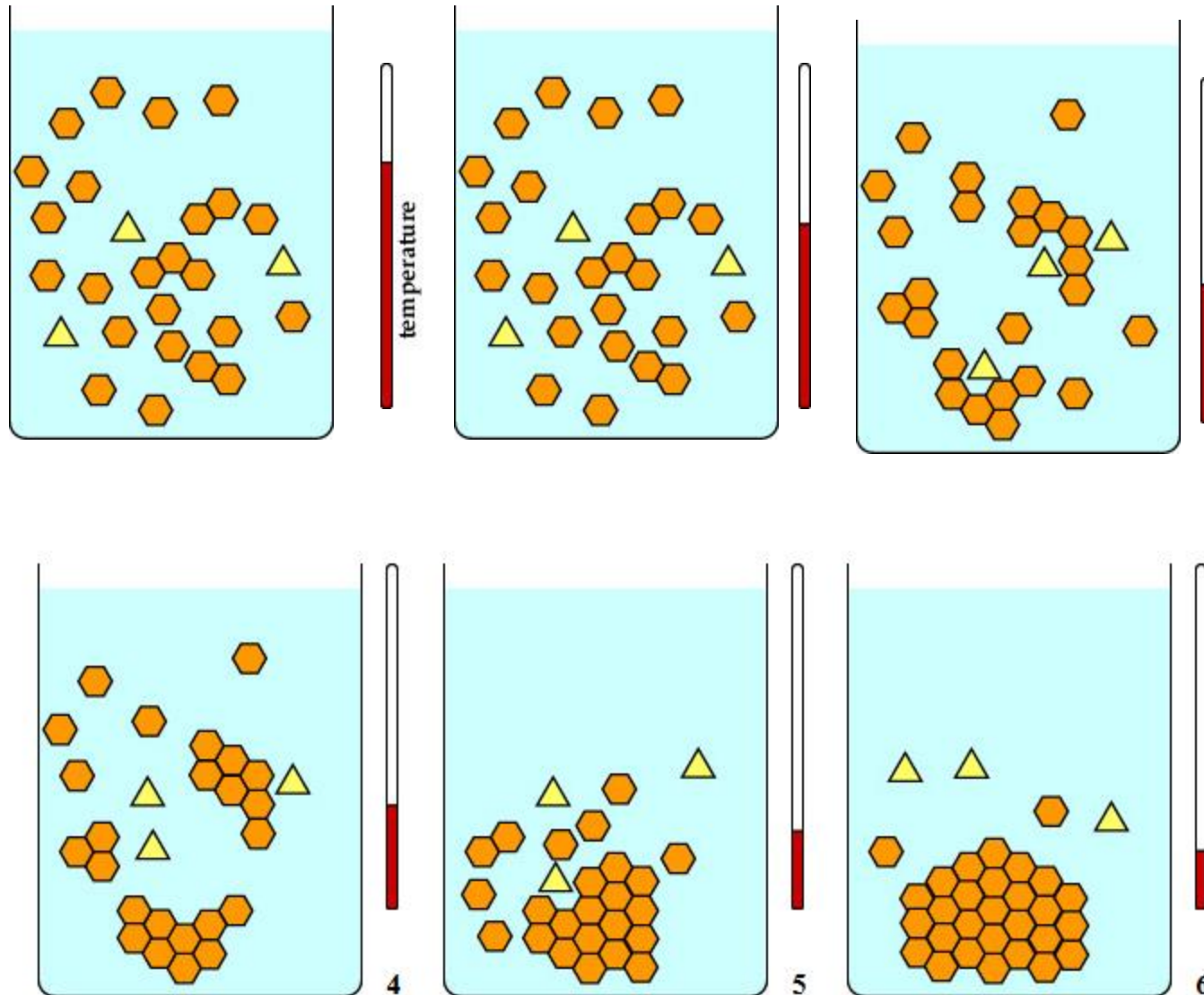


# Slow Cooling Crystallization



# Crystallization: Slow cooling vs rapid cooling

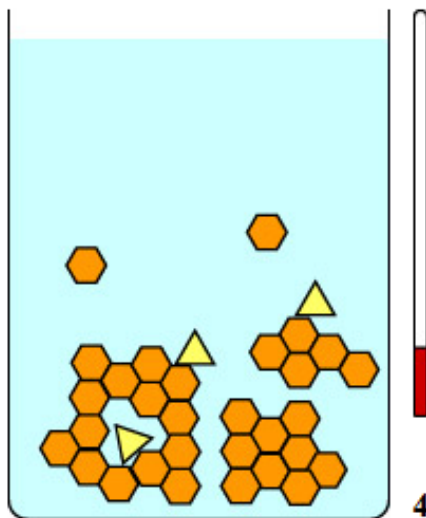
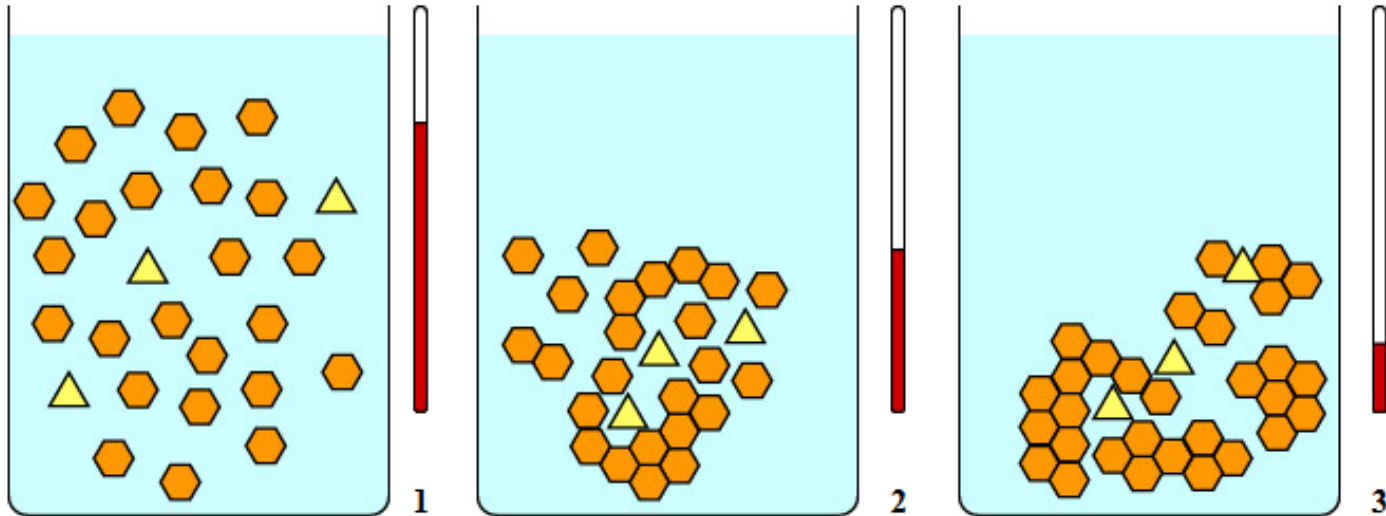
Crystallization proceed slowly



The yellow triangles are an impurity in the hot solution of orange hexagons. If the solution is allowed to cool slowly, the impurities may sit down briefly in the growing crystal lattice, but they soon leave as a compound with a more suitable geometry comes in to take their place. Suitable hexagons stay more readily in the growing lattice, and eventually pure crystals of orange hexagons are formed.

## Crystallization: Slow cooling vs rapid cooling

This second series of diagrams shows what happens if you cool the solution too quickly. The yellow triangle impurities are trapped inside the crystals being formed by the orange hexagons, thus, the crystals isolated are impure.



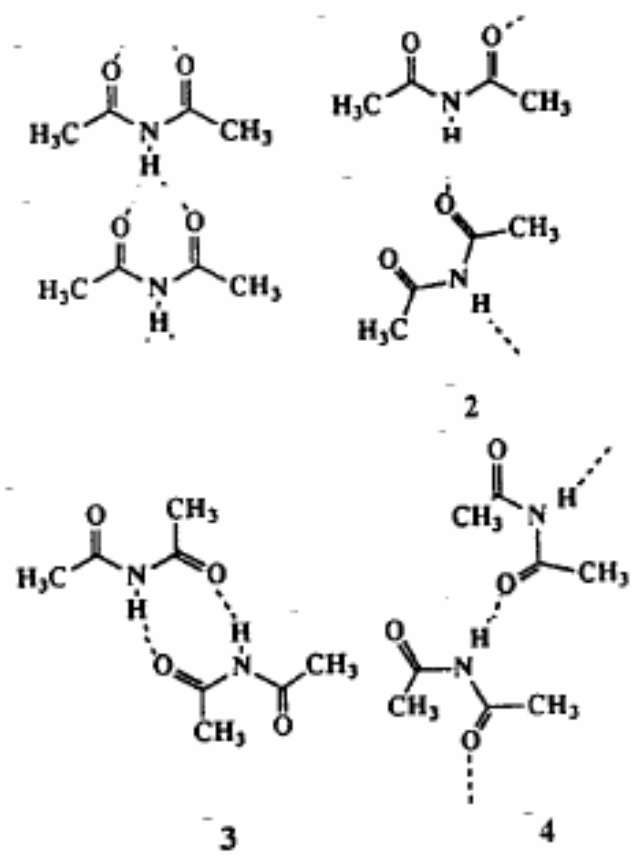
Note that slow crystallization gives larger crystals than this series of fast crystallization. Small crystals have a large surface area to volume ratio and impurities are located on the surface of the crystals as well as trapped inside the matrix.

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

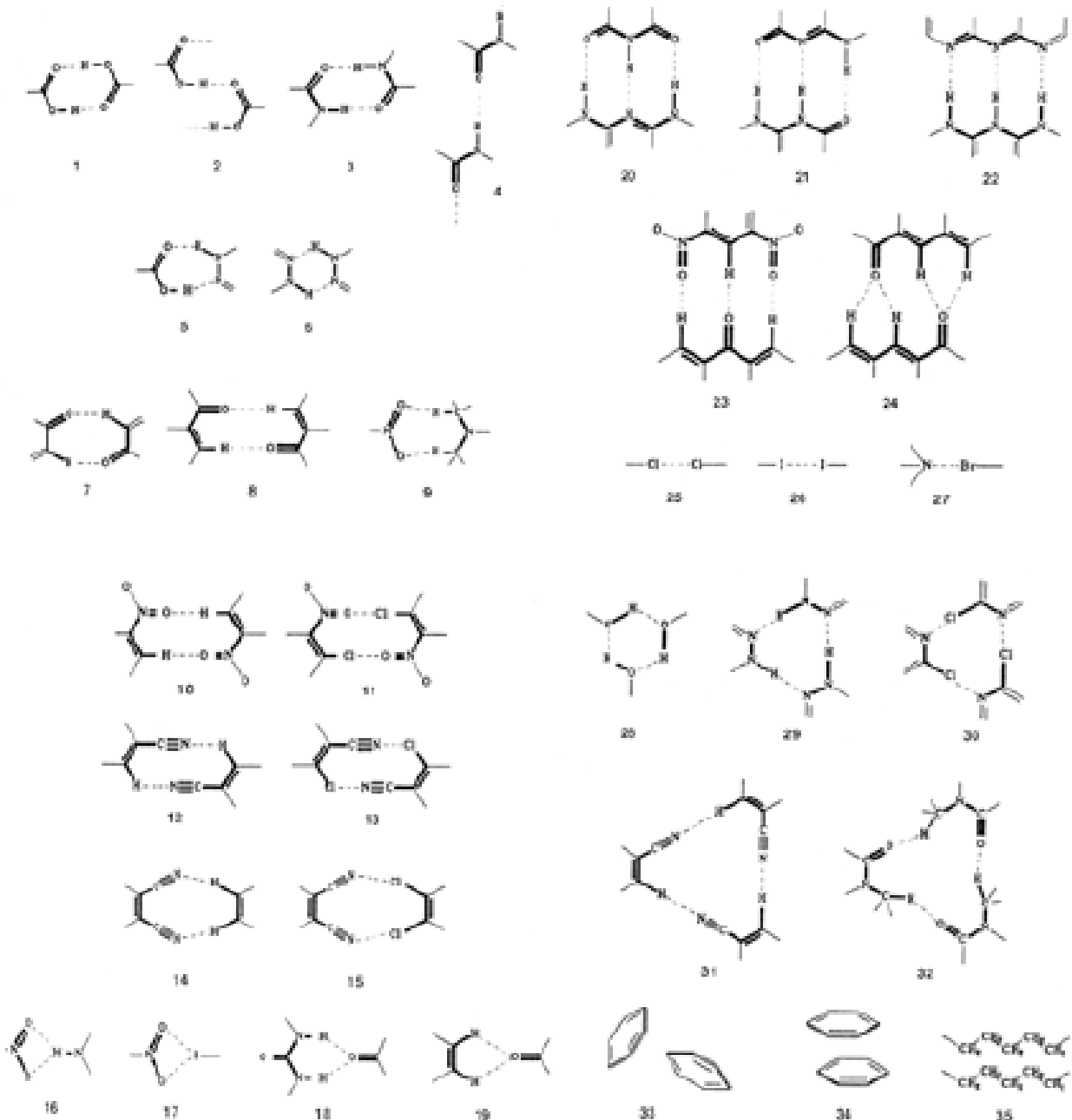
## H-bonding often plays an important role in determining crystal structures and thus the utility of encoding and decoding H-Bond patterns for crystal structure prediction

- General H-Bond “Rules” (M. C. Etter):
  - All good proton donors and acceptors are used in hydrogen bonding.
  - Six-membered-ring intramolecular hydrogen bonds form in preference to intermolecular hydrogen bonds.
  - The best proton donors and acceptors remaining after intramolecular hydrogen-bond formation form intermolecular hydrogen bonds to one another.

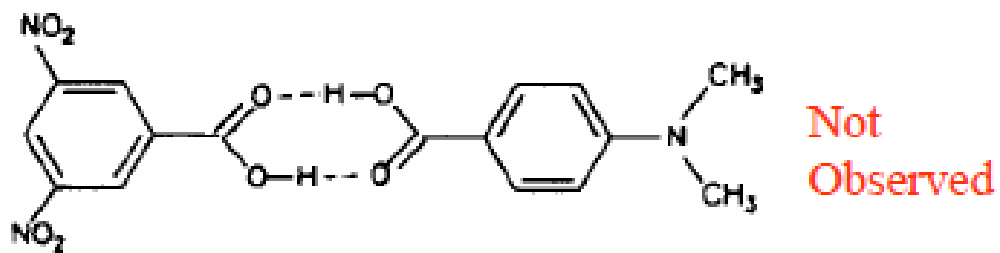
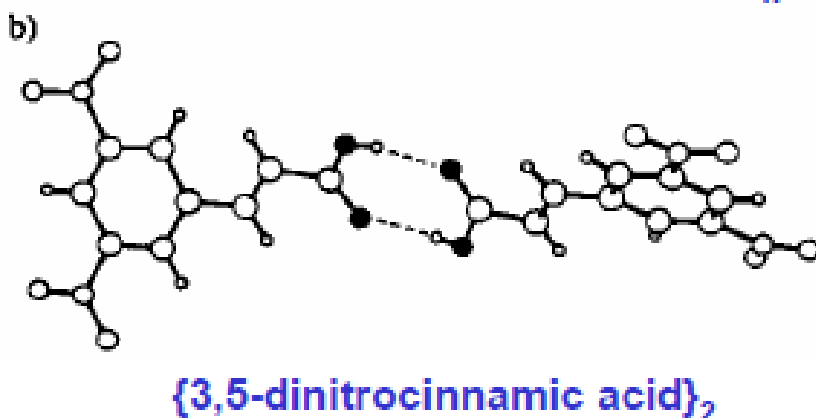
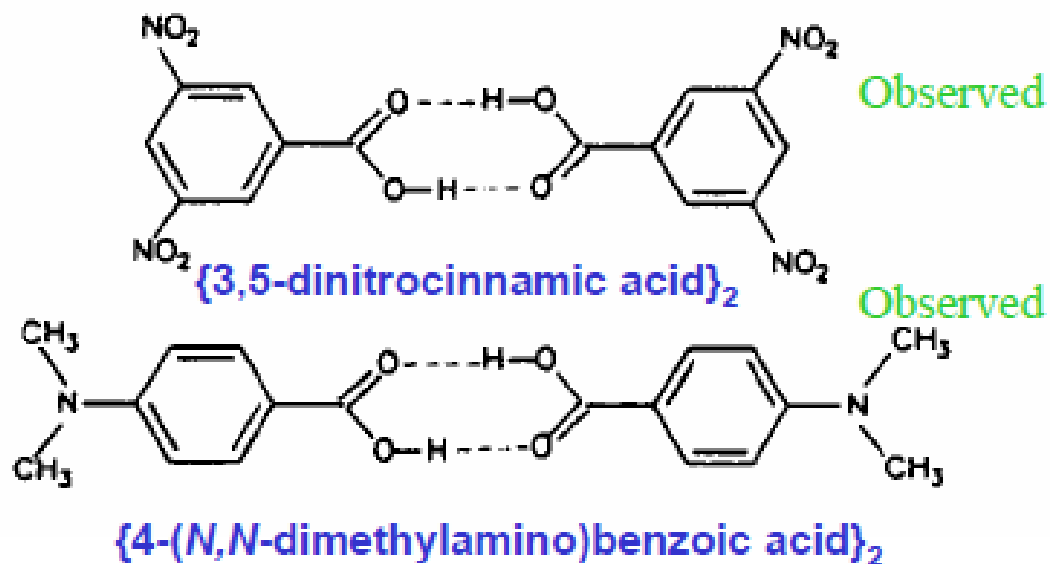
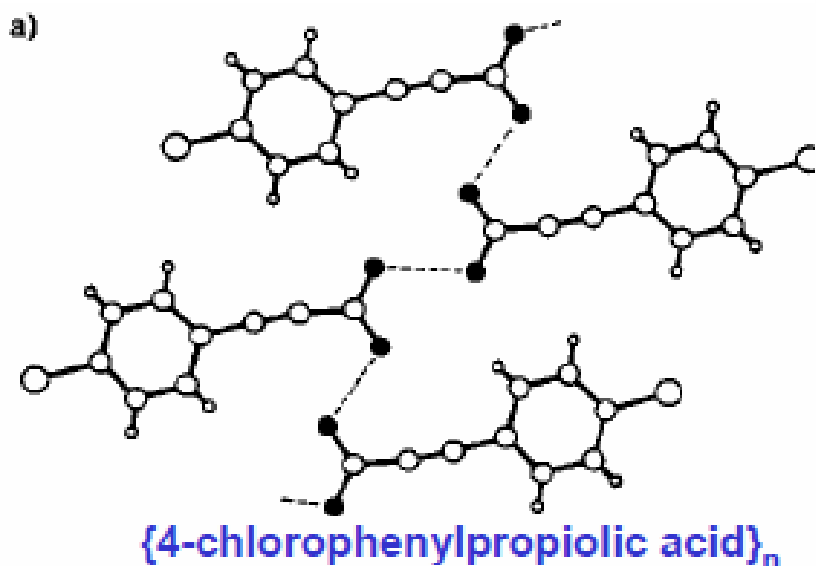
The prediction of H-bond patterns can be complicated, even for the simplest cases.



# Examples of Supramolecular Synthons

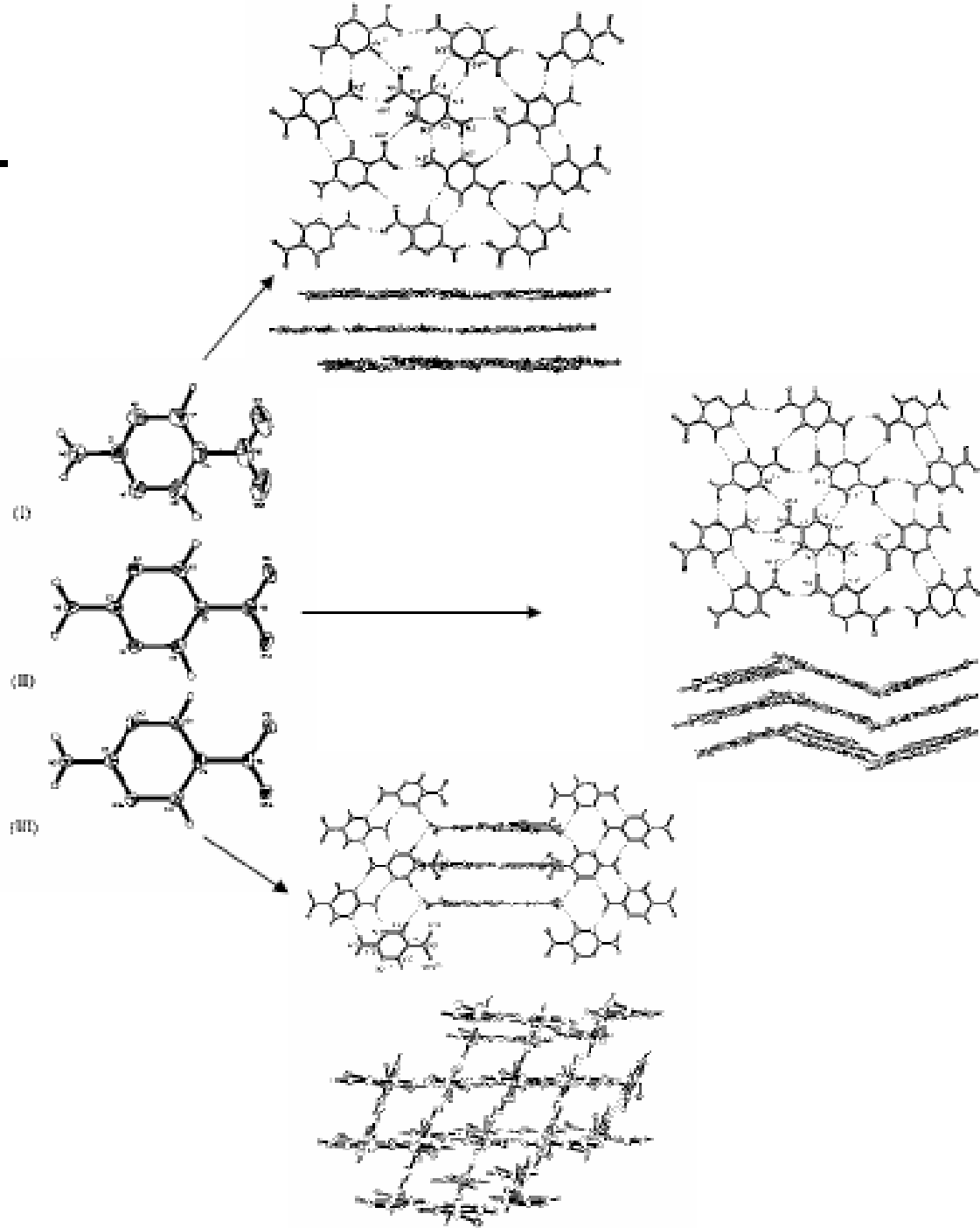
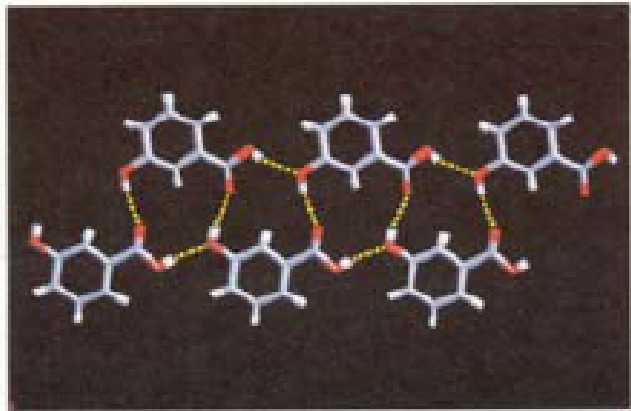
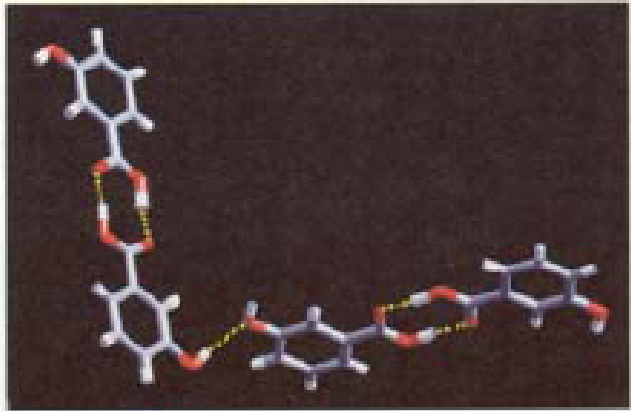


# Robustness of particular synthons: Interference of other synthons.





# Polymorphism



# Supramolecular Synthesis: Networks of Organic and Inorganic Molecules

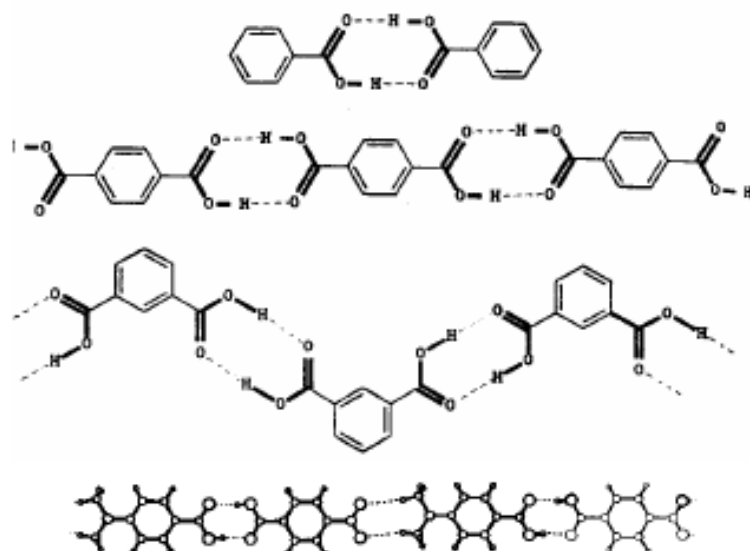
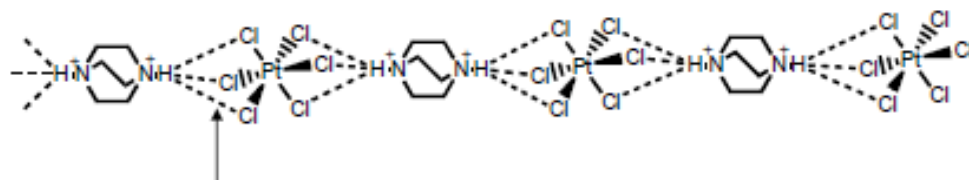


Figure 3 O—H...O and C—H...O dimers in the crystal structure of the 1:1 complex 4-(*N,N*-dimethylamino)benzoic acid–4-nitrobenzoic acid (source: Sharma *et al.*<sup>19</sup>).

- Dimers
- Chains:
  - Linear
  - Zig-zag
  - Combination of Synthons

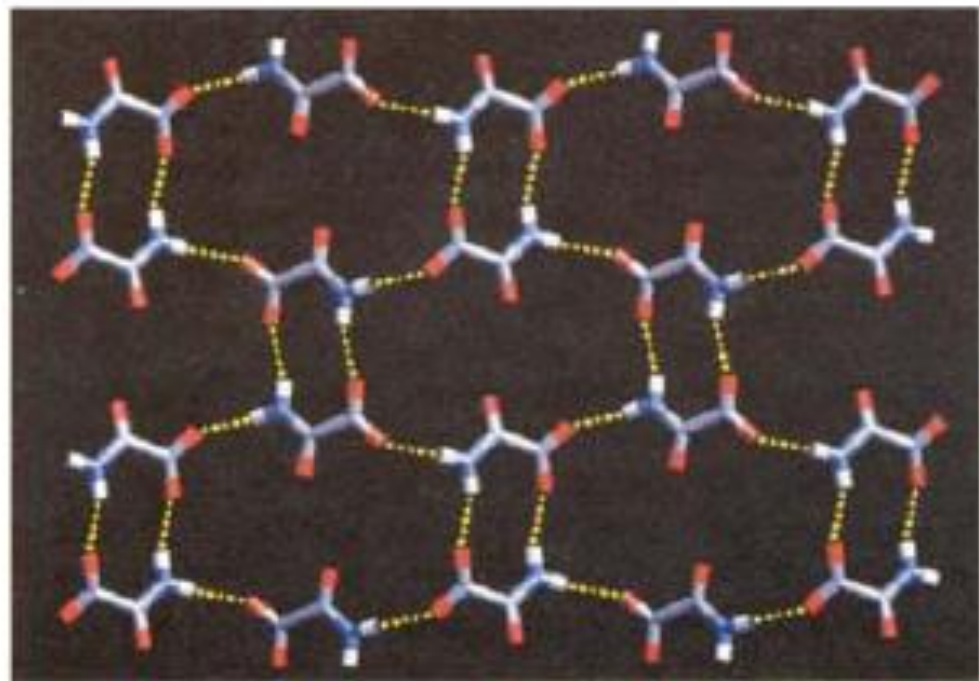
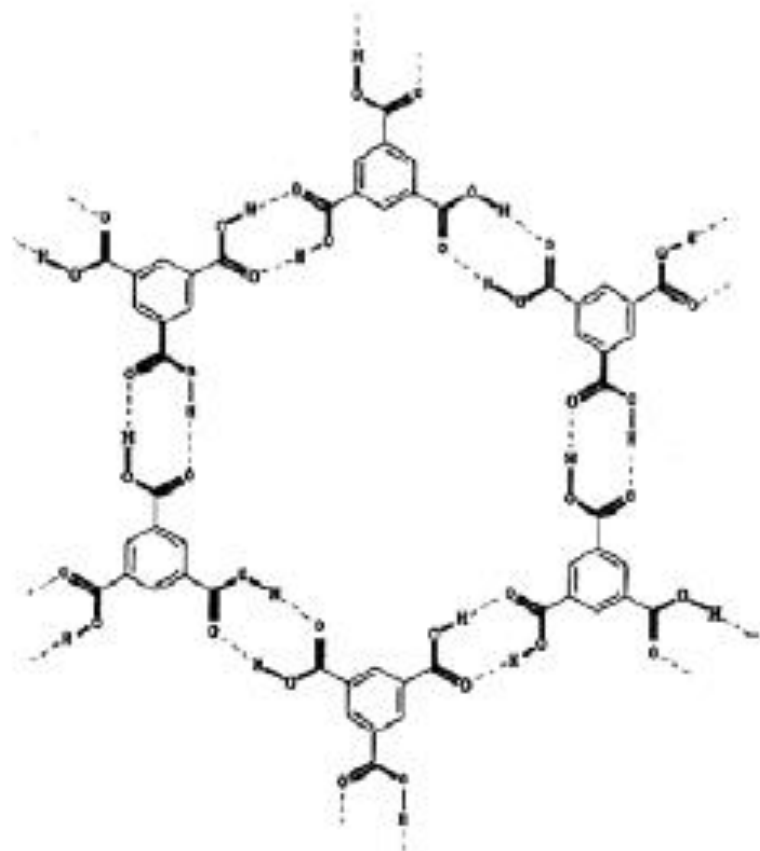


– Inorganic Synthons

**Co-operation leading to a robust synthon.**

## Cross-linking chains: 2D crystal design

---



# Cocrystals

