



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ  
ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)  
«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

Δομική και βιοχημική μελέτη βιολογικών μακρομορίων με στόχο την  
βελτιστοποίηση φαρμακευτικών σκευασμάτων

Καφετζή Σταματίνα

Α.Μ. 60

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025







**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ  
ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)  
«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

Δομική και βιοχημική μελέτη βιολογικών μακρομορίων με στόχο την  
βελτιστοποίηση φαρμακευτικών σκευασμάτων

Καφετζή Σταματίνα  
Α.Μ. 60

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025



**Εισαγωγή στο ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)**  
**«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**  
**της κ. Καφετζή Σταματίνας**

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Δρ. Μαργιωλάκη Ειρήνη

Θέμα: «Δομική και βιοχημική μελέτη βιολογικών μακρομορίων με στόχο την βελτιστοποίηση φαρμακευτικών σκευασμάτων»

Ορισμός Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής από την Επιτροπή Προγράμματος Σπουδών (ΕΠΣ):...<sup>Α</sup>/...-...-....

1. Δρ. Μαργιωλάκη Ειρήνη, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών
2. Δρ. Σταματάτος Θεοχάρης, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών
3. Δρ. Περλεπές Σπυρίδων, Ομότιμος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις \_\_\_\_\_

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.  
Καθηγητής Σωτήριος Χατζηκακού

Ο/Η Γραμματέας

\_\_\_\_\_

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας

Καφετζή Σταματίνα

©2025 – Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος

Η Επιβλέπουσα Καθηγήτρια  
**Μαργιωλάκη Ειρήνη**  
Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας

Τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

**Μαργιωλάκη Ειρήνη**  
Καθηγήτρια,  
Τμήμα Βιολογίας  
Πανεπιστήμιο Πατρών

**Σταματάτος Θεοχάρης**  
Καθηγητής,  
Τμήμα Χημείας  
Πανεπιστήμιο Πατρών

**Περλεπές Σπυρίδων**  
Ομότιμος Καθηγητής,  
Τμήμα Χημείας  
Πανεπιστήμιο Πατρών

# Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στην ερευνητική ομάδα Βιοχημείας, Δομικής Βιολογίας και Κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X, στο Πανεπιστήμιο Πατρών υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κυρίας Μαργιωλάκη Ειρήνης.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω, ολόψυχα, την κυρία Μαργιωλάκη, που δέχτηκε να εκπονήσω, τόσο την προπτυχιακή, όσο και την μεταπτυχιακή διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο της και να γίνω μέλος της ομάδας της. Από το πρώτο έτος στο Βιολογικό αποτέλεσε το επιστημονικό μου πρότυπο, με τον θαυμασμό μου να έγκειται στην ταπεινότητα που συνοδεύει ένα τόσο πλούσιο βιογραφικό, δηλωτικό εργατικότητας και ευφυΐας. Είμαι ευγνώμων για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και για την αμέριστη στήριξη που έλαβα σε αυτό το πολυετές, πλέον, ταξίδι. Από την στιγμή που έγινα μέλος του εργαστηρίου ανοίχτηκε μπροστά μου ένας καινούργιος ορίζοντας γνώσεων, εμπειριών και ευκαιριών, με την κυρία Μαργιωλάκη να βρίσκεται πάντοτε δίπλα μου, με τις επιστημονικές της συμβουλές και την καθοδήγηση της, ώστε να αξιοποιήσω κάθε στιγμή και να ωριμάσω, όσο αυτό ήταν εφικτό, επιστημονικά.

Ακολούθως, θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον κύριο Θεοχάρη Σταματάτο, Καθηγητή, και τον κύριο Σπυρίδωνα Περλεπέ, Ομότιμο Καθηγητή, για την επιστημονική τους καθοδήγηση και για το γεγονός, ότι δέχτηκαν με χαρά να αποτελέσουν την Επιτροπή αξιολόγησής μου.

Οι γνώσεις δεν είναι το μόνο πολύτιμο απόκτημά μου, αλλά και το γεγονός πως μέσα από αυτό το απαιτητικό ταξίδι η ομάδα του εργαστηρίου έγινε για εμένα κομμάτι της καρδιάς μου, αφού απέκτησα στη ζωή μου ανθρώπους ξεχωριστούς και πολύτιμους. Ένα ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου θέλω να εκφράσω στους μεταπτυχιακούς φοιτητές Μάριο Κωνσταντόπουλο και Δημήτρη Κούτουλα, που μέσα από την διαδρομή αυτή, με τις δυσκολίες και τις ομορφιές της, φτάσαμε να μας δένει μία ισχυρή φιλία. Η συμπόρευση μας στηρίχθηκε στην εμπιστοσύνη, στην αμοιβαία ψυχολογική στήριξη σε συνθήκες έντονου άγχους, καθώς και στην αναζήτηση λύσεων σε πάσης φύσεως πρόκληση. Τίποτα δεν θα ήταν το ίδιο ευχάριστο αν δεν είχαν εμφανιστεί στην ζωή μου! Την ευγνωμοσύνη μου οφείλω, ακόμα, στην υποψήφια διδάκτορα Χριστίνα Παπαευθυμίου για την καθοδήγηση, την στήριξη και την φιλία της. Τρεις άνθρωποι που θεωρώ οικογένεια μου.

Στο πλαίσιο των ευχαριστιών, ένα εξίσου μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής ομάδας, αρχικά, σε ένα από τα παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου τον Άγγελο Κονταρίνη για την καθοδήγησή του και την φιλία του, ενώ στην συνέχεια, από τα νεότερα μέλη, τους προπτυχιακούς φοιτητές Νεφέλη Καρααργυρίου, Νίκο Παγώνη, Άρτεμι Καραπέτη και Μαριάννα Λαμπροπούλου, για το ευχάριστο φιλικό περιβάλλον που δημιούργησαν στο πλαίσιο του εργαστηρίου. Επιπροσθέτως, ιδιαίτερα σημαντικοί για την φιλία τους και την στήριξη τους είναι τρεις συνάδελφοι από προσφιλή εργαστήρια, αρχικά, η Νικολίνα Χαραλάμπους και ο Γιώργος Καλαμαράς, υποψήφιοι διδάκτορες από το εργαστήριο του κύριου Νταϊλιάνη του τμήματος Βιολογίας, και στην συνέχεια, η υποψήφια διδάκτορας Παναγιώτα Καραμπά από το εργαστήριο Δομικής Βιολογίας του τμήματος των Χημικών Μηχανικών.

Την ευγνωμοσύνη μου, εν συνεχεία, θα ήθελα να εκφράσω για τον Καθηγητή κύριο Σωτήριο Χατζηκακού και την διδάκτορα Βιολογίας κυρία Χριστίνα Μπαντή, τους συντονιστές του μεταπτυχιακού προγράμματος «Ανόργανη Βιολογική Χημεία» για όλη την στήριξη, την καθοδήγηση και την προθυμία τους να μας βοηθήσουν σε οποιοδήποτε ζήτημα προέκυπτε.

Εκ μέρους του εργαστηρίου, θα ήθελα, ακόμη, να ευχαριστήσω τους Dr. Detlef Beckers και Dr. Thomas Degen της Malvern Panalytical για την διαρκή υποστήριξη στα εργαστηριακά συστήματα περίθλασης, καθώς και τους Dr. Gerd Schluckebier και Dr. Matthias Norman από τη Novo Nordisk για την παροχή πρωτεϊνών, και τη Mihaela Pop από την TeraCrystal για την παροχή πολυφαινολών.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τον Dr. Andrew N. Fitch και την Dr. Catherine Dejoie, για την βοήθειά τους στη συλλογή δεδομένων στον πειραματικό σταθμό ID22 (ESRF) και για την υλικοτεχνική υποστήριξη και καθοδήγηση κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων περίθλασης XRPD. Στην υλικοτεχνική υποστήριξη θα ήθελα να ευχαριστήσω, επιπροσθέτως, τον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτρη Τριανταφυλλίδη, και παλαιότερο μέλος του εργαστηρίου για την δημιουργία νέων δειγματοφορέων με βελτιωμένες προδιαγραφές.

Καταληκτικά, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους ανθρώπους μου εκτός του πλαισίου του εργαστηρίου, την οικογένεια και τους φίλους μου. Ιδιαίτερα στους γονείς μου και στον αδελφό μου, οι οποίοι αποτελούν τις ρίζες που με θρέφουν με την αγάπη και την υπομονή τους για να μπορέσω να φτάσω στο ύψος των ονείρων μου. Μια ξεχωριστή αναφορά, τέλος, θα ήθελα να κάνω στον αγαπημένο μου παππού, που αν και έφυγε μέσα σε χρόνο ανύποπτο από την ζωή, η αγάπη που μου έδωσε και η δύναμη που υπέδειξε προς το τέλος, μπροστά σε μία μάχη άνιση, ήταν η ώθηση για την ολοκλήρωση της συγγραφής αυτού του μεταπτυχιακού, ακόμα και σε συνθήκες που η θλίψη ήταν ασήκωτη.

Ένα ευχαριστώ είναι λίγο σε σχέση με την ευγνωμοσύνη που νιώθω προς όλα τα πρόσωπα που ανέφερα, αλλά και σε όσα δεν έχω αναφέρει. Είναι πολλά τα χέρια που με κράτησαν και σε κάθε ένα ξεχωριστά οφείλω ότι έχω καταφέρει ως σήμερα, από το πιο ασήμαντο ως το πιο σημαντικό.

# Πίνακας Περιεχομένων

|                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------|----|
| Ευχαριστίες                                               | ii |
| Περίληψη                                                  | 1  |
| Abstract                                                  | 2  |
| 1. Εισαγωγή                                               | 3  |
| 1.1 Κρύσταλλος                                            | 4  |
| 1.1.1 Συμμετρία                                           | 7  |
| 1.1.2 Δείκτες Miller                                      | 10 |
| 1.1.3 Αντίστροφο πλέγμα                                   | 11 |
| 1.2 Κρυστάλλωση                                           | 12 |
| 1.2.1 Βιοχημικές και Βιοφυσικές Αρχές Κρυστάλλωσης        | 13 |
| 1.2.2 Παράγοντες Κρυστάλλωσης                             | 15 |
| 1.2.3 Μέθοδοι κρυστάλλωσης                                | 16 |
| 1.3 Ακτίνες-X                                             | 17 |
| 1.3.1 Ηλεκτρομαγνητική Ακτινοβολία                        | 18 |
| 1.3.2 Παραγωγή ακτίνων-X                                  | 18 |
| 1.3.3 Κυματική φύση του φωτός                             | 22 |
| 1.3.4 Ατομικός παράγοντας σκέδασης                        | 23 |
| 1.3.5 Περίθλαση                                           | 24 |
| 1.3.6 Νόμος Bragg                                         | 25 |
| 1.3.7 Σφαίρα του Ewald                                    | 26 |
| 1.3.8 Παράγοντας δομής                                    | 27 |
| 1.3.9 Μέθοδοι περίθλασης SCXRD και XRPD                   | 28 |
| 1.3.10 Συστηματικές αποσβέσεις ανακλάσεων                 | 30 |
| Σκοπός της μελέτης                                        | 31 |
| 2. Διερεύνηση του Πολυμορφισμού της Ανθρώπινης Ινσουλίνης | 31 |
| 2.1 Ο ρόλος της Ανθρώπινης Ινσουλίνης                     | 31 |
| 2.1.1 Παραγωγή Ινσουλίνης                                 | 32 |
| 2.1.2 Δομή Ινσουλίνης                                     | 34 |
| 2.2 Σακχαρώδης Διαβήτης                                   | 37 |
| 2.2.1 Διαβήτης Τύπου I                                    | 38 |
| 2.2.2 Διαβήτης Τύπου II                                   | 38 |
| 2.2.3 Διαβήτης Κύησης                                     | 39 |
| 2.2.4 Γλυκοζυλίωση Πρωτεϊνών                              | 39 |
| 2.2.5 Θεραπεία                                            | 39 |



|       |                                                                                                  |     |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.2.6 | Αξία Κρυσταλλικών Φαρμάκων -----                                                                 | 40  |
| 2.3   | Επίδραση Χημικών Παραμέτρων στην Ανθρώπινη Ινσουλίνη -----                                       | 42  |
| 2.3.1 | Υλικά και Μέθοδοι -----                                                                          | 42  |
| 2.3.2 | Ο προσδέτης μετα-κρεσόλη -----                                                                   | 42  |
| 2.3.3 | Πειράματα κρυστάλλωσης μέσω της μεθόδου Batch -----                                              | 43  |
| 2.3.4 | Πειράματα κρυστάλλωσης μέσω της μεθόδου διάχυσης ατμών-----                                      | 46  |
| 2.3.5 | Συλλογή δεδομένων περίθλασης από πολυκρυσταλλικά δείγματα-----                                   | 49  |
| 2.3.6 | European Synchrotron Radiation Facility-ESRF (Beamline: ID22) -----                              | 50  |
| 2.3.7 | Συλλογή δεδομένων περίθλασης από μονοκρυστάλλους-----                                            | 52  |
| 2.3.8 | Ανάλυση δεδομένων -----                                                                          | 54  |
| 2.4   | Επίδραση της Σχετικής Υγρασίας στην Ανθρώπινη Ινσουλίνη-----                                     | 55  |
| 2.4.1 | Υλικά και Μέθοδοι -----                                                                          | 56  |
| 2.4.2 | Ανθρώπινη Ινσουλίνη Απουσία προσδέτη-----                                                        | 56  |
| 2.4.3 | Πειράματα κρυστάλλωσης με την μέθοδο Batch -----                                                 | 56  |
| 2.4.4 | Πειράματα περίθλασης ακτίνων-X -----                                                             | 60  |
| 2.5   | Αποτελέσματα -----                                                                               | 63  |
| 2.5.1 | Πολυμορφισμός της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη m-cresol-----                      | 63  |
| 2.5.2 | Πολυμορφισμός της ανθρώπινης ινσουλίνης απουσία προσδέτη με pH <sub>(initial)</sub> 5.50 ---     | 84  |
| 2.5.3 | Πολυμορφισμός της ανθρώπινης ινσουλίνης απουσία προσδέτη με pH <sub>(initial)</sub> 7.00 ---     | 87  |
| 2.6   | Συμπεράσματα-----                                                                                | 92  |
| 2.6.1 | Πολυμορφισμός του συμπλόκου [ανθρώπινη ινσουλίνη-m-cresol] -----                                 | 92  |
| 2.6.2 | Επίδραση της σχετικής υγρασίας στα κρυσταλλικά πολύμορφα R3(T <sub>6</sub> ) και R3(T3R3f)<br>97 |     |
| 2.7   | Συζήτηση -----                                                                                   | 99  |
| 3.    | Μελέτη της επίδρασης της σχετικής υγρασίας στη HEWL -----                                        | 102 |
| 3.1   | Ρόλος Λυσοζύμης -----                                                                            | 102 |
| 3.1.1 | Δομή Λυσοζύμης-----                                                                              | 102 |
| 3.2   | Επίδραση Φυσικών Παραμέτρων στην -----                                                           | 103 |
| 3.2.1 | Υλικά και Μέθοδοι -----                                                                          | 103 |
| 3.2.2 | Πειράματα κρυστάλλωσης με την μέθοδο Batch -----                                                 | 103 |
| 3.2.3 | Συλλογή δεδομένων περίθλασης-----                                                                | 105 |
| 3.3   | Αποτελέσματα -----                                                                               | 107 |
| 3.4   | Συμπεράσματα & Συζήτηση -----                                                                    | 111 |
| 4.    | Παράρτημα-----                                                                                   | 113 |
| 4.1   | Πολυκρυσταλλικά δείγματα ΗΙ παρουσία του προσδέτη m-cresol -----                                 | 113 |

|     |                                                                  |     |
|-----|------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2 | Κύκλοι μεταβολής της σχετικής υγρασίας – HI_n1 ( $T3R3f$ ) ----- | 117 |
|     | Σειρά A <sub>1</sub> -----                                       | 117 |
|     | Σειρά A <sub>2</sub> -----                                       | 119 |
| 4.3 | Κύκλοι ομαλής μεταβολής της υγρασίας - HEWL -----                | 121 |
| 5.  | Βιβλιογραφία -----                                               | 124 |

# Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στην μελέτη της επίδρασης χημικών και φυσικών παραμέτρων σε διαφορετικά πολύμορφα πρωτεϊνών με φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Το κύριο αντικείμενο μελέτης αποτελεί η ανθρώπινη ινσουλίνη, μία πρωτεΐνη που αξιοποιείται για την θεραπεία της ασθένειας του σακχαρώδους διαβήτη, και η εντατική διερεύνηση του κρυσταλλικού και μοριακού πολυμορφισμού της, παρουσία φαινολικών προσδετών, αποσκοπεί στην ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών σκευασμάτων με βελτιωμένα χαρακτηριστικά φαρμακοκινητικής. Για τον λόγο αυτό, ο πρώτος άξονας διερεύνησης αφορά το σύμπλοκο της ανθρώπινης ινσουλίνης με τον οργανικό προσδέτη meta-cresol, σε τέσσερις σειρές κρυστάλλωσης υπό την μεταβλητή παράμετρο του pH, δοκιμάζοντας, επιπλέον, τρεις διαφορετικούς διαλύτες ως περιβάλλον διάλυσης του προσδέτη. Για την μελέτη του πολυμορφισμού της ινσουλίνης συναρτήσεως του pH πραγματοποιήθηκαν, και για τις τέσσερις σειρές κρυστάλλωσης, πειράματα περίθλασης ακτίνων-X από πολυκρυσταλλικά δείγματα (*X-Ray Powder Diffraction*), τα οποία έλαβαν χώρα στο Ευρωπαϊκό Σύγχροτρον (ESRF), με τα αποτελέσματα να φανερώνουν το ίδιο μοτίβο κρυσταλλικών πολυμόρφων με μικρές διαφοροποιήσεις ως προς το εύρος pH που απαντώνται. Ο δεύτερος ερευνητικός άξονας αφορά την ανθρώπινη ινσουλίνη, κρυσταλλωμένη απουσία προσδέτη και την διερεύνηση δύο διαφορετικών μοριακών διαμορφώσεων ρομβοεδρικής συμμετρίας  $R3$ , υπό μεταβαλλόμενη σχετική υγρασία (Relative Humidity, RH). Τα πειράματα περίθλασης υλοποιήθηκαν με την χρήση του ειδικού θαλάμου ελεγχόμενης μεταβολής της υγρασίας και της θερμοκρασίας (*MHC-trans humidity chamber*) της εταιρείας Anton Paar, που διαθέτει το εργαστηριακό περιθλασίμετρο του τμήματος Βιολογίας Πατρών, και επιτρέπει in-situ XRPD μετρήσεις. Οι μετρήσεις για κάθε πολύμορφο διεξήχθησαν υπό μεταβαλλόμενη σχετική υγρασία μέσω διαδοχικών κύκλων αφυδάτωσης και ενυδάτωσης, με τα αποτελέσματα να φανερώνουν την αξία της μοριακής διαμόρφωσης στην ανθεκτικότητα του δείγματος. Η αξία διαφαίνεται από το γεγονός πως το λιγότερο σταθερό κρυσταλλικό πολύμορφο  $R3$  μοριακής διαμόρφωσης  $T_6$  χάνει την κρυσταλλικότητα του στο επίπεδο υγρασίας 80% της πρώτης αφυδάτωσης και δεν επανέρχεται, ενώ το κρυσταλλικό πολύμορφο  $R3$  μοριακής διαμόρφωσης  $T_3R_3^f$  διατηρεί την κρυσταλλικότητα του έως και το 50% RH, με σημαντικές μεταβολές σε επίπεδο μοναδιαίας κυψελίδας, με μερική επαναφορά. Καταληκτικά, άλλη μία πρωτεΐνη που μελετήθηκε είναι η λυσοζύμη από το ασπράδι του αυγού της όρνιθας, της οποίας το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P4_32_12$  μελετήθηκε σε πέντε σειρές υπό την μεταβλητή παράμετρο της σχετικής υγρασίας, σε κύκλους τόσο ομαλής μεταβολής μεταξύ των επιπέδων αφυδάτωσης και ενυδάτωσης, όσο και μη ομαλής μεταβολής μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων. Ωστόσο, στην παρούσα εργασία παρατίθενται τα αποτελέσματα μόνο από τους κύκλους που αφορούν την ομαλή μεταβολή RH.

# Abstract

This thesis focuses on the study of the effects of chemical and physical parameters on various polymorphs of proteins of pharmaceutical interest. The primary object of study is human insulin, a protein used for the treatment of diabetes mellitus. The intensive investigation of its crystalline and molecular polymorphism, in the presence of phenolic ligands, aims to develop new pharmaceutical formulations with improved pharmacokinetic characteristics. For this reason, the first axis of investigation concerned the complex of human insulin with the organic ligand meta-cresol, in four crystallization series under the variable pH parameter, testing, in addition, three different solvents as a dissolution environment of the ligand. To study the polymorphism of insulin as a function of pH, X-Ray Powder Diffraction experiments were carried out on polycrystalline samples for all four crystallization series, which took place at the European Synchrotron (ESRF), with the results revealing the same pattern of crystalline polymorphs with small variations in the pH range encountered. The second research axis concerns human insulin, crystallized in the absence of a ligand and the investigation of two different molecular configurations of rhombohedral symmetry  $R3$ , under varying relative humidity (RH). The diffraction experiments were carried out using the dedicated chamber of controlled humidity and temperature variation (MHC-trans humidity chamber, Anton Paar), which has the laboratory diffractometer of the Department of Biology of Patras, and allows in-situ XRPD measurements. The measurements for each polymorph were carried out under varying relative humidity through gradual cycles of dehydration and rehydration, with the results revealing the value of the molecular configuration in the resilience of the sample. The value is evident from the fact that the less stable  $R3$  crystalline polymorph of molecular configuration  $T_6$  loses its crystallinity at the 80% RH level of the first dehydration and does not recover, while the  $R3$  crystalline polymorph of molecular configuration  $T_3R_3^f$  maintains its crystallinity up to 50% RH, with significant changes at the unit cell level, with partial recovery. Finally, another protein studied is lysozyme from hen's egg white, whose crystalline polymorph  $P4_32_12$  was studied in five series under the variable parameter of relative humidity, in cycles of both gradual variation between dehydration and rehydration levels, and non-gradual variation between different levels. However, in this thesis, the results are presented only from the cycles involving the gradual RH variation.

# 1. Εισαγωγή

Ο δομικός χαρακτηρισμός των βιολογικών μακρομορίων αποτελεί τη βάση για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους, δεδομένου ότι η δομή προηγείται, και κατά επέκταση καθορίζει την λειτουργία τους. Η εύρεση της τρισδιάστατης δομής, επομένως, και κατά συνέπεια η αποκάλυψη της χημικής σύστασης ενός μορίου κρίνεται θεμελιώδους σημασίας, αποτελώντας αντικείμενο μελέτης του κλάδου της **Δομικής Βιοχημείας** (*Structural Biochemistry*).

Ο προσδιορισμός της στερεοδιάταξης των βιομορίων καθίσταται εφικτός με την χρήση κυρίως τριών ανεξάρτητων τεχνικών, της **κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X** (*X-Ray Crystallography*), της **φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού** (*Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, NMR*) και της **κρυογονικής ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας** (*cryogenic electron microscopy, Cryo-EM*). Εντούτοις, η σημαντικότερη τεχνική είναι αυτή της κρυσταλλογραφίας με τη χρήση ακτίνων-X, καθώς δίνει την δυνατότητα προσδιορισμού με λεπτομερή ακρίβεια των διατάξεων των ιόντων, των μορίων και των ατόμων σε ένα κρυσταλλικό στερεό, πλεονέκτημα που την διακρίνει από τις υπόλοιπες μεθόδους.

Συγκεκριμένα, για την επίλυση μίας πρωτεϊνικής δομής, με την χρήση της ανωτέρω διακριθείσας τεχνικής, ακολουθείται μία σύνθετη και απαιτητική πορεία συγκεκριμένων βημάτων, από την παραγωγή της πρωτεΐνης ως και το τελικό βήμα που είναι η επίλυση της δομής. Η διεξαγωγή του κρυσταλλογραφικού πειράματος ξεκινά με την παραγωγή της πρωτεΐνης στόχου, η έκφραση της οποίας πραγματοποιείται σε μετασχηματισμένα κύτταρα με την χρήση της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, ώστε να φέρουν το γονίδιο του υπό μελέτη μορίου. Η έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης θα πρέπει να γίνεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις (υπερέκφραση), καθότι τα επόμενα βήματα της πορείας περιλαμβάνουν πληθώρα μεθόδων για τον αποτελεσματικό καθαρισμό της, από πιθανές προσμίξεις και παραπροϊόντα. Έπειτα από τον επιτυχή καθαρισμό, πραγματοποιούνται κρυσταλλώσεις με την χρήση κατάλληλων παραγόντων καθίζησης, σε υδατικό διάλυμα, που θα μειώσουν την διαλυτότητα της πρωτεΐνης, με στόχο την παραγωγή κρυστάλλων.

Οι κρύσταλλοι που παράγονται συλλέγονται σε ειδικούς δειγματοφορείς και στην συνέχεια τοποθετούνται εντός της πορείας μονοχρωματική δέσμης ακτίνων-X, κατάλληλου μήκους κύματος, ώστε τα περιοδικά διευθετημένα άτομα του κρυστάλλου να περιθλάσουν την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Τα περιθλώμενα κύματα συμβάλλουν ενισχυτικά σε χαρακτηριστικές για τα διαφορετικά επίπεδα ατόμων κατευθύνσεις και δίνουν σήμα περίθλασης, που καταγράφει ειδικός ανιχνευτής. Οι εντάσεις και οι γωνιακές τους θέσεις αποτελούν τις αξιοποιήσιμες πληροφορίες που θα οδηγήσουν στην επίλυση δομής. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η σύνθεση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας με την εφαρμογή συνθέσεων Fourier, που αποκαλύπτει τελικά την κατανομή των ατόμων του υπό μελέτη μορίου. Η γραφική τρισδιάστατη απεικόνιση αυτής της κατανομής αποτελεί τον χάρτη της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, από τον οποίο εξάγεται το δομικό μοντέλο του μορίου στόχου.

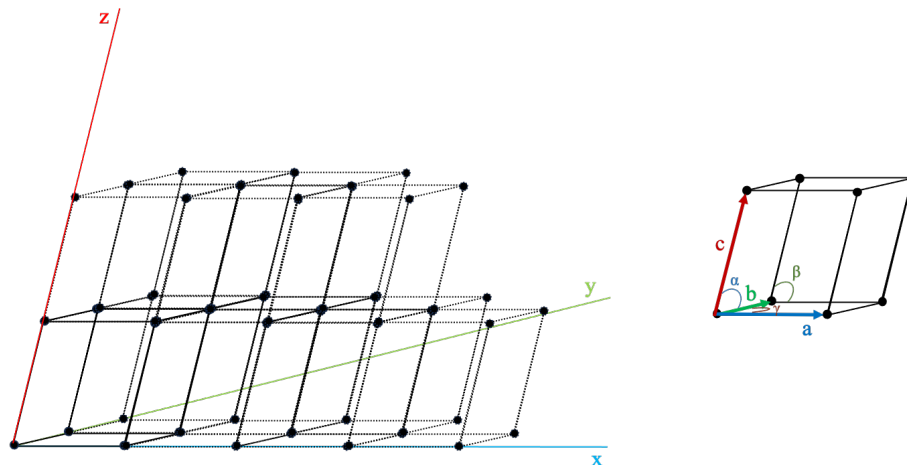
Το κρυσταλλογραφικό πείραμα ολοκληρώνεται, αφού το δομικό μοντέλο υποστεί μια σειρά ελέγχων στερεογεωμετρίας και ορθότητας και τελικά κατατίθεται σε μία παγκόσμια ανοιχτή βάση δεδομένων. Τα πρωτεϊνικά δομικά μοντέλα που προκύπτουν, δύναται να αξιοποιηθούν για τον σχεδιασμό φαρμάκων ή ακόμα και την βελτίωση των ήδη υπαρχόντων.

## 1.1 Κρύσταλλος

Ο **κρύσταλλος** (*crystal*) είναι μία ιδιαίτερη φυσική κατάσταση των στερεών που χαρακτηρίζεται από αυστηρή περιοδική διεύθυνση των μορίων, τα οποία μεταβαίνουν σε μία θερμοδυναμικά σταθερότερη διάταξη (αυξημένη εντροπία και χαμηλή ελεύθερη ενέργεια). Μία ελάχιστη μονάδα συμμετρίας επαναλαμβάνεται και στις τρεις χωρικές διαστάσεις με απλή μετατόπιση, χωρίς την εφαρμογή άλλων γεωμετρικών διεργασιών, όπως περιστροφή, αναστροφή και ανάκλαση, συνθέτοντας τον κρύσταλλο. Η ελάχιστη μονάδα συμμετρίας της χωρικά περιοδικής διάταξης ονομάζεται **μοναδιαία κυψελίδα** (*unit cell*). Μία δομική οντότητα που προηγείται της μοναδιαίας κυψελίδας είναι η **ασύμμετρη μονάδα** (*asymmetric unit*), δηλαδή ένα σύνολο ατόμων, ιόντων ή μορίων, το οποίο θα αποτελέσει τον δομικό λίθο για την σύνθεση όλου του κρυστάλλου (Atkins, 2017).

Η κρυσταλλική δομή προκύπτει από την απόδοση ασύμμετρων μονάδων σε πλεγματοειδή σημεία. Τα **πλεγματοειδή σημεία** (*lattice points*) είναι επαναλαμβανόμενα περιοδικά σημεία διευθετημένα κατά τρόπο τέτοιο, ώστε να σχηματίζεται ένα πλέγμα. Το πλέγμα αυτό χαρακτηρίζεται ως κρυσταλλικό (*crystal lattice*) και διαθέτει την ιδιότητα κάθε ένα σημείο του να περιβάλλεται από το ίδιο ακριβώς περιβάλλον με τα υπόλοιπα. Η ένωση πλεγματοειδών σημείων με ευθείες γραμμές, δύναται να οδηγήσει στον σχηματισμό αρκετών πιθανών πολυέδρων με χαρακτηριστικές πλευρές και γωνίες ως προς τους τρεις ορισθέντες άξονες (x,y,z). Ωστόσο, επιλέγεται η ελάχιστη μονάδα όγκου με την υψηλότερη συμμετρία, που μπορεί να επαναληφθεί με αμιγώς μεταφορικές μετατοπίσεις, η οποία θα αποτελέσει την στοιχειώδη μοναδιαία κυψελίδα.

Κατά αυτόν τον τρόπο η μοναδιαία κυψελίδα είναι η μονάδα όγκου με πλευρές  $a$ ,  $b$ ,  $c$  και γωνίες  $\alpha$ ,  $\beta$ , και  $\gamma$ , με τις γωνίες να ορίζονται εντός δύο πλευρών, όπου καμία δεν είναι η αντίστοιχη της ορισθείσας γωνίας. Επεξηγηματικά, η γωνία  $\alpha$  βρίσκεται μεταξύ των πλευρών  $b$  και  $c$ , η γωνία  $\beta$  ανάμεσα στις πλευρές  $a$  και  $c$ , και τέλος η γωνία  $\gamma$  βρίσκεται μεταξύ των πλευρών  $a$  και  $b$ . Οι πλευρές και οι γωνίες αποτελούν τις **πλεγματοειδείς παράμετροι** (*unit cell parameters*) της στοιχειώδους κυψελίδας. Ο κρύσταλλος προκύπτει από όμοιες μοναδιαίες κυψελίδες που έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και επαναλαμβάνονται και στις τρεις διαστάσεις, χωρίς τον σχηματισμό κενών, μόνο με μεταφορικές μεταθέσεις.



Εικόνα 1.1 Αναπαράσταση κρυσταλλικού πλέγματος (αριστερά) και μίας μοναδιαίας κυψελίδας (δεξιά).

Ο κρύσταλλος, ουσιαστικά αποτελεί ένα τρισδιάστατο φυσικό αντικείμενο, στον περιοδικά διατεταγμένο χώρο, με το σύνολο των πλεγματοειδών σημείων που το αποτελούν να θεωρείται ότι ανήκουν στον Ευθύ χώρο, και ο ίδιος να συμβολίζεται ως  $E^3$ . Δύο σημεία του πραγματικού χώρου δύναται αντιστοιχιστούν σε ένα διάνυσμα και οι ιδιότητες του διανυσματικού χώρου να εφαρμοστούν

στον φυσικό χώρο. Θεωρώντας ένα σημείο του φυσικού χώρου ως αρχή, τότε η θέση κάθε επόμενου σημείου του χώρου του κρυστάλλου, να μπορεί να αποδοθεί από ένα διάνυσμα  $r$ . Δηλαδή:

$$r = x\vec{a} + y\vec{b} + z\vec{c}$$

όπου  $x, y, z$  ανήκουν στους πραγματικούς αριθμούς και  $\vec{a}, \vec{b}, \vec{c}$ , αποτελούν την βάση του διανυσματικού χώρου.

Την μοναδιαία κυψελίδα ορίζουν τρία μη ομοεπίπεδα διανύσματα με κοινό σημείο αναφοράς, γνωστά και ως **θεμελιώδη διανύσματα μετατόπισης** (*primitive vectors*). Η θέση όλων των πλεγματικών σημείων που χαρακτηρίζουν την μοναδιαία κυψελίδα πρέπει να ικανοποιούν την ακόλουθη σχέση:  $x\vec{a} + y\vec{b} + z\vec{c}$ , μόνο που σε αυτή την περίπτωση οι  $x, y, z$  είναι πραγματικοί αριθμοί και βρίσκονται εντός του κλειστού διαστήματος  $[0,1]$ . Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι πιθανοί αρκετοί συνδυασμοί σημείων, εντούτοις, η διαλογή γίνεται βάσει της υψηλότερης συμμετρίας και του μικρότερου δυνατού όγκου. Ο όγκος προκύπτει από την αξιοποίηση των θεμελιωδών διανυσμάτων, δίδεται από την ακόλουθη εξίσωση  $V = |\vec{a} \cdot (\vec{b} \times \vec{c})|$ , και είναι το εσωτερικό γινόμενο του ενός διανύσματος με το εξωτερικό γινόμενο των άλλων δύο διανυσμάτων.

Για την μετάβαση σε μία γειτονική κυψελίδα, μετατοπίζεται η κυψελίδα κατά ένα διάνυσμα ακεραίων δεικτών ( $m_1, m_2, m_3$ ) ως προς τα διανύσματα  $\vec{a}, \vec{b}, \vec{c}$ . Κατά αυτόν τον τρόπο, προκύπτει ένας εναλλακτικός τρόπος απόδοσης του κρυσταλλικού πλέγματος, ως το σύνολο των πλεγματικών σημείων του τρισδιάστατου χώρου που ορίζονται από την σχέση:  $m_1\vec{a} + m_2\vec{b} + m_3\vec{c}$ .

Ακόμη, δύναται να πραγματοποιηθεί μία διάκριση των μοναδιαίων κυψελίδων ανάλογα με τον τύπο **κέντρωσης** (*centering*) τους, την απόδοση δηλαδή πλεγματικών σημείων στις θέσεις υψηλότερης συμμετρίας, σε δύο κατηγορίες. Στις **πρωτογενείς** ή **απλές** (*primitive*) με πλεγματικά σημεία να απαντώνται μόνο στις κορυφές των πλευρών της μοναδιαίας κυψελίδας, καθώς και στις **μη πρωτογενείς** ή **κεντρωμένες** (*centered*), με πλεγματικά σημεία να είναι τοποθετημένα, τόσο στις κορυφές όσο και στο κέντρο ή και σε ζεύγη απέναντι εδρών (Atkins, 2017).

Επιπροσθέτως, υπάρχουν επτά **κρυσταλλικά συστήματα** (*crystal systems*), τα οποία αντικατοπτρίζουν τους επτά βασικούς τύπους μοναδιαίων κυψελίδων και καθορίζονται βάσει των στοιχείων περιστροφικής συμμετρίας. Τα κρυσταλλικά συστήματα αναπαριστούν τα γεωμετρικά σχήματα που προκύπτουν από την εσωτερική διευθέτηση των ατόμων στον κρύσταλλο με χαρακτηριστικά στοιχεία συμμετρίας. Τα κρυσταλλικά συστήματα και τα χαρακτηριστικά στοιχεία συμμετρίας τους, δίδονται στον ακόλουθο πίνακα 1.1.

**Πίνακας 1.1.** Τα χαρακτηριστικά στοιχεία συμμετρίας κάθε κρυσταλλικού συστήματος.

| Κρυσταλλικό Σύστημα | Χαρακτηριστικά στοιχεία συμμετρίας           |
|---------------------|----------------------------------------------|
| Τρικλινές           | Κανένα                                       |
| Μονοκλινές          | Ένας άξονας $C_2$                            |
| Ορθορομβικό         | Τρεις ορθογώνιοι άξονες $C_2$                |
| Ρομβοεδρικό         | Ένας άξονας $C_3$                            |
| Τετραγωνικό         | Ένας άξονας $C_4$                            |
| Εξαγωνικό           | Ένας άξονας $C_6$                            |
| Κυβικό              | Τέσσερις άξονες $C_3$ σε τετραεδρική διάταξη |

Η περιστροφική συμμετρία έχει ορισμένες μόνο επιτρεπτές στροφές που μπορούν να εφαρμοστούν ως προς τους άξονες συμμετρίας. Οι δυνατές στροφές είναι  $0^\circ$  ή  $360^\circ$  ( $1^{\text{η}}$  τάξης),  $180^\circ$  ( $2^{\text{η}}$  τάξης),  $120^\circ$  ( $3^{\text{η}}$  τάξης),  $90^\circ$  ( $4^{\text{η}}$  τάξης) και τέλος  $60^\circ$  ( $6^{\text{η}}$  τάξης). Κατά αντιστοιχία και οι άξονες

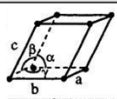
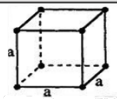
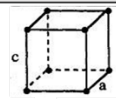
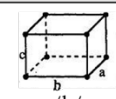
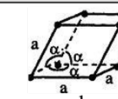
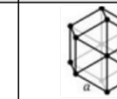
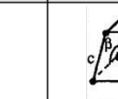
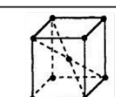
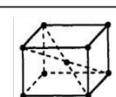
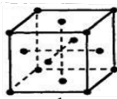
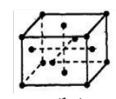
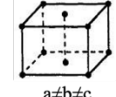
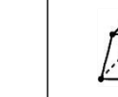
συμβολίζονται ως  $C_n$ , όπου το  $n$  δηλώνει περιστροφή  $n$ -οστής τάξης, στην οποία προκύπτουν πανομοιότυπες δομές, έπειτα από περιστροφή  $360^\circ/n$ .

Εντούτοις, τα κρυσταλλικά συστήματα δεν αρκούν για τον πλήρη χαρακτηρισμό των μοναδιαίων κυψελίδων. Για τον λόγο αυτό, εισάγεται μία ακόμη θεμελιώδης έννοια, τα **πλέγματα Bravais** (*Bravais lattices*). Τα πλέγματα Bravais προκύπτουν από το κρυσταλλικό σύστημα σε συνδυασμό με την διαδικασία της κέντρωσης, δηλαδή την εισαγωγή πλεγματικών σημείων στις θέσεις με την υψηλότερη συμμετρία του θεμελιώδους πλέγματος. Διακρίνονται τέσσερεις τύποι κέντρωσης, ανάλογα με την θέση εύρεσης πλεγματικών σημείων στην μοναδιαία κυψελίδα. Οι τέσσερεις βασικοί τύποι κέντρωσης ακολουθούν παρακάτω:

- **Απλό πλέγμα** (*P, Primitive*): η μοναδιαία κυψελίδα περιλαμβάνει πλεγματικά σημεία μόνο στις κορυφές των εδρών της.
- **Χωροκεντρωμένο πλέγμα ή Ενδοκεντρωμένο** (*I, Body centered*): πλεγματικά σημεία απαντώνται τόσο στις κορυφές των εδρών, όσο και σε ένα σημείο στο κέντρο της μοναδιαίας κυψελίδας.
- **Εδροκεντρωμένο πλέγμα ή Ολοεδρικά κεντρωμένο** (*F, Face centered*): πλεγματικά σημεία βρίσκονται στις κορυφές κάθε έδρας, καθώς και σε ένα σημείο στο κέντρο κάθε έδρας.
- **Βάση-κεντρωμένο πλέγμα ή Μονοεδρικά κεντρωμένο** (*A, B, ή C, Base centered*): πλεγματικά σημεία συναντώνται στις κορυφές των εδρών και στα κέντρα δύο απέναντι εδρών.

Από τον συνδυασμό των τύπων κέντρωσης και των 7 κρυσταλλικών συστημάτων προκύπτουν τα 14 πλέγματα Bravais.

Πίνακας 1.2. Πλέγματα Bravais

|   | Triclinic                                                                                                                                   | Cubic                                                                                                                                           | Tetragonal                                                                                                                                         | Orthorhombic                                                                                                                                          | Rhombohedral                                                                                                                                       | Hexagonal                                                                                                                                                            | Monoclinic                                                                                                                                                 |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| P | <br>$a \neq b \neq c$<br>$\alpha \neq \beta \neq \gamma$ | <br>$a = b = c$<br>$\alpha = \beta = \gamma = \frac{\pi}{2}$ | <br>$a = b \neq c$<br>$\alpha = \beta = \gamma = \frac{\pi}{2}$ | <br>$a \neq b \neq c$<br>$\alpha = \beta = \gamma = \frac{\pi}{2}$ | <br>$a = b = c$<br>$\alpha = \beta = \gamma \neq \frac{\pi}{2}$ | <br>$a = b \neq c$<br>$\alpha = \beta = \frac{\pi}{2}, \gamma = \frac{3\pi}{4}$ | <br>$a \neq b \neq c$<br>$\alpha = \gamma = \frac{\pi}{2} \neq \beta$ |
| I |                                                                                                                                             | <br>$a = b = c$<br>$\alpha = \beta = \gamma = \frac{\pi}{2}$ | <br>$a = b \neq c$<br>$\alpha = \beta = \gamma = \frac{\pi}{2}$ | <br>$a \neq b \neq c$<br>$\alpha = \beta = \gamma = \frac{\pi}{2}$ |                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                            |
| F |                                                                                                                                             | <br>$a = b = c$<br>$\alpha = \beta = \gamma = \frac{\pi}{2}$ |                                                                                                                                                    | <br>$a \neq b \neq c$<br>$\alpha = \beta = \gamma = \frac{\pi}{2}$ |                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                            |
| C |                                                                                                                                             |                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                    | <br>$a \neq b \neq c$<br>$\alpha = \beta = \gamma = \frac{\pi}{2}$ |                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                      | <br>$a \neq b \neq c$<br>$\alpha = \gamma = \frac{\pi}{2} \neq \beta$ |



**Πίνακας 1.3.** Τα επτά κρυσταλλικά συστήματα και τα δεκατέσσερα πλέγματα που τους αντιστοιχούν.

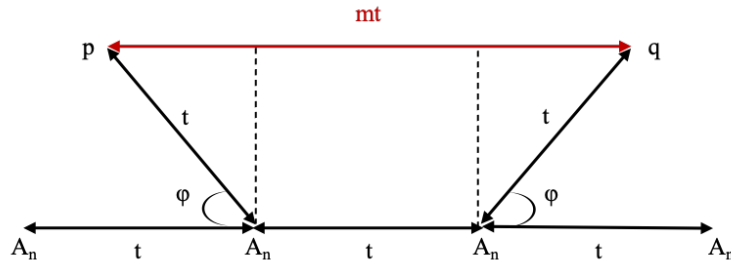
| Κρυσταλλικό Σύστημα | Σχέση μεταξύ πλευρών | Σχέση μεταξύ γωνιών                               | Πλέγμα Bravais        | Σύμβολο πλέγματος |
|---------------------|----------------------|---------------------------------------------------|-----------------------|-------------------|
| Κυβικό              | $a = b = c$          | $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$              | Απλό                  | P                 |
|                     |                      |                                                   | Ενδοκεντρωμένο        | I                 |
|                     |                      |                                                   | Ολοεδρικά κεντρωμένο  | F                 |
| Τετραγωνικό         | $a = b \neq c$       | $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$              | Απλό                  | P                 |
|                     |                      |                                                   | Ενδοκεντρωμένο        | I                 |
|                     |                      |                                                   |                       |                   |
| Ορθορομβικό         | $a \neq b \neq c$    | $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$              | Απλό                  | P                 |
|                     |                      |                                                   | Ενδοκεντρωμένο        | I                 |
|                     |                      |                                                   | Μονοεδρικά κεντρωμένο | C                 |
| Ρομβοεδρικό         | $a = b \neq c$       | $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$           | Ολοεδρικά κεντρωμένο  | F                 |
|                     |                      |                                                   |                       |                   |
|                     |                      |                                                   |                       |                   |
| Ρομβοεδρικό         | $a = b \neq c$       | $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$           | Απλό                  | R                 |
| Εξαγωνικό           | $a = b \neq c$       | $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$   | Απλό                  | P                 |
| Μονοκλινές          | $a \neq b \neq c$    | $\alpha = \gamma = 90^\circ, \beta \neq 90^\circ$ | Απλό                  | P                 |
|                     |                      |                                                   | Μονοεδρικά κεντρωμένο | C                 |
|                     |                      |                                                   |                       |                   |
| Τρικλινές           | $a \neq b \neq c$    | $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$     | Απλό                  | P                 |

### 1.1.1 Συμμετρία

Η συμμετρία είναι η βασική ιδιότητα που χαρακτηρίζει τους κρυστάλλους, και το θεμέλιο για την εύρεση της κρυσταλλικής δομής. Στις προηγούμενες παραγράφους έγινε λόγος για μία ελάχιστη μονάδα συμμετρίας, την μοναδιαία κυψελίδα, όπου με την εφαρμογή μετασχηματισμών για την εύρεση της συνολικής συμμετρίας στην τελευταία, δύναται να βρεθεί ολόκληρη η κρυσταλλική δομή. Αυτό είναι εφικτό, καθώς από τον ορισμό και μόνο του κρυστάλλου δίδεται η πρώτη μορφή συμμετρίας, η μεταφορική συμμετρία, κατά την οποία επαναλαμβάνεται περιοδικά, χωρίς κενά, με αμιγώς μεταφορικές μεταθέσεις η μοναδιαία κυψελίδα.

Η έννοια της συμμετρίας περιλαμβάνει το σύνολο των μετασχηματισμών που θα κινήσουν ένα αντικείμενο και η επαναδιάταξη των ατόμων που το αποτελούν θα αποδώσει τελικά το **ισοδύναμο** (*congruent*) του. Απαραίτητη προϋπόθεση, βέβαια, είναι οι εφαρμοζόμενοι μετασχηματισμοί να διατηρούν αναλλοίωτες τις αποστάσεις και τις γωνίες. Ένας μετασχηματισμός που διατηρεί την μορφή του αντικειμένου, δημιουργώντας ισοδύναμα αντικείμενα, καλείται **διεργασία συμμετρίας** (*symmetry operation*). Τα ισοδύναμα αντικείμενα που δύναται να προκύψουν είτε θα είναι ευθέως ισοδύναμα, είτε αντιθέτως ισοδύναμα. Κάθε πράξη συμμετρίας πραγματοποιείται είτε ως προς ένα σημείο (κέντρο συμμετρίας), είτε ως προς μία ευθεία (άξονα συμμετρίας) ή ένα επίπεδο (επίπεδο συμμετρίας), και τα οποία ονομάζονται **στοιχεία συμμετρίας** (*symmetry elements*). Σημαντικό χαρακτηριστικό των στοιχείων αυτών είναι πως τα σημεία που τα αποτελούν παραμένουν αμετάβλητα και μετά το πέρας των διεργασιών συμμετρίας (Landsberg and Hankamer, 2007).

Σχετικά με τις επιτρεπτές στροφές που δύναται να εφαρμοστούν για την περιγραφή του κρυσταλλικού πλέγματος, δίδεται, η γεωμετρική απόδειξη, από ένα απλό διάγραμμα όπως αποτυπώνεται παρακάτω:



Εικόνα 1.2. Σχηματική απεικόνιση των επιτρεπτών στροφών.

Έστω ένας άξονας  $A_n$ , ο οποίος επαναλαμβάνεται κατά μία περίοδο  $t$ . Αν μετατοπίσουμε κατά μία περίοδο  $t$  και στρέψουμε κατά γωνία  $\varphi$  ως προς τον άξονα, ένα σημείο του πλέγματος, με τρόπο τέτοιο, ώστε να διατηρούνται οι αποστάσεις και οι γωνίες σταθερές, ο μετασχηματισμός αυτός θα πρέπει να οδηγήσει σε ένα επόμενο σημείο του κρυσταλλικού πλέγματος. Για να έχει ισχύ βέβαια η περιστροφική συμμετρία, θα πρέπει η απόσταση μεταξύ των δύο αυτών σημείων να είναι ακέραιο πλήθος των μετατοπίσεων  $t$ . Η απόσταση μεταξύ των σημείων δίδεται από την ακόλουθη σχέση, όπως προκύπτει και από το άνωθεν σχήμα,  $mt = t + 2t \cos \varphi$ , όπου  $m$  ακέραιος αριθμός. Από την επίλυση αυτής προκύπτουν οι επιτρεπτές τάξης περιστροφής ( $1^{\text{ης}}$ ,  $2^{\text{ης}}$ ,  $3^{\text{ης}}$ ,  $4^{\text{ης}}$  και  $6^{\text{ης}}$  τάξης).

Η αλγεβρική απόδειξη είναι πιο σύνθετη, βασίζεται σε πίνακες και η επίλυση της σε ορίζουσες. Έστω ένα τρισδιάστατο κρυσταλλικό πλέγμα που περιγράφεται από τα τρία θεμελιώδη διανύσματα  $\vec{a}, \vec{b}, \vec{c}$  και συμβολίζεται ως  $L$ , θεωρείται πίνακας  $A$  που αναπαριστά μία διεργασία συμμετρίας και για την οποία ισχύει  $r' = Ar$ , όπου  $r'$  και  $r$  είναι ανύσματα του πλέγματος, το μέτρο των οποίων διατηρείται ( $\vec{r}' \cdot \vec{r}' = \vec{r} \cdot \vec{r}$ ), λόγω της ισοδυναμίας από την εφαρμογή της συμμετρίας. Για να ισχύει αυτή η σχέση για κάθε  $r'$  και  $r$ , θα πρέπει τα στοιχεία του πίνακα  $A$  να είναι ακέραιοι αριθμοί. Με την γενική γνώση ότι ο μετρικός τελεστής, έστω  $G$ , για τις τρεις διαστάσεις είναι ένας  $3 \times 3$  συμμετρικός πίνακας, που έχει σαν στοιχεία τα εσωτερικά γινόμενα των διανυσμάτων, δίδεται η ακόλουθη σχέση:

$$r'^t G r' = r^t G r \Rightarrow r^t A^t G A r = r^t G r \Rightarrow A^t G A = G$$

Παίρνοντας την ορίζουσα και για τα δύο μέλη της εξίσωσης:

$$|A^t| |G| |A| = |G| \Rightarrow |A|^2 = 1 \Rightarrow |A| = \pm 1$$

Οι συμμετρίες που αντιστοιχούν σε πίνακες με ορίζουσα  $|A| = +1$  είναι διεργασίες τύπου I και χαρακτηρίζονται ως στροφές, ενώ οι πίνακες με ορίζουσα  $|A| = -1$  αποτελούν διεργασίες τύπου II και χαρακτηρίζονται ως στροφοαναστροφές.

Για ορθογώνιο σύστημα συντεταγμένων με ορθοκανονική βάση, μία οποιαδήποτε στροφή γύρω από έναν άξονα κατά γωνία  $\varphi$  δίδεται από τον ακόλουθο πίνακα :

$$\begin{bmatrix} \cos \varphi & -\sin \varphi & 0 \\ \sin \varphi & \cos \varphi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

Και από το ίχνος (το άθροισμα των ιδιοτιμών της διαγωνίου) του πίνακα η τελική σχέση που δίνει τις επιτρεπτές στροφές του ευθέως πλέγματος, λαμβάνονται από την εξής σχέση:

$$2 \cos \varphi + 1 = \text{ακέραιος αριθμός } (-2, -1, 0, 1, 2)$$

Με τις επιτρεπτές γωνίες είναι οι  $0^\circ$  ή  $360^\circ$  ( $1^{\text{ης}}$  τάξης),  $180^\circ$  ( $2^{\text{ης}}$  τάξης),  $120^\circ$  ( $3^{\text{ης}}$  τάξης),  $90^\circ$  ( $4^{\text{ης}}$  τάξης) και τέλος  $60^\circ$  ( $6^{\text{ης}}$  τάξης). Η απόδειξη αυτή έχει ισχύ, λόγω της ιδιότητας του αναλλοίωτου ίχνους ενός πίνακα σε μία αλλαγή βάσης.

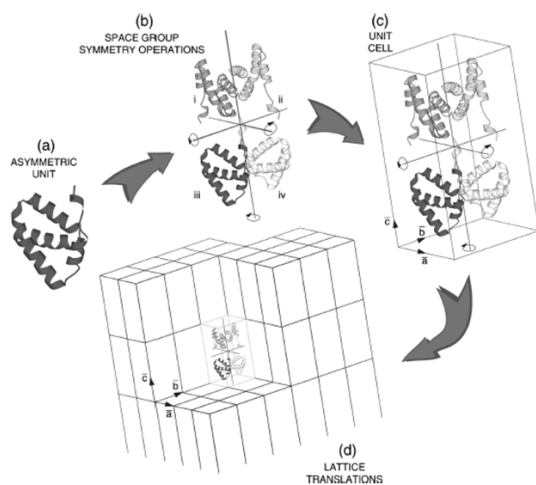
Εν συνεχεία, είναι σημαντική η διάκριση ως προς το πως επηρεάζεται το κρυσταλλικό πλέγμα σχετικά με τις διεργασίες συμμετρίας. Οι διεργασίες που δεν μετατοπίζουν το πλέγμα υπάγονται στην

ευρύτερη κατηγορία της **συμμετρίας σημείου** (*point groups*), ενώ η διεργασίες που μετατοπίζουν όλα τα σημεία του πλέγματος ανήκουν στην κατηγορία της **συμμετρίας χώρου** (*space groups*). Στη συμμετρία σημείου συγκαταλέγονται οι εξής διεργασίες: **κατοπτρισμός** (*mirror*), **στοφοαναστροφή** (*inversion*) και συμμετρία **περιστροφής** (*rotation*). Η περιστροφική συμμετρία υπάγεται στις διεργασίες τύπου I, ενώ οι άλλες δύο διεργασίες συμμετρίας σημείου στις διεργασίες τύπου II. Στις διαδικασίες συμμετρίας χώρου ανήκουν οι **άξονες βίδας** (*screw axes*), και τα **επίπεδα ολίσθησης** (*glide planes*).

Σημαντική είναι η διευκρίνιση πως ένα αντικείμενο δύναται να παρουσιάζει περισσότερα του ενός στοιχεία συμμετρίας, τα οποία είτε εφαρμόζονται ανεξάρτητα είτε συνδυαστικά μεταξύ τους (Atkins, 2017). Ωστόσο, επειδή δεν είναι όλοι οι άξονες συμβατοί με την μεταφορική πλήρωση του χώρου, μόνο 32 συνδυασμοί των στοιχείων συμμετρίας είναι εφικτοί και ονομάζονται ομάδες συμμετρίας σημείου, καθώς αφήνουν πάντοτε αναλλοίωτο ένα σημείο του χώρου. Οι διεργασίες από τις οποίες προκύπτουν οι ομάδες συμμετρίας σημείου είναι η περιστροφή, η κατοπτρική συμμετρία, η αναστροφή, καθώς και συνδυασμοί αυτών.

Ακολουθώντας, συνδυάζοντας τις 32 ομάδες σημείου με τα 14 πλέγματα Bravais προκύπτουν 230 μοναδικοί γεωμετρικοί συνδυασμοί που ονομάζεται ομάδες συμμετρίας χώρου. Κάθε ομάδα συμμετρίας χώρου ταυτοποιείται από ένα σύνολο χαρακτήρων βάσει των διεθνών συμβόλων Hermann-Mauguin. Το πρώτο γράμμα αυτών των συμβολισμών καθορίζει τον τύπο του πλέγματος Bravais, ενώ οι χαρακτήρες που το ακολουθούν σχετίζονται με τους άξονες και τα επίπεδα συμμετρίας που υπάρχουν παράλληλα ή κάθετα προς τις κύριες κρυσταλλογραφικές διευθύνσεις του εκάστοτε συστήματος.

Στην ιδιαίτερη περίπτωση των πρωτεϊνικών κρυστάλλων, αποδεκτές είναι μόνο οι διεργασίες συμμετρίας που αποδίδουν ευθέως ισοδύναμα αντικείμενα, δηλαδή η μεταφορική συμμετρία ή **μετατόπιση** (*translation*), η περιστροφική συμμετρία ή **περιστροφή** (*rotation*), και η **κοχλίωση** (*screw*) που αποτελεί συνδυασμό των δύο προηγούμενων (στροφή γύρω από έναν άξονα και μετατόπιση κατά μήκος του). Η διάκριση αυτή, οφείλεται στο γεγονός πως οι πρωτεΐνες είναι χειρόμορφα μόρια, επομένως, δεν μπορούν να υπερτεθούν στο κατοπτρικό του είδωλο. Η τελευταία συνθήκη εξαιρεί αυτομάτως τις κατοπτρικές διεργασίες συμμετρίας, καθώς και όλες όσες δίνουν αντιθέτως ισοδύναμα αντικείμενα. Άμεση συνέπεια των ανωτέρω πληροφοριών είναι πως από τον συνολικό αριθμό των 230 ομάδων χώρου για τους πρωτεϊνικούς κρυστάλλους, μόνο οι 65 είναι αποδεκτοί.



**Εικόνα 1.3.** Τα στάδια δημιουργίας μίας κρυσταλλική δομής από την επιλογή της ασύμμετρης μονάδας, την εφαρμογή διεργασιών συμμετρίας, την εύρεση της μοναδιαίας κυψελίδας (McPherson, 2009).

### 1.1.2 Δείκτες Miller

Η εύρεση της εσωτερικής διευθέτησης των ατόμων ή των μορίων της μοναδιαίας κυψελίδας, η εφαρμογή των διεργασιών συμμετρίας, καθώς και ο επακόλουθος προσδιορισμός των διαστάσεων της, συνιστούν θεμέλια βήματα για την αποκάλυψη της κρυσταλλικής συμμετρίας. Η προαναφερθείσα διευθέτηση δύναται να περιγραφεί αποτελεσματικά με την χρήση της έννοιας των κρυσταλλογραφικών επιπέδων. Τα **κρυσταλλογραφικά επίπεδα** (*crystallographic planes*) είναι νοητά σμήνη επιπέδων επιφανειών, που ομαδοποιούν τα σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος, βάσει της κατανομής των ατόμων και του προσανατολισμού τους σε σχέση με τους άξονες του πλέγματος.

Ένα σμήνος κρυσταλλογραφικών επιπέδων, ονομάζεται οικογένεια κρυσταλλογραφικών επιπέδων, και διαθέτει ορισμένες χαρακτηριστικές ιδιότητες. Το σύνολο των επιπέδων που το αποτελούν διαθέτουν άτομα στις ίδιες θέσεις, έχουν τον ίδιο προσανατολισμό, ενώ, επιπροσθέτως, είναι παράλληλα και ισαπέχουν μεταξύ τους μία χαρακτηριστική απόσταση  $d$  ( $d$ -spacing). Για την εύρεση της πλεγματικής απόστασης εφαρμόζεται διαφορετική εξίσωση, ανάλογα με το κρυσταλλικό σύστημα που απαντάται κάθε φορά. Ωστόσο, γενικές παρατηρήσεις για όλα τα κρυσταλλικά συστήματα είναι ότι με την αύξηση των δεικτών *Miller*, η πλεγματική απόσταση μειώνεται, όπως επίσης και η πυκνότητα των κόμβων στα επίπεδα ελαττώνεται.

**Πίνακας 1.4.** Εξισώσεις που εφαρμόζονται ανάλογα με το κρυσταλλικό σύστημα για την εύρεση των αποστάσεων μεταξύ των κρυσταλλογραφικών επιπέδων.

| Κρυσταλλικό Σύστημα | Πλεγματική απόσταση                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Κυβικό              | $\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{h^2 + k^2 + l^2}{a^2}$                                                                                                                                                                                                                                   |
| Τετραγωνικό         | $\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{h^2 + k^2}{a^2} + \frac{l^2}{c^2}$                                                                                                                                                                                                                       |
| Ορθορομβικό         | $\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2}$                                                                                                                                                                                                           |
| Εξαγωνικό           | $\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{4}{3} \left( \frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2}$                                                                                                                                                                                       |
| Ρομβοεδρικό         | $\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{(1 + \cos \alpha) + \left\{ (h^2 + k^2 + l^2) - [1 - \tan \alpha \left( \frac{a}{2} \right)](hk + kl + lh) \right\}}{a^2(1 + \cos \alpha - 2\cos^2 \alpha)}$                                                                                             |
| Μονοκλινές          | $\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{1}{\sin^2 \beta} \left( \frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2 \sin^2 \beta}{b^2} + \frac{l^2}{c^2} - \frac{2h \cos \beta}{ac} \right)$                                                                                                                             |
| Τρικλινές           | $\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{b^2 c^2 (\sin^2 \alpha) h^2 + a^2 c^2 (\sin^2 \beta) k^2 + a^2 b^2 (\sin^2 \gamma) l^2 + 2abc^2 (\cos \alpha \cos \beta - \cos \gamma) hk + 2a^2 bc (\cos \beta \cos \gamma - \cos \alpha) kl + 2ab^2 c (\cos \gamma \cos \alpha - \cos \beta) lh}{V^2}$ |

Για τον χαρακτηρισμό ενός κρυσταλλογραφικού επιπέδου χρησιμοποιούνται αριθμητικές παράμετροι που είναι γνωστές ως **δείκτες Miller** (*Miller indices*) (Lee, Erdemir, and Myerson, 2019). Πρόκειται για τρεις ακέραιους αριθμούς, που χρησιμοποιούνται για την περιγραφή του κρυσταλλικού πλέγματος, και κυρίως των κρυσταλλογραφικών επιπέδων και διευθύνσεων που ορίζουν μία κρυσταλλική δομή (Lee, Erdemir, and Myerson, 2019). Ανάλογα με το πλαίσιο που περιλαμβάνει τους τρεις αυτούς αριθμούς, δίδονται και οι αντίστοιχες πληροφορίες. Συγκεκριμένα, οι δείκτες *Miller* αν σημειώνονται εντός διαφορετικών συμβόλων, παρουσιάζουν και διαφορετικά χαρακτηριστικά, τα οποία δίδονται παρακάτω στον Πίνακα 1.5.

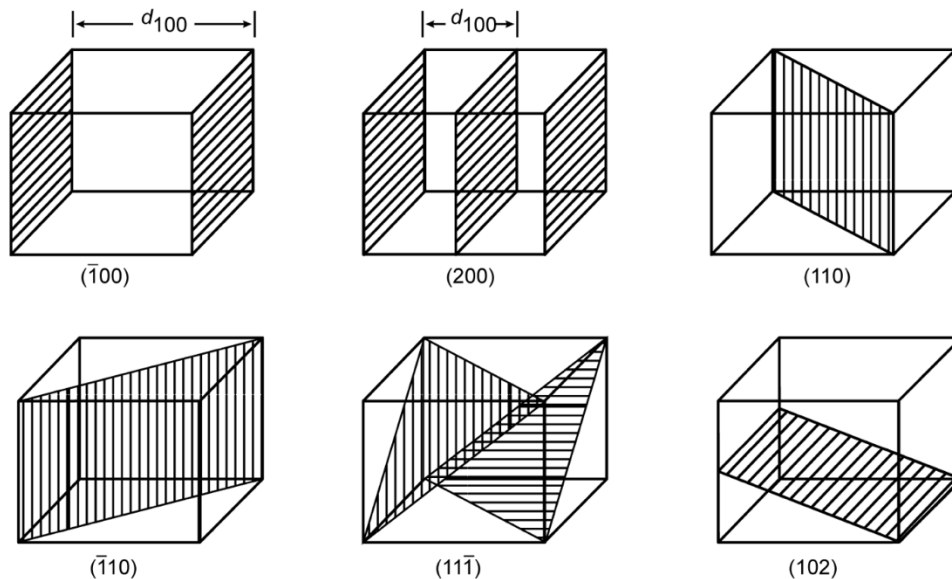
Πίνακας 1.5. Συμβολισμός που περιλαμβάνει τα hkl και περιγραφή.

| Συμβολισμός | Περιγραφή                             |
|-------------|---------------------------------------|
| ( hkl )     | Κρυσταλλογραφικά επίπεδα              |
| { hkl }     | Οικογένεια κρυσταλλογραφικών επιπέδων |
| [ hkl ]     | Διευθύνσεις                           |
| < hkl >     | Οικογένειες διευθύνσεων               |

Έστω οι τρεις κρυσταλλογραφικοί άξονες με μήκη αξόνων a, b, και c, και (x,y,z) τα σημεία όπου το κρυσταλλογραφικό επίπεδο τέμνει τους άξονες, οι δείκτες Miller (hkl), προκύπτουν από τις ακόλουθες σχέσεις:

$$h = \frac{a}{x}, \quad k = \frac{b}{y}, \quad l = \frac{c}{z}$$

και ορίζονται ως οι αντίστροφες τιμές των αποστάσεων τομής του κρυσταλλογραφικού επιπέδου κατά μήκος των αξόνων a, b και c, αντίστοιχα. Σε περίπτωση που ένα επίπεδο είναι παράλληλο σε έναν κρυσταλλογραφικό άξονα τότε τον τέμνει ουσιαστικά στο  $\infty$  και ο δείκτης Miller του σημείου είναι ίσος με το μηδέν. Επίσης, οι αρνητικού δείκτες γράφονται με μία παύλα πάνω από τον αντίστοιχο αριθμό, ενώ, επειδή πρόκειται για ακέραιους αριθμούς, σε περίπτωση που προκύψουν κλάσματα θα πρέπει να μετατραπούν σε ομώνυμα και ύστερα καθίστανται πρώτοι μεταξύ τους, διαιρώντας με τον μέγιστο κοινό διαιρέτη τους.



Εικόνα 1.4. Δείκτες Miller των επιπέδων σε ένα κυβικό σύστημα. Η απόσταση d αντιστοιχεί στην μεταξύ των επιπέδων απόσταση (Lee, Erdemir, & Myerson, 2019)

### 1.1.3 Αντίστροφο πλέγμα

Οι προηγούμενοι παράγραφοι αφορούσαν κυρίως τον κρύσταλλο, την περιγραφή του ως προς τον πραγματικό κόσμο και την απόδοση του με βάση το ευθύ πλέγμα. Παρόλα αυτά υπάρχει ένα σημείο τομής του πραγματικού κόσμου με την περίθλαση ακτίνων-X, και ονομάζεται αντίστροφος χώρος. Η περίθλαση αναλύεται λεπτομερώς σε επόμενο κεφάλαιο, όμως, στο σημείο αυτό πραγματοποιείται μία αναφορά στην συνθήκη περίθλασης, ώστε να οριστεί ο αντίστροφος χώρος.

Η συνάρτηση περίθλασης δίδεται από την σχέση:

$$\frac{\sin^2 \frac{\pi}{\lambda} (S - S_0) \cdot M_1 a \sin^2 \frac{\pi}{\lambda} (S - S_0) \cdot M_2 b \sin^2 \frac{\pi}{\lambda} (S - S_0) \cdot M_3 c}{\sin^2 \frac{\pi}{\lambda} (S - S_0) \cdot a \sin^2 \frac{\pi}{\lambda} (S - S_0) \cdot b \sin^2 \frac{\pi}{\lambda} (S - S_0) \cdot c}$$

Με την γενική μορφή:

$$y = (\sin^2 Mx) / \sin^2 x$$

Και σήμα λαμβάνεται μόνο στα σημεία για τα οποία ισχύει  $x = n\pi$ , όπου  $n$  ακέραιος αριθμός και η ένταση παίρνει τελικά την μέγιστη τιμή της όταν επαληθεύονται οι συνθήκες Laue, οι οποίες αναγράφονται στην συνέχεια (Rupp, 2010).

$$(S - S_0) \cdot a = h\lambda, \quad (S - S_0) \cdot b = k\lambda, \quad (S - S_0) \cdot c = l\lambda$$

όπου  $h, k, l$  ακέραιοι αριθμοί

Ο αντίστροφος χώρος αποτελείται από το **αντίστροφο πλέγμα** (*reciprocal lattice*), μία μαθηματική κατασκευή για την ερμηνεία του τρόπου αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας με την κρύσταλλο, και κατά επέκταση των μοτίβων περίθλασης. Σε αυτή την περίπτωση το διάνυσμα  $(S - S_0)/\lambda$  θεωρείται ισοδύναμο με το  $r^* = ha^* + kb^* + lc^*$ , με την προϋπόθεση ότι ισχύουν οι εξής σχέσεις:

$$\begin{array}{lll} a^* \cdot a = 1 & b^* \cdot a = 0 & c^* \cdot a = 0 \\ a^* \cdot b = 0 & b^* \cdot b = 1 & c^* \cdot b = 0 \\ a^* \cdot c = 0 & b^* \cdot c = 0 & c^* \cdot c = 1 \end{array}$$

Τα διανύσματα  $a^*$ ,  $b^*$  και  $c^*$  και το σύνολο των σημείων που προκύπτει από τους γραμμικούς συνδυασμούς των διανυσμάτων με τους ακραίους  $h, k, l$  αποτελούν το αντίστροφο πλέγμα. Όπως ορίστηκε και προηγουμένως, οι τρεις αυτοί ακέραιοι χαρακτηρίζουν μία οικογένεια κρυσταλλικών επιπέδων του ευθέως πλέγματος, κατά αυτόν τον τρόπο και κάθε κόμβος του αντιστρόφου πλέγματος (σήμα περίθλαση) αντιπροσωπεύει ένα σμήνος κρυσταλλογραφικών επιπέδων. Η απόσταση αυτών των σημείων από την ορισθείσα αρχή των αξόνων, υπαγορεύει την αντίστροφη απόσταση  $d$  των κρυσταλλογραφικών επιπέδων στο ευθύ πλέγμα, δηλαδή  $d^* = 1/d$ .

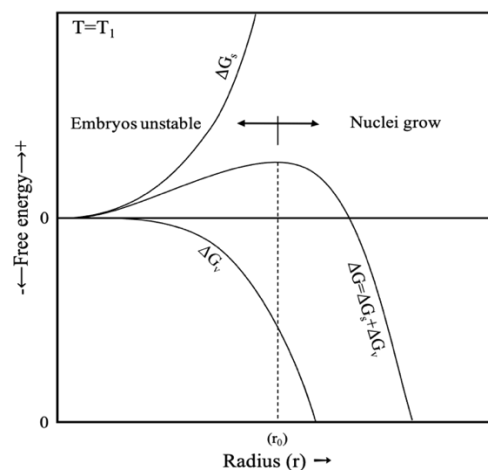
## 1.2 Κρυστάλλωση

Τα βιολογικά μακρομόρια είναι ιδιαίτερος πολύπλοκα μόρια, όπως και τα σχήματα που δημιουργούν, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να «πακεταριστούν» αποτελεσματικά και να σχηματίσουν κρυστάλλους αν δεν πληρείται η προϋπόθεση, ότι ένας διαλύτης συμπληρώνει τα κενά ανάμεσα τους (Χαμόδρακας, 1993). Για τον λόγο αυτό έχει αναπτυχθεί η πειραματική διαδικασία της **κρυστάλλωσης** (*crystallization*), η οποία εξετάζει τα προαπαιτούμενα για την επιτυχή ανάπτυξη κρυστάλλων, ικανών, μάλιστα, να περιθλούν την ακτινοβολία. Η επιτυχής συλλογή δεδομένων στηρίζεται στην δημιουργία ικανοποιητικού μεγέθους κρυστάλλων, αλλά και υψηλής ποιότητας.

Η εύρεση των συνθηκών κρυστάλλωσης στηρίζεται σε δοκιμές τροποποίησης του περιβάλλοντος της υπό μελέτη ουσίας, αξιοποιώντας παράγοντες με διαφορετικές ιδιότητες. Απώτερος στόχος είναι ο περιορισμός των πιθανών τρόπων που γειτονικά μόρια της ουσίας μπορούν να αλληλοεπιδράσουν ευνοϊκά, στις περιπτώσεις εκείνες που θα οδηγήσουν στην αυτό-οργάνωση των μορίων σε περιοδικό πλέγμα. Η πολυπλοκότητα σύνθετων μακρομορίων, καθιστά δύσκολη την συστηματική προσέγγιση των ευνοϊκών συνθηκών κρυστάλλωσης τους, και για κάθε άγνωστη ουσία, που τίθεται πρώτη φορά για δομική μελέτη, η κρυστάλλωση της αποτελεί μία πρόκληση.

### 1.2.1 Βιοχημικές και Βιοφυσικές Αρχές Κρυστάλλωσης

Αρχικά, το διάλυμα της κρυστάλλωσης, ανεξάρτητα από την τεχνική που θα χρησιμοποιηθεί, πρέπει να ξεπεράσει την κρίσιμη διαλυτότητά του. Δηλαδή, θα πρέπει να ξεπεράσει το σημείο κορεσμού, όπου η αδιάλυτη στερεή ουσία είναι σε ισορροπία με αυτή που έχει διαλυθεί και μεταβεί στην υπέρκορη κατάσταση. Κατά την μετάβαση του συστήματος στην κατάσταση **υπερκορεσμού** (*supersaturation*), το όριο της διαλυτότητας έχει υπερκεραστεί και το διάλυμα εξαναγκάζει τα μόρια σε έξοδο από το διάλυμα σε στερεά φάση προκειμένου να έλθει εκ νέου σε κατάσταση ισορροπίας. Κατά αυτόν τον τρόπο, η πρωτεΐνη αρχίζει να συσσωματώνεται και να δημιουργεί ασταθείς πυρήνες. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται **πυρήνωση** (*nucleation*), ενώ τα ασταθή συσσωματώματα μορίων αποτελούν τους **πυρήνες** (*nuclei*). Όταν τα συσσωματώματα αυτά υπερβούν ένα κρίσιμο μέγεθος, ώστε η δομή τους να καθίσταται ανεπηρέαστη από διακυμάνσεις που σημειώνονται στο διάλυμα, τότε κάθε επιπλέον μόριο που εναποτίθεται συμβάλει στην διαμόρφωση της στερεάς φάσης, που ευνοείται σε αυτό το στάδιο από θερμοδυναμική άποψη. Η δημιουργία κρυστάλλων επιτυγχάνεται στην περίπτωση όπου το φαινόμενο αυτό ακολουθείται από περιοδική οργάνωση, λόγω κατάλληλου συνδυασμού μεγέθους συσσωματώματος και ελεύθερης ενέργειας *Gibbs*.

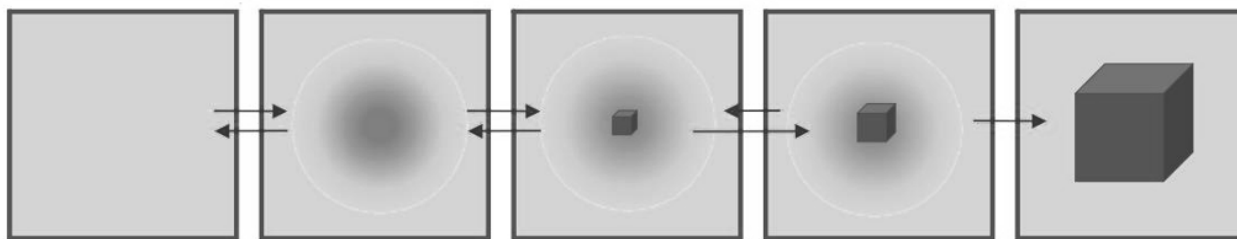


**Εικόνα 1.5.** Μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs κατά τον σχηματισμό κρυστάλλων σε σταθερή θερμοκρασία (Schupsky, 2020).

Αναλυτικότερα, η διαρκής προσθήκη μορίων πρωτεΐνης προκαλεί φυσικοχημικές μεταβολές. Με την υπέρβαση μίας κατωφλίου τιμής της ελεύθερης ενέργειας *Gibbs* στην οποία το μέγεθος των πυρήνων έχει φτάσει σε μία τιμή  $r_0$ , σε εκείνο ακριβώς το σημείο η δημιουργία στερεάς φάσης έχει αρχίσει να ευνοείται (Vekilov, 2012). Αν οι πυρήνες που σχηματίζονται χαρακτηρίζονται από αυστηρή περιοδική οργάνωση, τότε έχει επιτευχθεί η διαδικασία της κρυστάλλωσης. Το φυσικοχημικό υπόβαθρο της διαδικασίας της πυρήνωσης δύναται να γίνει κατανοητό, λαμβάνοντας υπόψη την πολυπλοκότητα των επιδράσεων στις μεταβολές που σημειώνονται στην ενθαλπία και την εντροπία τόσο του διαλύματος όσο και της πρωτεΐνης. Με οδηγό τη σχέση:

$$\Delta G^0_{crystal} = \Delta H^0_{crystal} - T(\Delta S^0_{protein} + \Delta S^0_{solvent})$$

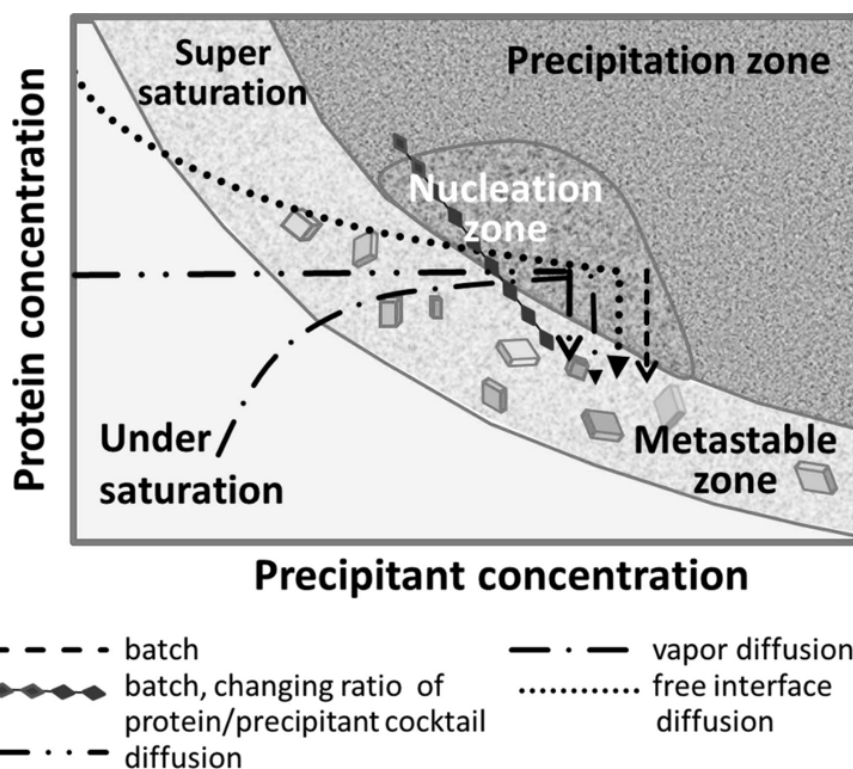
απαιτείται ο όρος της εξίσωσης  $(\Delta S^0_{protein} + \Delta S^0_{solvent})$  να είναι αρνητικός και η ενθαλπία του συστήματος να μειωθεί λόγω πολύπλοκων διεργασιών, που αφορούν τις διαμοριακές δυνάμεις ανάμεσα στα μόρια του διαλύματος και την θερμοκινητική τους που μεταβάλλεται. Συνολικό αποτέλεσμα είναι ότι η εντροπία του συστήματος αυξάνεται, έτσι ώστε και  $\Delta G_{crystal}^0 < 0$ . Κατά αυτό τον τρόπο, αποδεικνύεται πως η αλλαγή φάσης και η δημιουργία κρυστάλλων είναι αυθόρμητη, θερμοδυναμικά ευνοϊκή διαδικασία (Vekilov, 2012).



Εικόνα 1.6. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού πυρήνωσης των κρυστάλλων (Vekilov, 2012).

Η διεργασία της κρυστάλλωσης στηρίζεται στην μεταβολή της διαλυτότητας μίας ουσίας, και η διαλυτότητα με την σειρά της εξαρτάται από ένα σύνολο διαφορετικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, για την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών, βασικός στόχος είναι η ελάττωση της διαλυτότητας της, με έναν ελεγχόμενο τρόπο, καθώς ταχεία μείωση είναι πιθανό να οδηγήσει στον σχηματισμό άμορφου ιζήματος. Η εναπόθεση μορίων στην επιφάνεια ανάπτυξης του κρυστάλλου θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο σταδιακή, για τον σχηματισμό του κρυσταλλικού πλέγματος, ώστε να δίδεται επαρκής χρόνος στην ανάπτυξη ειδικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ επιφανειακών ομάδων γειτονικών μορίων.

Η πολυπλοκότητα στην περιγραφή των συνδυαστικών πληροφοριών περιορίζεται με την χρήση των διαγραμμάτων φάσης (*phase diagrams*). Τα διαγράμματα φάσης, όπως αυτό που παρατίθεται στην Εικόνα 1.7, αναπαριστούν οπτικά τις φάσεις από τις οποίες διέρχονται τα μόρια ως την δημιουργία κρυστάλλων, και εκφράζουν την συγκέντρωση της πρωτεΐνης (άξονας y) συναρτήσει της συνθήκης ή του παράγοντα καθίζησης (άξονας x) (Vekilov, 2012). Εντός του διαγράμματος υπάρχουν δύο βασικές καμπύλες, με την κατώτερη να αποτελεί την **καμπύλη διαλυτότητας** (*solubility curve*), και την ανώτερη να αποτελεί την **καμπύλη υπερδιαλυτότητας** (*supersolubility curve*). Η καμπύλη διαλυτότητας είναι η οριοθετημένη γραμμή που αντιπροσωπεύει τα σημεία κορεσμού του διαλύματος, δηλαδή την ισορροπία μεταξύ στερεής και διαλυτής φάσης. Ακόμη, επιτρέπει έναν επιπλέον διαχωρισμό, με ό,τι βρίσκεται κάτω από αυτή την καμπύλη να ανήκει στην υπόκορη περιοχή, ενώ αντίθετα ό,τι βρίσκεται στο ανώτερο τμήμα να αποτελεί την υπέρκορη περιοχή.



Εικόνα 1.7. Διάγραμμα φάσης συμπεριλαμβανομένων και των διαφορετικών τεχνικών κρυστάλλωσης πρωτεϊνών (Schlichting, 2015).



Θέτοντας ως στόχο την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών, βασική προϋπόθεση είναι το σύστημα να μεταβεί στην υπέρκορη κατάσταση, ώστε να αυξηθούν οι πιθανότητες σχηματισμού πυρήνων, εκκινώντας την διαδικασία της πυρήνωσης. Στο διάγραμμα, το σημείο όπου είναι πιθανό να συμβεί η πυρήνωση ονομάζεται **ζώνη πυρήνωσης** (*nucleation zone*) (Vekilov, 2012). Στην περίπτωση που σχηματιστούν οι πυρήνες, ακολούθως μεταβαίνουν στην **μετασταθή ζώνη** (*metastable zone*) όπου μεγαλώνουν σε μέγεθος και σταδιακά σχηματίζουν κρυστάλλους. Να σημειωθεί, ότι εάν ο κρύσταλλος ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο μέγεθος, η ανάπτυξη του είναι μη αναστρέψιμη (Vekilov, 2012). Οι δύο αυτές ζώνες διαχωρίζονται από την καμπύλη υπερδιαλυτότητας. Τέλος, σε περιπτώσεις υψηλού υπερκορεσμού, υπάρχει η πιθανότητα να προκύψει στερεή φάση αλλά ιζηματοποιημένης μορφής, όταν το σύστημα μεταβαίνει στην **ζώνη καθίζησης** (*precipitation zone*).

### 1.2.2 Παράγοντες Κρυστάλλωσης

Η διαδικασία της κρυστάλλωσης περιλαμβάνει την εφαρμογή ορισμένων παραγόντων, οι οποίοι είτε αλληλεπιδρούν με τον διαλύτη είτε με την ίδια πρωτεΐνη και έχουν ως κύριο στόχο να μεταβάλλουν την διαλυτότητα του πρωτεϊνικού διαλύματος. Οι παράγοντες αυτοί ονομάζονται παράγοντες κρυστάλλωσης ή **παράγοντες καθίζησης** (*precipitants*), καθώς συμβάλλουν στην πραγματοποίησή της. Η καλύτερη γνώση των βέλτιστων παραμέτρων για επιτυχή κρυστάλλωση θεωρείται θεμελιώδους σημασίας, δεδομένου ότι επιτρέπει μεγαλύτερο έλεγχο και αποτελεσματικότερο χειρισμό της διαδικασίας.

Η επιλογή των παραγόντων καθίζησης εξαρτάται από την υπό μελέτη ουσία και για ουσίες για τις οποίες δεν υπάρχουν γνωστοποιημένα πρωτόκολλα κρυστάλλωσης, είναι αναγκαία η διερεύνηση των συνθηκών. Το πρώτο βήμα σε αυτή την περίπτωση είναι οι δοκιμασίες *screening* που επιτρέπουν την μελέτη ενός μεγάλου εύρους παραγόντων χρησιμοποιώντας πολύ μικρό όγκο διαλύματος (της τάξης των 0.5- 1μl) και μικρή ποσότητα πρωτεΐνης. Αν μία συνθήκη αποδώσει κρυστάλλους, κρίνεται απαραίτητη η βελτιστοποίηση της, ώστε να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της συνήθως με ένα δεύτερο *screening*.

Βασική προϋπόθεση για την έναρξη ενός πειράματος κρυστάλλωσης είναι η καθαρότητα του δείγματος, τόσο των μερών που συμβάλλουν στην κρυστάλλωση, όσο και του υπό μελέτη μορίου, καθώς σωματίδια σκόνης ή κλάσματα πρωτεϊνών θα επηρεάζουν αρνητικά το ορθή εναπόθεση των μορίων για την δημιουργία του πλέγματος, υποβαθμίζοντας την ποιότητα του κρυστάλλου. Αφού έχει εξασφαλιστεί η υψηλή καθαρότητα, ακολουθεί μία σειρά βημάτων που περιλαμβάνει την εύρεση των κατάλληλων συστατικών που πρέπει να προστεθούν στο διάλυμα κρυστάλλωσης, οι συγκεντρώσεις τους, όπως, επίσης, και η ρύθμιση του περιβάλλοντος ανάπτυξης των κρυστάλλων.

Οι παράγοντες που διαμορφώνουν το περιβάλλον ανάπτυξης των κρυστάλλων είναι το pH και η θερμοκρασία, τα οποία ουσιαστικά επηρεάζουν έμμεσα την διαλυτότητα. Ειδικότερα, το pH επιδρά άμεσα στα φορτία των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων, και κατά επέκταση στις αλληλεπιδράσεις των μορίων πρωτεΐνης τόσο μεταξύ τους, όσο και με τα μόρια του διαλύτη, με τη μικρότερη διαλυτότητα να απαντάται σε pH κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης. Σχετικά με την θερμοκρασία, η αύξηση της αυξάνει και την διαλυτότητα, αλλά η τελική επίδραση εξαρτάται αθροιστικά από τον συνδυασμό και των υπόλοιπων παραγόντων.

Εν συνεχεία, όσον αναφορά στα αντιδραστήρια και τις δοσολογίες τους, χρειάζεται ιδιαίτερη ακρίβεια και προσοχή, γιατί ακόμα και μικρές μεταβολές δύναται να έχουν μεγάλο αντίκτυπο, τόσο στην έκβαση της διαδικασίας της κρυστάλλωσης, όσο και στον ίδιο τον κρύσταλλο και την συμμετρία του. Σε πρωταρχικό επίπεδο, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης είναι βασικό στάδιο και χρησιμοποιείται ως δεδομένο ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης οδηγεί σε υπερκορεσμό του διαλύματος και, ακολούθως, σε μείωση της διαλυτότητας. Εντούτοις, επειδή η πρωτεΐνη δεν αρκεί για να πραγματοποιηθεί η κρυστάλλωση, διατίθεται πλήθος **πρόσθετων**

(*additives*), που δύναται να χρησιμοποιηθούν για να ενισχύσουν τις πιθανότητες δημιουργίας κρυστάλλων.

Οι πιο διαδεδομένοι παράγοντες καθίζησης είναι τα άλατα, με την καθοριστικής σημασίας ιοντική τους ισχύ, η οποία σχετίζεται με την συγκέντρωσή τους. Η προσθήκη του άλατος ή των αλάτων σε ένα διάλυμα οδηγεί στην άμεση διάστασή τους, με την ύπαρξη δύο διαφορετικών μηχανισμών δράσης, ανάλογα με τον τρόπο αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Πρωταρχική περίπτωση είναι η «*Salting in*», όπου υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των μορίων της πρωτεΐνης και των ιόντων του άλατος με τα μόρια του νερού. Αυτή η διττή αλληλεπίδραση έχει ως απόρροια την απομάκρυνση μορίων νερού από την επιφάνεια των μορίων της πρωτεΐνης και εντέλει μείωση της διαλυτότητας. Και κατά δεύτερον τον μηχανισμό «*Salting out*», που υπάρχει δέσμευση των ιόντων του άλατος από την επιφάνεια των μορίων της πρωτεΐνης και παράλληλη αύξηση της υδροφιλικότητας της. Η συνθήκη αυτή οδηγεί το διάλυμα στην ακόρεστη περιοχή, αντίθετα, δηλαδή, από την επιδιωκόμενη κατεύθυνση που οδηγεί αρχικά στον κορεσμό και στη συνέχεια στον υπερκορεσμό που διαλύματος, όπου και δημιουργούνται η κρύσταλλοι.

Εν συνεχεία, στα αντιδραστήρια ανήκουν, επιπλέον, τα πολυμερή, τα οποία μειώνουν την διαλυτότητα, χωρίς να αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη, καθώς καταλαμβάνουν μεγάλο όγκο δυσανάλογο με το μοριακό τους βάρος. Ακόμη, χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες, οι οποίοι προκαλούν μεταβολή της διηλεκτρικής σταθεράς με την απομάκρυνση μορίων νερού από το διάλυμα, επηρεάζοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων του διαλύματος. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται μείωση της πολικότητας της πρωτεΐνης, με την επιφερόμενη δέσμευση μορίων διαλύτη στις πολικές ομάδες επιφανειακά των μορίων της, με άμεση συνέπεια τη μείωση της διαλυτότητας. Τέλος, άλλη μία κατηγορία αντιδραστηρίων είναι οι προσδέτες, στους οποίους υπάγονται οργανικά μόρια και ιόντα μετάλλων, τα οποία αλληλοεπιδρούν με την πρωτεΐνη, επηρεάζοντας ως έναν μεγάλο βαθμό την αναδίπλωση της. Διαφορετικό «πακετάρισμα» της πρωτεΐνης υποδεικνύει διαφορετικές διαμοριακές αλληλεπιδράσεις στο διάλυμα, γεγονός που μεταβάλλει την διαλυτότητα.

Μία παράμετρος, που είναι φρόνιμο να λαμβάνεται υπόψη, είναι ο χρόνος που απαιτείται για την πραγματοποίηση της κρυστάλλωσης, ο οποίος διαφέρει ανάλογα με την πρωτεΐνη και το πρωτόκολλο που εφαρμόζεται κάθε φορά, με κάποιες πρωτεΐνες να σχηματίζουν κρυστάλλους σχεδόν αμέσως και άλλες από ώρες έως μέρες. Σε γενικές γραμμές, η πάροδος του χρόνου ευνοεί την κρυστάλλωση και όταν ο κρύσταλλος φθάσει σε ένα συγκεκριμένο μέγεθος, τότε αυτομάτως θα σταματήσει να αναπτύσσεται.

### 1.2.3 Μέθοδοι κρυστάλλωσης

Η επιλογή κατάλληλων συνθηκών κρυστάλλωσης είναι μία απαιτητική διαδικασία και εξαρτάται από πληθώρα παραμέτρων που πρέπει να συνδυαστούν αποτελεσματικά για την επιτυχή παραγωγή κρυστάλλων. Η επιλογή των κατάλληλων παραγόντων καθίζησης βασίζεται στην εφαρμοζόμενη τεχνική κρυστάλλωσης. Οι διάφοροι μέθοδοι κρυστάλλωσης που έχουν αναπτυχθεί διαφέρουν ως προς την διάταξη, ωστόσο, διατηρούν μία κοινή βασική αρχή η οποία υπαγορεύει την ανάμιξη ενός πρωτεϊνικού διαλύματος με τους επιλεγμένους παράγοντες κρυστάλλωσης σε ένα κλειστό σύστημα, έως ότου επέλθει ισορροπία.

Από το σύνολο των διαθέσιμων τεχνικών, επιλέγονται δύο οι οποίες εφαρμόστηκαν και πρακτικά στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Αρχικά, η μέθοδος άμεσης ανάμειξης (*Batch*) κατά τη διεξαγωγή της οποίας πραγματοποιείται απευθείας ανάμειξη του διαλύματος της πρωτεΐνης και του διαλύματος των παραγόντων καθίζησης με όλους τους αναγκαίους παράγοντες για το εκάστοτε δείγμα στις κατάλληλες συγκεντρώσεις, με στόχο την δημιουργία κρυστάλλων ύστερα από την απευθείας ανάμειξη τους σε ένα ειδικό σωλήνα τύπου Eppendorf. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στο φυσικοχημικό φαινόμενο της **αιφνίδιας πυρήνωσης** (*shock nucleation*), κατά την οποία η

ανάμειξη των δύο πολύ πυκνών διαλυμάτων οδηγεί στον ταχύ σχηματισμό συσσωματωμάτων που δεν προλαβαίνουν να καθιζάνουν, καθώς η αλληλοδιαδοχή των διαλυμάτων οδηγεί το σύστημα απευθείας στην ζώνη υπερκορεσμού.

Τα κύρια πλεονεκτήματα της μεθόδου Batch είναι το γεγονός ότι επιτρέπει να είναι γνωστές οι ακριβείς συνθήκες στις οποίες κρυσταλλώθηκε το υπό μελέτη μόριο, ενώ είναι κατάλληλη για πειράματα που αφορούν πολύ-κρυσταλλικά δείγματα, όπου απαιτούνται μεγάλες ποσότητες μικρό-κρυσταλλικών ιζημάτων. Στα μειονεκτήματα που σημειώνονται από την εφαρμογή της τεχνικής αυτής είναι η μεγάλη ποσότητα της πρωτεΐνης που απαιτείται σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, καθώς και πως δεν ανταποκρίνονται όλα τα πρωτεϊνικά μόρια σε αυτές τις απότομες συνθήκες κρυστάλλωσης.

Εν συνεχεία, η επόμενη μέθοδος είναι η μέθοδος **διάχυσης ατμών** (*vapor diffusion*), η οποία στοχεύει αρχικά στη δημιουργία μίας υπόκορης συνθήκης με την ανάμειξη του διαλύματος της πρωτεΐνης και των παραγόντων καθίζησης. Στη συνέχεια, ακολουθεί εξισορρόπηση μέσω μίας δεξαμενής που περιέχει διάλυμα κρυστάλλωσης και της σταγόνας κρυστάλλωσης, η οποία πραγματοποιείται μέσω διάχυσης ατμών του πιο πτητικού παράγοντα του διαλύματος από τη σταγόνα προς την δεξαμενή, έως ότου η σταγόνα καταστεί υπέρκορη. Να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση των παραγόντων καθίζησης, εντός της δεξαμενής, είναι μεγαλύτερη από την συγκέντρωσή τους στην σταγόνα. Η διαδικασία της διάχυσης συνεχίζεται ως το σημείο όπου η τάση ατμών της σταγόνας εξισώνεται με την τάση ατμών της δεξαμενής. Στο σημείο αυτό ο κύριος παράγοντας καθίζησης συμπυκνώνεται, ώστε να αποκτήσει την ίδια συγκέντρωση με αυτή στη δεξαμενή.

Η μέθοδος *vapor diffusion* διακρίνεται κυρίως σε δύο κατηγορίες τη διάχυση ατμών **καθήμενης σταγόνας** (*sitting drop*), και τη διάχυση ατμών **κρεμάμενης σταγόνας** (*hanging drop*), οι οποίες διαφέρουν ως προς την διάταξη. Στην διάταξη της καθήμενης σταγόνας, η σταγόνα του πρωτεϊνικού διαλύματος με τους παράγοντες κρυστάλλωσης τοποθετείται σε ένα **πηγάδι** (*well*) δεξαμενή πολύ μικρού όγκου (~ 5μl) ακριβώς δίπλα από την δεξαμενή του διαλύματος παραγόντων καθίζησης (*reservoir solution*). Η μέθοδος αυτή είναι ιδανική για έλεγχο συνθηκών (*screening*) και **βελτιστοποίηση** (*optimization*). Αντίθετα, στη διάταξη της κρεμάμενης σταγόνας η σταγόνα των παραγόντων κρυστάλλωσης τοποθετείται σε καλυπτρίδα με τρόπο τέτοιο ώστε να βρίσκεται ακριβώς πάνω από τη δεξαμενή με το διάλυμα παραγόντων καθίζησης, όπου και συγκρατείται λόγω της επιφανειακής τάσης.

Μία εναλλακτική μέθοδος που δύναται να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά, ιδίως στην περίπτωση που λαμβάνεται κρύσταλλος, με την χρήση άλλων μεθόδων κρυστάλλωσης, αλλά δεν ενδείκνυται η ποιότητα του για την διεξαγωγή πειράματος περίθλασης, είναι **μέθοδος σποράς** (*seeding*). Για την πραγματοποίηση της κρυστάλλωσης χρησιμοποιούνται θραύσματα ήδη σχηματισμένων κρυστάλλων από μία προϋπάρχουσα πηγή και μεταφέρονται σε νέες δοκιμαστικές συνθήκες, όχι απαραίτητα τις ίδιες με το μητρικό διάλυμα. Κατά αυτόν τον τρόπο διατίθενται στο νέο διάλυμα οι πυρήνες και είναι εφικτό το σύστημα να μεταβεί στην μετασταθή ζώνη ευνοώντας τον σχηματισμό νέων κρυστάλλων (D'Arcy *et al.*, 2014).

### 1.3 Ακτίνες-X

Από το ευρύ ηλεκτρομαγνητικό φάσμα, για την πραγματοποίηση των πειραμάτων περίθλασης, αξιοποιούνται οι **ακτίνες-X** (*X-rays*). Η αιτία για την οποία επιλέγεται το είδος αυτό της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας έγκειται στο γεγονός ότι οι διαστάσεις των πρωτεϊνικών μορίων κυμαίνονται σε ένα εύρος της τάξεως 20-100 Å. Για την διάκριση λεπτομερειών σε επίπεδο μοριακής δομής, επομένως, απαιτείται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μήκους κύματος πλησιέστερα της τιμής του 1 Å. Οι ακτίνες-X απαντώνται σε μήκη κύματος από  $10^{-8}$  m έως  $10^{-12}$  m, περιλαμβάνοντας τα μήκη κύματος που είναι συγκρίσιμα με τις αποστάσεις των αυστηρά διευθετημένων μορίων μίας κρυσταλλικής δομής. Στο σημείο αυτό, να διευκρινιστεί ότι το Ångström, Å, είναι μία εναλλακτική μονάδα μήκους που χρησιμοποιείται κυρίως για την περιγραφή ατομικών αποστάσεων και ως μέτρο

της διακριτικότητας, με το 1 Å να ισούται με 0.1 nm, απόσταση περίπου ίση με την διάμετρο του ατόμου του υδρογόνου.

### 1.3.1 Ηλεκτρομαγνητική Ακτινοβολία

Τόσο η παραγωγή των ακτίνων-X, όσο και το φαινόμενο της περίθλασης βασίζονται για την ερμηνεία τους στις ιδιότητες της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, με κάθε συνθήκη να αξιοποιεί μία διαφορετική όψη του κυματοσωματιδιακού δυϊσμού της τελευταίας. Προκειμένου να καταστεί εφικτή η κατανόηση κάθε σταδίου από την παραγωγή ως και την περίθλαση, αναγκαία κρίνεται μία προσέγγιση του θεωρητικού υποβάθρου των βασικών ιδιοτήτων της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

Σε πρωταρχικό επίπεδο, η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ορίζεται ως η διάδοση μίας κυματικής διαταραχής, η οποία συνίσταται από ηλεκτρικές και μαγνητικές κυματικές διαταραχές κάθετες μεταξύ τους και κάθετες στην διεύθυνση διάδοσης. Διαδίδονται ακόμα και στο κενό με ταχύτητα ίση με την ταχύτητα του φωτός,  $c$  ( $c=2.99792458 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$ ). Συναφώς με τα μηχανικά κύματα, τα ηλεκτρομαγνητικά, χαρακτηρίζονται από το μήκος κύματος,  $\lambda$ , την απόσταση δηλαδή μεταξύ δύο διαδοχικών κοιλάδων ή κορυφών του κύματος, καθώς και από την συχνότητα,  $\nu$ , όπου συμβολίζει το πλήθος των ταλαντώσεων σε ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα προς το χρονικό αυτό διάστημα. Τα δύο αυτά χαρακτηριστικά συνδέονται μέσω της θεμελιώδους εξίσωσης της κυματικής, σύμφωνα με την οποία, στο κενό, ισχύει ότι:  $c = \lambda \nu$ .

Εντούτοις, η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία δεν απαντάται μόνο ως κύμα, αλλά παρουσιάζει και σωματιδιακά χαρακτηριστικά. Σύμφωνα με αυτή την προσέγγιση, όπως διατυπώθηκε από τον Max Planck, το άτομο εκπέμπει την ακτινοβολία υπό μορφή διακεκριμένων ποσών ενέργειας, τα γνωστά κβάντα ενέργειας και τα σωματίδια της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ορισμένης ενέργειας ονομάζονται φωτόνια. Κάθε φωτόνιο συχνότητας  $\nu$ , περικλείει ενέργεια  $E$ , η οποία είναι ίση με  $E=h \cdot \nu$ , όπου  $h$  η σταθερά του Planck ( $h=6.626 \times 10^{-34} \text{ Js}$ ).

Ο διττός χαρακτήρας της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας επιτρέπει τα κύματα και τα σωματίδια να αντιμετωπίζονται ως ανεξάρτητες οντότητες και να ερμηνεύονται αναλόγως από τις κατάλληλες κάθε φορά εξισώσεις. Κατά αυτόν τον τρόπο όταν προσεγγίζεται ως προς τον κυματικό χαρακτήρα, η ένταση είναι ανάλογη του τετραγώνου του πλάτους του κύματος. Ενώ, από την άλλη πλευρά, βάσει του σωματιδιακού μοντέλου η ένταση είναι ανάλογη του αριθμού των φωτονίων που είναι κάθε στιγμή παρόντα.

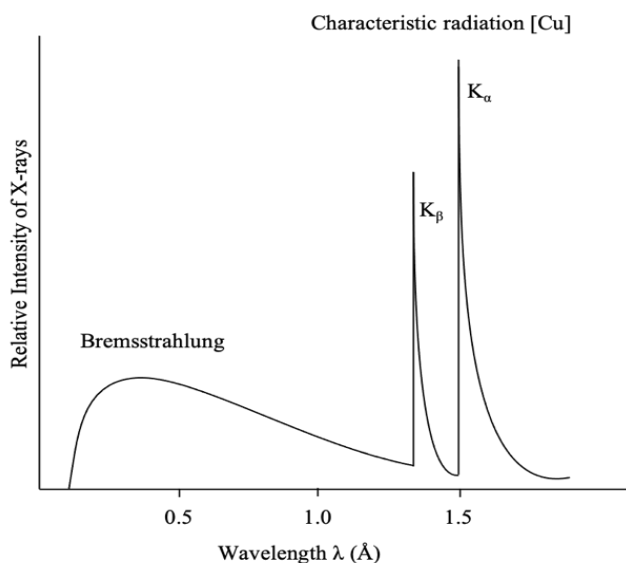
### 1.3.2 Παραγωγή ακτίνων-X

Η παραγωγή των ακτίνων-X δύναται να πραγματοποιηθεί, είτε σε εργαστηριακό περιθλασίμετρο, είτε σε εγκαταστάσεις Σύγχροτρον. Κάθε μία από τις προαναφερθείς περιπτώσεις φέρει διαφορετικά πλεονεκτήματα και για τον λόγο αυτό αξιοποιούνται και οι δύο στο πλαίσιο διεξαγωγής ενός ολοκληρωμένου κρυσταλλογραφικού πειράματος.

Η παραγωγή ακτίνων-X στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο προϋποθέτει την ύπαρξη ειδικών **σωλήνων ακτίνων-X** (*X-ray tubes*). Εντός του σωλήνα, σε συνθήκες κενού, υπάρχει ένα νήμα βολφραμίου, που αποτελεί την κάθοδο, το οποίο διαπυρώνεται και μέσω θερμιονικής εκπομπής παράγει ηλεκτρόνια. Ακριβώς απέναντι από την κάθοδο είναι τοποθετημένος ένα θετικά φορτισμένος μεταλλικός στόχος, που αποτελείται από δύστηκτο μέταλλο και ονομάζεται άνοδος ή αντικάθοδος. Μεταξύ της ανόδου και της καθόδου εφαρμόζεται υψηλή τάση και το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται, επιταχύνει την παραγόμενη δέσμη ηλεκτρονίων από την κάθοδο στον στόχο. Καθώς τα ηλεκτρόνια φτάνουν με υψηλή ταχύτητα, διεισδύουν στο μέταλλο της ανόδου και επιβραδυνόμενα παράγουν ακτίνες-X προς όλες τις κατευθύνσεις. Η έξοδος των ακτίνων-X, γίνεται από ειδικά «παράθυρα» βηρυλλίου, Be ( $Z=4$ ), εφόσον ο μικρός αριθμός ηλεκτρονίων ανά άτομο, επιτρέπει την ανεμπόδιστη διέλευση τους.

Η επιβράδυνση των ηλεκτρονίων που προκύπτει από την σύγκρουση τους με το μέταλλο-στόχο αποδίδει ένα συνεχές φάσμα ακτινοβολίας, γνωστό και ως **λευκή ακτινοβολία** (*white radiation*) ή **ακτινοβολία πέδησης** (*breaking radiation, Bremsstrahlung*). Ουσιαστικά, ηλεκτρόνια κατά την αλληλεπίδραση τους με το ηλεκτρικό πεδίο των πυρήνων των ατόμων του μετάλλου χάνουν μέρος της κινητικής τους ενέργειας. Το ποσό της κινητικής ενέργειας που δύναται να χαθεί εξαρτάται από την ακτινική απόσταση του ηλεκτρονίου από τον πυρήνα από του οποίου το ηλεκτρικό πεδίο διέρχεται. Οι πιθανές τιμές που μπορεί να λάβει η ακτινική απόσταση περιλαμβάνουν ένα μεγάλο πεδίο τιμών και κατά αυτό τον τρόπο προκύπτει το συνεχές φάσμα.

Στο συνεχές φάσμα υπερτίθενται κορυφές υψηλών εντάσεων, οι **χαρακτηριστικές ακτίνες-X** (*characteristic X-rays*) οι οποίες οφείλονται σε συγκρούσεις των προσπιπτόντων ηλεκτρονίων με τα ηλεκτρόνια των εσωτερικών φλοιών των ατόμων του μετάλλου της αντικαθόδου. Αν κατά την σύγκρουση πραγματοποιηθεί αποβολή ηλεκτρονίου εσωτερικής στιβάδας, ένα ηλεκτρόνιο υψηλότερης ενέργειας θα μεταπέσει για την πλήρωση της κενής θέσης και θα εκπεμφθεί φωτόνιο ακτίνων-X. Για την ερμηνεία της εμφάνισης των χαρακτηριστικών, για το εκάστοτε μέταλλο, ακτίνων-X, αξιοποιείται η σωματιδιακή φύση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, δεδομένου ότι οι ενεργειακές στάθμες είναι κβαντισμένες και κάθε μετάπτωση αποδίδει μία κορυφή ανάλογη της ενέργειας μετάβασης μεταξύ των ενεργειακών σταθμών. Συγκεκριμένα, για την περίπτωση που το μέταλλο που χρησιμοποιείται ως υλικό της ανόδου είναι ο χαλκός,  $^{29}\text{Cu}$ , οι σχεδόν μονοχρωματικές γραμμές  $K\alpha$  ( $K\alpha_1$  και  $K\alpha_2$ ) και  $K\beta$  ( $K\beta_1$  και  $K\beta_2$ ) στο φάσμα προκύπτουν κατά αντιστοιχία από τις ακόλουθες μεταβάσεις  $L \rightarrow K$  ( $h\nu = E_2 - E_1$ ) και  $M \rightarrow K$  ( $h\nu = E_3 - E_1$ ). Η ενεργειακή διαφορά κατά την μετάβαση  $L \rightarrow K$  είναι μικρότερη συγκριτικά με την  $M \rightarrow K$  μετάβαση και, κατά συνέπεια η  $K\alpha$  αναμένεται να σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με την  $K\beta$ .

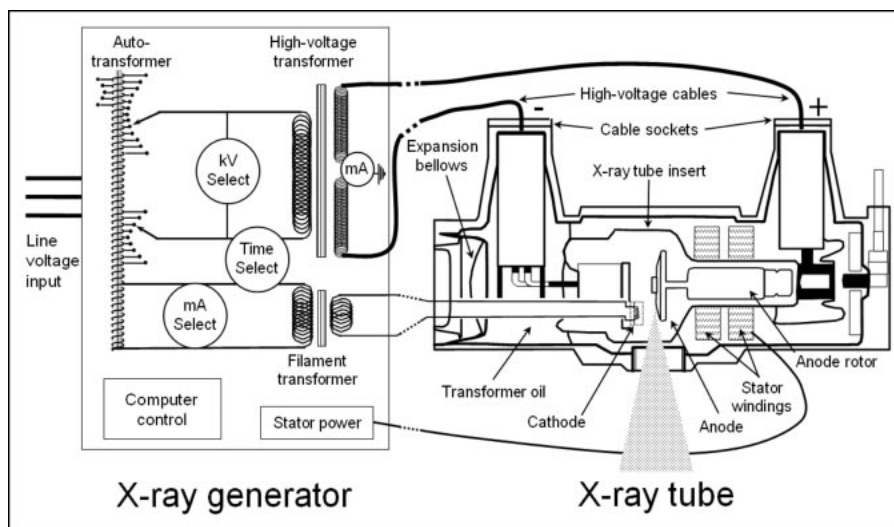


Εικόνα 1.8. Φάσμα ακτίνων-X νήματος ανόδου Cu (Atkins, 2017).

Η παραγωγή ακτίνων-X, από σωλήνες ακτίνων-X είναι χαμηλής απόδοσης, δεδομένου ότι ένα ποσοστό της τάξεως του 1% της κινητικής ενέργειας των επιταχυνόμενων ηλεκτρονίων μετατρέπεται σε αξιοποιήσιμη ακτινοβολία, με το υπόλοιπο 99% να μετατρέπεται σε θερμότητα. Για αυτόν ακριβώς τον λόγο, η πηγή ακτίνων-X θα πρέπει διαρκώς να ψύχεται, από ένα κλειστό κύκλωμα συνεχούς παροχής ψυχόμενου νερού, με στόχο την αποφυγή τήξης του νήματος της ανόδου.

Οι ακτίνες-X που εξέρχονται από τα παράθυρα βηρυλλίου, προκειμένου να καταστούν αξιοποιήσιμες θα πρέπει να διέλθουν από ένα σύνολο φίτρων, μονοχρωματόρων και κατόπτρων εστίασης. Η περίθλαση ακτίνων-X προϋποθέτει η ακτινοβολία να είναι μονοχρωματική (ακτινοβολία που αποτελείται από ένα μόνο μήκος κύματος) και όσο το δυνατόν πιο αποτελεσματικά εστιασμένη. Σε πρωταρχικό επίπεδο, χρησιμοποιείται ειδικό φίλτρο από μέταλλο με ατομικό αριθμό  $Z-1$ , όπου  $Z$

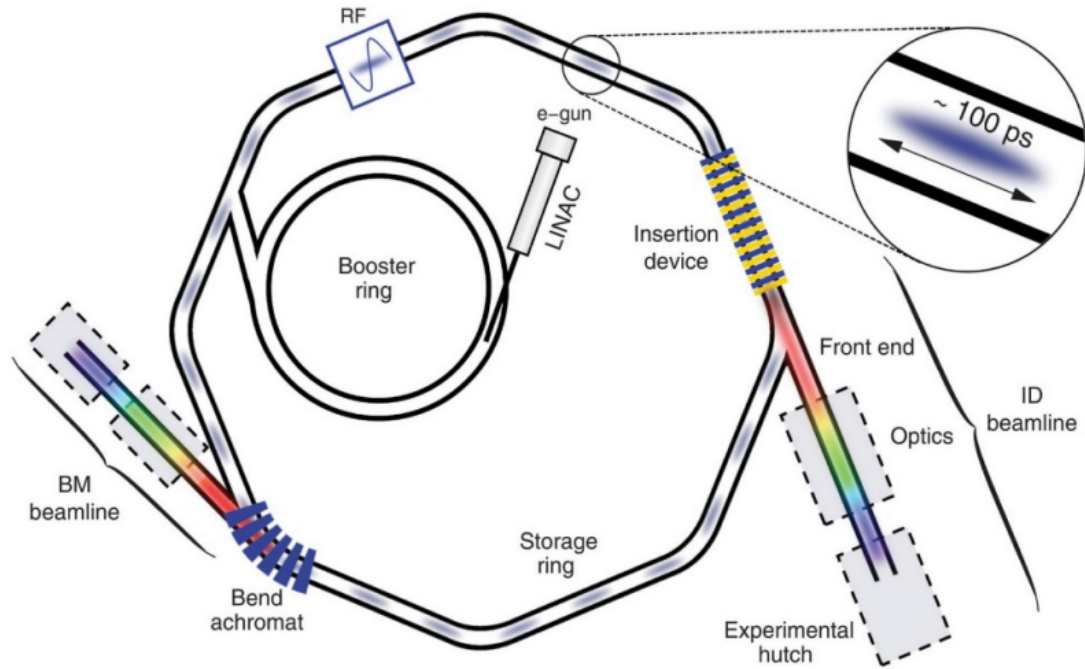
ο ατομικός αριθμός του υλικού της ανόδου, προκειμένου η ακμή απορρόφησης του να βρίσκεται μεταξύ των χαρακτηριστικών γραμμών Κα και Κβ, επιτρέποντας κατά αυτόν τον τρόπο την απομάκρυνση της Κβ από το φάσμα. Για την περίπτωση του της ανόδου χαλκού το εκλεκτικό φίλτρο αφαίρεσης της Κβ είναι νικελίου,  $^{28}\text{Ni}$ . Εν συνεχεία, οι ακτίνες-Χ περνούν από κρυσταλλικούς μονοχρωμάτορες από γραφίτη ή πυρίτιο, όπου τα επιλεγμένα κρυσταλλικά επίπεδα (002) και (111), αντίστοιχα, περιθλούν την εισερχόμενη ακτινοβολία, ακολουθώντας τον νόμο του Bragg, σε συγκεκριμένη γωνία περίθλασης. Το συγκεκριμένο βήμα διαχωρίζει αποτελεσματικότερα την χαρακτηριστική Κα ακτινοβολία από την πολυχρωματική ακτινοβολία πέδησης και την Κβ. Η πορεία της δέσμης ακτίνων-Χ, ανακόπτεται από ειδικά κάτοπτρα και μεταλλικές σχισμές που επιτρέπουν την διέλευση μόνο συγκεκριμένου κύματος ακτινοβολίας, ενώ, επιπροσθέτως, περιορίζουν την γωνιακή απόκλιση της ακτινοβολίας, που είναι φυσικό επόμενο της διάδοσής της, καθώς και την σκέδαση από μόρια του αέρα.



Εικόνα 1.9. Απεικόνιση της γεννήτριας του σωλήνα παραγωγής ακτίνων-Χ (Seibert, 2004).

Το εργαστηριακό περιθλασίμετρο και οι σωλήνες ακτίνων-Χ αποτελούν αδιαμφισβήτητα ένα χρήσιμο και προσιτό μέσο για την πραγματοποίηση πειραμάτων περίθλασης. Για την παραγωγή, εντούτοις, ακτινοβολίας υψηλότερης ποιότητας, τόσο σε επίπεδο ενέργειας, όσο και εστίασης, χρησιμοποιούνται ειδικές εγκαταστάσεις **σύγχροτρον** (*synchrotron*). Ακριβέστερα, πρόκειται για ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που εκπέμπουν φορτισμένα σωματίδια, καθώς κινούνται με σχετικιστική ταχύτητα, την οποία αποκτούν ύστερα από την συνεχή επιτάχυνση τους σε κυκλικές τροχιές. Για την πλήρη κατανόηση της αξίας που παρουσιάζει αυτό το είδος ακτινοβολίας, είναι σημαντικό να χαρτογραφηθεί η πορεία του ηλεκτρονίου εντός των μερών που συνθέτουν μία εγκατάσταση σύγχροτρον.

Στην Εικόνα 1.10 αποτυπώνονται τα κυριότερα μέρη παραγωγής ακτινοβολίας ενός σύγχροτρον. Το πρώτο βήμα είναι η παραγωγή των ηλεκτρονίων, η οποία πραγματοποιείται σε ένα κανόνι ηλεκτρονίων (*electron gun*), δηλαδή μία κάθοδο η οποία διαρρέεται από ηλεκτρικό ρεύμα και με θερμιονική εκπομπή παράγονται ηλεκτρόνια, ενέργειας της τάξεως των 100 keV (Aquilanti, 2014). Ακολούθως, τα παραγόμενα ηλεκτρόνια εισάγονται στον **γραμμικό επιταχυντή** (*linear accelerator, LINAC*), όπου υπόκεινται στο πρώτο στάδιο επιτάχυνσης με την αντίστοιχη ενέργεια ανέρχεται σε τάξεις MeV. Εν συνεχεία, η δέσμη των ηλεκτρονίων εισέρχεται σε έναν **δακτύλιο ενίσχυσης** (*booster ring*), όπου τα ηλεκτρόνια θα υποστούν το τελευταίο στάδιο επιτάχυνσης ώστε να φτάσουν σε ενέργειες MeV ή GeV (Aquilanti, 2014). Ο δακτύλιος αυτός περιλαμβάνει μαγνήτες που καμπυλώνουν την τροχιά και εστιάζουν την δέσμη, αλλά και ευθύγραμμα τμήματα για την επιπλέον επιτάχυνση των ηλεκτρονίων.



Εικόνα 1.10. Διαγραμματική απεικόνιση των τμημάτων μίας εγκατάστασης παραγωγής ακτινοβολίας Σύγχροτρον (Willmott, 2019).

Αφού τα ηλεκτρόνια φτάσουν την ενέργεια που είναι η επιθυμητή, τότε γίνεται **έγχυση** (*injection*) των ηλεκτρονίων στον **δακτύλιο αποθήκευσης** (*storage ring*) σε **δεσμίδες** (*bunches*). Τα ηλεκτρόνια εντός του δακτυλίου αποθήκευσης θα πρέπει να διατηρούνται σε σταθερή κυκλική τροχιά, γεγονός που επιτυγχάνεται με **μαγνήτες κάμψης** (*bending magnets*) και **ηλεκτρομαγνήτες διεύθυνσης πολλαπλών πόλων** (*multi-pole steering electromagnets*). Ενεργειακές απώλειες κατά την διάρκεια της κίνησης των ηλεκτρονίων, λόγω μετατροπής τους σε ενέργεια σύγχροτρον, αναπληρώνονται από ειδικές **κοιλότητες επιτάχυνσης ραδιοσυχνότητας** (*accelerating radiofrequency cavities, RF*). Να σημειωθεί, πως τα ηλεκτρόνια βρίσκονται σε συνθήκες υψηλού κενού προκειμένου να ελαχιστοποιούνται οι απώλειες λόγω συγκρούσεων. Στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι στα ευθύγραμμα τμήματα του δακτυλίου αποθήκευσης δύναται εναλλακτικά να διατίθενται **διατάξεις παρεμβολής** (*insertion devices*), οι οποίες εξαναγκάζουν τα ηλεκτρόνια σε ταλάντωση μέσω της εφαρμογής υψηλού εναλλασσόμενου μαγνητικού πεδίου, το οποίο παράγεται από μία συστοιχία μαγνητών εναλλασσόμενης πολικότητας. Στις διατάξεις παρεμβολής ανήκουν οι **ταλαντωτές** (*undulators*) και οι **εκτροπείς** (*wigglers*), οι οποίοι επιταχύνουν τα ηλεκτρόνια με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, εκπέμποντας έντονη και εστιασμένη ακτινοβολία. Τελικά, η ακτινοβολία κατευθύνεται, μέσω των οδηγών ακτινοβολίας, στα ειδικά συστήματα εκπομπής, όπου φιλτράρεται από ειδικά φίλτρα, κάτοπτρα εστίασης, και μονοχρωμάτορες, και καταλήγει στους πειραματικούς σταθμούς για την αξιοποίηση της ακτινοβολίας που έχει λάβει τα επιθυμητά, πλέον, χαρακτηριστικά.

Έκαστη εκ των δύο πηγών ακτίνων-Χ διαθέτει και τα πλεονεκτήματά της, με την ακτινοβολία σύγχροτρον βέβαια να υπερτερεί σημαντικά. Η θεμελιωδέστερη αιτία έγκειται στο γεγονός πως η ακτινοβολία είναι υψηλότερης λαμπρότητας. Ο όρος **λαμπρότητα** (*brilliance*) είναι ο πληρέστερος για την περιγραφή της ποιότητας της ακτινοβολίας και ορίζεται ως εξής:

$$B = \frac{d^4 N}{dt \cdot d\Omega \, dS \frac{d\lambda}{\lambda}}$$

όπου  $N$  είναι ο αριθμός των φωτονίων,  $t$  ο χρόνος παραγωγής των φωτονίων σε δευτερόλεπτα,  $\Omega$  την γωνιακή απόκλιση των φωτονίων,  $S$  την επιφάνεια διατομής της δέσμης και τέλος το κλάσμα  $d\lambda/\lambda$ , το οποίο είναι το φασματικό εύρος και εκφράζει την μονοχρωματικότητα της δέσμης. Με μια συνοπτική προσέγγιση, η λαμπρότητα είναι η έκφραση της φωτεινότητας προς το γινόμενο των διαστάσεων της δέσμης.

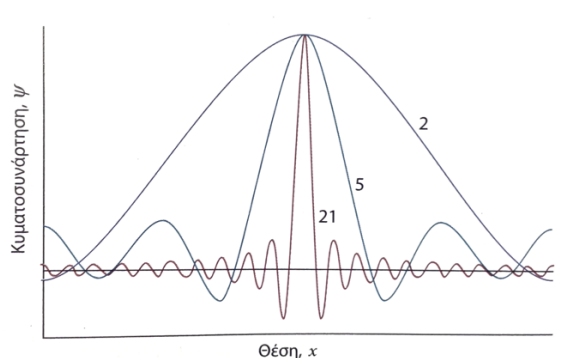
### 1.3.3 Κυματική φύση του φωτός

Τα πειράματα περίθλασης βασίζονται στο χαρακτηριστικό των ακτίνων-X να αλληλεπιδρούν μόνο με τα ηλεκτρόνια της ύλης, καθώς και στην σκέδαση Thomson. Το πρότυπο Thomson προϋποθέτει την κυματική φύση του φωτός και ορίζει πως δεν σημειώνονται ενεργειακές απώλειες κατά την διάδοση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Κατά αυτόν τον τρόπο όταν ένα ηλεκτρόνιο αλληλεπιδράσει με την συνιστώσα του ηλεκτρικού πεδίου μίας μονοχρωματικής δέσμης ακτίνων-X, τότε αποκτά επιτάχυνση και το επιταχυνόμενο ηλεκτρόνιο λειτουργεί ως δευτερογενής πηγή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Τα άτομα της ύλης αποτελούνται από ηλεκτρόνια και η σκεδαστική ικανότητα των ατόμων καθορίζεται από το πλήθος των ηλεκτρονίων τους. Η συσχέτιση αυτή αποτυπώνεται από τον ατομικό παράγοντα σκέδασης.

Τα ηλεκτρόνια κινούνται γύρω από τους θετικά φορτισμένους πυρήνες των ατόμων, σε καθορισμένες τροχιές. Η πιθανότητα εύρεσης του ηλεκτρονίου σε μία θέση εντός του ηλεκτρικού πεδίου του πυρήνα, εκφράζεται από την πυκνότητα πιθανότητας, η οποία είναι ανάλογη του τετραγώνου της κυματοσυνάρτησης  $\psi$ . Η εύρεση της κυματοσυνάρτησης ακολουθεί μία χρονο-ανεξάρτητη εξίσωση, όπως υποδείχθηκε από τον Erwin Schrödinger και εφαρμόζεται για ένα σωματίδιο μάζας  $m$ , που κινείται σε μία διάσταση με ενέργεια  $E$  ως προς ένα σύστημα αμετάβλητο στον χρόνο και δίδεται ως ακολούθως:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2\psi}{dx^2} + V(x)\psi = E\psi$$

όπου  $V(x)$  είναι η δυναμική ενέργεια του σωματιδίου στην θέση  $x$  και  $\hbar = h/2\pi$  ( $\hbar$ -bar). Η κυματοσυνάρτηση  $\psi$  αποτελεί το πλάτος της πιθανότητας και το  $|\psi|^2$  είναι η πυκνότητα πιθανότητας. Συγκεκριμένα αν η τιμή της κυματοσυνάρτησης ενός ηλεκτρονίου σε ένα σημείο  $r$  (με συντεταγμένες  $x, y, z$ ) είναι  $\psi$ , τότε η πιθανότητα να βρεθεί το ίδιο ηλεκτρόνιο σε ένα απειροστό όγκο είναι  $dt = dx dy dz$ , είναι ανάλογη του  $|\psi|^2 dt$  (Atkins, 2017). Η κυματοσυνάρτηση για ένα σωματίδιο με ασθενώς καθορισμένη θέση, δύναται να εντοπιστεί ακριβέστερα, με την υπέρθεση μεγάλου αριθμού κυματοσυναρτήσεων καθορισμένου μήκους κύματος, όπου συμβάλλουν ενισχυτικά σε μία περιοχή και αναιρετικά οπουδήποτε αλλού (Atkins, 2017). Εν συνεχεία, το πλάτος του σκεδαζόμενου κύματος που προέρχεται από ένα άτομο βασίζεται στην κατανομή των ηλεκτρονίων και συγκεκριμένα από πόσα ηλεκτρόνια σκεδαζουν από οποιοδήποτε θέση  $r$  εντός του ατόμου, το οποίο περιγράφεται από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα  $\rho(r)$  (Rupp, 2010).



**Εικόνα 1.11.** Αύξηση της πιθανότητας εντοπισμού της ακριβούς θέσης ενός σωματιδίου με την αύξηση του αριθμού των κυμάτων που συμβάλλουν ενισχυτικά (Atkins, 2017).

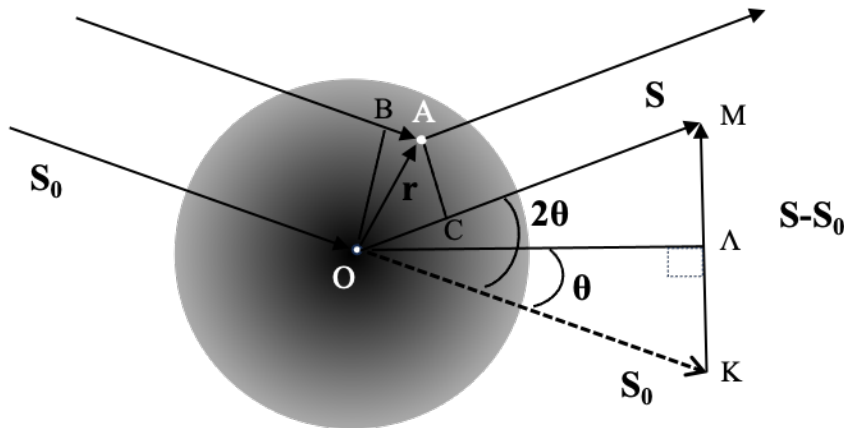


### 1.3.4 Ατομικός παράγοντας σκέδασης

Η σκεδαστική ικανότητα ενός ατόμου δίδεται, όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, από τον όρο του **ατομικού παράγοντα σκέδασης** (*atomic scattering factor*),  $f$ , ο οποίος εκφράζει τον λόγο της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου που σκεδάζεται από ένα άτομο  $E_a$  προς την ένταση που σκεδάζεται από ένα μόνο ηλεκτρόνιο  $E_e$ . Προκειμένου, ωστόσο, να καταστεί κατανοητή η έννοια του ατομικού παράγοντα σκέδασης, είναι αναγκαίο να θεωρηθεί το άτομο σαν συνάθροιση στοιχειωδών όγκων, όπου κάθε ένας συνεισφέρει στην συνολική σκέδαση. Σε έναν στοιχειώδη όγκο,  $dV$ , περιέχεται ένα στοιχειώδες φορτίο ( $dq = \rho dV$ ) που σκεδάζει μία ένταση ηλεκτρικού πεδίου  $dE_a$ . Ακολουθώντας την ηλεκτρομαγνητική θεωρία, όπου ο λόγος των εντάσεων του ηλεκτρικού πεδίου είναι ίσος με τον λόγο των φορτίων, τότε:

$$f = \frac{E_a}{E_e} = \frac{dq}{e} = \frac{\rho dV}{e}$$

Η συνάθροιση, όμως, των στοιχειωδών όγκων, ακριβώς επειδή το άτομο φέρει διαστάσεις, απαιτεί και ένα παράγοντα φάσης που συσχετίζει τον προσανατολισμό της προσπίπτουσας και της σκεδαζόμενης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με το διάνυσμα της θέσης  $r$  του στοιχειώδους όγκου. Η χρησιμότητα της διαφοράς φάσης σχετίζεται με την προσπάθεια αποτύπωσης της διαφοράς διαδρομής που χρειάζεται να διανύσει η σκεδαζόμενη δέσμη εκάστου στοιχειώδους φορτίου, λόγω της διαφορετικής θέσης του ως προς τα υπόλοιπα που συνιστούν το άτομο (Rupp, 2010). Τα σκεδαζόμενα κύματα από διαφορετικά στοιχειώδη φορτία θα πρέπει να σκεδαζούν την ακτινοβολία σε φάση για να λάβει ο ατομικός παράγοντας σκέδασης την μέγιστη τιμή του.



Εικόνα 1.12. Σκέδαση ακτίνων-X από ένα μόνο άτομο (Rupp, 2010).

Σε μία προσπάθεια αποσαφήνισης της διαφοράς φάσης θεωρούνται τα μοναδιαία διανύσματα  $S_0$  και  $S$ , όπως παρουσιάζονται και στην Εικόνα 1.12, με το πρώτο στην διεύθυνση της προσπίπτουσας και το δεύτερο της ανακλώμενης ακτινοβολίας. Τα σημεία  $O$  και  $A$  αναπαριστούν δυο στοιχειώδη φορτία του ίδιου ατόμου τα οποία απέχουν μεταξύ τους απόσταση  $r$ . Η διαφορά διαδρομής μεταξύ της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που σκεδάζεται από το  $O$  και εκείνης που σκεδάζεται από το  $A$  είναι  $(OA) - (AB) = (S \cdot r) - (S_0 \cdot r) = (S - S_0) \cdot r$ . Πολλαπλασιάζοντας με  $2\pi$  για να προκύψει η έκφραση σε ακτίνια, το αποτέλεσμα δίδει την διαφορά φάσης, η οποία είναι  $\Delta\phi = 2\pi(S - S_0) \cdot r$  (Rupp, 2010). Επομένως, για κάθε στοιχειώδη όγκο η συνεισφορά του δίνεται ως εξής:

$$df = \frac{\rho(r)}{e} e^{(2\pi i/\lambda)(S - S_0) \cdot r} dV$$

Και ολοκληρώνοντας ως προς  $dV$ , λαμβάνεται η εξίσωση του ατομικού παράγοντα σκέδασης:

$$f_s = \frac{4\pi}{e} \int_r^{V(atom)} \rho(r) \frac{\sin kr}{kr} r^2 dr, \text{ όπου } k = \frac{2\pi \sin \theta}{\lambda}$$

Να διευκρινιστεί ότι για εμπρόσθια σκέδαση ( $\theta=0$ ), ισχύει ότι  $k = 0$ , όποτε θεωρούμε ότι το όριο

$\lim_{k \rightarrow 0} kr \rightarrow 0$  και ο παράγοντας  $\lim_{k \rightarrow 0} \frac{\sin kr}{kr} \rightarrow 1$ . Αντικαθιστώντας στην παραπάνω εξίσωση, καταλήγει

τελικά :

$$f_s = \frac{4\pi}{e} \int_r^{V(atom)} \rho(r)r^2 dr$$

Το ολοκλήρωμα της ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $\rho$  (όπου  $\rho$  ο αριθμός των ηλεκτρονίων ανά μονάδα όγκου), επί τον όρο  $4\pi r^2 dr$  ισούται με τον ολικό αριθμό ηλεκτρονίων του ατόμου,  $N_e$  ( $f_s = N_e$ ). Επομένως, για γωνία  $\theta=0$  ο παράγοντας σκέδασης του ατόμου είναι ίση με τον ατομικό αριθμό του  $Z$ .

Το πλάτος ταλάντωσης του σκεδαζόμενου ατόμου χαρακτηρίζεται από τον ατομικό παράγοντα σκέδασης και αποτελεί ένα μετασχηματισμό Fourier της ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $\rho(r)$  του ατόμου (Rupp, 2010). Όμως, ο υπολογισμός των ατομικών παραγόντων σκέδασης υποθέτει ότι τα άτομα βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας, γεγονός που πραγματικά δεν υφίσταται, δεδομένου ότι τα ηλεκτρόνια, λόγω θερμικής κίνησης ταλαντώνονται γύρω από μία θέση ισορροπίας. Κατά αυτό τον τρόπο, η τελική τιμή του ατομικού παράγοντα σκέδασης να είναι μικρότερη της ιδανικής, εξαιτίας του **παράγοντα της θερμοκρασίας** (*temperature factor*) (Χαμόδρακας, 1993).

### 1.3.5 Περίθλαση

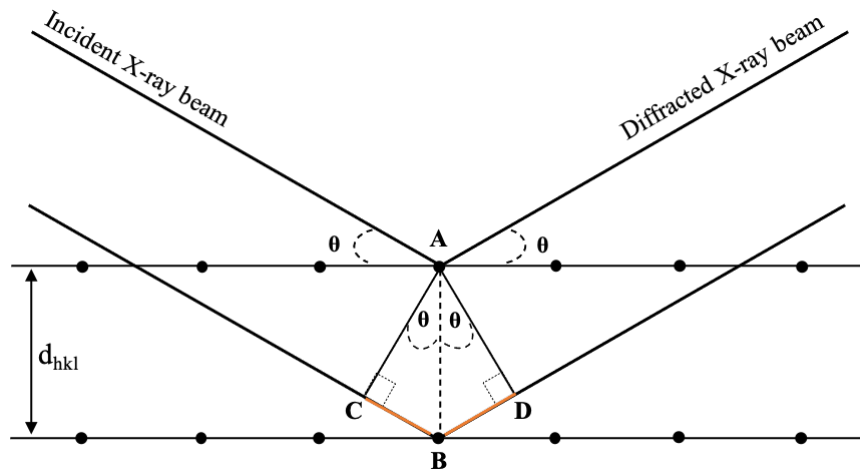
Ένα άτομο ή ένα μόριο σκεδάζουν ασθενώς τις ακτίνες-X, για τον λόγο αυτό, απαιτείται η αυστηρή περιοδική επανάληψη των μορίων, που επιτυγχάνεται στην περίπτωση των κρυστάλλων, και επιτρέπει την ισχυρή σκέδαση της ακτινοβολίας. Ο Max Von Laue είχε προβλέψει μαθηματικά τις συνθήκες σκέδασης από ένα κρυσταλλικό πλέγμα, και η θεωρητική του προσέγγιση επιβεβαιώθηκε πειραματικά από τους W.Fredrich και P.Knippling το 1912. Εκείνη την χρονική περίοδο επιβεβαιώθηκε η κυματική φύση του φωτός και πως η ύλη αποτελείται από διακριτά άτομα. Εντούτοις, επειδή για την διεξαγωγή των πειραμάτων αυτών χρησιμοποιήθηκαν πολυχρωματικές ακτίνες-X, η αξιοποίηση των εξισώσεων του Laue για τις συνθήκες περίθλασης σε κάθε μία από τις διαστάσεις του κρυσταλλικού πλέγματος, πραγματοποιήθηκε, αργότερα, από τον πατέρα και υιό Bragg, οι οποίοι καινοτόμησαν χρησιμοποιώντας μονοχρωματική ακτινοβολία. Βέβαια, η χρήση μονοχρωματικής δέσμης ήταν μόνο η αρχή στην συμβολή τους στον τομέα της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X, καθώς προχώρησαν και στην θεμελίωση του νόμου Bragg για την ερμηνεία του φαινομένου της περίθλασης από κρυστάλλους.

Εντούτοις, πριν από την εισαγωγή στην ερμηνεία και απόδειξη του νόμου, κρίνεται αναγκαίος ο ορισμός της έννοιας της περίθλασης. Η **περίθλαση** (*diffraction*) είναι το φαινόμενο κατά το οποίο μια αρχική κυματική διαταραχή εκτρέπεται από την πορεία της, λόγω της παρεμβολής ενός φράγματος στην κατεύθυνση της διάδοσης της, το οποίο στη συνέχεια λειτουργεί ως δευτερογενής πηγή κυματικών διαταραχών (Halliday, Resnick, and Walker, 2008). Στην ειδική περίπτωση των κρυστάλλων, η περίθλαση πραγματοποιείται, όταν μια δέσμη ακτίνων-X προσπέσει στο κρυσταλλικό πλέγμα, διεγείροντας τα ηλεκτρόνια των ατόμων και εξαναγκάζοντάς τα σε ταλάντωση. Η ταλάντωση επάγει την δημιουργία σφαιρικών κυμάτων, τα οποία διαδίδονται προς όλες τις διευθύνσεις στο χώρο και έχουν ως κέντρο τα ίδια τα άτομα. Σε ορισμένες μόνο διευθύνσεις, όπου επαληθεύεται ο νόμος του Bragg, τα σκεδαζόμενα κύματα υφίστανται ενισχυτική συμβολή με αποτέλεσμα την εμφάνιση μέγιστων έντασης και κατά συνέπεια την λήψη σήματος περίθλασης. Οι διευθύνσεις αυτές ως προς τα κρυσταλλικά επίπεδα ανακλούν την ακτινοβολία σε γωνία ίση με την γωνία πρόσπτωσης.

### 1.3.6 Νόμος Bragg

Οι William και Lawrence Bragg στηρίχτηκαν στην τρισδιάστατη περιοδικότητα του κρυστάλλου και συγκεκριμένα στο ότι τα σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος σχηματίζουν σύνολα παράλληλων και ισαπεχόντων επιπέδων. Προϋπόθεση για το φαινόμενο της περίθλασης είναι τα ανακλώμενα κύματα από ένα σύνολο κρυσταλλικών επιπέδων να συμβάλλουν ενισχυτικά. Η ενισχυτική συμβολή πραγματοποιείται, όταν οι προσπίπτουσες και ανακλώμενες δέσμες ακτίνων-X, από το ένα κρυσταλλογραφικό επίπεδο στο επόμενο, διανύουν επιπλέον διαδρομή που είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της ακτινοβολίας. Η συνθήκη αυτή αποτελεί το Νόμο Bragg.

Ένα σύνολο παράλληλων και ισαπεχόντων επιπέδων, όπως διατυπώθηκε και στο υποκεφάλαιο 1.1.2, αποτελεί μία οικογένεια κρυσταλλογραφικών επιπέδων, χαρακτηρίζεται από του δείκτες  $h, k, l$ , συμβολίζεται ως  $(hkl)$  και τα επίπεδα της ίδιας οικογένειας φέρουν άτομα στις ίδιες θέσεις. Για την απόδειξη του νόμου, από το πλήθος των οικογενειών κρυσταλλογραφικών επιπέδων ενός κρυστάλλου, αξιοποιείται μόνο μία. Έστω, λοιπόν, δύο κρυσταλλικά επίπεδα, μίας οικογένειας κρυσταλλογραφικών επιπέδων  $(hkl)$ , τα οποία είναι παράλληλα και απέχουν μεταξύ τους σταθερή απόσταση  $d_{hkl}$ . Θεωρείται μία δέσμη ακτίνων-X η οποία προσπίπτει με γωνία  $\theta$  σε μία οικογένεια κρυσταλλογραφικών επιπέδων και ανακλάται από αυτά με ίση γωνία ανάκλασης  $\theta$ .



Εικόνα 1.13. Διαγραμματική απεικόνιση ενός δισδιάστατου κρυσταλλικού πλέγματος για την απόδειξη του νόμου Bragg.

Για την γεωμετρική απόδειξη του νόμου Bragg αξιοποιείται το σχήμα της Εικόνας 1.13, στο οποίο παρατηρούνται δύο κρυσταλλογραφικά επίπεδα, όπου σε κάθε ένα καταφθάνει μία προσπίπτουσα δέσμη με γωνία  $\theta$  ως προς το εκάστοτε επίπεδο και ανακλάται από αυτό με ακριβώς ίση γωνία. Εντούτοις, η ακτινοβολία στο δεύτερο επίπεδο διανύει μία επιπρόσθετη διαδρομή, την  $(CD)$  που ορίζεται από τα δύο πορτοκαλί ίσα ευθύγραμμα τμήματα  $(CB)$  και  $(BD)$ . Τα τρίγωνα  $ACB$  και  $ADB$  είναι ίσα και ορθογώνια και με εφαρμογή της τριγωνομετρίας δίδεται ότι:

$$(CB) = (BD) = d_{hkl} \sin \theta$$

Επιπροσθέτως, είναι γνωστό ότι τα κύματα συμβάλλουν δημιουργικά, άρα η επιπλέον απόσταση είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της ακτινοβολίας, οπότε ισχύει ότι:

$$(CD) = n\lambda \Rightarrow (CB) + (BD) = n\lambda \Rightarrow$$

$$2d_{hkl} \sin \theta = n\lambda$$

Με την τελευταία εξίσωση να αποτελεί το Νόμο Bragg.

### 1.3.7 Σφαίρα του Ewald

Η **σφαίρα του Ewald** (*Ewald's sphere*) είναι μία γεωμετρική κατασκευή, που γεφυρώνει το χάσμα μεταξύ του πραγματικού και του αντίστροφου χώρου. Η κύρια λειτουργία της αφορά στην αντίληψη ποιων επιπέδων είναι ικανά να προκαλέσουν την περίθλαση. Η σφαίρα αυτή έχει ακτίνα  $1/\lambda$  με κέντρο τον κρύσταλλο, ο οποίος περιστρέφεται και αποτελεί και την πηγή των σκεδαζόμενων ακτινοβολιών. Στην απεικόνιση της σφαίρας του Ewald, όπως παρατίθεται στην εικόνα που ακολουθεί, στο κέντρο O βρίσκεται ο κρύσταλλος, (OA) η διεύθυνση της προσπίπτουσας και στο σημείο A η προσπίπτουσα τέμνει την σφαίρα του Ewald. Το σημείο τομής της προσπίπτουσας ακτινοβολίας με την σφαίρα ορίζεται ως η αρχή του αντιστρόφου πλέγματος.

Όπως εξηγήθηκε και στο κεφάλαιο 1.1.3, ο κρύσταλλος συνδέεται με ένα αντίστροφο πλέγμα. Με την περιστροφή του κρυστάλλου, περιστρέφεται και το αντίστροφο πλέγμα, αυξάνοντας τις πιθανότητες, μέσω των τυχαίων προσανατολισμών να βρεθεί η κατάλληλη γωνία στην οποία θα ικανοποιείται ο νόμος Bragg και θα ληφθεί σήμα περίθλασης. Όταν, επομένως, ένας κόμβος του αντιστρόφου πλέγματος τμήσει την σφαίρα του Ewald, τότε θα προκύψει ανάκλαση στην διεύθυνση (OB) από μία οικογένεια κρυσταλλογραφικών επιπέδων (hkl). Ακολουθώντας, από το μέτρο του διανύσματος  $\overrightarrow{AB}$  είναι εφικτό να βρεθεί η απόσταση που χαρακτηρίζει την συγκεκριμένη οικογένεια (hkl), εφόσον ισχύει ότι  $d_{hkl}^* = 1/d_{hkl}$ .

Ισχύει, επιπλέον ότι:

$$(AB) = (AC) + (CB) = \frac{\sin \theta}{\lambda} + \frac{\sin \theta}{\lambda} = 2 \frac{\sin \theta}{\lambda} = d_{hkl}^*$$

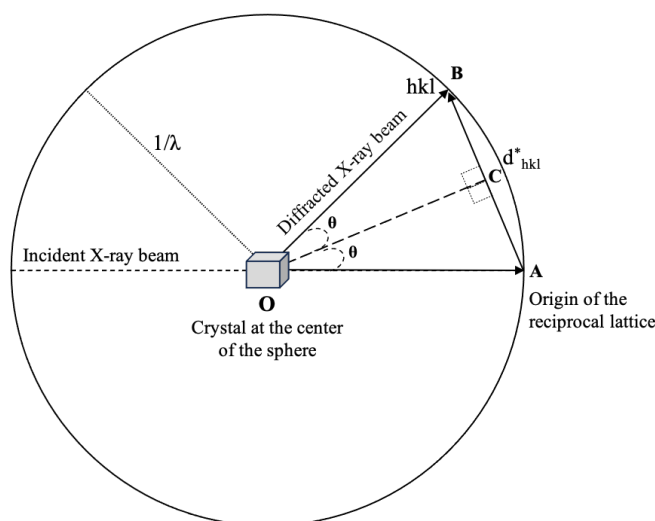
Ακόμη, εφαρμόζοντας ότι:

$$d_{hkl} = 1/d_{hkl}^* = \frac{\lambda}{2 \cdot \sin \theta}$$

Με την εφαρμογή των ανωτέρω πράξεων να οδηγούν στην εξίσωση Bragg, δηλαδή:

$$2d_{hkl} \sin \theta = \lambda$$

Γεγονός που επιβεβαιώνει πως για να συμβαίνει ενισχυτική συμβολή και να ληφθεί σήμα περίθλασης θα πρέπει να ικανοποιείται ο Νόμος Bragg.



Εικόνα 1.14. Σχηματική απεικόνιση της σφαίρας του Ewald (Ameh, 2019).

Στην περίμετρο της σφαίρας του Ewald θεωρείται ότι κινείται ένας **ανιχνευτής** (*detector*) της περιθλώσας ακτινοβολίας. Ανάλογα με το την διάταξη του εκάστοτε περιθλασιμέτρου διαφέρει τόσο η θέση και η γωνία κίνηση του ανιχνευτή ως προς το δείγμα, όσο και το είδος του ανιχνευτή, με δύο κυρίως κατηγορίες τους **ανιχνευτές σημείων** (*point detectors*) ή **ολόκληρης περιοχής** (*area detectors*) ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος. Η ανίχνευση προϋποθέτει την μετατροπή της ανακλώμενης ακτινοβολίας σε ηλεκτρικό σήμα και την ακριβή καταγραφή της στην γωνία ανάκλασης.

### 1.3.8 Παράγοντας δομής

Οι πληροφορίες για την σκέδαση από ένα άτομο, σε συνδυασμό με την πληροφορία ότι μία οικογένεια κρυσταλλογραφικών επίπεδων, της μοναδιαίας κυψελίδας, αποτελείται από άτομα που βρίσκονται στις ίδιες θέσεις και μπορούν να ανακλούν συμφασικά στην ίδια γωνία  $2\theta$ , δύνανται να εκφραστούν σε έναν όρο, αυτό του παράγοντα δομής. Ο **παράγοντας δομής** (*structure factor*) είναι το ολικό πλάτος της σκέδασης όλων των ατόμων μίας δεδομένης οικογένειας κρυσταλλικών επιπέδων  $\{hkl\}$ , ο οποίος βέβαια λαμβάνει υπόψη όλα τα άτομα της μοναδιαίας κυψελίδας, καθώς και τις θέσεις τους. Θεωρώντας έναν κρύσταλλο που αποτελείται από  $N$  άτομα σε κάθε μοναδιαία κυψελίδα, που βρίσκονται στις θέσεις  $x_j, ky_j, lz_j$ , (όπου  $j = 1, N$ ), το ολικό πλάτος της ανάκλασης ( $hkl$ ), δηλαδή ο παράγοντας δομής, δίδεται από την ακόλουθη σχέση:

$$F_{hkl} = \sum_{j=1}^{N_{atoms}} f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (\text{όπου } i = \sqrt{-1})$$

Με την μιγαδική προσέγγιση της ανωτέρω εξίσωσης προκύπτουν οι εξής χρήσιμοι όροι:

$$F_{hkl} = A_{hkl} + iB_{hkl}$$

$$A_{hkl} = \sum_{j=1}^{N_{atoms}} f_j \cos 2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j) \quad \text{και} \quad B_{hkl} = \sum_{j=1}^{N_{atoms}} f_j \sin 2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)$$

Σχετικά με το μέτρο του παράγοντα δομής, δηλαδή το πλάτος του κύματος ισχύει ότι:

$$|F_{hkl}| = \sqrt{A_{hkl}^2 + B_{hkl}^2}$$

Εισάγοντας, επιπλέον, την σχέση του Euler, όπου  $e^{i\varphi} = (\cos \varphi + i \cdot \sin \varphi)$  η αρχική εξίσωση μπορεί να γραφτεί και ως:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| \cdot e^{i\varphi_{hkl}}$$

Όπου  $\varphi_{hkl} = \tan^{-1} \frac{B_{hkl}}{A_{hkl}}$  αποτελεί τη φάση της ανάκλασης ( $hkl$ ).

Η περιοδικότητα των κρυστάλλων επιτρέπει να θεωρηθεί η ηλεκτρονιακή πυκνότητα ως μία τριδιάστατη περιοδική συνάρτηση και να αναπαρασταθεί με την εφαρμογή σε κάθε διάσταση μετασχηματισμών Fourier, ώστε να λαμβάνεται τελικά η ακόλουθη σύνθεση Fourier.

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} F_{hkl} e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}$$

όπου  $F_{hkl}$  είναι οι παράγοντες δομής και  $V$  ο όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας.

Στο σημείο αυτό ανακύπτει το θεμελιώδες ζήτημα της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X, το γνωστό **πρόβλημα φάσης** (*phase problem*). Πειραματικά είναι εφικτό να μετρηθούν μόνο τα πλάτη των ανακλάσεων  $F_{hkl}$ , καθώς οι καταγραφόμενες, από τους ανιχνευτές εντάσεις είναι ανάλογες του τετραγώνου των πλατών ( $I_{hkl} \propto F_{hkl}^* F_{hkl}$  ή  $I_{hkl} \propto |F_{hkl}|^2$ ). Εντούτοις, δεν έχει βρεθεί ως σήμερα λύση για την πειραματική μέτρηση των φάσεων  $\phi_{hkl}$  των ανακλάσεων και είναι ο περιοριστικός παράγοντας για τον απευθείας σχηματισμό του «ειδώλου» της κρυσταλλικής δομής.

Το πρόβλημα φάσης δύναται να υπερκεραστεί ως έναν βαθμό με την χρήση διαφόρων μεθόδων. Από τις πιο χρήσιμες μεθόδους που έχουν αναδειχθεί είναι η **πολλαπλή ισόμορφη αντικατάσταση** (*multiple isomorphous replacement*), η **ανώμαλη σκέδαση πολλαπλών μηκών κύματος** (*multiple anomalous dispersion*), και η **μοριακή αντικατάσταση** (*molecular replacement*). Οι δύο πρώτες ανήκουν στις **άμεσες μεθόδους** (*direct methods*) και χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για μικρές μοριακές δομές, δεδομένου ότι οι στατιστικές συσχετίσεις μεταξύ ομάδων παραγόντων δομής εξασθενούν με την αύξηση του αριθμού των ατόμων. Η μοριακή αντικατάσταση χρησιμοποιείται κατά κόρον για την επίλυση του προβλήματος της φάσης πρωτεϊνικών κρυσταλλικών δομών. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή αυτή της μεθόδου είναι η ύπαρξη ενός δομικού μοντέλου μίας πρωτεΐνης υψηλής ομολογίας. Στην συνέχεια, το δομικό μοντέλο θα πρέπει να τοποθετηθεί με τον βέλτιστο δυνατό τρόπο στο μοντέλο των συλλεχθέντων πειραματικών δεδομένων. Η βέλτιστη ταύτιση επέρχεται με σειρές δοκιμών, του δομικού μοντέλου, από συνδυασμούς περιστροφών και μετατοπίσεων εντός της μοναδιαίας κυψελίδας.

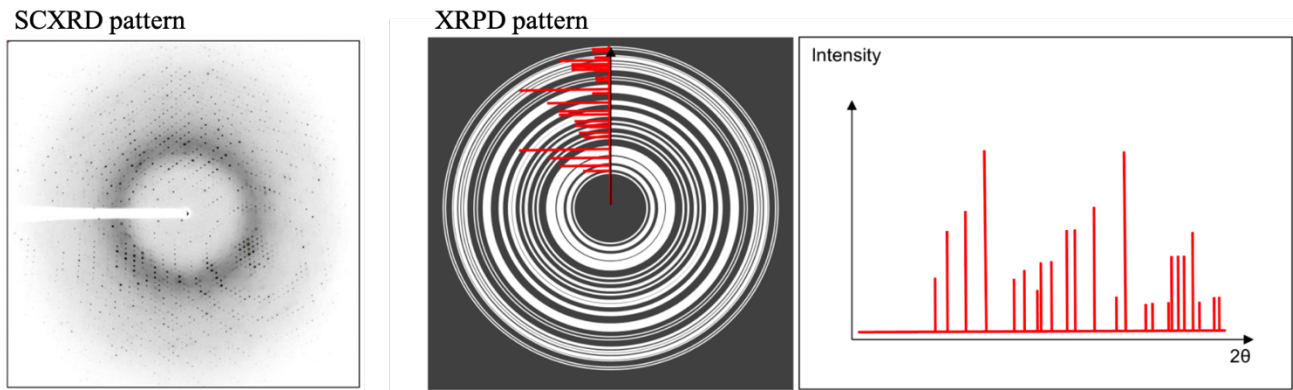
### 1.3.9 Μέθοδοι περίθλασης SCXRD και XRPD

Θεμέλιο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X αποτελεί η **περίθλαση ακτίνων-X από μονοκρύσταλλο** (*Single Crystal X-Ray Diffraction, SCXRD*). Στην μέθοδο αυτή αξιοποιείται ένα ευμεγέθους καλοσχηματισμένος κρύσταλλος, ο οποίος τοποθετείται σε ειδικό δειγματοφορέα και μετέπειτα σε γωνιόμετρο που δίνει την δυνατότητα περιστροφής του κρυστάλλου. Ο κρύσταλλος τοποθετείται κατάλληλα και ευθυγραμμίζεται, ώστε να βρίσκεται ακριβώς στην πορεία της μονοχρωματικής δέσμης ακτίνων-X. Η περιστροφή είναι το ισχυρό πλεονέκτημα, αφού δίνει την δυνατότητα στην προσπίπτουσα ακτινοβολία να συναντήσει σε πολλούς διαφορετικούς προσανατολισμούς τον κρύσταλλο.

Η τυχαιότητα των προσανατολισμών αυξάνει τις πιθανότητες, ώστε μία οικογένεια κρυσταλλογραφικών επιπέδων  $\{hkl\}$ , να βρεθεί με κατάλληλο προσανατολισμό ως προς την δέσμη, ώστε να ικανοποιείται ο νόμος Bragg και να λαμβάνεται σήμα περίθλασης. Το σήμα περίθλασης ανιχνεύεται από έναν ανιχνευτή, συνήθως ολόκληρης περιοχής (*area detector*), που κινείται εφαπτομενικά της περιμέτρου της σφαίρας του Ewald. Το διάγραμμα περίθλασης που προκύπτει είναι, ουσιαστικά, δισδιάστατες τομές από διευθετημένες κηλίδες που συνδυάζονται προκειμένου να προκύψει ένα τρισδιάστατο διάγραμμα περίθλασης. Κάθε κηλίδα αποτελεί και μία ανάκλαση από μία οικογένεια κρυσταλλογραφικών επιπέδων  $\{hkl\}$ , με τις εντάσεις των κηλίδων να υποδεικνύουν κατά την ανάλυση την θέση των ατόμων, ενώ από τις αποστάσεις μεταξύ των κηλίδων είναι εφικτό να υπολογιστούν οι πλεγματικές σταθερές της στοιχειώδους κυψελίδας. Λαμβάνοντας υπόψη πως οι κηλίδες αντιπροσωπεύουν σημεία του αντίστροφου πλέγματος, πλησιέστερες κηλίδες φανερώνουν μεγαλύτερες περιοδικότητες στο πραγματικό κρυσταλλικό πλέγμα.

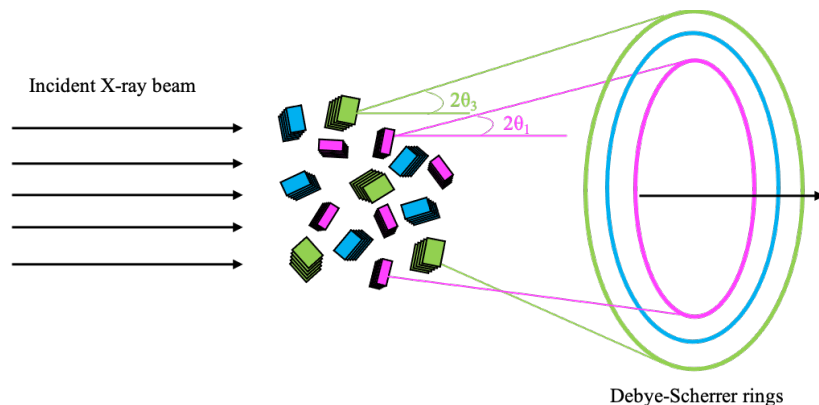
Μία εναλλακτική μέθοδος που είναι εξαιρετικά χρήσιμη για τον τομέα της Δομικής Βιολογίας αποτελεί η **περίθλαση ακτίνων-X από πολυκρυσταλλικό δείγμα** (*X-Ray Powder Diffraction*). Σε αυτή την περίπτωση το δείγμα αποτελείται από πολλούς μικρούς, όμοιου μεγέθους, κρυστάλλους, οι οποίοι τοποθετούνται σε ειδικό τριχοειδή σωλήνα από βοριοπυριτικό γυαλί. Στην συνέχεια, το δείγμα ως αναμένεται, τοποθετείται σε γωνιόμετρο, ευθυγραμμίζεται εντός της πορείας της μονοχρωματικής δέσμης και κατόπιν περιστρέφεται ταχέως. Οι συλλεχθείσες περιθλούσες ακτίνες-X καταγράφονται από ανιχνευτές σημείων. Η διαφορά της μεθόδου αυτής συγκριτικά με την περίθλαση από

μονοκρυστάλλο έγκειται στο γεγονός, ότι η περιστροφή αποσκοπεί στην καταγραφή σήματος από όλους τους τυχαία προσανατολισμένους κρυστάλλους για τους οποίους ικανοποιείται ο νόμος Bragg.



**Εικόνα 1.15.** Ένα τυπικό διάγραμμα περίθλασης από δείγμα μονοκρυστάλλου (αριστερά), και ένα διάγραμμα περίθλασης από πολυκρυσταλλικό δείγμα αρχικά υπό την μορφή ομόκεντρων κύκλων (μεσαία εικόνα) και το ισοδύναμο διάγραμμα υπό μορφή κορυφών (δεξιά) (Karavassili, PhD thesis, 2018).

Η ένταση που καταγράφεται σε μία γωνία θα είναι αποτέλεσμα της συνεισφοράς ανάκλασης από το ίδιο σμήνος κρυσταλλικών επιπέδων (hkl) από πολλούς κρυσταλλίτες και οι περιθλούσες ακτίνες κατανέμονται στην επιφάνεια ενός κώνου. Μία ανάκλαση με γωνία έγκλισης  $\theta$  σχηματίζει ως προς την διεύθυνση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας γωνία ίση με  $2\theta$ . Το περιθλασίγραμμα που προκύπτει από τη χρήση αυτής της τεχνικής δημιουργείται από κώνους, που αντιστοιχούν στις ανακλάσεις από όλα τα σμήνη επιπέδων (hkl) με τους διαφορετικούς προσανατολισμούς, όπου ικανοποιούν τον νόμο Bragg. Οι εντάσεις που προκύπτουν στην συνέχεια ολοκληρώνονται και το τελικό διάγραμμα περιλαμβάνει στον άξονα y τις εντάσεις, όπου το ύψος των κορυφών τους είναι ανάλογο της έντασης του σήματος περίθλασης προς την γωνία  $2\theta$  στον άξονα x.



**Εικόνα 1.16.** Σχηματική απεικόνιση της περίθλασης από πολυκρυσταλλικό δείγμα.

Η ένταση της ανάκλασης  $I_{hkl}$  σε μία συγκεκριμένη γωνιακή θέση ( $2\theta$ ) που καταγράφεται από τον ανιχνευτή δίδεται από την ακόλουθη σχέση:

$$I_{hkl} = K_o a \left( \frac{|F_{hkl}|}{V_{uc}} \right)^2 H P L$$

Όπου κάθε όρος έχει την λειτουργική του σημασία, ξεκινώντας από τον  $a$  που είναι συντελεστής απορρόφησης,  $F_{hkl}$  ο παράγοντας δομής, και  $V_{uc}$  ο όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας. Επιπλέον, ακολουθεί ο όρος  $H$ , ο οποίος ονομάζεται παράγοντας πολλαπλότητας και αφορά σε διαφορετικές οικογένειες κρυσταλλογραφικών επιπέδων, που λόγω συμμετρίας, έχουν ίδιο  $d$  και  $F^2$ , συνεισφέροντας στην ίδια ένταση. Στην συνέχεια, παρατίθενται οι όροι  $P$  και  $L$  που είναι ο παράγοντας πόλωσης και ο παράγοντας Lorentz, οι οποίοι λειτουργούν ως διορθωτικοί παράγοντες της έντασης,



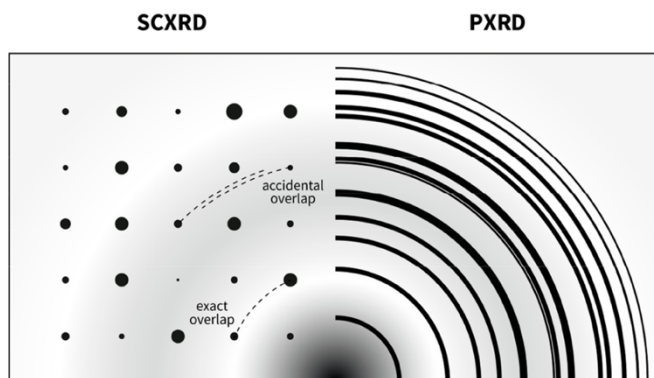
λόγω της παρουσίας μονοχρωμάτωρα για την αφαίρεση της ακτινοβολίας  $K\beta$ . Καταληκτικά, ο όρος  $K\alpha$  είναι ο παράγοντας που σχετίζεται με τον εξοπλισμό και εκφράζεται από την σχέση:

$$K_o = \frac{I_o e^4 \lambda^3 Q_o}{m_e^2 c^4}$$

Όπου  $I_o$  η ένταση της αρχικής δέσμης,  $e$  το στοιχειώδες φορτίο,  $\lambda$  το μήκος κύματος της ακτινοβολίας,  $Q_o$  η διατομή της εισερχόμενης δέσμης ακτινοβολίας,  $m_e$  η μάζα του ηλεκτρονίου και  $c$  η ταχύτητα του φωτός.

Η περίθλαση ακτίνων-Χ από πολυκρυσταλλικά δείγματα παρέχει ένα σύνολο από σημαντικές πληροφορίες. Αρχικά, την συμμετρία της μοναδιαίας κυψελίδας των κρυστάλλων, η οποία προκύπτει από την γωνιακή θέση των κορυφών περίθλασης, καθώς και από το ύψος τους. Οι εντάσεις αποκαλύπτουν τόσο τα είδη των ατόμων που περιέχονται εντός της μοναδιαίας κυψελίδας, όσο και την διάταξη τους. Επιπροσθέτως, το σχήμα των κορυφών περίθλασης δύναται να φανερώσει τις διαστάσεις των σωματιδίων ή τυχόν παραμορφώσεις των κρυσταλλιτών. Κατά αυτό τον τρόπο είναι εφικτός ένας πρωταρχικός προσδιορισμός της κρυσταλλικής φάσης ή των συνυπαρχουσών φάσεων του κρυσταλλικού δείγματος.

Εντούτοις, η μέθοδος αυτή παρουσιάζει ένα βασικό ζήτημα, την **αλληλοεπικάλυψη κορυφών** (*peak overlap*) και η οποία διακρίνεται σε **απόλυτη** (*exact overlap*) και σε **τυχαία** (*accidental overlap*). Με την πρώτη κατηγορία να είναι λογικό επακόλουθο σε κρυσταλλικά συστήματα υψηλής συμμετρίας, όπου διαφορετικές οικογένειες κρυσταλλικών επιπέδων έχουν την ίδια απόσταση  $d_{hkl}^*$ , με αποτέλεσμα πολλά σημεία του αντιστρόφου πλέγματος να εμφανίζουν εντάσεις στις ίδιες γωνιακές θέσεις (Spiliouroulou, Triandafillidis et al., 2020). Η δεύτερη κατηγορία σχετίζεται με την ευκρίνεια του οργάνου και με την αδυναμία να διακρίνονται, ως ξεχωριστές, οι εντάσεις με διαφορά  $\Delta d_{hkl}^*$  μικρότερη του ορίου ανιχνευσιμότητας.



**Εικόνα 1.17.** Απόλυτη και τυχαία αλληλοεπικάλυψη κορυφών σε ένα πείραμα περίθλασης από πολυκρυσταλλικό δείγμα (Spiliouroulou, Triandafillidis et al., 2020) .

### 1.3.10 Συστηματικές αποσβέσεις ανακλάσεων

Η περιοδικότητα του κρυστάλλου επιτρέπει, όπως αναφέρθηκε και στις προηγούμενες παραγράφους να λαμβάνονται μέγιστα εντάσεων σε συγκεκριμένες διευθύνσεις, των οποίων οι θέσεις προκύπτουν από διανύσματα του αντίστροφου χώρου. Η διατύπωση αυτή φανερώνει μόνο την μισή αλήθεια, δεδομένου ότι αναφέρεται μόνο στους φωτεινούς κροσσούς και στην λήψη σημάτων περίθλασης. Η μελέτη της συμβολής, όμως, των περιθλώμενων ακτίνων, καταλήγει σε κάποιες συνθήκες μεταξύ των δεικτών ( $hkl$ ) για τις οποίες η συμβολή είτε θα είναι ενισχυτική, είτε αποσβεστική. Κατά αντιστοιχία, η διάταξη των ατόμων στα διαφορετικά επίπεδα και η συμμετρία τους, που περιγράφεται μονοσήμαντα από την ομάδα συμμετρίας χώρου, καθορίζει την εμφάνιση ή την απουσία ορισμένων ανακλάσεων. Υπάρχουν, επομένως, οικογένειες κρυσταλλογραφικών



επιπέδων για τις οποίες οι τιμές των παραγόντων δομής τους είναι μηδέν, δεδομένου ότι τα κύματα σε εκείνα τα σημεία συμβάλλουν αποσβεστικά και δεν λαμβάνεται σήμα περίθλασης. Οι οικογένειες αυτές εμφανίζουν συστηματική απόσβεση και είναι χαρακτηριστικές για κάθε ομάδα συμμετρίας Χώρου.

## Σκοπός της μελέτης

Η στοχοθεσία της παρούσας διπλωματικής εργασίας επικεντρώνεται στην εμβριθή διερεύνηση της ανθρώπινης ινσουλίνης ως προς τον κρυσταλλικό και μοριακό πολυμορφισμό της. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη τίθεται ως αντικείμενο μελέτης δύο ερευνητικών αξόνων. Στο πλαίσιο του πρώτου άξονα διερεύνησης εξετάζεται το κρυσταλλικό σύμπλοκο της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του φαινολικού προσδέτη *m*-cresol, με την επιπλέον παράμετρο ελέγχου του περιβάλλοντος διάλυση του προσδέτη (ddH<sub>2</sub>O, ethanol, DMSO). Η ανάλυση και η σύγκριση των διαφορετικών κρυσταλλικών πολυμόρφων λειτουργεί συμπληρωματικά για την προσθήκη νέων δεδομένων στον χάρτη πολυμόρφων της πεπτιδικής αυτής ορμόνης. Ο δεύτερος ερευνητικός άξονας αφορά στην μελέτη του προαναφερθέντος μακρομορίου, κρυσταλλωμένου, χωρίς την παρουσία προσδέτη, με την πραγματοποίηση *in situ* κρυσταλλογραφικών μελετών υπό μεταβαλλόμενη σχετική υγρασία (*Relative Humidity*, RH) σε δύο διαφορετικές μοριακές διαμορφώσεις την  $T_6$  και την  $T_3R_3^f$ , ρομβοεδρικής συμμετρίας. Καίριοι στόχοι αποτελούν η συσχέτιση της κρυσταλλικής συμμετρίας και της μοριακής διαμόρφωσης με την σταθερότητα του μορίου, η ανίχνευση πιθανών αναδιατάξεων ή μεταβάσεων φάσης των πολυμόρφων, καθώς και η ανθεκτικότητα των κρυστάλλων σε διαφορετικά επίπεδα σχετικής υγρασίας.

Επιπροσθέτως, οι *in situ* κρυσταλλογραφικές μελέτες επεκτείνονται και σε ένα ακόμη πρωτεϊνικό μόριο, την λυσοζύμη από το ασπράδι του αυγού της κότας (HEWL), με κύριο σκοπό την συγκριτική συμπεριφορική αντίδραση διαφορετικών πρωτεϊνικών κρυστάλλων ως προς τον παράγοντα RH. Στους ευρύτερους στόχους που επιτυγχάνονται με την διεξαγωγή του συνόλου των πειραματικών διαδικασιών που απαιτούνται για την πραγματοποίηση των ανωτέρω μελετών περιλαμβάνονται η βελτιστοποίηση των συνθηκών κρυστάλλωσης για την παραγωγή σταθερών και αποτελεσματικά διατεταγμένων κρυστάλλων, καθώς και η εύρεση των ορίων ανοχής της κρυσταλλικότητας διαφορετικών κρυσταλλικών πολυμόρφων.

Κάθε χάρτης έχει και έναν προορισμό, κατά αναλογία η χαρτογράφηση των επιδράσεων των φυσικοχημικών παραμέτρων, όπως το pH και η σχετική υγρασία, στον κρυσταλλικό και στον μοριακό πολυμορφισμό, τόσο της ινσουλίνης, όσο και άλλων πρωτεϊνών, δύναται να αποτελέσουν την βάση για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων ή ακόμη και την βελτίωση των ήδη υφιστάμενων. Οι πληροφορίες που συγκεντρώνονται από τα διαφορετικά κρυσταλλικά πολύμορφα δύναται να αξιοποιηθούν για την αποτελεσματικότερη παραγωγή, μεταφορά και αποθήκευση κρυσταλλικών φαρμάκων, με σκοπό να μην υποβαθμίζεται η ποιότητα τους και κατά συνέπεια η λειτουργικότητά τους.

## 2. Διερεύνηση του Πολυμορφισμού της Ανθρώπινης Ινσουλίνης

### 2.1 Ο ρόλος της Ανθρώπινης Ινσουλίνης

Η γλυκόζη είναι ένα σάκχαρο έξι ατόμων άνθρακα, με κεντρικό ρόλο στον μεταβολισμό της πλειονότητας των οργανισμών, διότι αποτελεί την κυριότερη πηγή ενέργειας. Ο άνθρωπος

οργανισμός είναι αναγκαίο να διατηρεί τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, εντός σταθερών ορίων και για την εύρυθμη λειτουργία του διαθέτει μεταβολικούς μηχανισμούς που διασφαλίζουν η συγκέντρωση της να κυμαίνεται εντός των φυσιολογικών τιμών. Η κύρια ρύθμιση πραγματοποιείται από δυο πεπτιδικές ορμόνες με ανταγωνιστική δράση μεταξύ τους, την ινσουλίνη και την γλυκαγόνη. Η **γλυκαγόνη** (*glucagon*) είναι μονομερές πεπτίδιο που παράγεται στα  $\alpha$  παγκρεατικά κύτταρα και ο κύριος στόχος της αφορά στην αύξηση της γλυκόζης στο αίμα. Αντίθετα, η **ινσουλίνη** (*insulin*) είναι ένα ετεροδιμερές, το οποίο αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες, την  $\alpha$  και την  $\beta$ , η σύνδεση των οποίων επιτυγχάνεται από δισουλφιδικές γέφυρες. Η ορμόνη αυτή παράγεται στα  $\beta$  κύτταρα του παγκρέατος και συγκεκριμένα από τις νησίδες του Langerhans, με κύρια βιολογική δράση την μείωση της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος. Στα προαναφερθέντα κύτταρα, ένας μοριακός αισθητήρας της γλυκόζης, η γλυκοκινάση, εκκινεί το μονοπάτι σηματοδότησης για την έκκριση της ινσουλίνης σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (Garrett and Grisham, 2019).

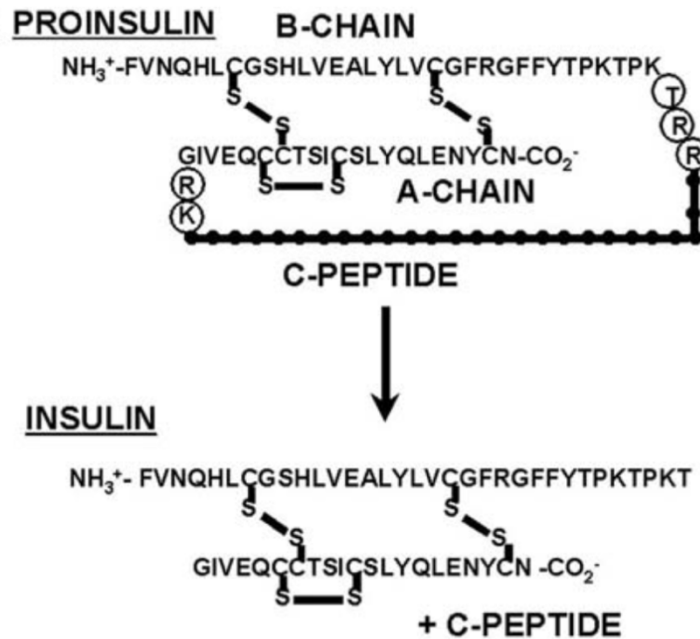
### 2.1.1 Παραγωγή Ινσουλίνης

Σε μοριακό επίπεδο, η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα οδηγεί στην αύξηση της πρόσληψης της από τους μεταφορείς της στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης των  $\beta$  παγκρεατικών κυττάρων, με την συμμετοχή των GLUT-2 μεταφορέων (Murray et al., 2017). Με διευκολυνόμενη διάχυση, αυξάνεται και η ενδοκυττάρια συγκέντρωση γλυκόζης σε επίπεδα mM και ακολουθεί φωσφορυλίωση της από την γλυκοκινάση, η οποία εκκινεί την διαδικασία της γλυκόλυσης. Η φωσφορυλίωση της γλυκόζης και η μετατροπή της σε 6-φωσφορική γλυκόζη επιτρέπει την διατήρηση της διαβάθμισης συγκέντρωσης της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και την διαρκή είσοδο γλυκόζης στα παγκρεατικά κύτταρα (Garrett and Grisham, 2019).

Εν συνεχεία, οι αυξανόμενες τιμές της γλυκόζης αυξάνουν την μεταβολική ροή μέσω των διαδικασιών της γλυκόλυσης και του κύκλου του κιτρικού οξέος, με αποτέλεσμα την υψηλή απόδοση σε ATP (Murray et al., 2017). Η αύξηση, μάλιστα, του κλάσματος ATP/ADP οδηγεί στο κλείσιμο των διαύλων  $K^+$ , προκαλώντας την εκπόλωση της πλασματικής μεμβράνης και το επακόλουθο άνοιγμα των διαύλων  $Ca^{+2}$ . Οι αυξημένες συγκεντρώσεις του ενδοκυττάριου ασβεστίου διεγείρουν την έκκριση της ινσουλίνης στα συγκεκριμένα κύτταρα, προκαλώντας, ακολούθως, και την εξωκυττάρωση της.

Η παραγωγή της ινσουλίνης ακολουθεί μία σειρά από βιοχημικά μονοπάτια για να φτάσει στη τελική λειτουργική μορφή της, την ώριμη ινσουλίνη. Αρχικά, παράγεται στα ριβοσώματα των παγκρεατικών κυττάρων ένα πρόδρομο μόριο, η **προ-προ-ινσουλίνη** (*pre-insulin*), η οποία φέρει ένα σηματοδοτικό μόριο που αποτελείται από μια υδρόφοβη αλληλουχία 23 αμινοξέων. Το σήμα του μορίου αυτού είναι απαραίτητο για την αποτελεσματική μετάβαση των παγκρεατικών κυττάρων στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου το μόριο θα υποστεί επιπλέον επεξεργασία.

Στο σημείο αυτό, η μετακίνηση της προ-προ-ινσουλίνης στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου οδηγεί στην αποκοπή του πεπτιδίου-σήματος, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό της **προ-ινσουλίνης** (*pro-insulin*) (Εικόνα 2.1). Η προ-ινσουλίνη, μετά την παραγωγή της, αποθηκεύεται στα εκκριτικά κοκκία του συμπλέγματος Golgi με τη μορφή κρυστάλλων. Η τελική μορφή θα ληφθεί μετά την δράση ενδοπεπτιδασών οι οποίες θα αποκόψουν το ενδιάμεσο πεπτίδιο C. Ύστερα από την αποκοπή του πεπτιδίου C, οι  $\alpha$  και  $\beta$  πολυπεπτιδικές αλυσίδες παραμένουν συνδεδεμένες με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς.



**Εικόνα 2.1.** Σχηματική απεικόνιση της μετατροπής της ινσουλίνης σε προ-ινσουλίνη (Dunn, 2005).

Συνεπώς, η βιοχημική επεξεργασία του αρχικού πρόδρομου μορίου, έχει ως τελικό προϊόν, την ώριμη ινσουλίνη, η οποία αποτελείται από 51 αμινοξέα από το αρχικό πρόδρομο μόριο των 110 αμινοξέων. Πρόκειται για ένα μόριο δύο πολυπεπτιδικών αλυσίδων, την α η οποία απαρτίζεται από 21 αμινοξέα και την β η οποία αποτελείται από 30 αμινοξέα. Για την σύνδεση των δύο αλυσίδων απαιτούνται δύο δισουλφιδικοί δεσμοί, και το συνολικό μοριακό βάρος της ινσουλίνης απαντάται στα 5808 Da.

Ακολούθως, οι κύριες λειτουργίες της ώριμης ινσουλίνης αφορούν στην ενεργοποίηση μεταβολικών μονοπατιών και σχετίζονται με βιοχημικές διαδικασίες για την μείωση της γλυκόζης. Σε πρωταρχικό επίπεδο, αυξάνεται ο αριθμός των μεταφορέων γλυκόζης GLUT4 στην πλασματική μεμβράνη των μυϊκών και λιπώδων κυττάρων, ενώ μέσα σε δευτερόλεπτα διεγείρει την παραγωγή του γλυκογόνου στο ήπαρ (Lodish et al., 2016). Με το πέρασμα του χρόνου, οι δράσεις της στο ήπαρ επεκτείνονται στην αναστολή της σύνθεσης ενζύμων που καταλύουν την γλυκονογένεση. Επιπροσθέτως, λόγω ανταγωνιστικής δράσης με την γλυκαγόνη, η ινσουλίνη δρα και στα α παγκρεατικά κύτταρα αναστέλλοντας τη σύνθεση της γλυκαγόνης.

Μια διαφοροποίηση υφίσταται στην πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα του μυϊκού και του λιπώδους ιστού σε σχέση με τα κύτταρα του ήπατος. Η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι τα κύτταρα του μυϊκού και του λιπώδους ιστού φέρουν ειδικούς υποδοχείς GLUT-4, οι οποίοι σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης βρίσκονται φυσιολογικά σε ενδοκυτταρικά κυστίδια. Ως απάντηση στην ινσουλίνη, τα ενδοκυτταρικά αυτά κυστίδια μεταναστεύουν στην κυτταρική επιφάνεια, συνδέονται με την πλασματική μεμβράνη, και εκθέτουν τους ενεργούς πλέον μεταφορείς γλυκόζης (Murray et al., 2017). Αντιθέτως, στα ηπατικά κύτταρα η ινσουλίνη έχει διαφορετική λειτουργική αξία, εφόσον η δράση της είναι παρόμοια με αυτή της συνθετάσης του γλυκογόνου, αναστέλλοντας τη φωσφορύλαση του γλυκογόνου. Συγκεκριμένα, στα ηπατικά κύτταρα η είσοδος της γλυκόζης διαμεσολαβείται από το ισοένζυμο της εξοκινάσης.

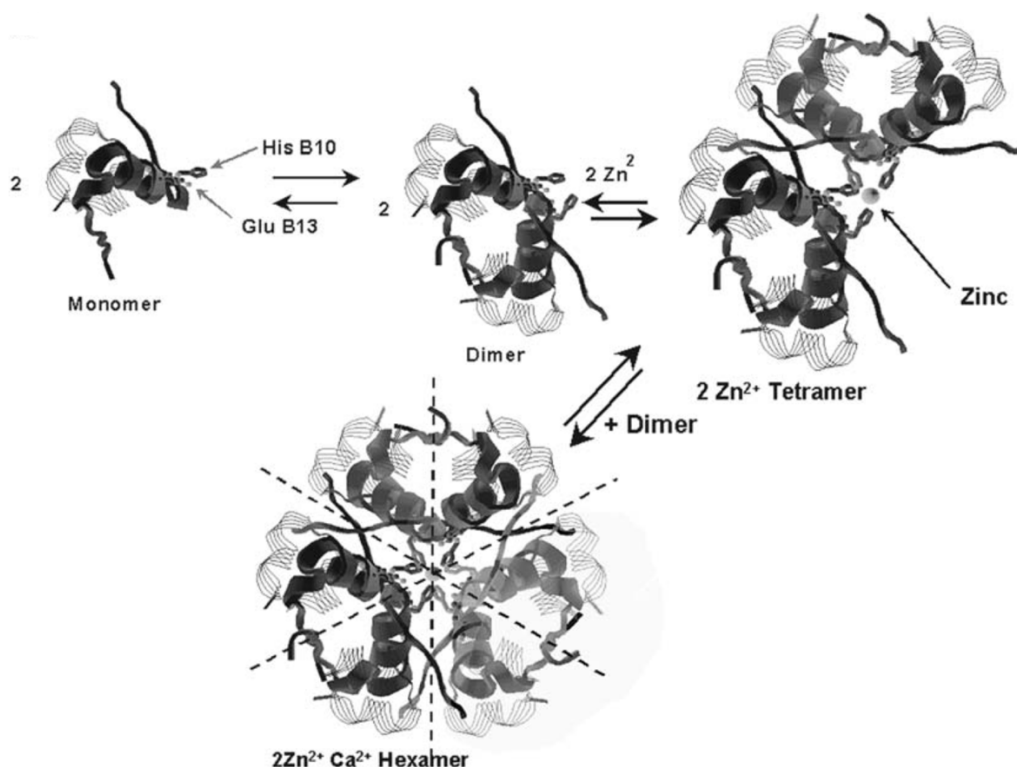
Οι αυξημένες συγκεντρώσεις της γλυκόζης αποτελούν την θεμελιώδη αιτία της έκφρασης της ινσουλίνης. Η δράση της τελευταίας συμμετέχει ενεργά στην μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, και όταν τα επίπεδα της φτάσουν σε φυσιολογικές τιμές της τάξεως των 70-110 mg/dl ολικού

αίματος, τότε το σήμα αίρεται, δεδομένου ότι πρόκειται για ένα σύστημα αρνητικής ανατροφοδότησης.

### 2.1.2 Δομή Ινσουλίνης

Η δομή της ινσουλίνης αποτελεί αντικείμενο εντατικής μελέτης, λόγω της λειτουργικής της αξίας, αλλά και της σημασίας της στην θεραπεία της ασθένειας του σακχαρώδους διαβήτη. Η στερεοδιαμόρφωση της ινσουλίνης, τόσο σε διαφορετικές συνθήκες, όσο και συγκρυσταλλωμένη με προσδέτες, δίδει χρήσιμες πληροφορίες που δύναται να αξιοποιηθούν ποικιλοτρόπως. Η μοναδικότητα αυτού του μορίου διαφαίνεται και από το γεγονός, πως η αποθήκευση της ινσουλίνης στα εκκριτικά κοκκία του παγκρέατος πραγματοποιείται με την μορφή κρυστάλλων, ενώ στην φυσιολογία των ζωικών οργανισμών, σπάνια συναντώνται κρυσταλλικές δομές.

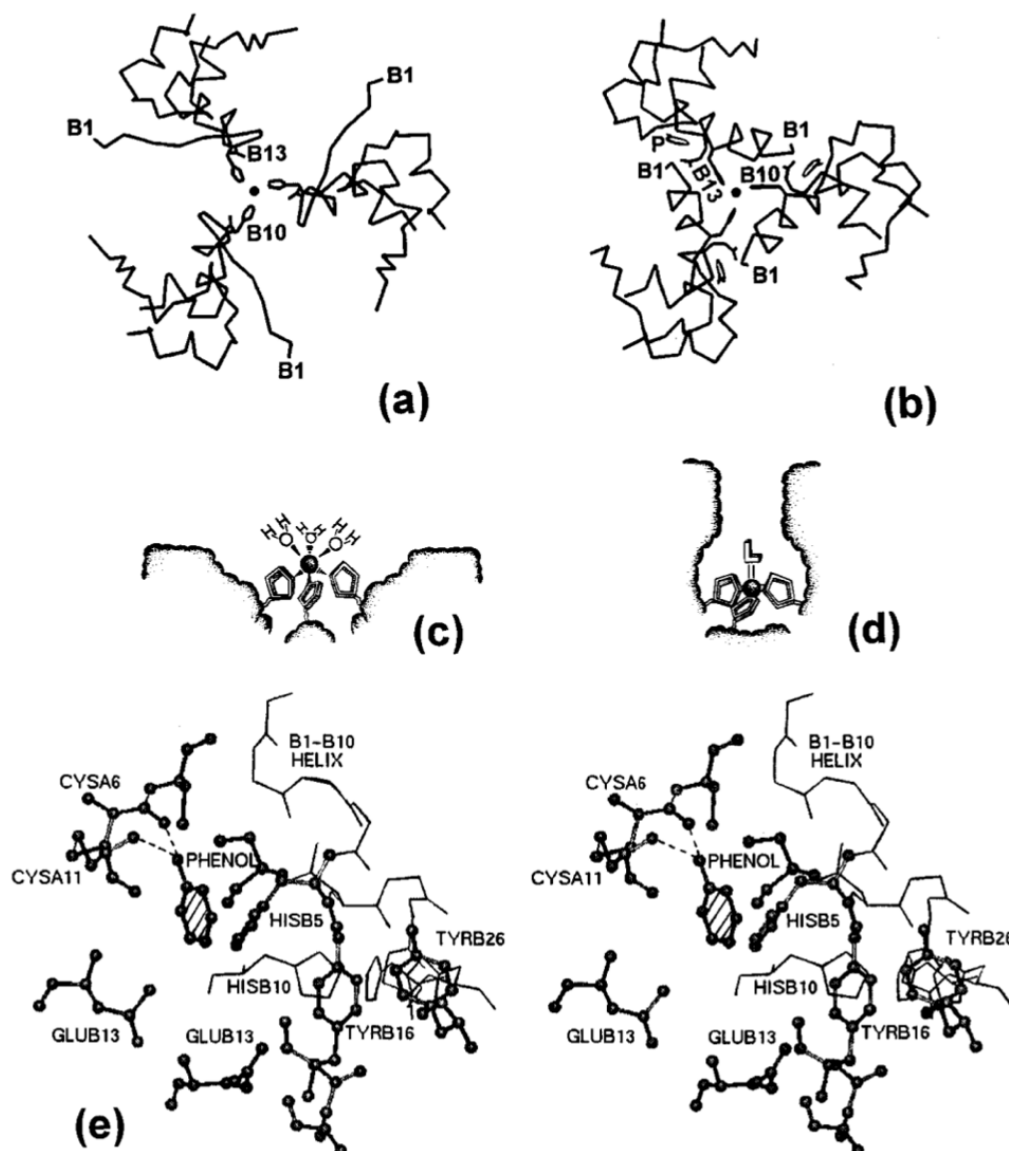
Η βιολογικά ενεργή μορφή της ινσουλίνης είναι υπό τη μορφή μονομερούς, ενώ η αποθήκευση της στηρίζεται στην δημιουργία κρυσταλλικών εξαμερών. Πιο συγκεκριμένα, στα εκκριτικά κοκκία η απομάκρυνση του πεπτιδίου C με την μεσολάβηση τρυψίνης και καρβοξυλοπεπτιδασών συμβάλλουν στην μετατροπή του εξαμερούς, παρουσία πάντοτε ιόντων ψευδαργύρου  $Zn^{+2}$  και ασβεστίου  $Ca^{+2}$ . Η απομάκρυνση του πεπτιδίου C αλλάζει σημαντικά την διαλυτότητα του εξαμερούς εντός των κοκκίων, γεγονός που προκαλεί την κρυστάλλωση με την ενεργό συμμετοχή των δισθενών ιόντων. Η βιολογική σημασία της δημιουργίας των εξαμερών έχει ως πρωτεύοντα στόχο την προστασία τμημάτων των πολυπεπτιδικών αλυσίδων από πρωτεολυτική διάσπαση (Dunn, 2005).



Εικόνα 2.2. Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού δημιουργίας της T<sub>6</sub> εξαμερικής ινσουλίνης (Dunn, 2005).

Σε μία σύνοψη των ανωτέρω, η ινσουλίνη απαντάται σε μονομερή, διμερή και εξαμερή. Αρχικά, αποθηκεύεται με την μορφή μικροκρυστάλλων στα εκκριτικά κοκκία του παγκρέατος, οι οποίοι ύστερα από ερέθισμα εισέρχονται στην κυκλοφορία, όπου και σταδιακά καταρρέουν (Smith, 1984). Η κατάρρευση των κρυστάλλων οφείλεται στο γεγονός ότι το pH μεταβάλλεται από όξινο σε ουδέτερο, καθώς και στο ότι μειώνονται και οι συγκεντρώσεις δισθενών ιόντων, κατά την είσοδο τους στην κυκλοφορία του αίματος. Η δραστική μορφή της ινσουλίνης είναι το μονομερές και τον καίριο ρόλο διαδραματίζει η β αλυσίδα, λόγω της ιδιαίτερης δομής της. Αυτή αποτελείται από μία α-έλικα

κεντρικά, ενώ στα δύο άκρα απαντώνται δύο περιοχές αμινοξέων (B<sub>1</sub>-B<sub>8</sub> και B<sub>20</sub>-B<sub>30</sub>) εκτεταμένης διαμόρφωσης (*extended conformation*), με την περιοχή B<sub>1</sub>-B<sub>8</sub> να καθορίζει τις μοριακές διαμορφώσεις της ινσουλίνης.



**Εικόνα 2.3.** Απεικονίσεις μιας μονάδας T<sub>3</sub> (a) και μιας μονάδας R<sub>3</sub> (b). Στην T<sub>3</sub>, τα κατάλοιπα 1-9 της αλυσίδας B έχουν εκτεταμένη διαμόρφωση (a), ενώ στην R<sub>3</sub>, τα κατάλοιπα 1-9 της αλυσίδας B καταλαμβάνουν μια R-ελικοειδή διαμόρφωση. Οι θέσεις των φαινολικών θυλάκων στο πλαίσιο b (με δεσμευμένη φαινόλη) υποδεικνύονται με το σύμβολο P. Στα σκίτσα c και d, οι θέσεις HisB10 Zn<sup>2+</sup> της κατάστασης T (c) και της κατάστασης R (d) παρατηρούνται κάθετα στον τριπλό άξονα συμμετρίας. Στην κατάσταση T (c), το οκταεδρικό πεδίο υποκαταστάτη γύρω από τον Zn<sup>2+</sup> αποτελείται από τρεις πλευρικές αλυσίδες HisB10 και τρία μόρια νερού. Στην κατάσταση R (d), το τετραεδρικό πεδίο υποκαταστάτη του Zn<sup>2+</sup> που αποτελείται από τις τρεις πλευρικές αλυσίδες HisB10 και έναν τέταρτο (εξωγενή) υποκαταστάτη. Στο πλαίσιο e, φαίνεται ένα στερεοδιάγραμμα του φαινολικού θύλακα μιας θέσης R<sub>6</sub> με τη φαινόλη να δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα CysA6 και CysA11. Οι φαινολικοί θύλακες σύνδεσης βρίσκονται στη διεπαφή διμερούς-διμερούς, δηλαδή στο πλαίσιο b, τόσο στις διαμορφώσεις R<sub>6</sub> (έξι θέσεις) όσο και T<sub>3</sub>R<sub>3</sub><sup>f</sup> (τρεις θέσεις) (Rahuel-Clermont et al., 1997).

Ειδικότερα, το εξαμερές Zn-ινσουλίνη παρουσιάζει αλλοστερικές ιδιότητες, οι οποίες επάγονται από την χρήση φαινολικών παραγώγων και ανιόντων, που επηρεάζουν την φυσικοχημική σταθερότητα επάγοντας πιο συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις με το πρωτεϊνικό μόριο. Οι τρεις μοριακές προαναφερθείς διαμορφώσεις T<sub>6</sub>, T<sub>3</sub>R<sub>3</sub><sup>f</sup>, R<sub>6</sub>, οι οποίες αποτελούνται από δύο διασυνδεδεμένες τριμερείς μονάδες T<sub>3</sub>, R<sub>3</sub><sup>f</sup> ή R<sub>3</sub>. Στην κατάσταση T, το οχτώ κατάλοιπα του αμινοτελικού άκρου της B αλυσίδας λαμβάνουν εκτεταμένη διαμόρφωση, ενώ στην περίπτωση της R τα κατάλοιπα αυτά

αναδιπλώνονται σχηματίζοντας ελικοειδή διαμόρφωση (Rahuel-Clermont *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2000; Dunn, 2005). Η ελικοειδής αυτή διαμόρφωση, ανοίγει υδρόφοβους θύλακες που βρίσκονται στις δι-επαφές διμερούς-διμερούς εντός του εξαμερούς, στους οποίους προσδένονται τα μικρά οργανικά μόρια. Ακολούθως, δύο ιόντα ψευδαργύρου ( $Zn^{+2}$ ) εντάσσονται στον τριπλό άξονα της δομής με τα τρία συμμετρικά κατάλοιπα HisB10 από κάθε τριμερή μονάδα (Rahuel-Clermont *et al.*, 1997).

Κατά την πραγματοποίηση της μετάβασης από την T μοριακή διαμόρφωση στην R, συσσωρεύονται τα ελικοειδή τμήματα B1-B8 προκαλώντας την μετάβαση της γεωμετρίας ένταξης του  $Zn^{+2}$  από την οχταεδρική διάταξη, που είναι ανοιχτή στον διαλύτη και αποτελείται από τρία άζωτα HisB10 και τρία μόρια νερού, σε τετραεδρική διάταξη και την δημιουργία μίας θηλιάς, που τα τρία μόρια νερού αντικαθίστανται από φαινολικά παράγωγα, και ανιόντα. Η αλλοστερική συμπεριφορά του εξαμερούς της ινσουλίνης προκύπτει από μία προϋπάρχουσα ισορροπία μεταξύ των τριών αλλοστερικών διαμορφώσεων, οι οποίες καταλήγουν τελικά στις σταθερότερες μοριακές διαμορφώσεις  $T_3R_3^f$ , και  $R_6$ , όταν πραγματοποιείται η πρόσδεση ανιόντων ή οργανικών προσδετών στους υδρόφοβους θύλακες. Η πρόσδεση στις φαινολικές θέσεις προκαλεί ομοτροπικές αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις, όπου με την επιπλέον συνεργιστική δράση ανιόντων στα ιόντα ψευδαργύρου που δρουν ως ετεροτροπικοί τελεστές, επάγονται οι σταθερότερες φυσικοχημικά διαμορφώσεις (Rahuel-Clermont *et al.*, 1997; Dunn, 2005).

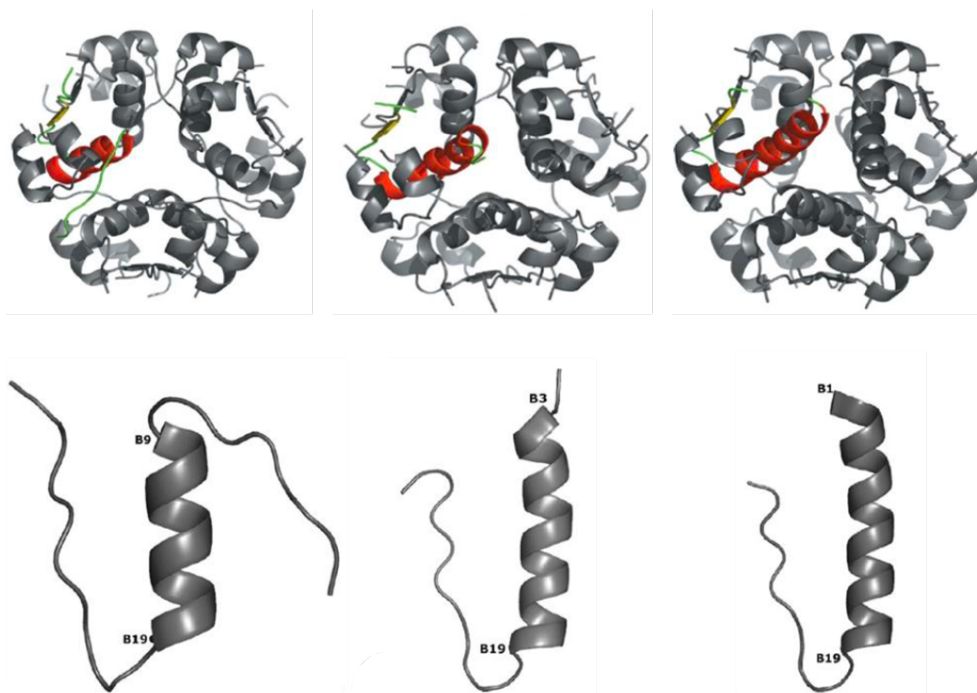
Σε μία σύνοψη, παρατίθεται η διάκριση μεταξύ των τριών γνωστοποιημένων **μοριακών διαμορφώσεων** (*molecular conformations*) της ινσουλίνης, της ίδιας συμμετρίας χώρου, συγκεκριμένα ρομβοεδρικής ( $R3$ ), που καθορίζουν την σταθερότητα του μορίου, καθώς και τον βαθμό προστασίας των λειτουργικών θέσεων. Οι διαμορφώσεις αυτές αφορούν το εξαμερές της ινσουλίνης το οποίο θεωρείται ένα τριμερές από διμερή, η δόμηση των οποίων απαιτεί δύο –συνήθως– ιόντα ψευδαργύρου. Η διαφοροποίηση έγκειται στην αναδίπλωση του αμινοτελικού άκρου της β αλυσίδας κάθε μονομερούς. Με τα παραπάνω δεδομένα διακρίνονται οι τρεις εξής διαμορφώσεις (Smith *et al.*, 2000):

- $T_6$ , κατά την οποία τα αμινοξέα B1-B8 λαμβάνουν εκτεταμένη (T) διαμόρφωση. Εμφανίζεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις ανιόντων.
- $R_6$ , όπου τα προαναφερθέντα αμινοξέα αποκτούν ελικοειδή (R) διαμόρφωση. (Προκύπτει με την πρόσδεση φαινολικών παραγώγων.)
- $T_3R_3^f$ , σε αυτήν την περίπτωση στα 3 εκ των 6 μονομερών (τα αμινοξέα B1-B3) λαμβάνουν T διαμόρφωση και τα αμινοξέα B4-B8 αποκτούν  $R^f$  διαμόρφωση ( $f$ : *frayed*).

Με τα αμινοξέα B9-B19 να λαμβάνουν ελικοειδή διαμόρφωση και στις τρεις αλλοστερικές διαμορφώσεις.

Η  $R_6$  διαμόρφωση είναι η πιο σταθερή, καθώς διατηρεί τον ψευδάργυρο κοντά στα αμινοξέα, αποτρέποντας πιθανή κατάρρευση της κρυσταλλικής δομής. Δεδομένου ότι οι ελικοειδείς διαμορφώσεις διαφυλάσσουν αποτελεσματικότερα τα αμινοξέα, η σταθερότητα μεταξύ των τριών διαμορφώσεων ακολουθεί την εξής σειρά:

$$T_6 < T_3R_3^f < R_6$$



**Εικόνα 2.4.** Στο ανώτερο μέρος της εικόνας απεικονίζονται οι εξαμερικές διατάξεις των τριών διαμορφώσεων της ινσουλίνης με σειρά από τα αριστερά προς τα δεξιά η  $T_6$ , η  $T_3R_3$  και η  $R_6$ . Με κόκκινο απεικονίζεται η διαμόρφωση του αμινοτελικού άκρου, σε ένα από τα μονομερή κάθε εξαμερούς, που διαφοροποιεί τις τρεις μορφές. Στο κάτω μέρος της εικόνας παρατίθενται με την προαναφερθείσα σειρά τα αμινοτελικά άκρα της Β αλυσίδας σε κάθε μία από τις τρεις μοριακές διαμορφώσεις (Karavassili, PhD thesis, 2018).

Με αφορμή την διαφορά που σημειώνεται μεταξύ των μοριακών διαμορφώσεων στο επίπεδο σταθερότητας της ίδιας κρυσταλλικής συμμετρίας, να τονιστεί πως η πολυπλοκότητα στην αναζήτηση σταθερότερων δομών αναγάζεται σε υψηλότερα επίπεδα, όταν αναζητάτε και σε νέες κρυσταλλικές συμμετρίες. Μία γενικότερη διάκριση των υλικών δύναται να πραγματοποιηθεί ως προς την εμφάνιση περισσότερων του ενός κρυσταλλικών δομών. Όταν πρόκειται για στοιχεία τότε ονομάζονται αλλοτροπικά, ενώ όταν αφορούν σε σύνθετες χημικές ενώσεις ονομάζονται πολυμορφικά. Η ινσουλίνη υπάγεται στην δεύτερη κατηγορία και παρουσιάζει διαφοροποιήσεις ως προς την διάταξη, το πακετάρισμα, ακόμη και όσον αναφορά την διαμόρφωση της μοναδιαίας κυψελίδας. Η διαφορετική δομή είναι συνώνυμη της διαφορετικής λειτουργίας, και η σχέση αυτή αποτελεί και την θεμέλια αιτία για την διεξαγωγή πολυάριθμων μελετών που να εξετάζουν τον κρυσταλλογραφικό πολυμορφισμό. Ιδιαίτερα όσον αναφορά την ινσουλίνη, έχει πραγματοποιηθεί ένα πλήθος πειραμάτων για την μελέτη του πολυμορφισμού της σε πολλούς διαφορετικούς συνδυασμούς συνθηκών κρυστάλλωσης.

## 2.2 Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο **σακχαρώδης διαβήτης** (*diabetes mellitus*) αποτελεί ένα σύνδρομο που απαρτίζεται από ένα σύνολο μεταβολικών ασθενειών με κοινή συμπτωματολογία, διαφορετική αιτιολογία, και ετερογένεια ως προς τις επιπλοκές. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι άμεσα σχετιζόμενα με το χρόνο εξέλιξης της νόσου, αλλά και με την ανθεκτικότητα που παρουσιάζει ο εκάστοτε οργανισμός (Guthrie and Guthrie, 2004). Καίριο ρόλο στην ανάπτυξη του διαβήτη διαδραματίζει η ινσουλίνη, ενώ η διάκριση μεταξύ των διαφόρων τύπων διαβήτη στηρίζεται σε μηχανισμούς δράσης που την αφορούν άμεσα. Όπως έχει ήδη επισημανθεί, η ινσουλίνη είναι αναβολική πεπτιδική ορμόνη και η ενδοκρινής της δράση είναι η μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος. Εντούτοις, εάν προκύψει κάποια παθολογική κατάσταση που σχετίζεται είτε με μειωμένη λειτουργική δράση της ινσουλίνης, είτε με την ελαττωμένη (ή και καθόλου) παραγωγή ινσουλίνης, τότε ακολουθεί μία σειρά επιπτώσεων που αφορούν και άλλα μεταβολικά μονοπάτια του οργανισμού.

Διακρίνονται κυρίως τρεις τύποι διαβήτη, καθένας από τους οποίους χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένα κριτήρια. Το κοινό τους γνώρισμα αποτελεί η μειωμένη ανοχή του οργανισμού στην γλυκόζη. Παρακάτω, ακολουθούν οι τύποι διαβήτη και τα χαρακτηριστικά που τους διέπουν.

### 2.2.1 Διαβήτης Τύπου I

Ο **διαβήτης τύπου I** (*type-I diabetes mellitus, T1DM*) γνωστός και ως **ινσουλινο-εξαρτώμενος διαβήτης** (*insulin-dependent diabetes mellitus*), αποτελεί μία ιδιαίτερη αυτοάνοση ασθένεια που εκδηλώνεται ως επί τω πλείστον κατά την νεανική ηλικία, χωρίς βέβαια αυτή η ένδειξη να εξαιρεί τους ενήλικες. Η συγκεκριμένη ασθένεια φαίνεται να εξαρτάται, τόσο από συγκεκριμένα γονίδια, όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Μάλιστα, έχουν προσδιοριστεί γονίδια στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 6, τα οποία φαίνεται να έχουν άμεση συσχέτιση με την εμφάνιση διαβήτη τύπου I (Guthrie and Guthrie, 2004). Εντούτοις, το γενετικό υπόβαθρο δεν καθίσταται η μόνη αιτία εμφάνισης της ασθένειας, καθώς από μελέτες σε μονοζυγωτικά δίδυμα φανέρωσαν πως οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι καθοριστικής σημασίας για την εκδήλωση ή μη της ασθένειας.

Στον διαβήτη τύπου I, ο ίδιος ο οργανισμός επιτίθεται στον εαυτό του, με αποτέλεσμα να προκαλείται προοδευτική καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων, όταν αυτό-αντισώματα παράγονται και δρουν έναντι των κυττάρων των νησιδίων του Langerhans (Guthrie and Guthrie, 2004). Την κυτταρική νέκρωση ακολουθεί η έκπτωση της λειτουργίας, με άμεση απόρροια την βαθμιδωτή μείωση της έκκρισης της ινσουλίνης, έως και το σημείο της ολοκληρωτικής απώλειας λειτουργίας των κυττάρων και την μη παραγωγή ινσουλίνης. Στα αρχικά στάδια της νόσου, η παντελής έλλειψη της ρυθμιστικής αυτής ορμόνης προκαλεί συμπτώματα, όπως πολυουρία, διαρκές αίσθημα δίψας, βουλιμία και ταυτόχρονη μείωση του βάρους των πασχόντων. Η μη έγκυρη διάγνωση δύναται να οδηγήσει σε κετοξέωση, κώμα, έως και θάνατο.

### 2.2.2 Διαβήτης Τύπου II

Ο **διαβήτης τύπου II** (*type II diabetes mellitus, T2DM*) σημειώνει δραματική αύξηση παγκοσμίως ως συνέπεια του τρόπου ζωής, σε συνδυασμό βέβαια και με το γονιδιακό υπόβαθρο. Παρουσιάζεται ως σύνδρομο αντίστασης στην ινσουλίνη, καθώς, ενώ η πεπτιδική αυτή ορμόνη παράγεται φυσιολογικά, δεν είναι εφικτή η είσοδος της στα κύτταρα. Σε μοριακό επίπεδο, δεν είναι πλήρως κατανοητή η αιτιολογία που οδηγεί στην ασθένεια. Πιθανές ερμηνείες αφορούν είτε την δημιουργία μη λειτουργικών υποδοχέων, είτε την παραγωγή μη λειτουργικής ινσουλίνης, είτε την ανεπιτυχή σηματοδότηση του χημικού σήματος της ινσουλίνης στο εσωτερικό των κυττάρων, κυρίως των μυϊκών και ηπατικών (Guthrie and Guthrie, 2004). Το ζήτημα με την συγκεκριμένη ασθένεια είναι η διαρκής παραγωγή ινσουλίνης, ως απάντηση στα υψηλά επίπεδα γλυκόζης, αφού το σήμα για την έκκριση της ινσουλίνης παραμένει εφόσον η τελευταία δεν δύναται να δράσει αποτελεσματικά. Τα β-παγκρεατικά κύτταρα υπερπαράγουν ινσουλίνη, το ενδοπλασματικό δίκτυο εξαντλεί την χωρητικότητά του, και στην συνέχεια ενεργοποιείται η **απάντηση σε μη διπλωμένες πρωτεΐνες** (*unfolded protein response, UPR*), και τελικά επέρχεται η απόπτωση (Alberts, 2017). Η υπερλειτουργία του παγκρέατος, σε συνδυασμό με την ανεπιτυχή πρωτεόσταση, οδηγεί στην σταδιακή έκπτωση της λειτουργίας του με το πέρασ του χρόνου.

Η εμφάνιση του συγκεκριμένου τύπου διαβήτη, επηρεάζεται κατά κύριο λόγο από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η διατροφή πλούσια σε υδατάνθρακες, η παχυσαρκία, η καθιστική ζωή, καθώς και έλλειψη δραστηριότητας, αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης της ασθένειας. Συνήθως, πριν την εμφάνιση του διαβήτη τύπου II προηγείται μία χρόνια αντίσταση στην ινσουλίνη, δηλαδή μία μικρότερη ευαισθησία των κυττάρων στην δράση της ινσουλίνης. Σε αυτήν την περίπτωση, οι αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης δεν αντισταθμίζονται, ακόμα και αν το πάγκρεας υπερπαράγει ινσουλίνη. Ως αποτέλεσμα, συνεπάγονται τόσο η χρόνια υπεργλυκαιμία, όσο και η σταδιακή καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων.



### 2.2.3 Διαβήτη Κύησης

Η συγκεκριμένη μορφή του **διαβήτη κύησης** (*gestational diabetes mellitus, GDM*) είναι αναστρέψιμη και παρουσιάζεται κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης. Τα συμπτώματα ομοιάζουν με αυτά του διαβήτη τύπου II, δηλαδή αύξηση της έκκρισης ινσουλίνης και μειωμένη ανοχή των κυττάρων στην ορμόνη αυτή. Ύστερα από την ολοκλήρωση της εγκυμοσύνης, τα επίπεδα της γλυκόζης επιστρέφουν στο εύρος των φυσιολογικών τιμών. Η εμφάνιση διαβήτη κύησης είναι μία ισχυρή στατιστικά προειδοποιητική ένδειξη (30-40%) για την εκδήλωση διαβήτη τύπου II στο μέλλον.

### 2.2.4 Γλυκοζυλίωση Πρωτεϊνών

Η υπεργλυκαιμία, που είναι επακόλουθο των διαφόρων τύπων σακχαρώδους διαβήτη, όταν δεν είναι ορθή και συστηματική η ρύθμιση των σακχάρου στο αίμα, ακολουθείται από ένα επιβλαβές φαινόμενο, την γλυκοζυλίωση. Ο όρος γλυκοζυλίωση αναφέρεται στην μη ενζυμική, ομοιοπολική πρόσδεση σακχάρων, κυρίως σε πρωτεΐνες. Στον οργανισμό, η δημιουργία γλυκοπρωτεϊνών γίνεται φυσιολογικά από πλήρως ελεγχόμενη ενζυμική δραστηριότητα. Η C-1 καρβονυλική ομάδα της γλυκόζης σχηματίζει δεσμούς Schiff με τις πλευρικές αλυσίδες της λυσίνης των πρωτεϊνών (Lodish et al., 2016). Οι βάσεις Schiff δύναται να επαναδιαταχθούν περαιτέρω με την εφαρμογή μεταθέσεων Amadori και οξειδώσεων, με αποτέλεσμα την δημιουργία μη αντιστρεπτών προϊόντων γλυκοζυλίωσης. Η συνολική σειρά των αντιδράσεων είναι γνωστή ως αντίδραση Mallard, ενώ τα προϊόντα αυτά ονομάζονται **τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης** (*advanced glycation end products, AGEs*) (Murray et al., 2017). Τα AGEs παρουσιάζουν ιατρικό ενδιαφέρον, καθώς επηρεάζουν σημαντικά την λειτουργικότητα των πρωτεϊνών και ευθύνονται για πληθώρα ιστικών βλαβών του οργανισμού.

Για τον διαβήτη τύπου II, μάλιστα, η **γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη** (*glycosylated hemoglobin, hemoglobin A1c, HbA1c*) αποτελεί ένα αποτελεσματικό διαγνωστικό δείκτη. Με την μέτρηση της HbA1c, είναι εφικτός ο προσδιορισμός της μέσης συγκέντρωσης της γλυκόζης στον οργανισμό σε ένα βάθος χρόνου, δεδομένου ότι τα ερυθροκύτταρα επιβιώνουν στον οργανισμό έως και τέσσερεις μήνες. Οι επιπλοκές που συνδέονται με τον σακχαρώδη διαβήτη είναι άμεση συνάρτηση του ποσοστού γλυκοζυλίωσης και των ιστών που επιβαρύνονται, κυρίως, από την μη ενζυμική δημιουργία γλυκοπρωτεϊνών. Ενδεικτικά παρατίθενται ορισμένες μόνο από τις επιδράσεις αυτής της επιβλαβούς συνθήκης. Η γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών του εξωκυττάρου υγρού, κυρίως του κολλαγόνου, είναι πιθανό να συμβάλλει στην συσσώρευση πρωτεϊνών του πλάσματος στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων συντελώντας στην αθηροσκλήρυνση, καθώς και στις μικροαγγειακές και μακροαγγειακές επιπλοκές που απαντώνται στην ασθένεια του διαβήτη. Επιπροσθέτως, η γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες μπορούν να προσδεθούν σε κύτταρα που φέρουν υποδοχείς πρόσδεσης AGE, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μακροφάγα, διεγείροντας του παράγοντες που προκαλούν φλεγμονή. Ακόμη, επηρεάζονται αρνητικά από την γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών οι αρθρώσεις και το οφθαλμολογικό σύστημα. Οι ζημίες που προκαλούνται στον οργανισμό οφείλονται κατά κύριο λόγο στην ανταγωνιστική δράση για την δέσμευση των υποδοχέων μεταξύ των μη λειτουργικών γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών και των λειτουργικών.

### 2.2.5 Θεραπεία

Η έγκαιρη διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη αποτελεί ίσως το σημαντικότερο βήμα για την θεραπεία και την καθυστέρηση της εξέλιξης της νόσου. Τα αυξημένα επίπεδα σακχάρων στο αίμα επηρεάζουν αρνητικά ένα σύνολο διαφορετικών ιστών, ενώ η παρατεταμένη έκθεση σε μη ενζυμικές γλυκοπρωτεΐνες οδηγεί στην σταδιακή κατάρρευση των οργάνων. Οι διαβητικοί ασθενείς, ανάλογα με τον τύπο της ασθένειας, υποβάλλονται σε θεραπεία εξωγενούς χορήγησης ινσουλίνης, σε συνδυασμό με την βελτίωση της διατροφής και την προσθήκη της άθλησης στην καθημερινή τους ζωή. Για τον πλήρη έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης απαιτούνται συχνές μετρήσεις από τους

πάσχοντες με στόχο την κατάλληλη λήψη φαρμακευτικής αγωγής προσαρμοσμένης στις ανάγκες του οργανισμού για την αποτελεσματική ρύθμιση.

Η θεραπεία του διαβήτη περιλαμβάνει τόσο την χρήση ινσουλίνης και **αναλόγων ινσουλίνης** (*insulin analogues*), όσο και μη ινσουλινικά φάρμακα, όπως **ανάλογα GLP-1** (*Glucagon-Like Peptide-1 receptor agonists*). Τα ανάλογα αποτελούν συνθετικές μορφές μορίων ινσουλίνης με καίριο στόχο την προσομοίωση της φυσικής δράσης της στον οργανισμό. Παρουσιάζουν, εντούτοις, δομικές τροποποιήσεις σε σχέση με την ανθρώπινη ινσουλίνη, ώστε να τους προσδοθούν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά ενίσχυσης της λειτουργικότητάς τους καθώς και ελέγχου της δράσης τους. Οι τροποποιήσεις αφορούν είτε την αμινοξική αλληλουχία, είτε την προσθήκη προσδετών, διαδικασίες που σχετίζονται σημαντικά με την επιθυμητή διάρκεια δράσης του ινσουλινικού αναλόγου στον οργανισμό. Η διάκριση, των ινσουλινικών αναλόγων πραγματοποιείται με βάση την διάρκεια δράσης τους και διακρίνονται σε 1. **Ταχείας δράσης** (*Rapid acting*), 2. **Βραδείας δράσης** (*Short acting*), 3. **Ενδιάμεσης δράσης** (*Intermediate acting*) 4. **Μακράς δράσης** (*Long acting*) και 5. **Premixed**. Τα βραδείας και μακράς δράσης ινσουλινικά ανάλογα, συνήθως, συνχορηγούνται σε συνδυασμό με τα ανάλογα ταχείας δράσης για βέλτιστη αποτελεσματικότητα. Ωστόσο, η θεραπεία προσαρμόζεται με βάση τον τύπο του σακχαρώδους διαβήτη, αλλά και του επιπέδου ανταπόκρισης του οργανισμού του κάθε ασθενούς στην αγωγή.

Η ασθένεια του σακχαρώδους διαβήτη έχει λάβει εκτεταμένες διαστάσεις, δεδομένου ότι το 2021 σημειώθηκαν 529 εκατομμύρια ασθενείς σε παγκόσμιο επίπεδο που έφεραν την νόσο (Liu, 2023). Παράλληλα, η στατιστική πρόβλεψη προμηνύει ότι μέχρι το 2050 ο συνολικός αριθμός των πασχόντων θα φτάσει και θα ξεπεράσει τα 1.31 δισεκατομμύρια. Το γεγονός αυτό προσανατολίζει το ερευνητικό ενδιαφέρον στην εύρεση φαρμάκων με βελτιωμένες ιδιότητες, με κύριο στόχο την ελαχιστοποίηση των συμπτωμάτων και την βελτιστοποίηση της ποιότητας της ζωής των πασχόντων.

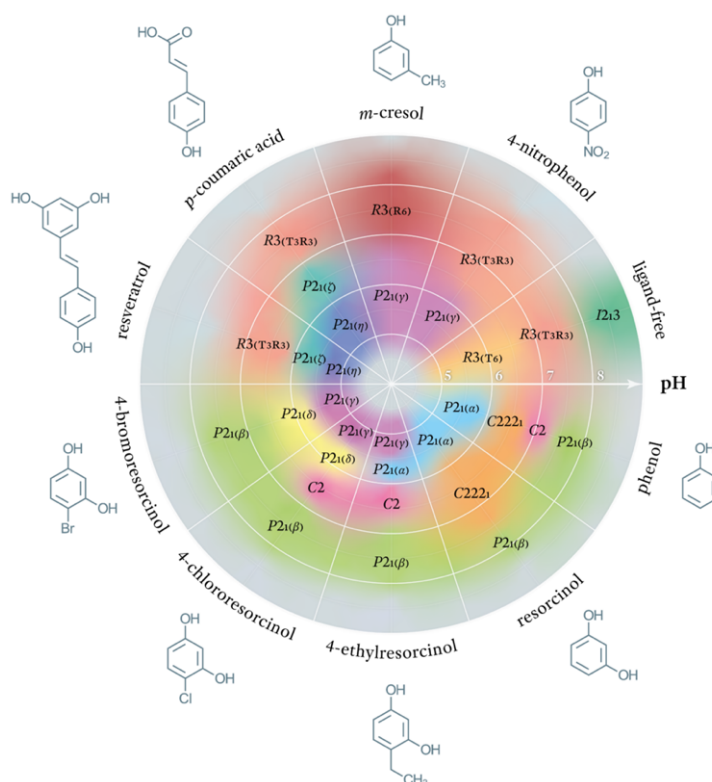
## 2.2.6 Αξία Κρυσταλλικών Φαρμάκων

Επί σειρά ετών σημειώνεται εντατική έρευνα του μοριακού και κρυσταλλικού πολυμορφισμού της ινσουλίνης. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-X διαδραματίζει καίριο ρόλο, εφόσον επιτρέπει την τρισδιάστατη απόδοση των μορίων της αγρίου τύπου ανθρώπινης ινσουλίνης, όσο και τροποποιημένων μορφών της, καθώς επίσης και συμπλεγμάτων αυτής με ιόντα ψευδαργύρου ή προσδετών, φαινολικών και μη (Fili, 2015). Η διερεύνηση εναλλακτικών μεθόδων κρυστάλλωσης της ινσουλίνης δεν αποσκοπεί μονάχα στην αποκρυπτογράφηση της δομής του μορίου και των ιδιοτήτων που μία στεροδιαμόρφωση αποκαλύπτει, αλλά και στην χαρτογράφηση των διαφοροποιήσεων που οι υπό μελέτη προσδέτες προκαλούν στην δομή. Η συγκρυστάλλωση της ινσουλίνης, επομένως, και η δημιουργία συμπλόκων είναι μία ακόμη ερευνητική κατεύθυνση με ιδιαίτερο φαρμακευτικό ενδιαφέρον.

Ειδικότερα, τα μικρο-κρυσταλλικά αντιδιαβητικά φάρμακα πλεονεκτούν έναντι σκευασμάτων σε διαλυτή μη κρυσταλλική κατάσταση. Οι κρύσταλλοι δύναται να συμπυκνώσουν υψηλή συγκέντρωση της ινσουλίνης, παρέχοντας μεγαλύτερες ποσότητες της ουσίας σε μικρότερο όγκο (Karavassili et al., 2020). Επιπλέον, η κρυσταλλική δομή προσδίδει στα μόρια μεγαλύτερη σταθερότητα και ανθεκτικότητα από την δράση πρωτεολυτικών ενζύμων, αποτρέποντας την αποδιάταξη τους και, κατά συνέπεια, ενισχύοντας την αντοχή τους. Μία ακόμη σημαντική ιδιότητα είναι η ελεγχόμενη *in vivo* απελευθέρωση της ινσουλίνης κατά την είσοδο του κρυσταλλικού φαρμακευτικού σκευάσματος στον οργανισμό, δίδοντας μία εναλλακτική μέθοδο για την παραγωγή σκευασμάτων με ελεγχόμενη απόδοση στον οργανισμό.

Το σύνολο των δομικών τροποποιήσεων και του ελέγχου του κρυσταλλικού πολυμορφισμού (*polymorphism*) σχετίζονται άμεσα με λειτουργικά προτερήματα, που θα μπορούσαν εν δυνάμει να αποδοθούν σε νέα φαρμακευτικά σκευάσματα ή ακόμα και να αποτελέσουν πρότυπα **σχεδιασμού φαρμάκων με βάση την δομή** (*structure-based drug design, SBDD*). Η αξιολόγηση των ουσιών για

την αξιοποίηση τους ως φάρμακα σχετίζεται σε ένα μεγάλο βαθμό με την φαρμακοκινητική τους, δηλαδή την πορεία τους μετά από την είσοδο τους στον οργανισμό. Τα βασικά χαρακτηριστικά που ελέγχονται περιλαμβάνουν την **πρόσληψη** (*uptake*), την **απορρόφηση** (*absorption*), την **κατανομή** (*distribution*), την **αποβολή** (*excretion*), καθώς και η **τοξικότητα** (*toxicity*) της ουσίας. Ο δρόμος, βέβαια, ως τον έλεγχο της φαρμακοκινητικής μίας κρυσταλλικής ουσίας είναι μακρύς, εφόσον πρέπει να πραγματοποιούνται εκτεταμένες κρυσταλλογραφικές μελέτες που εξετάζουν την δομή της. Συγκεκριμένα ως προς την ινσουλίνη, με το πέρασμα των ετών έχουν συγκεντρωθεί πληθώρα πολυμόρφων που προέρχονται είτε από την κρυστάλλωσή της, είτε από την συγκρυστάλλωσή της με διαφορετικούς προσδέτες, σε ένα εύρος συνθηκών και διαφορετικών μεθόδων κρυστάλλωσης. Η εργαστηριακή ομάδα Βιοχημείας, Δομικής Βιολογίας και Κρυσταλλογραφίας Ακτίνων-Χ, επί σειρά ετών συλλέγει δεδομένα για την ινσουλίνη, σε μία προσπάθεια χαρτογράφησης του πλήθους των διαφορετικών πολυμόρφων που έχουν βρεθεί.



**Εικόνα 2.5.** Διαγραμματική απεικόνιση των κρυσταλλικών φάσεων της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία προσδετών (Triantafyllidis, MSc thesis, 2021).<sup>1</sup>

<sup>1</sup> <https://sites.google.com/view/margiolaki-biology-upat/publications>

## 2.3 Επίδραση Χημικών Παραμέτρων στην Ανθρώπινη Ινσουλίνη

### 2.3.1 Υλικά και Μέθοδοι

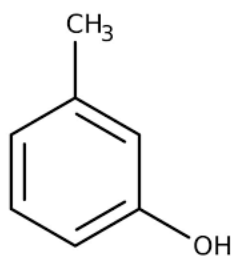
Ένα σημαντικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας επικεντρώνεται στο κρυσταλλωμένο σύμπλοκο της ανθρώπινης ινσουλίνης με τον οργανικό προσδέτη **μετα-κρεσόλη** (*meta-cresol*). Συγκεκριμένα, το συγκρυσταλλωμένο σύμπλοκο εξετάστηκε ως προς δύο φυσικοχημικές παραμέτρους, το pH και το περιβάλλον διάλυσης του προσδέτη, για τον τρόπο που επιδρούν στον μοριακό και κρυσταλλικό πολυμορφισμό του.

### 2.3.2 Ο προσδέτης μετα-κρεσόλη

Η χρήση των προσδετών είναι στο επίκεντρο των κρυσταλλογραφικών πειραμάτων, γιατί η λειτουργική τους αξία συμπεριλαμβανομένης της αντιμικροβιακής και αντιοξειδωτικής δράσης, την επαγωγή της σταθερότερης εκ των διαμορφώσεων της ινσουλίνης ( $R_6$ ) και την μεταβολή του ισοηλεκτρικού σημείου προς το ουδέτερο pH μειώνοντας την διαλυτότητα. Συγκεκριμένα για την ινσουλίνη και την χρήση φαινολικών παραγώγων για την δημιουργία συμπλόκων, είναι γνωστό από εκτεταμένες μελέτες πως επάγουν την δημιουργία κρυστάλλων που φέρουν την σταθερότερη εκ των μοριακών διαμορφώσεων, την διαμόρφωση R (Dunn, 2005).

Οι κρεσόλες είναι ένα σύνολο ισομερών οργανικών ενώσεων, οι οποίες ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των φαινολών, δηλαδή φέρουν έναν αρωματικό δακτύλιο. Η προέλευσή τους είναι από επεξεργασία πετρελαίου ή λιθάνθρακα. Επιπροσθέτως, χαρακτηρίζονται από έντονη μυρωδιά που προσομοιάζει αυτή της φαινόλης. Απαντώνται σε υγρή μορφή και τα διαλύματά τους είναι είτε άχρωμα, είτε εμφανίζουν μία ανοιχτή κίτρινη απόχρωση.

Είθισται να χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 0.15-0.3%, σε ενδομυϊκά, ενδοδερμικά και υποδόρια ενέσιμα φαρμακευτικά σκευάσματα για την αντιμικροβιακή τους δράση. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι ιδιαίτερος τοξική και δυνητικά επικίνδυνη αν έρθει σε επαφή με το δέρμα ή τα μάτια. Η κρεσόλη υπερτερεί της φαινόλης, καθώς σημειώνει αποτελεσματικότερη αντιμικροβιακή δράση, ενώ παράλληλα είναι λιγότερο καυστική και τοξική. Απαντάται κυρίως με τρεις στεροϊσομερικές μορφές, την ορθο-κρεσόλη (o-cresol), την παρα-κρεσόλη (p-cresol) και την μετα-κρεσόλη (m-cresol). Από τα τρία αυτά ισομερή, η μετα-κρεσόλη (Εικόνα 2.6) είναι αυτή που παρουσιάζει την λιγότερη τοξικότητα. Η διαλυτότητα της στο νερό είναι μέτρια, ενώ διαλύεται πλήρως σε αιθανόλη και σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide, DMSO).



Εικόνα 2.6. Ο οργανικός προσδέτης m-cresol.

### 2.3.3 Πειράματα κρυστάλλωσης μέσω της μεθόδου Batch

Τα πειράματα κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκαν με την χρήση λυοφιλοποιημένης ανθρώπινης ινσουλίνης, η οποία ήταν ευγενική χορηγία της Novo Nordisk στο πλαίσιο μακροχρόνιας συνεργασίας με την ερευνητική ομάδα Βιοχημείας, Δομικής Βιολογίας και Κρυσταλλογραφίας Ακτίνων-X. Πραγματοποιήθηκαν 4 σειρές κρυσταλλώσεων των οποίων η χρονική σειρά και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά παρατίθενται στον **πίνακα 2.1**, που ακολουθεί. Να σημειωθεί ότι και οι τέσσερις σειρές παρασκευάστηκαν για πειράματα συλλογής δεδομένων περίθλασης στο Ευρωπαϊκό Σύγχροτρον (ESRF), σε διαφορετικές, ωστόσο χρονικές περιόδους.

**Πίνακας 2.1.** Οι πειραματικές σειρές που εξετάστηκαν και τα χαρακτηριστικά τους.

| Σειρά   | Αριθμός Δειγμάτων | Εύρος pH  | Διαλύτης           | Ημερομηνία |
|---------|-------------------|-----------|--------------------|------------|
| Σειρά 3 | 22                | 4.20-8.20 | ddH <sub>2</sub> O | 07/06/23   |
| Σειρά 4 | 18                | 5.00-8.00 | Αιθανόλη           | 07/06/23   |
| Σειρά 5 | 20                | 4.80-8.20 | Αιθανόλη           | 19/06/25   |
| Σειρά 6 | 20                | 4.20-8.00 | DMSO               | 19/06/25   |

Οι τέσσερις σειρές εξετάστηκαν σε ένα εύρος τιμών pH και η δημιουργία των ρυθμιστικών *buffers* με μία συγκεκριμένη τιμή pH για κάθε δείγμα, να επιτυγχάνεται με την χρήση δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων ενός όξινου του NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (δι-ένυδρο φωσφορικό νάτριο) και ενός βασικού του K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (φωσφορικό κάλιο), με αρχική συγκέντρωση 2M.

Την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων (*buffers*) με τις συγκεκριμένες τιμές pH για την εκάστοτε συνθήκη, ακολουθεί η δημιουργία του *stock* διαλύματος ινσουλίνης. Λυοφυλοποιημένη ινσουλίνη διαλύεται σε δις-απεσταγμένο νερό (*double distilled water*, ddH<sub>2</sub>O) υπό ελαφριά ανάδευση, με τακτική επανατοποθέτηση στον παγό, έως ότου η πρωτεΐνη διαλυθεί και το διάλυμα διαυγάσει πλήρως. Στην συνέχεια, στο ίδιο διάλυμα προστίθενται με την σειρά, δι-ένυδρος οξικός ψευδάργυρος (*zinc acetate*, ZnAc<sub>2</sub>), ο προσδότης m-cresol και μετά το πέρας 5 λεπτών και θειακυανιούχο νάτριο (NaSCN). Το ZnAc<sub>2</sub> παρέχει στο διάλυμα τα ιόντα ψευδαργύρου που είναι αναγκαία για τον σχηματισμό των εξαμερών της ινσουλίνης. Τα πέντε λεπτά επώασης, αμέσως μετά την προσθήκη του προσδέτη, αποσκοπούν στο να δοθεί επαρκής χρόνος για την δημιουργία των εξαμερών και την πρόσδεση του προσδέτη. Τέλος, με προσθήκη του θειακυανιούχου νατρίου, απελευθερώνονται ιόντα SCN<sup>-</sup> στο διάλυμα, τα οποία συμβάλλουν στην σταθεροποίηση των β-αλυσιδών. Το τελικό διάλυμα αποτελεί το *protein-ligand mix*.

Παρακάτω, παρατίθεται ένας συνοπτικός συγκεντρωτικός πίνακας των διαλυμάτων πρωτεΐνης (protein mixes) με χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια, τους απαιτούμενους όγκους, καθώς και τις αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις για κάθε σειρά.

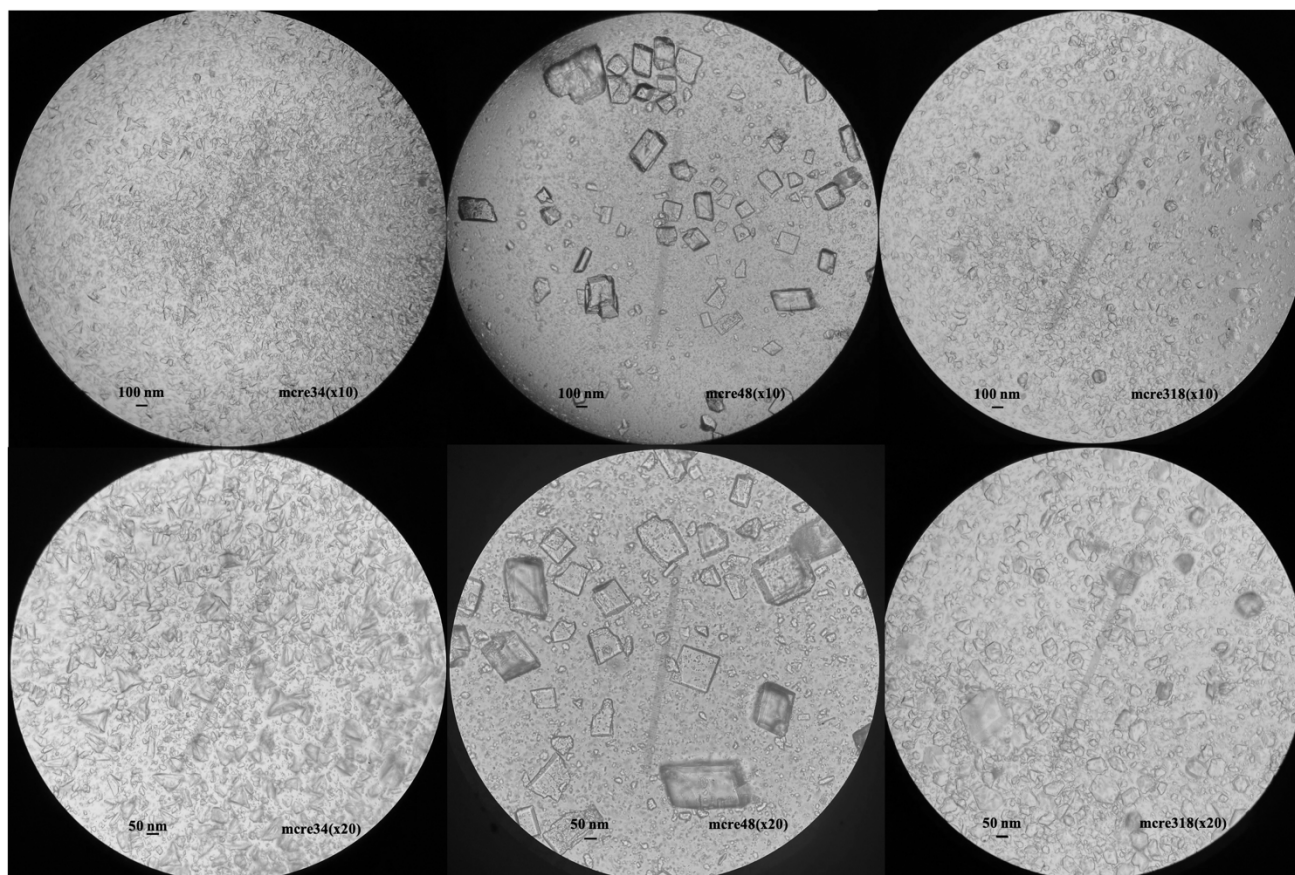
**Πίνακας 2.2.** Τα protein-ligand mixes για κάθε σειρά.

| Σειρά 3: Protein mix  |              |                    |                               | $V_{(\text{τελικό})} = 13.0856 \text{ ml}$ |                   |
|-----------------------|--------------|--------------------|-------------------------------|--------------------------------------------|-------------------|
|                       | HI           | ZnAc <sub>2</sub>  | m-cresol (ddH <sub>2</sub> O) |                                            | NaSCN             |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις | 19 mg/ml     | 10 mM              | 1 M                           | Επώαση 5'                                  | 1 M               |
| Αρχικός όγκος         | 11 ml        | 1265 $\mu\text{l}$ | 655.6 $\mu\text{l}$           |                                            | 165 $\mu\text{l}$ |
| Τελικές συγκεντρώσεις | 15.97 mg/ml  | 0.967 mM           | 50 mM                         |                                            | 12.6 mM           |
| Σειρά 4: Protein mix  |              |                    |                               | $V_{(\text{τελικό})} = 10.9214 \text{ ml}$ |                   |
|                       | HI           | ZnAc <sub>2</sub>  | m-cresol (ethanol)            |                                            | NaSCN             |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις | 17.037 mg/ml | 1.216 mM           | 2.39 mM                       | Επώαση 5'                                  | 1M                |
| Αρχικός όγκος         | 10.5 ml      |                    | 281.4 $\mu\text{l}$           |                                            | 140 $\mu\text{l}$ |
| Τελικές συγκεντρώσεις | 16.37 mg/ml  | 0.99 mM            | 61.58 mM                      |                                            | 12.82 mM          |
| Σειρά 5: Protein mix  |              |                    |                               | $V_{(\text{τελικό})} = 11 \text{ ml}$      |                   |
|                       | HI           | ZnAc <sub>2</sub>  | m-cresol (ethanol)            |                                            | NaSCN             |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις | 19 mg/ml     | 10 mM              | 2.39 M                        | Επώαση 5'                                  | 1 M               |
| Αρχικός όγκος         | 9.48 ml      | 1089 $\mu\text{l}$ | 283 $\mu\text{l}$             |                                            | 141 $\mu\text{l}$ |
| Τελικές συγκεντρώσεις | 16.37 mg/ml  | 0.99 mM            | 61.58 mM                      |                                            | 12.82 mM          |
| Σειρά 6: Protein mix  |              |                    |                               | $V_{(\text{τελικό})} = 10.5 \text{ ml}$    |                   |
|                       | HI           | ZnAc <sub>2</sub>  | m-cresol (DMSO)               |                                            | NaSCN             |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις | 19 mg/ml     | 10 mM              | 2.39 M                        | Επώαση 5'                                  | 1 M               |
| Αρχικός όγκος         | 9.05 ml      | 1040 $\mu\text{l}$ | 271 $\mu\text{l}$             |                                            | 135 $\mu\text{l}$ |
| Τελικές συγκεντρώσεις | 16.37 mg/ml  | 0.99 mM            | 61.58 mM                      |                                            | 12.82 mM          |

Για την δημιουργία του εκάστοτε διαλύματος κρυστάλλωσης, με σκοπό την δημιουργία των πολυκρυσταλλικών δειγμάτων αναμείχθηκαν 0.5 ml του protein mix με 0.125 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών σε ένα σωληνάκι τύπου Eppendorf των 1.5 ml. Οι τελικές συγκεντρώσεις του εκάστοτε δείγματος για κάθε σειρά παρατίθενται στον ακόλουθο **πίνακα 2.3**.

**Πίνακας 2.3.** Τα διαλύματα κρυστάλλωσης για κάθε σειρά.

| Σειρά 3: Crystallization mix |             |                   |                               |          | $V_{(\text{τελικό})} = 0.625 \text{ ml}$ |
|------------------------------|-------------|-------------------|-------------------------------|----------|------------------------------------------|
|                              | HI          | ZnAc <sub>2</sub> | m-cresol (ddH <sub>2</sub> O) | NaSCN    | PO <sub>4</sub> buffer                   |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις        | 15.97 mg/ml | 0.967 mM          | 50 mM                         | 12.6 mM  | 2M                                       |
| Αρχικός όγκος                |             |                   | 0.5 ml                        |          | 0.125 ml                                 |
| Τελικές συγκεντρώσεις        | 12.77 mg/ml | 0.078 mM          | 40 mM                         | 10.1 mM  | 0.4 M                                    |
| Σειρά 4: Crystallization mix |             |                   |                               |          | $V_{(\text{τελικό})} = 0.625 \text{ ml}$ |
|                              | HI          | ZnAc <sub>2</sub> | m-cresol (ethanol)            | NaSCN    | PO <sub>4</sub> buffer                   |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις        | 16.37 mg/ml | 0.99 mM           | 61.58 mM                      | 12.82 mM | 2M                                       |
| Αρχικός όγκος                |             |                   | 0.5 ml                        |          | 0.125 ml                                 |
| Τελικές συγκεντρώσεις        | 13.10 mg/ml | 0.792 mM          | 49.26 mM                      | 10.26 mM | 0.4 M                                    |
| Σειρά 5: Crystallization mix |             |                   |                               |          | $V_{(\text{τελικό})} = 0.625 \text{ ml}$ |
|                              | HI          | ZnAc <sub>2</sub> | m-cresol (ethanol)            | NaSCN    | PO <sub>4</sub> buffer                   |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις        | 16.37 mg/ml | 0.99 mM           | 61.58 mM                      | 12.82 mM | 2M                                       |
| Αρχικός όγκος                |             |                   | 0.5 ml                        |          | 0.125 ml                                 |
| Τελικές συγκεντρώσεις        | 13.10 mg/ml | 0.792 mM          | 49.26 mM                      | 10.26 mM | 0.4 M                                    |
| Σειρά 6: Crystallization mix |             |                   |                               |          | $V_{(\text{τελικό})} = 0.625 \text{ ml}$ |
|                              | HI          | ZnAc <sub>2</sub> | m-cresol (DMSO)               | NaSCN    | PO <sub>4</sub> buffer                   |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις        | 16.37 mg/ml | 0.99 mM           | 61.58 mM                      | 12.82 mM | 2M                                       |
| Αρχικός όγκος                |             |                   | 0.5 ml                        |          | 0.125 ml                                 |
| Τελικές συγκεντρώσεις        | 13.10 mg/ml | 0.792 mM          | 49.26 mM                      | 10.26 mM | 0.4 M                                    |



**Εικόνα 2.7.** Μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων mcre34 ( $pH_{final}$  5.39), mcre48 ( $pH_{final}$  6.93) και mcre318 ( $pH_{final}$  7.43) σε εστίαση αρχικά (x10) (πάνω) και στην συνέχεια (x20) (κάτω).

### 2.3.4 Πειράματα κρυστάλλωσης μέσω της μεθόδου διάχυσης ατμών

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν, επιπλέον, 2 πειράματα κρυστάλλωσης με την εφαρμογή της μεθόδου της καθήμενης σταγόνας, που υπάγεται στην ευρύτερη κατηγορία της μεθόδου κρυστάλλωσης με διάχυση ατμών, με σκοπό την παραγωγή, αυτή τη φορά μονοκρυστάλλων. Η πρώτη κρυστάλλωση πραγματοποιήθηκε στις 17/05/2024 και η δεύτερη στις 29/04/2025.

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων αυτών χρησιμοποιήθηκαν (2×96)-well plate, τα οποία ουσιαστικά αποτελούνται από 96 δεξαμενές που σε κάθε μία δεξαμενή (*reservoir*) αντιστοιχούν 2 σταγόνες (*drops*). Από το μεγάλο εύρος συνθηκών που εξετάστηκαν σε κάθε πειραματική διαδικασία, στην παρούσα εργασία αναφέρονται μόνο οι συνθήκες που σχετίζονται με τον προσδότη m-cresol. Κάθε συνθήκη που εξετάστηκε ακολουθούσε ένα συγκεκριμένο μοτίβο μεταβολών ανά εννέα δεξαμενές. Να σημειωθεί ότι σε σχέση με την εφαρμογή προηγούμενων πρωτοκόλλων που ακολουθούνταν στο εργαστήριο, τα δύο ξεχωριστά πειράματα διέφεραν ως προς το ότι στην δεξαμενή προστέθηκε και προσδότης. Στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε στις 17/05/2024 εξετάστηκαν 6 συνθήκες, οι τρεις πρώτες αξιοποιούσαν m-cresol διαλυμένη σε ddH<sub>2</sub>O για τις τιμές pH (5.40, 6.60, 7.80), ενώ οι υπόλοιπες τρεις ελέγχθηκαν στις ίδιες τιμές pH αλλά με την m-cresol διαλυμένη σε αιθανόλη. Ακολούθως, για το πείραμα που έλαβε χώρα στις 29/04/25 εξετάστηκαν 4 συνθήκες, συγκεκριμένα δύο τιμές pH (5.40, 7.80) για δύο περιβάλλοντα διάλυσης της m-cresol, στην πρώτη περίπτωση με διαλύτη αιθανόλη και στην δεύτερη με διαλύτη το DMSO.



| Αύξηση της $[ZnAc_2]$                                         |                                                               |                                                               | Αύξηση της $[PO_4^-]$ |
|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 0.3 M $PO_4^-$<br>1 mM $ZnAc_2$<br>9 mM NaSCN<br>25 mM ligand | 0.3 M $PO_4^-$<br>2 mM $ZnAc_2$<br>9 mM NaSCN<br>25 mM ligand | 0.3 M $PO_4^-$<br>3 mM $ZnAc_2$<br>9 mM NaSCN<br>25 mM ligand |                       |
| 0.4 M $PO_4^-$<br>1 mM $ZnAc_2$<br>9 mM NaSCN<br>25 mM ligand | 0.4 M $PO_4^-$<br>2 mM $ZnAc_2$<br>9 mM NaSCN<br>25 mM ligand | 0.4 M $PO_4^-$<br>3 mM $ZnAc_2$<br>9 mM NaSCN<br>25 mM ligand |                       |
| 0.5 M $PO_4^-$<br>1 mM $ZnAc_2$<br>9 mM NaSCN<br>25 mM ligand | 0.5 M $PO_4^-$<br>2 mM $ZnAc_2$<br>9 mM NaSCN<br>25 mM ligand | 0.5 M $PO_4^-$<br>3 mM $ZnAc_2$<br>9 mM NaSCN<br>25 mM ligand |                       |

Εικόνα 2.8. Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής των παραγόντων καθίζησης σε ένα σύνολο εννέα δεξαμενών (1 συνθήκη).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως κάθε συνθήκη αξιοποιεί 9 διαφορετικές θέσεις στο *plate* και σχετίζεται με μία καθορισμένη τιμή pH. Κάθε θέση φέρει μία **δεξαμενή** (*reservoir*) και δύο **σταγόνες** (*drops*), ενώ χαρακτηρίζεται από ένα κεφαλαίο γράμμα και έναν αριθμό, τα οποία αναγράφονται και στο *plate*. Κατά την διεξαγωγή του πειράματος, τοποθετήθηκαν στη δεξαμενή 80 λ master mix. Το master mix, είναι ουσιαστικά εκείνο που καθορίζει τις διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφορικών ( $PO_4^-$ ) και ακετικού οξέος ( $ZnAc_2$ ), με το θειοκυανιούχο νάτριο (NaSCN) να διατηρεί σε όλη την συνθήκη την ίδια συγκέντρωση 9 mM, όπως επίσης και η m-cresol με συγκέντρωση 25mM. Η συγκέντρωση του  $ZnAc_2$  μεταβάλλεται στον οριζόντιο άξονα με βήμα 1 mM, ενώ η συγκέντρωση του ( $PO_4^-$ ) μεταβάλλεται στον κάθετο άξονα με βήμα 0.1 M, όπως παρουσιάζεται και στην ανωτέρω εικόνα 2.8. Επιπροσθέτως, η δημιουργία των ρυθμιστικών *buffers* με μία συγκεκριμένη τιμή pH για κάθε δείγμα, επετεύχθη με την ανάμειξη δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων του  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  (δι-ένυδρο φωσφορικό νάτριο) και του  $K_2HPO_4$  (φωσφορικό κάλιο), με αρχική συγκέντρωση 2M.

Εν συνεχεία, ακολουθεί η παρασκευή του **διαλύματος της πρωτεΐνης** (*protein mix*). Για την παραγωγή του θεωρείται δεδομένη η συγκέντρωση της ανθρώπινης ινσουλίνης ίση με 12.6 mg/ml ή εναλλακτικά 2.17 mM. Επιπροσθέτως, είναι γνωστοί και οι λόγοι των συστατικών του *protein mix* και έχουν ως εξής:

$$\frac{[HI]}{[ZnAc_2]} = 2.2, \quad \frac{[Ligand]}{[ZnAc_2]} = 52, \quad \frac{[NaSCN]}{[ZnAc_2]} = 13$$

**Πίνακας 2.4.** Πίνακας των protein mixes για κάθε συνθήκη.

| 17/05/2024 Protein mix (pH 5.40, 6.60, 7.80) |                     |                    |                               | $V_{(\text{τελικό})} = 100 \mu\text{l}$ |                    |
|----------------------------------------------|---------------------|--------------------|-------------------------------|-----------------------------------------|--------------------|
|                                              | HI                  | ZnAc <sub>2</sub>  | m-cresol (ddH <sub>2</sub> O) | Επώαση 5'                               | NaSCN              |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις                        | 3.27 mM             | 10 mM              | 1 M                           |                                         | 1 M                |
| Αρχικός όγκος                                | 66.36 $\mu\text{l}$ | 9.86 $\mu\text{l}$ | 5.13 $\mu\text{l}$            |                                         | 1.28 $\mu\text{l}$ |
| Τελικές συγκεντρώσεις                        | 2.17 mM             | 0.98 mM            | 51.27 mM                      |                                         | 12.82 mM           |
| 17/05/24 Protein mix (pH 5.40, 6.60, 7.80)   |                     |                    |                               | $V_{(\text{τελικό})} = 100 \mu\text{l}$ |                    |
|                                              | HI                  | ZnAc <sub>2</sub>  | m-cresol (ethanol)            | Επώαση 5'                               | NaSCN              |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις                        | 3.27 mM             | 10 mM              | 1 M                           |                                         | 1 M                |
| Αρχικός όγκος                                | 66.36 $\mu\text{l}$ | 9.86 $\mu\text{l}$ | 5.13 $\mu\text{l}$            |                                         | 140 $\mu\text{l}$  |
| Τελικές συγκεντρώσεις                        | 2.17 mM             | 0.98 mM            | 51.27 mM                      |                                         | 12.82 mM           |
| 29/04/2025 Protein mix (pH 5.40, 7.80)       |                     |                    |                               | $V_{(\text{τελικό})} = 100 \mu\text{l}$ |                    |
|                                              | HI                  | ZnAc <sub>2</sub>  | m-cresol (DMSO)               | Επώαση 5'                               | NaSCN              |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις                        | 3.27 mM             | 10 mM              | 2.39 M                        |                                         | 1 M                |
| Αρχικός όγκος                                | 66.36 $\mu\text{l}$ | 9.86 $\mu\text{l}$ | 4.29 $\mu\text{l}$            |                                         | 1.28 $\mu\text{l}$ |
| Τελικές συγκεντρώσεις                        | 2.17 mM             | 0.98 mM            | 102.54 mM                     |                                         | 12.82 mM           |
| 29/04/25 Protein mix (pH 5.40, 7.80)         |                     |                    |                               | $V_{(\text{τελικό})} = 100 \mu\text{l}$ |                    |
|                                              | HI                  | ZnAc <sub>2</sub>  | m-cresol (ethanol)            | Επώαση 5'                               | NaSCN              |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις                        | 3.27 mM             | 10 mM              | 2.39 M                        |                                         | 1 M                |
| Αρχικός όγκος                                | 66.36 $\mu\text{l}$ | 9.86 $\mu\text{l}$ | 4.29 $\mu\text{l}$            |                                         | 140 $\mu\text{l}$  |
| Τελικές συγκεντρώσεις                        | 2.17 mM             | 0.98 mM            | 102.54 mM                     |                                         | 12.82 mM           |

Σε κάθε σταγόνα (*drop*) αναμείχθηκαν 1  $\lambda$  από το *protein mix* και 1 $\lambda$  από την δεξαμενή με το *master mix*. Στο τέλος, το plate καλύφθηκε με ειδική κρυσταλλογραφική ταινία και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας δύο ημερών, παρατηρούνταν τακτικά σε στερεοσκόπιο με κλίμακα ώστε να υπάρχει μέτρο σύγκρισης με παράλληλη καταγραφή των παρατηρήσεων.

### 2.3.5 Συλλογή δεδομένων περίθλασης από πολυκρυσταλλικά δείγματα

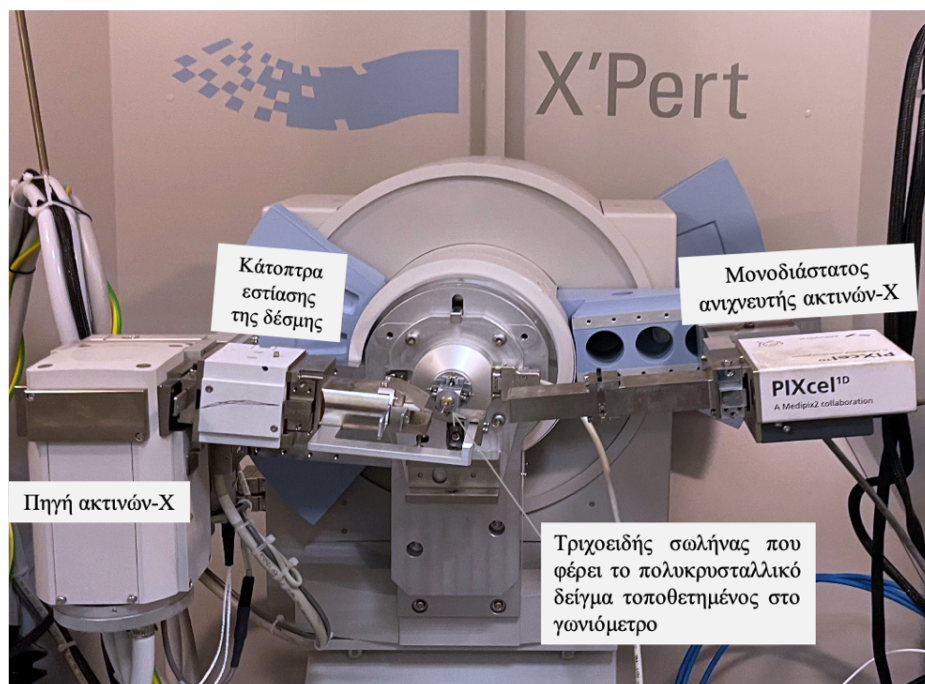
Η επιτυχής δημιουργία κρυστάλλων ακολουθείται από την εύρεση του κατάλληλου δειγματοφορέα που θα επιτρέψει το κρυσταλλικό ίζημα να τοποθετηθεί εντός της μονοχρωματικής δέσμης και να ληφθούν τα βέλτιστα δεδομένα περίθλασης. Για την πραγματοποίηση πειραμάτων περίθλασης ακτίνων-Χ σε πολυκρυσταλλικά δείγματα, χρησιμοποιούνται ειδικοί **τριχοειδείς σωλήνες από βοριοπυριτικό γυαλί** (*borosilicate glass capillary*). Αυτό το είδος τριχοειδούς σωλήνα περιέχει τριοξείδιο του βορίου ( $B_2O_3$ ), το οποίο αποτελεί και το βασικότερο συστατικό που προσδίδει θερμική αντοχή στο υλικό. Ακόμη, περιλαμβάνει και άλλα συστατικά, όπως ανθρακικό νάτριο ( $NaCO_3$ ), silica ( $SiO_2$ ) και alumina ( $Al_2O_3$ ). Αυτά προσδίδουν στους τριχοειδείς αυτούς σωλήνες δύο ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, δηλαδή χαμηλό συντελεστή θερμικής διαστολής και χαμηλό συντελεστή απορρόφησης, που ακολουθούνται από ορισμένα πλεονεκτήματα. Αφενός, το borosilicate glass capillary δύναται να αντέξει χωρίς να καταστρέφεται από τις υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύσσονται κατά την αλληλεπίδραση με τις ακτίνες-Χ. Αφετέρου, οι συγκεκριμένοι τριχοειδείς σωλήνες δεν επηρεάζουν σημαντικά τα δεδομένα περίθλασης, ελαχιστοποιώντας τον θόρυβο που αποδίδεται στο υπόβαθρο του περιθλασιγράμματος.

Οι τριχοειδείς σωλήνες που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή πειραμάτων τόσο στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο όσο και στο Ευρωπαϊκό Σύγχροτρον έφεραν τα εξής χαρακτηριστικά 1mm διάμετρο και 0.1mm πάχος, με το ένα άκρο να είναι κλειστό και το άλλο άκρο ανοιχτό και την διάμετρο του να ανοίγει προοδευτικά προς τα πάνω, ώστε να διευκολύνεται η μεταφορά του δείγματος. Η διαδικασία μεταφοράς του δείγματος στο *borosilicate glass capillary* χρήζει ιδιαίτερης μεταχείρισης, καθώς το τελευταίο είναι εξαιρετικά εύθραυστο και καθίσταται εύκολο να σπάσει. Να σημειωθεί, πως πριν την έναρξη της διαδικασίας τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε ειδική μικροφυγόκεντρο για 2 λεπτά στις 3000 στροφές, με σκοπό να πακτωθεί το ίζημα στο κατώτατο τμήμα του Eppendorf και να είναι ευκολότερη η μετέπειτα συλλογή του.

Αμέσως μετά την φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο διάλυμα που αποτελεί το **μητρικό υγρό** (*mother liquor*) μεταφέρθηκε με αποστειρωμένη σύριγγα εντός του borosilicate glass capillary και συμπληρώθηκε με υγρό έως το σημείο ακριβώς που αρχίζει το τμήμα με την μεγαλύτερη διάμετρο του ανοιχτού άκρου. Λόγω τριχοειδικών φαινομένων που αναπτύσσονται στο εσωτερικό του τριχοειδούς σωλήνα, απαιτήθηκαν μικρά επαναλαμβανόμενα «τινάγματα» με το χέρι, ώστε να πληρωθούν τα κενά που δημιουργεί ο αέρας εντός του σωλήνα. Η αξία του μητρικού υγρού έγκειται στο γεγονός πως αποτελεί το περιβάλλον ανάπτυξης και διατήρησης των κρυστάλλων. Χωρίς την παρουσία μητρικού υγρού, οι κρύσταλλοι θα αφυδατωθούν και θα καταρρεύσουν. Έπειτα από την πλήρωση του τριχοειδούς με μητρικό υγρό, ακολούθησε η μεταφορά του κρυσταλλικού ιζήματος. Το ίζημα μεταφέρθηκε με την χρήση πιπέτας (0.5-10λ), σε μικρές ποσότητες κάθε φορά. Μετά από κάθε «πιπετάρισμα», ακολουθούσαν μικρά, επαναλαμβανόμενα τινάγματα, ώστε να καθιζάνει ταχύτερα το ίζημα και μετά την συμπλήρωση τουλάχιστον 50λ ιζήματος, ο τριχοειδής σωλήνας υποβαλλόταν σε φυγοκέντρηση, με σκοπό να επιτευχθεί το βέλτιστο πάκτωμα των κρυστάλλων.

Αφού πληρωθεί ο τριχοειδής σωλήνας έως και τα 3/5 του με κρυσταλλικό ίζημα, κόβεται από την πλευρά που βρίσκεται το ανοιχτό άκρο του ελάχιστα υψηλότερα της μέσης. Ακολουθώντας με μία σύριγγα αφαιρείται το μητρικό υγρό, αφήνοντας το ίζημα να καλύπτεται οριακά από υγρό, με στόχο να εξασφαλιστεί πως κατά την διάρκεια της μέτρησης δεν θα αφυδατωθούν οι κρύσταλλοι. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την **σφράγιση με σιλικόνη** (*silicon vacuum grease*) του ανοιχτού άκρου του σωλήνα, τόσο για την αποφυγή επιμολύνσεων, όσο και για την επιτυχή τοποθέτηση του δειγματοφορέα στο γωνιόμετρο και την συγκράτηση αυτού στην θέση τοποθέτησής του. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την τοποθέτηση του γωνιομέτρου με το δείγμα στο περιθλασίμετρο και την ευθυγράμμιση του δείγματος. Η **ευθυγράμμιση** (*alignment*) είναι ένα εξαιρετικά σημαντικό σημείο στην διαδικασία, εφόσον φέρει το δείγμα ακριβώς στο κέντρο της δέσμης των ακτίνων-Χ. Στόχος

είναι καθώς περιστρέφεται το γωνιόμετρο να παρατηρεί ο χρήστης την ίδια, όσο το δυνατόν αμετάβλητη, εικόνα.



**Εικόνα 2.9.** Διάταξη του εργαστηριακού περιθλασιμέτρου σε capillary mode στο Βιολογικό Τμήμα Πατρών. Το δείγμα τοποθετείται σε capillary, το οποίο περιστρέφεται κατά την διάρκεια των μετρήσεων για να τυχαιοποιηθεί ο προσανατολισμός των μικροκρυστάλλων και να εξασφαλιστεί ακριβής συλλογή δεδομένων περίθλασης.

### 2.3.6 European Synchrotron Radiation Facility-ESRF (Beamline: ID22)

Ένα σημαντικό μέρος των πειραμάτων περίθλασης της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν στο Ευρωπαϊκό Σύγχροτρον και συγκεκριμένα στον πειραματικό σταθμό (beamline) ID22, ο οποίος προσφέρεται για την πραγματοποίηση πειραμάτων σε πολυκρυσταλλικά δείγματα, υψηλής ευκρίνειας. Ιδίως μετά την 2<sup>η</sup> φάση αναβάθμισης του ESRF και την αντικατάσταση του δακτυλίου αποθήκευσης από ένα δακτύλιο χαμηλής εκπομπής το 2019, ξεκίνησε η εποχή της “*Extremely Bright Source*” (EBS). Ο δακτύλιος σχεδιάστηκε ειδικά, ώστε να μειωθεί η οριζόντια εκπομπή από 4nm σε 134pm, αυξάνοντας σημαντικά την **λαμπρότητα** (brightness) της παραγόμενης ακτινοβολίας και την **ροή των φωτονίων** (photon flux).

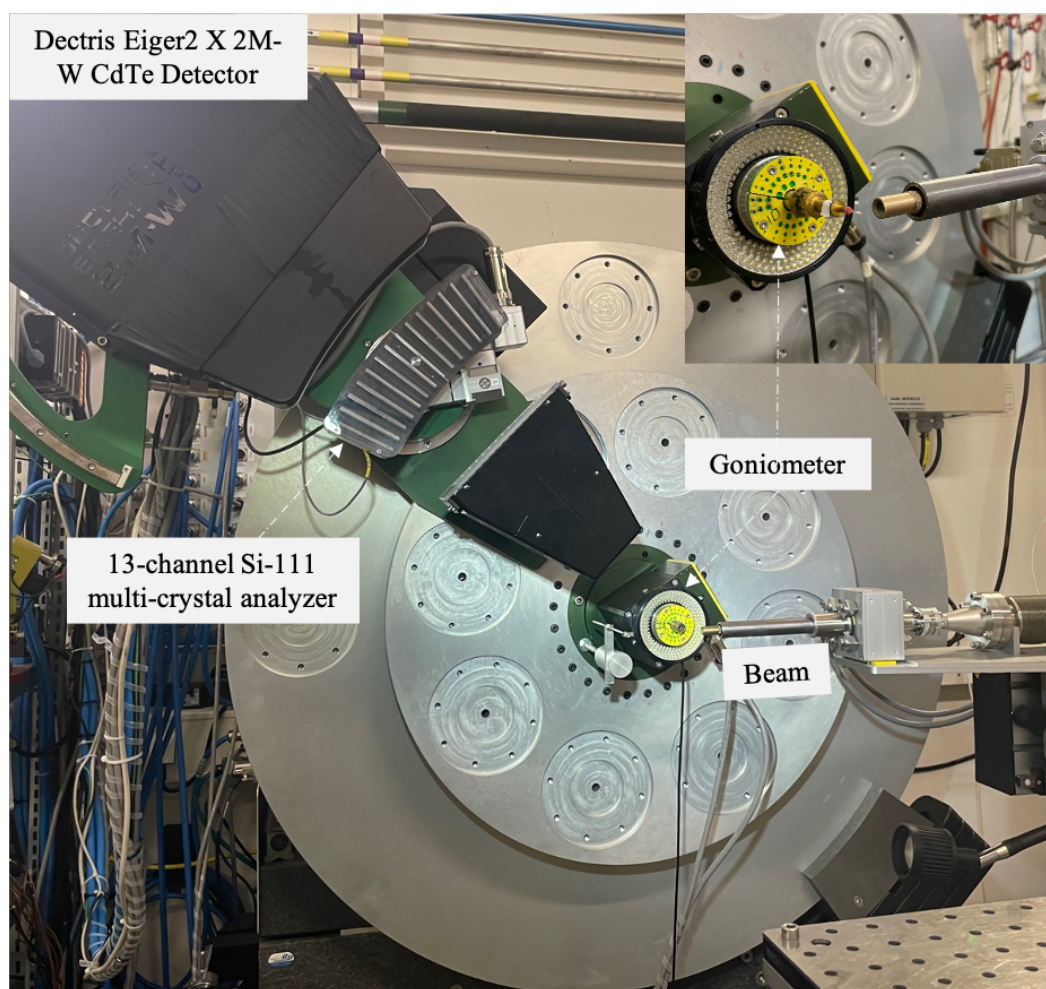
Σχετικά με τα αναβαθμισμένα χαρακτηριστικά του πειραματικού σταθμού ID22 που ακολούθησαν την δεύτερη φάση αναβάθμισης του ESRF. Αρχικά, να τονιστεί πως διαθέτει έναν ταλαντωτή σε συνθήκες κενού (*in-vacuum u26 undulator*), ο οποίος καθιστά εφικτή την παραγωγή ακτίνων-X σε ένα εύρος 6-75 keV, με την δέσμη της ακτινοβολίας να είναι εξαιρετικά παράλληλη (*highly collimated*). Η επιλογή του μήκους κύματος και η αποτελεσματική μονοχρωματικότητα της δέσμης της ακτινοβολίας επιτυγχάνεται με την χρήση ενός ψυχόμενου καναλιού Si 111 κρυσταλλικού μονοχρωμάτορα, προσφέροντας **υψηλή γωνιακή ευκρίνεια** (*high angular resolution*). Η ποιότητα των συλλεχθέντων δεδομένων αυξάνεται σημαντικά, καθώς μεταξύ του δείγματος και του ανιχνευτή είναι τοποθετημένο ένας **πολύ-αναλυτής 13 καναλιών κρυστάλλων Si 111** (*13-channel Si 111 multi-analyzer*). Οι 13 κρυσταλλικοί αναλυτές είναι τοποθετημένοι μεταξύ του ταχέως περιστρεφόμενου δείγματος και του ανιχνευτή.

Η χρησιμότητα του κρυσταλλικού αναλυτή των 13 καναλιών κρυστάλλων Si 111, έγκειται στο γεγονός ότι αξιοποιούνται κρύσταλλοι ευθυγραμμισμένοι ως προς το κρυσταλλογραφικό επίπεδο (111), εξαναγκάζοντας την περιθλούσα ακτινοβολία να υποστεί εκ νέου περίθλαση, για φωτόνια που προσπίπτουν στους κρυστάλλους με γωνία που ικανοποιεί τον νόμο Bragg. Η δεύτερη περίθλαση που



υπόκεινται τα φωτόνια από τον κρύσταλλο καθορίζει την ακριβή γωνία  $2\theta$  που θα καταγραφεί από τον ανιχνευτή, επιτρέποντας μεγαλύτερη ακρίβεια στην ανίχνευση της θέσης, υπερβαίνοντας ζητήματα, όπως είναι μικρές αποκλίσεις από σφάλμα κατά την ευθυγράμμιση του δείγματος ή από την διάμετρο του τριχοειδούς σωλήνα.

Οι ακτίνες που περιθλώνται από τους κρυσταλλικούς αναλυτές, στην συνέχεια συλλέγονται από τον ανιχνευτή εικονοστοιχείων δύο διαστάσεων Eiger (Detris Eiger2 X 2M-W CdTe pixel detector). Πρόκειται για ένα εξελιγμένο σύστημα καταγραφής σήματος με 13 ζώνες ενδιαφέροντος, τοποθετημένο σε έναν κινούμενο βραχίονα του περιθλασιμέτρου που καλύπτει ένα εύρος γωνιακής καταγραφής από  $-40^\circ$  έως  $140^\circ$ . Ο συνδυασμός του κρυσταλλικού αναλυτή με τον συγκεκριμένο ανιχνευτή επιτρέπει τον περιορισμό της ασυμμετρίας των κορυφών που οφείλεται σε **αξονική απόκλιση** (*axial divergence*) του ανιχνευτή. Βελτιώνει σημαντικά το σχήμα των κορυφών, ώστε να είναι πιο συμμετρικές, μειώνοντας παράλληλα το εύρος τους, δεδομένου ότι επιτρέπει την καταγραφή κάθε φωτονίου ανεξάρτητα (counting mode), ενώ καταγράφει και το συνολικό φορτίο από όλα τα φωτόνια (integrating mode). Σε μικρές γωνίες  $2\theta$ , οι Debye-Scherrer κώνοι έχουν μεγαλύτερη καμπυλότητα, αν δεν υπήρχε, λοιπόν, υψηλή **αξονική ευκρίνεια** (*axial resolution*) στον ανιχνευτή, θα απέδιδε τελικά διευρυμένες και ασύμμετρες κορυφές. Οι εκτεταμένες αναβαθμίσεις στην οργάνολογία και στους αλγόριθμους, αποδίδουν τελικά περιθλασιγράμματα με οξείες συμμετρικές κορυφές και στις ακριβείς τους γωνίες  $2\theta$ , αποτρέποντας την αλληλοεπικάλυψη κορυφών, που είναι πρόσκομμα στην προσπάθεια επίλυσης πρωτεϊνικών δομών από πολυκρυσταλλικά δείγματα.



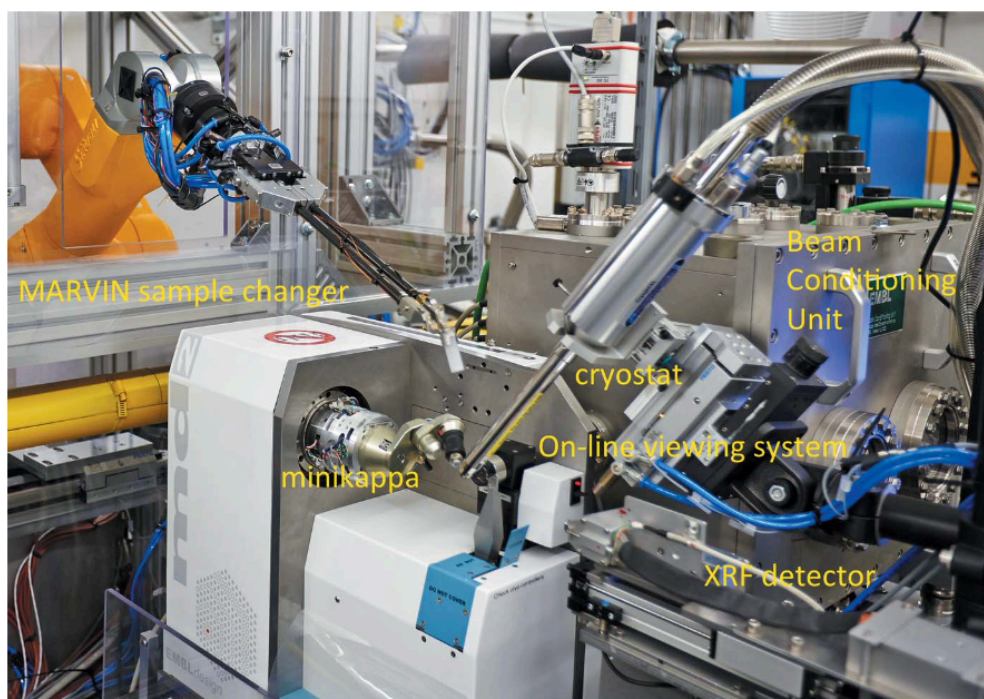
Εικόνα 2.10. Η διάταξη του περιθλασιμέτρου στον πειραματικό σταθμό ID22 του Ευρωπαϊκού Σύγχροτρον (ESRF).

### 2.3.7 Συλλογή δεδομένων περίθλασης από μονοκρυστάλλους

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα που αφορούσαν μονοκρυστάλλους, οι οποίοι συλλέχθηκαν σε ειδικές θηλιές loops, επώαστηκαν για 10' σε κρυοπροστατευτικό υγρό, ψυχθήκαν σε υγρό άζωτο και στάλθηκαν εντός ειδικού κρυογονικού **θερμομονωτικού δοχείου (dewar)** στο προγραμματισμένο για συλλογή δεδομένων περίθλασης πειραματικό σταθμό. Για το πρώτο πείραμα που πραγματοποιήθηκε το 2024 η συλλογή δεδομένων περίθλασης από μονοκρυστάλλους πραγματοποιήθηκε στο γερμανικό σύγχροτρον DESY, ενώ για το δεύτερο κατά σειρά πείραμα (2025) τα δεδομένα περίθλασης συλλέχθηκαν στον πειραματικό σταθμό ID23-2 του ESRF.

#### Deutsches Elektronen Synchrotron-DESY (Beamline: P13)

Το γερμανικό σύγχροτρον DESY διαθέτει τον επιταχυντή τρίτης γενιάς PETRA III, περιμέτρου 2304 m και ενέργεια λειτουργίας 6.084 GeV. Διατίθενται τρεις πειραματικοί σταθμοί αφιερωμένοι στην Δομική Βιολογία, που έχουν σχεδιαστεί και κατασκευαστεί από το EMBL του Αμβούργου και ανήκουν στην «EMBL Integrated Facility for Structural Biology». Στον τομέα 8 ο πειραματικός σταθμός P12, και στον τομέα 9 οι πειραματικοί σταθμοί P13 και P14 για μακρομοριακή κρυσταλλογραφία ακτίνων-X (macromolecular X-ray crystallography, MX). Η P13 σχεδιάστηκε ειδικά για την αντιμετώπιση προκλήσεων όσον αφορά τον προσδιορισμό απαιτητικών κρυσταλλικών δομών αξιοποιώντας τις μοναδικές ιδιότητες του PETRA III, συγκεκριμένα την **χαμηλή εκπομπή (low emittance)** ηλεκτρονίων **υψηλής ενέργειας (high energy)** (Cianci et al., 2017). Στα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου πειραματικού σταθμού περιλαμβάνονται ένα ενεργειακό εύρος ρύθμισης από 4.5 έως 17.5 keV (2.7 Å έως 0.7 Å), μία δέσμη ακτινοβολίας 30x20 μm<sup>2</sup> (με μία απόκλιση της τάξεως των 0.15 mrad) και έναν ανιχνευτή EIGER 16M (Cianci et al., 2017). Επιπροσθέτως, να σημειωθεί ότι δίνεται η δυνατότητα αυτόματης φόρτωσης των δειγμάτων στο γωνιόμετρο, καθιστώντας εφικτή την εξ αποστάσεως μέτρηση. Για την διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος η συλλογή έγινε εξ αποστάσεως, σε θερμοκρασία -173° C και με μήκος κύματος λ= 0.976300 Å.

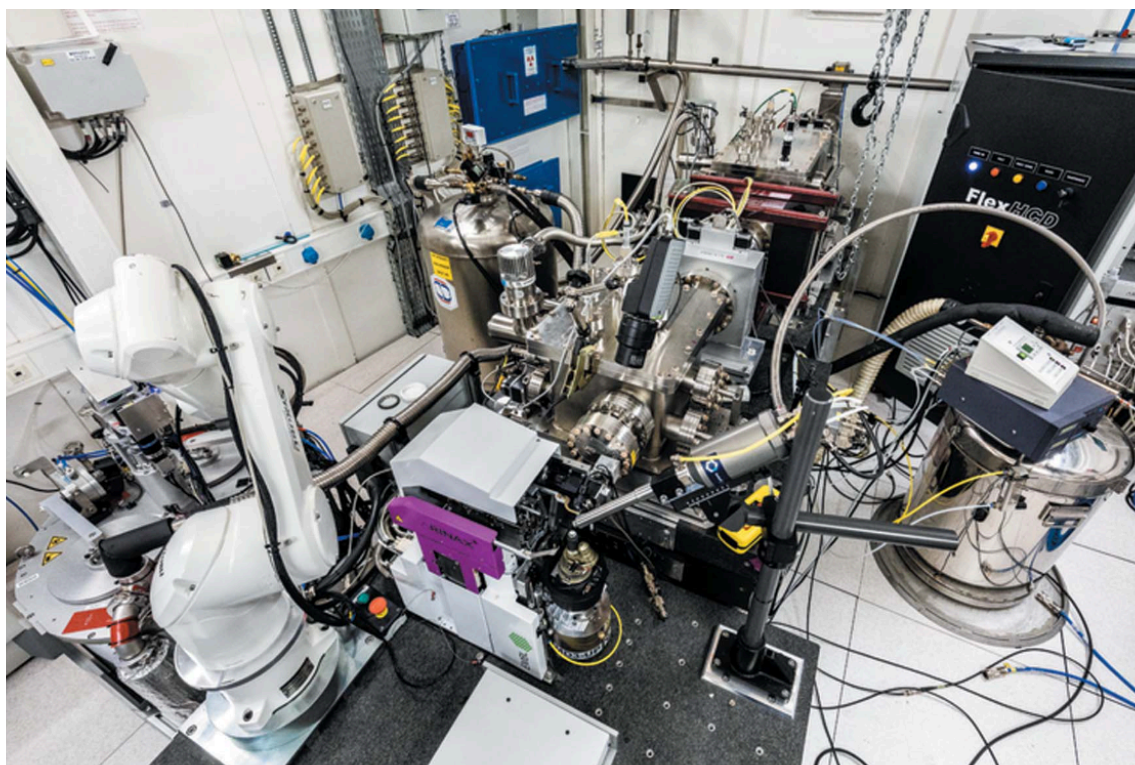


Εικόνα 2.11. Η διάταξη του περιθλασιμέτρου στον πειραματικό σταθμό P13 στο Γερμανικό Σύγχροτρον (DESY) (Cianci et al., 2017)



## European Synchrotron Radiation Facility-ESRF (Beamline: ID23-2)

Η συλλογή των δεδομένων περίθλασης για το δεύτερο πείραμα μονοκρυστάλλων πραγματοποιήθηκε στον πειραματικό σταθμό μικρο-εστίασης ID23-2. Ο συγκεκριμένος πειραματικός σταθμός είναι αφιερωμένος στην μακρομοριακή κρυσταλλογραφία και παρέχει σταθερής ενέργειας (14.2 keV) δέσμη πολύ μικρής διατομής (Nanao et al, 2022). Η εστίαση της ακτίνας με μικρή διατομή και υψηλή ενέργεια, επιτυγχάνεται με την χρήση δύο συνόλων από σύνθετους διαθλαστικούς φακούς και πολυστρωματικών κατόπτρων. Η ελάχιστη διατομή της παραγόμενης δέσμης είναι  $1 \times 2 \mu\text{m}^2$  και η μέγιστη  $8 \times 25 \mu\text{m}^2$ . Επιπροσθέτως, για την συλλογή των περιθλώμενων ακτίνων χρησιμοποιείται ο ανιχνευτής EIGER 9M (Nanao et al, 2022). Να σημειωθεί ότι και σε αυτόν τον πειραματικό σταθμό δίνεται η δυνατότητα αυτόματης φόρτωσης των δειγμάτων στο γωνιόμετρο με τη χρήση ρομπότ, καθιστώντας εφικτή την εξ αποστάσεως μέτρηση που πραγματοποιήθηκε με μήκος κύματος  $\lambda=0.87313 \text{ \AA}$ . Ο συγκεκριμένος πειραματικός σταθμός, αξίζει να διευκρινιστεί πως χρησιμοποιείται, επιπλέον και για **σειριακή σύγχροτρον κρυσταλλογραφία** (*Serial Synchrotron Crystallography, SSX*) επιτρέποντας από την συγχώνευση δεδομένων είτε από πολλούς πολύ μικρούς κρυστάλλους, είτε από διαφορετικές θέσεις ενός κρυστάλλου, για την δημιουργία νέων ολοκληρωμένων σετ δεδομένων περίθλασης.



**Εικόνα 2.12.** Η διάταξη του περιθλασιμέτρου στον πειραματικό σταθμό ID23-2 του Ευρωπαϊκού Σύγχροτρον (ESRF) (Nanao et al, 2022).

### 2.3.8 Ανάλυση δεδομένων

Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από πολυκρυσταλλικά δείγματα, ανεξαρτήτως από την προέλευση τους, από το αν προέρχονται δηλαδή από το εργαστηριακό περιθλασίμετρο ή από Σύγχροτρον αναλύθηκαν με την χρήση του κρυσταλλογραφικού υπολογιστικού πακέτου HighScore Plus της εταιρείας Marvel Panalytical. Οι ανακλάσεις συλλέγονται από τον ανιχνευτή, ο ανιχνευτής μετατρέπει το σήμα περίθλασης σε ηλεκτρικό σήμα, και ακολούθως ένα υπολογιστικό σύστημα μετατρέπει το ηλεκτρικό σήμα σε ένα διάγραμμα. Το διάγραμμα αυτό αποτελείται από τις ολοκληρωμένες εντάσεις σε αυθαίρετες μονάδες συναρτήσει της γωνίας  $2\theta$  που συλλέγει ο ανιχνευτής, και ονομάζεται **περιθλασίγραμμα** (*diffraction pattern*).

Η έναρξη της ανάλυσης έχει ως αφετηρία τον ορισμό ενός **υποβάθρου** (*background*), του άξονα, δηλαδή, αναφοράς στον οποίο θα στηριχθεί το πρόγραμμα για την αναζήτηση των κορυφών κατά την διαδικασία της δεικτοδότησης. Η **δεικτοδότηση** (*indexing*) είναι η διαδικασία αντιστοίχισης κάθε εντάσεως κορυφή με τον κατάλληλο συνδυασμό δεικτών Miller (*hkl*), επιτρέποντας τον προσδιορισμό της συμμετρίας χώρου της μοναδιαίας κυψελίδας, αποκαλύπτοντας και τις πλεγματικές σταθερές της (Cervellino, 2016). Αφού οριστεί το υπόβαθρο, τότε πραγματοποιείται μία πρώτη **αναζήτηση κορυφών** (*search peaks*) είτε αυτοματοποιημένα, και για όσες δεν βρέθηκαν αυτόματα γίνεται προσθήκη των επιπλέον κορυφών που θεωρούνται σημαντικές χειροκίνητα (*insert peaks*). Συνήθως, επιλέγονται οι 20 πρώτες κορυφές, δεδομένου ότι παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες εντάσεις, καθώς με αύξηση της γωνίας  $2\theta$  οι εντάσεις μειώνονται και υπάρχει ο κίνδυνος να μην διαχωρίζονται ορθά από τον θόρυβο, και με την χρήση αλγορίθμων αναζητούνται πιθανές πλεγματικές σταθερές της μοναδιαίας κυψελίδας. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται η **αναζήτηση μοναδιαίας κυψελίδας** (*Search Unit Cell*), και αφού επιλεγεί βάσει στατιστικών το καλύτερο αποτέλεσμα (*Figure Of Merit*, *FOM*), ακολουθεί το *Space Group Test* για την εύρεση της συμμετρίας.

Αμέσως μετά από τον ορισμό του space group, ακολουθεί η διαδικασία της βελτιστοποίησης (*refinement*). Η βελτιστοποίηση περιλαμβάνει τον υπολογισμό πληθώρας παραμέτρων που έχουν ως στόχο την ταύτιση της πειραματική γραφικής παράστασης στην θεωρητική. Η βελτιστοποίηση, αλλά και η ανάλυση, στηρίχθηκαν στην **ανάλυση Pawley** (*Pawley fit*). Σύμφωνα με αυτόν τον τύπο ανάλυσης, βελτιστοποιείται το σύνολο των παραμέτρων του κρυσταλλογραφικού πλέγματος και όχι μεμονωμένες θέσεις των κορυφών των εντάσεων. Ακόμη, τα ύψη των κορυφών αναλύονται ανεξάρτητα και ισχύει επιπλέον ότι το πλάτος, το σχήμα και η ασυμμετρία των κορυφών περιγράφονται από συγκεκριμένη συνάρτηση που καθορίζεται από την φάση του υπό ανάλυση δείγματος. Επιπροσθέτως, να αναφερθεί ότι για τις συγκεκριμένες αναλύσεις, το *profile shape function*, που επιλέγεται για τον ορισμό της εξίσωσης που θα χρησιμοποιηθεί για το fitting κάθε κορυφής, ήταν το *Pseudo Voigt*, που είναι μία συνάρτηση σχήματος από τις πιο αποτελεσματικές για την περίπτωση των ακτίνων-X, καθώς το σχήμα τους ποικίλει από Γκαουσιανή μέχρι Λορεντζιανή και, τέλος, ως **τύπος ασυμμετρίας** (*asymmetry type*) επιλέχθηκε το πρότυπο *Finger, Cox, Jephcoat*.

Η διαδικασία της βελτιστοποίησης διαρκεί, έως ότου, οι θεωρητικές εντάσεις πλησιάσουν την ταύτιση με τις πειραματικές, γεγονός που δύναται να αξιολογηθεί με ένα σύνολο στατιστικών όρων. Οι στατιστικοί αυτοί όροι στοχεύουν στην ποσοτικοποίηση των αποκλίσεων που σημειώνονται και είναι γνωστές ως R-values. Ο σημαντικότερος δείκτης είναι ο  $R_{wp}$  (*Weighted Profile R-factor*), καθώς θεωρεί σημαντικότερες τις περιοχές που εμφανίζονται εντάσεις σε σχέση με τις περιοχές που δεν εμφανίζονται εντάσεις και προκύπτει ως ακολούθως:

$$R_{wp} = \sqrt{\frac{\sum w(2\theta)[y_o(2\theta) - y_c(2\theta)]^2}{\sum w(2\theta)[y_o(2\theta)]^2}}, \text{ όπου } w(2\theta) = \frac{1}{\sigma_{y_o}^2(2\theta)}$$



Στην συνέχεια, οι πλεγματικές σταθερές και ο όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας συλλέχθηκαν από όλα τα κρυσταλλικά πολύμορφα που ταυτοποιήθηκαν, για κάθε πειραματική σειρά, και συγκεντρώθηκαν τα αποτελέσματα σε πίνακες και διαγράμματα, για την μελέτη της επίδρασης των υπο-μελέτη παραγόντων στον κρυσταλλικό πολυμορφισμό.

## 2.4 Επίδραση της Σχετικής Υγρασίας στην Ανθρώπινη Ινσουλίνη

Η μελέτη της επίδρασης της σχετικής υγρασίας στην δομή των πρωτεϊνών παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον, δεδομένου ότι το σύνηθες περιβάλλον διάλυσης και λειτουργίας τους είναι το υδατικό. Η σημασία της επίδρασης έγκειται στην αξία του νερού για τα βιομόρια, ιδίως τα αμφιπαθή, όπως οι πρωτεΐνες. Μία πρωτεΐνη, δηλαδή, διαθέτει τόσο πολικές, όσο και μη πολικές περιοχές, μία ιδιότητα που καθορίζεται από το είδος των αμινοξέων της αλληλουχίας της. Στο σημείο αυτό, να σημειωθεί πως πλην ορισμένων δισουλφιδικών ομοιοπολικών δεσμών, η τεταρτοταγής δομή των πρωτεϊνών καθορίζεται, κυρίως, από ασθενείς αλληλεπιδράσεις (ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου και δυνάμεις van der Waals) με τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και την κατανομή των μορίων νερού γύρω από τις μη πολικές περιοχές να είναι υψίστης σημασίας. Το νερό ως διαλύτης, επομένως, δύναται να συμμετάσχει ενεργά στην αναδίπλωση ή και στο ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών, να σταθεροποιήσει δομές ανώτερης τάξης αναδίπλωσης και να καθορίζει την καταλυτική τους δράση (Atakisi et al., 2018).

Ένα μεγάλο ποσοστό, αν όχι το μεγαλύτερο (30%-70%) ενός πρωτεϊνικού κρυστάλλου αποτελείται από διαλύτη, ο οποίος πληρώνει τα κενά μεταξύ των μορίων εντός της μοναδιαίας κυψελίδας, καθώς και των εσωτερικών κοιλότητων που σχηματίζουν οι πρωτεΐνες κατά την αναδίπλωση τους (Atakisi et al., 2018). Η κατανομή του διαλύτη εξαρτάται, κατά κύριο λόγο, από την αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης και της αλληλεπίδρασης της με τα αντιδραστήρια της κρυστάλλωσης που συμβάλλουν στην αναδίπλωση της, ενώ, ακόμη, η περιεκτικότητα σε διαλύτη εντός του κρυστάλλου φαίνεται να εξαρτάται άμεσα από τον παράγοντα της σχετικής υγρασίας (Relative Humidity). Για τον λόγο αυτό πραγματοποιούνται εκτεταμένες in-situ κρυσταλλογραφικές μελέτες που αφορούν την επίδραση της σχετικής υγρασίας στον κρυσταλλικό και μοριακό πολυμορφισμό. Οι μελέτες αυτές διερευνούν αν οι κύκλοι αφυδάτωσης και ενυδάτωσης, προκαλούν αλλαγές στην δομή των πρωτεϊνών (κρυσταλλικές και μοριακές διαμορφώσεις) ή αν υπάρχει βελτίωση ή επιδείνωση του σήματος περίθλασης. Επιπλέον, ένας στόχος που τίθεται είναι η εύρεση του ορίου ανθεκτικότητας των πρωτεϊνικών κρυστάλλων, καθώς και αν μετά την επανενυδάτωση των δειγμάτων αν θα επανακάμψει η κρυσταλλικότητα. Συνηθέστερα, παρατηρείται κατά την αφυδάτωση να σημειώνεται μία συστολή του πλέγματος και κατά συνέπεια μία μείωση του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας, αλλά επαναφορά αυτών κατά την ενυδάτωση (Atakisi et al., 2018).

Η συστηματική μελέτη της ανθρώπινης ινσουλίνης και συμπλόκων της συναρτήσει της μεταβλητής της σχετικής υγρασίας τίθεται στο επίκεντρο, διότι πρόκειται για μία πρωτεΐνη με ιδιαίτερο φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Αποτελέσματα που αφορούν είτε την βελτίωση κρυσταλλικών δομών, με καλύτερο «πακετάρισμα» της πρωτεΐνης σε μικρότερο όγκο, ή ακόμη και την αποκάλυψη επιπέδων υγρασίας που χάνεται η κρυσταλλικότητα, είναι πληροφορίες χρήσιμες που δύναται να αξιοποιηθούν είτε για την δημιουργία βελτιωμένων κρυσταλλικών φαρμάκων, είτε ακόμη και την αποφυγή φύλαξης ήδη υπαρχόντων κρυσταλλικών φαρμάκων σε συγκεκριμένα εύρη υγρασιών. Μία υποβάθμιση του κρυσταλλικού προϊόντος δυνητικά μπορεί να επιφέρει υποβάθμιση της ποιότητας και της δράσης του φαρμάκου. Στην παρούσα διπλωματική υγρασία, μελετήθηκαν δύο ξεχωριστά κρυσταλλικά πολύμορφα της ανθρώπινης ινσουλίνης, απουσία προσδότη, υπό την επίδραση ομαλών κύκλων αφυδάτωσης και ενυδάτωσης των δειγμάτων. Τα κύρια ερωτήματα που τέθηκαν αφορούσαν τον αν η θερμοδυναμική αυτή μεταβλητή της σχετικής υγρασίας προκαλέσει σε κάποιο από αυτά τα δύο πολύμορφα **μετάβαση φάσης** (*phase transition*) και το αν η απουσία προσδότη θα επηρεάσει την ανθεκτικότητα των κρυστάλλων.

### 2.4.1 Υλικά και Μέθοδοι

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας ιδιαίτερη σημασία δόθηκε και στην μελέτη της συμπεριφοράς την ανθρώπινης ινσουλίνης κρυσταλλωμένης απουσία προσδότη με την μεταβλητή παράμετρο της σχετικής υγρασίας. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές πειραμάτων για δυο ξεχωριστές τιμές pH (5.50, 7.00) ώστε να εξεταστούν δύο διαφορετικά πολύμορφα για πιθανές μεταβολές στον κρυσταλλικό ή στον μοριακό τους πολυμορφισμό.

### 2.4.2 Ανθρώπινη Ινσουλίνη Απουσία προσδότη

Η ανθρώπινη ινσουλίνη απουσία προσδότη σε ένα εύρος (5.00-6.50) εμφανίζεται με  $R3$  κρυσταλλικό πολυμορφισμό και  $T_6$  μοριακό πολυμορφισμό, ενώ στο εύρος (6.90-7.20) εμφανίζει και πάλι  $R3$  κρυσταλλικό πολυμορφισμό, αλλά  $T_3R_3^f$  μοριακό πολυμορφισμό. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω στο 2.1.2 από τις δύο αυτές ρομβοεδρικές μοναδιαίες κυψελίδες η σταθερότερη είναι αυτή με την μοριακή διαμόρφωση  $T_3R_3^f$ , καθώς στην περίπτωση της  $T_6$  όλες οι β-αλυσίδες παίρνουν την εκτεταμένη διαμόρφωση που εκθέτει περισσότερο τα αμινοξέα στο περιβάλλον, καθιστώντας τα επιρρεπή σε μεταβολές. Ο αρχικός προβληματισμός, επομένως, πλαισιώθηκε, στο πως τα διαφορετικά επίπεδα σχετικής υγρασίας επιδρούν αρχικά στον κρυσταλλικό πολυμορφισμό και κατά επέκταση στον μοριακό.

### 2.4.3 Πειράματα κρυστάλλωσης με την μέθοδο Batch

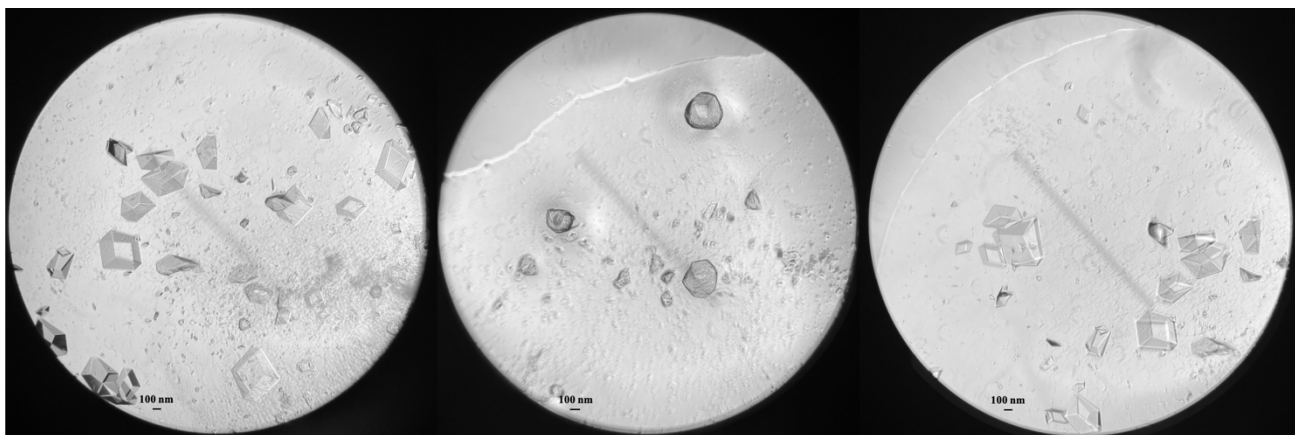
Τα πειράματα κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκαν με την χρήση λυοφιλοποιημένης ανθρώπινης ινσουλίνης, η οποία ήταν ευγενική χορηγία της Novo Nordisk στο πλαίσιο μακροχρόνιας συνεργασίας με την ερευνητική ομάδα Βιοχημείας, Δομικής Βιολογίας και Κρυσταλλογραφίας Ακτίνων-X. Πραγματοποιήθηκαν τέσσερα πειράματα κρυστάλλωσης, για δύο τιμές pH (5.50 και 7.00), όπου τα αρχικά πειράματα επαναλήφθηκαν, με σκοπό την επιβεβαίωση της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Η χρονική σειρά και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά εκάστου πειράματος παρατίθενται στον **πίνακα 2.5** που ακολουθεί. Να σημειωθεί ότι και οι τέσσερις σειρές παρασκευάστηκαν για πειράματα συλλογής δεδομένων περίθλασης στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο, στον εξειδικευμένο θάλαμο θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας. Για την εξασφάλιση αρκετής ποσότητας για την πλήρη κάλυψη με κρυσταλλικό ίζημα ειδικού δειγματοφορέα δημιουργήθηκαν 7 δείγματα της ίδιας συνθήκης για κάθε σειρά.

**Πίνακας 2.5.** Οι πειραματικές σειρές που εξετάστηκαν και τα χαρακτηριστικά τους.

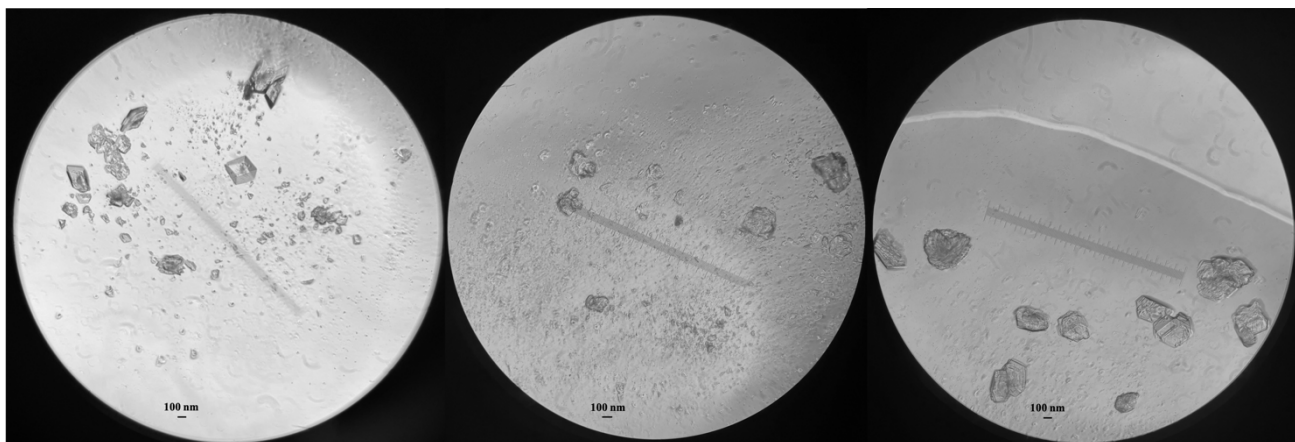
| Σειρά                | Τιμή pH <sub>(initial)</sub> | Τιμή pH <sub>(final)</sub> | Ημερομηνία |
|----------------------|------------------------------|----------------------------|------------|
| Σειρά A <sub>1</sub> | 5.50                         | 6.03                       | 13/06/24   |
| Σειρά A <sub>2</sub> | 5.50                         | 6.07                       | 12/07/24   |
| Σειρά A <sub>1</sub> | 7.00                         | 6.92                       | 03/07/24   |
| Σειρά A <sub>2</sub> | 7.00                         | 6.94                       | 25/10/24   |

Οι τέσσερις σειρές εξετάστηκαν σε διαφορετικά επίπεδα σχετικής υγρασίας και η δημιουργία των ρυθμιστικών *buffers* με την συγκεκριμένη τιμή pH που έχει οριστεί για τα δείγματα κάθε σειράς, πραγματοποιήθηκε με την χρήση δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων ενός όξινου του  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (δι-ένυδρο φωσφορικό νάτριο) και ενός βασικού του  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (φωσφορικό κάλιο), με αρχική συγκέντρωση 2M.

Την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων με τις συγκεκριμένες τιμές pH για την εκάστοτε συνθήκη, ακολουθεί η δημιουργία του *stock* διαλύματος ινσουλίνης. Λυοφιλοποιημένη ινσουλίνη διαλύεται σε δις-απεσταγμένο νερό (*double distilled water*, ddH<sub>2</sub>O) υπό ελαφριά ανάδευση, με τακτική επανατοποθέτηση στον πάγο, έως ότου η πρωτεΐνη διαλυθεί και το διάλυμα διαυγάσει πλήρως. Στην συνέχεια, στο ίδιο διάλυμα προστίθενται με την σειρά, δι-ένυδρος οξικός ψευδάργυρος (zinc acetate, ZnAc<sub>2</sub>), και μετά το πέρας 5 λεπτών και θειακυανιούχο νάτριο (NaSCN). Το ZnAc<sub>2</sub> παρέχει στο διάλυμα τα ιόντα ψευδαργύρου που είναι αναγκαία για τον σχηματισμό των εξαμερών της ινσουλίνης. Τα πέντε λεπτά επώσης αποσκοπούν στο να δοθεί επαρκής χρόνος για την δημιουργία των εξαμερών. Τέλος, με προσθήκη του θειακυανιούχου νατρίου, απελευθερώνονται ιόντα SCN<sup>-</sup> στο διάλυμα, τα οποία συμβάλλουν στην σταθεροποίηση των β-αλυσιδών. Το τελικό διάλυμα αποτελεί το *protein-ligand mix*.



**Εικόνα 2.13.** Μικροσκοπική παρατήρηση των κρυστάλλων ανθρώπινης ινσουλίνης απουσία προσδέτη σε pH 5.50.



**Εικόνα 2.14.** Μικροσκοπική παρατήρηση των κρυστάλλων ανθρώπινης ινσουλίνης απουσία προσδέτη σε pH 7.00.

### 2.4.3.1 Κρυστάλλωση Ανθρώπινης Ινσουλίνης απουσία προσδέτη σε αρχικό pH 5.50

Παρακάτω, παρατίθεται ένας συνοπτικός συγκεντρωτικός πίνακας των διαλυμάτων πρωτεΐνης (protein mixes) με χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια, τους απαιτούμενους όγκους, καθώς και τις αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις για κάθε σειρά.

**Πίνακας 2.6.** Τα αντιδραστήρια των διαλυμάτων πρωτεΐνης και οι αναλογίες τους για κάθε σειρά.

| Σειρά A <sub>1</sub> : Protein mix |             |                   |                    | V <sub>(τελικό)</sub> = 4.1636 ml |
|------------------------------------|-------------|-------------------|--------------------|-----------------------------------|
|                                    | HI          | ZnAc <sub>2</sub> | ddH <sub>2</sub> O | NaSCN                             |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις              | 19 mg/ml    | 10 mM             | 208.6 μl           | 1 M                               |
| Αρχικός όγκος                      | 3.5 ml      | 402.5 μl          |                    | 52.5 μl                           |
| Τελικές συγκεντρώσεις              | 15.97 mg/ml | 0.967 mM          |                    | 12.6 mM                           |
| Σειρά A <sub>2</sub> : Protein mix |             |                   |                    | V <sub>(τελικό)</sub> = 4.1636 ml |
|                                    | HI          | ZnAc <sub>2</sub> | ddH <sub>2</sub> O | NaSCN                             |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις              | 19 mg/ml    | 10 mM             | 208.6 μl           | 1 M                               |
| Αρχικός όγκος                      | 3.5 ml      | 402.5 μl          |                    | 52.5 μl                           |
| Τελικές συγκεντρώσεις              | 15.97 mg/ml | 0.967 mM          |                    | 12.6 mM                           |

Για την δημιουργία του εκάστοτε διαλύματος κρυστάλλωσης, με σκοπό την δημιουργία των πολυκρυσταλλικών δειγμάτων αναμείχθηκαν 0.5 ml του protein mix με 0.125 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών σε ένα σωληνάκι τύπου Eppendorf των 1.5 ml. Οι τελικές συγκεντρώσεις του εκάστοτε δείγματος για κάθε σειρά παρατίθενται στον ακόλουθο **πίνακα 2.7**.

**Πίνακας 2.7.** Τα διαλύματα κρυστάλλωσης για κάθε σειρά.

| Σειρά A1: Crystallization mix |             |                   |          | $V_{(τελικό)} = 0.625 \text{ ml}$ |
|-------------------------------|-------------|-------------------|----------|-----------------------------------|
|                               | HI          | ZnAc <sub>2</sub> | NaSCN    | PO <sub>4</sub> buffer            |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις         | 15.97 mg/ml | 0.967 mM          | 12.6 mM  | 2M                                |
| Αρχικός όγκος                 |             | 0.5 ml            |          | 0.125 ml                          |
| Τελικές συγκεντρώσεις         | 12.77 mg/ml | 0.078 mM          | 10.1 mM  | 0.4 M                             |
| Σειρά A2: Crystallization mix |             |                   |          | $V_{(τελικό)} = 0.625 \text{ ml}$ |
|                               | HI          | ZnAc <sub>2</sub> | NaSCN    | PO <sub>4</sub> buffer            |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις         | 16.37 mg/ml | 0.99 mM           | 12.82 mM | 2M                                |
| Αρχικός όγκος                 |             | 0.5 ml            |          | 0.125 ml                          |
| Τελικές συγκεντρώσεις         | 13.10 mg/ml | 0.792 mM          | 10.26 mM | 0.4 M                             |

### 2.4.3.2 Κρυστάλλωση Ανθρώπινης Ινσουλίνης απουσία προσδέτη σε αρχικό pH 7.00

Παρακάτω, παρατίθεται ένας συνοπτικός συγκεντρωτικός πίνακας των διαλυμάτων πρωτεΐνης (protein mixes) με χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια, τους απαιτούμενους όγκους, καθώς και τις αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις για κάθε σειρά.

**Πίνακας 2.8.** Τα αντιδραστήρια των διαλυμάτων πρωτεΐνης και οι αναλογίες τους για κάθε σειρά.

| Σειρά A <sub>1</sub> : Protein mix |             |                   |                    | V <sub>(τελικό)</sub> = 4.1636 ml |
|------------------------------------|-------------|-------------------|--------------------|-----------------------------------|
|                                    | HI          | ZnAc <sub>2</sub> | ddH <sub>2</sub> O | NaSCN                             |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις              | 19 mg/ml    | 10 mM             | 208.6 μl           | 1 M                               |
| Αρχικός όγκος                      | 3.5 ml      | 402.5 μl          |                    | 52.5 μl                           |
| Τελικές συγκεντρώσεις              | 15.97 mg/ml | 0.967 mM          |                    | 12.6 mM                           |
| Σειρά A <sub>2</sub> : Protein mix |             |                   |                    | V <sub>(τελικό)</sub> = 4.1636 ml |
|                                    | HI          | ZnAc <sub>2</sub> | ddH <sub>2</sub> O | NaSCN                             |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις              | 19 mg/ml    | 10 mM             | 208.6 μl           | 1 M                               |
| Αρχικός όγκος                      | 3.5 ml      | 402.5 μl          |                    | 52.5 μl                           |
| Τελικές συγκεντρώσεις              | 15.97 mg/ml | 0.967 mM          |                    | 12.6 mM                           |

Για την δημιουργία του εκάστοτε διαλύματος κρυστάλλωσης, με σκοπό την δημιουργία των πολυκρυσταλλικών δειγμάτων αναμείχθηκαν 0.5 ml του protein mix με 0.125 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών σε ένα σωληνάκι τύπου Eppendorf των 1.5 ml. Οι τελικές συγκεντρώσεις του εκάστοτε δείγματος για κάθε σειρά παρατίθενται στον ακόλουθο **πίνακα 2.9**.

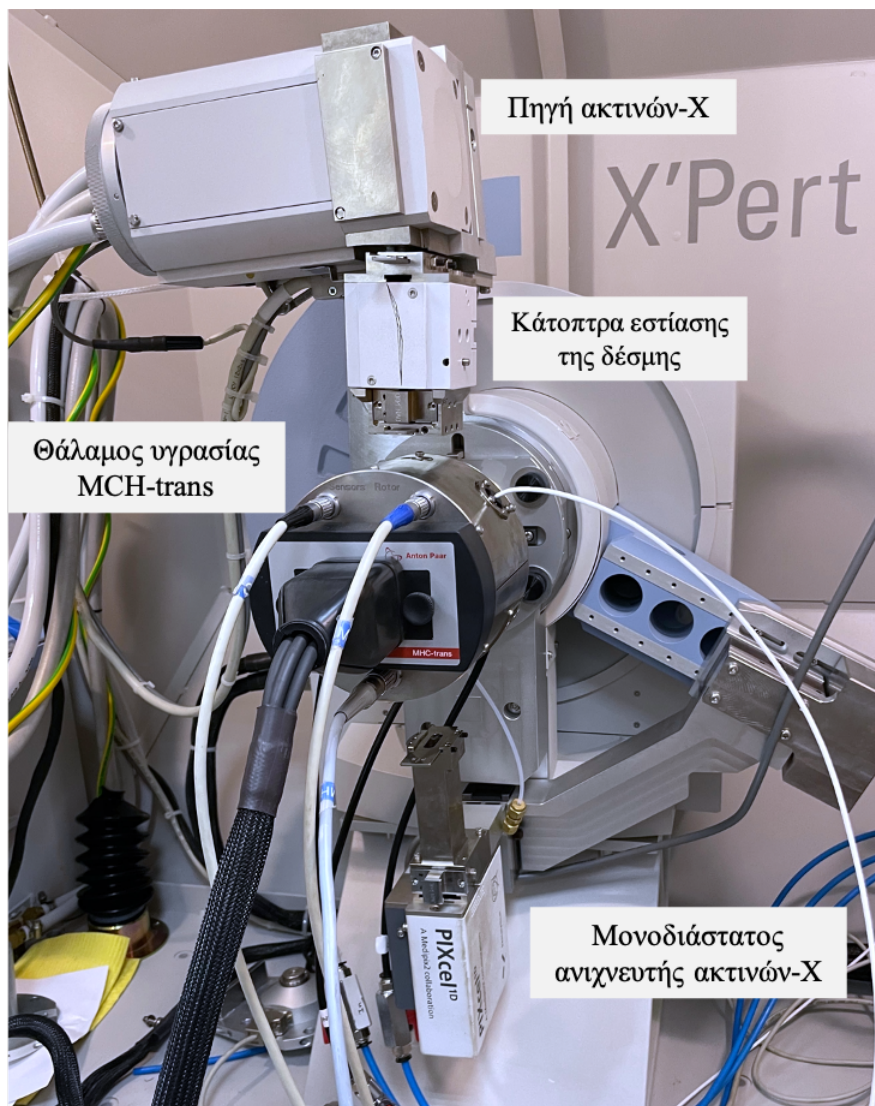
**Πίνακας 2.9.** Τα διαλύματα κρυστάλλωσης για κάθε σειρά.

| Σειρά A1: Crystallization mix |             |                   |          | $V_{(τελικό)} = 0.625 \text{ ml}$ |
|-------------------------------|-------------|-------------------|----------|-----------------------------------|
|                               | HI          | ZnAc <sub>2</sub> | NaSCN    | PO <sub>4</sub> buffer            |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις         | 15.97 mg/ml | 0.967 mM          | 12.6 mM  | 2M                                |
| Αρχικός όγκος                 |             | 0.5 ml            |          | 0.125 ml                          |
| Τελικές συγκεντρώσεις         | 12.77 mg/ml | 0.078 mM          | 10.1 mM  | 0.4 M                             |
| Σειρά A2: Crystallization mix |             |                   |          | $V_{(τελικό)} = 0.625 \text{ ml}$ |
|                               | HI          | ZnAc <sub>2</sub> | NaSCN    | PO <sub>4</sub> buffer            |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις         | 16.37 mg/ml | 0.99 mM           | 12.82 mM | 2M                                |
| Αρχικός όγκος                 |             | 0.5 ml            |          | 0.125 ml                          |
| Τελικές συγκεντρώσεις         | 13.10 mg/ml | 0.792 mM          | 10.26 mM | 0.4 M                             |



#### 2.4.4 Πειράματα περίθλασης ακτίνων-X

Οι *in-situ* κρυσταλλογραφικές μετρήσεις μεταβαλλόμενης σχετικής υγρασίας πραγματοποιήθηκαν στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο (*X'Pert Pro, Malvern Panalytical*). Το εργαστηριακό περιθλασίμετρο του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Πατρών είναι εφικτό να λάβει δύο διαφορετικές διατάξεις, την διάταξη που δέχεται *capillaries* (*capillary spinner stage*) και την διάταξη που φέρει τον θάλαμο ελεγχόμενης μεταβολής τόσο της θερμοκρασίας όσο και της υγρασίας (*MHC-trans humidity chamber*) της εταιρείας Anton Paar. Το συγκεκριμένο περιθλασίμετρο παράγει ακτινοβολία  $K_{\alpha}$  του χαλκού ( $CuK_{\alpha}$ ) με μήκος κύματος  $\lambda = 1.540585 (3) \text{ \AA}$ . Τα κύρια μέρη της οργάνωσης, δηλαδή η πηγή ακτίνων-X, τα ειδικά κάτοπτρα εστίασης της δέσμης, ο δειγματοφορέας και ο ανιχνευτής (*PIXcel<sup>1D</sup>*), απαντώνται σε γεωμετρική διάταξη *Debye-Scherrer*.



Εικόνα 2.15. Η διάταξη του εργαστηριακού περιθλασιμέτρου με τον θάλαμο υγρασίας MHC-trans.

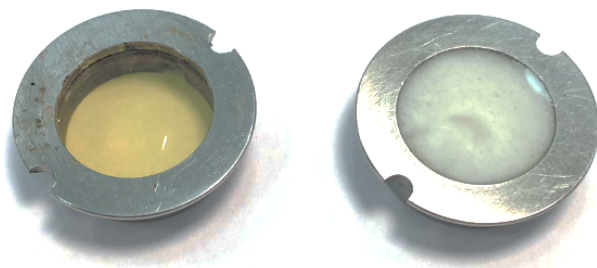
Πριν από την έναρξη ενός *in-situ* κρυσταλλογραφικού πειράματος στον θάλαμο υγρασίας είναι απαραίτητη η επιβεβαίωση πως το κρυσταλλικό δείγμα φέρει την επιθυμητή συμμετρία. Για τον λόγο αυτό, ένα εκ των επτά δειγμάτων που παρασκευάζονται αξιοποιείται για μέτρηση σε διάταξη *capillary spinner*. Σε αυτή την περίπτωση το κρυσταλλικό δείγμα μεταφέρεται στον ειδικό τριχοειδή σωλήνα από βοριοπυριτικό γυαλί διαμέτρου 1.0 mm, με αφαίρεση της μεγαλύτερης ποσότητας του μητρικού υγρού, ακολούθως σφραγίζεται με silicon grease και τοποθετείται στο γωνιόμετρο. Αφού

ευθυγραμμιστεί το κρυσταλλικό ίζημα εντός της δέσμης της ακτινοβολίας, ακολουθεί η μέτρηση του δείγματος.

Η μέτρηση κάθε δείγματος ως προς την διάρκεια λήψης του κάθε scan, ο χρόνος μεταξύ των διαδοχικών λήψεων, καθώς και ο αριθμός των scans, είναι παράμετροι που καθορίζονται με βάση την λήψη ενός πρώτου γρήγορου scan που αποκαλύπτει την ποιότητα των δεδομένων. Να τονιστεί, επιπροσθέτως, πως λόγω της χαμηλής λαμπρότητας των ακτίνων-X που παράγονται από τους σωλήνες ακτίνων-X, το δείγμα είναι εφικτό να μετρηθεί για ώρες, καθώς η βλάβη λόγω ακτινοβολίας (*radiation damage*) ήταν μικρότερη. Τα scans που προέκυπταν, αθροίζονται σε ένα dataset με αυτοματοποιημένες υπολογιστικές μεθόδους. Το τελικό dataset που προκύπτει αναλύεται, με ανάλυση κατά Pawley, ακολουθώντας τα βήματα που αναφέρθηκαν στο 2.3.6 και από την στιγμή που το αποτέλεσμα της ανάλυσης επικυρώνει την ύπαρξη του επιθυμητού κρυσταλλικού πολυμόρφου, ακολουθεί η αλλαγή του stage του περιθλασιμέτρου, ώστε να ακολουθήσει η *in-situ* συλλογή δεδομένων XRPD υπό μεταβαλλόμενη σχετική υγρασία.

Το εργαστηριακό περιθλασίμετρο δύναται να προσαρμοστεί με ορισμένους μηχανικούς χειρισμούς σε humidity mode. Σε αυτή την περίπτωση, η προετοιμασία του δείγματος είναι διαφορετική, εφόσον το capillary spinner δίνει τη θέση του στον θάλαμο υγρασίας MCH-trans (*Multi-sample Humidity Chamber*), ο οποίος επιτρέπει την ελεγχόμενη μεταβολή τόσο της υγρασίας όσο και της θερμοκρασίας, δεδομένου ότι διαθέτει και μία επιπλέον μονάδα ελέγχου της θερμοκρασίας (*TCU 60M Control Unit*). Τα εύρη των υγρασιών που μπορεί να διαχειριστεί ο θάλαμος είναι πάντοτε εξαρτώμενα από την ορισθείσα θερμοκρασία και για το εύρος θερμοκρασιών (20°C- 60°C), το αποδεκτό εύρος διακύμανσης των σχετικών υγρασιών είναι 5%-95%. Εντός του θαλάμου υπάρχει μία ροδέλα που φέρει 8 θέσεις για τους ειδικούς δειγματοφορείς.

Για την διάταξη αυτή χρησιμοποιείται άλλος τύπο δειγματοφορέα, συγκεκριμένα σε ένα μεταλλικό **δακτύλιο τοποθέτησης πολυμερούς** (*kapton holder*) τοποθετείται το κρυσταλλικό υλικό σε ειδικό φύλλο από **πολυμερές πολυαμίδιο** (*kapton foil*), το οποίο είναι ανθεκτικό στην ακτινοβολία ενώ, παράλληλα, δεν συνεισφέρει στο υπόβαθρο. Για να επιτευχθεί το βέλτιστο πάκτωμα των κρυστάλλων, τα δοχεία τύπου Erppendorf φυγοκεντρούνται στις 2000 rpm για 5 λεπτά. Με πιπέτα μεταφέρεται το κρυσταλλικό ίζημα στην επιφάνεια του foil μέχρι την πλήρη κάλυψη του και το holder με το δείγμα μεταφέρονται σε μία από τις 8 θέσεις του ρότορα (*sample changer*), ενώ αμέσως μετά το κλείσιμο των θυρών, εκκινείτε το πρόγραμμα συλλογής δεδομένων για το ορισθέντα επίπεδα υγρασίας. Με την ολοκλήρωση του προγράμματος ακολουθεί σύγκριση ένα προς ένα το scans για κάθε επίπεδο υγρασίας και όσα ομοιάζουν ως προς θέση και ένταση συνενώνονται με merge σε ένα dataset. Στην συνέχεια το dataset που δημιουργήθηκε τίθεται προς ανάλυση κατά Pawley.



**Εικόνα 2.16.** Δειγματοφορέας Kapton holder, με άδειο foil (αριστερά) και φορτωμένο με δείγμα HEWL (δεξιά) (Logotheti et al., 2019).

#### 2.4.4.1 *In situ* συλλογή XRPD δεδομένων υπό μεταβαλλόμενη σχετική υγρασία σε πολυκρυσταλλικά δείγματα της ανθρώπινης ινσουλίνης, απουσία προσδότη με αρχικό pH 5.50

Για την διερεύνηση της επιρροής που ασκεί η μεταβολή της σχετικής υγρασίας στο κρυσταλλικό πολυμόρφου  $R3$  με μοριακή διαμόρφωση  $T_6$  που εμφανίζεται σε αρχικό pH 5.50, μελετήθηκε με δύο σειρές πειραμάτων (Σειρές  $A_1$  και  $A_2$ ). Η ορισθείσα θερμοκρασία για την διεξαγωγή της μελέτης των σχετικών υγρασιών ήταν οι 21°C, η θερμοκρασία δωματίου. Κάθε σειρά αποτελούνταν από 2 κύκλους ομαλής μεταβολής της σχετικής υγρασίας με επίπεδο εκκίνηση το 95%, με την αφυδάτωση να ακολουθείται από την ενυδάτωση, τα χαρακτηριστικά των οποίων παρατίθενται στον **πίνακα 2.10**.

**Πίνακας 2.10.** Τα χαρακτηριστικά των κύκλων μεταβολής της σχετικής υγρασίας για κάθε σειρά pH<sub>(initial)</sub>=5.50.

| Σειρά $A_1$            | Αφυδάτωση | Ενυδάτωση | Βήμα RH% | Χρόνος Αναμονής | Scans/RH level |
|------------------------|-----------|-----------|----------|-----------------|----------------|
| 1 <sup>ος</sup> Κύκλος | 95% → 75% | 75% → 95% | 5%       | 60 minutes      | 10             |
| 2 <sup>ος</sup> Κύκλος | 95% → 75% | 75% → 95% | 5%       | 60 minutes      | 8              |
| Σειρά $A_2$            | Αφυδάτωση | Ενυδάτωση | Βήμα RH% | Χρόνος Αναμονής | Scans/RH level |
| 1 <sup>ος</sup> Κύκλος | 95% → 75% | 75% → 95% | 5%       | 60 minutes      | 8              |
| 2 <sup>ος</sup> Κύκλος | 95% → 75% | 75% → 95% | 5%       | 60 minutes      | 8              |

Τα scans που συλλέχθηκαν από κάθε επίπεδο σχετικής υγρασίας συγκρίθηκαν ένα προς ένα μεταξύ τους είτε με Overplot στο υπολογιστικό πακέτο HighScore Plus, είτε μέσω του προγράμματος WinPlotR, και όσα είχαν την ίδια ποιότητα εντάσεων συνδυάστηκαν (merge) σε ένα μοναδικό dataset, αντιπροσωπευτικό για το επίπεδο υγρασίας από το οποίο συλλέχθηκαν. Για το συγκεκριμένο πείραμα η ανάλυση όπως περιεγράφηκε στο υποκεφάλαιο 2.3.8, ήταν εφικτή μόνο για την μέτρηση από το *capillary*, καθώς η συγκεκριμένη μοριακή διαμόρφωση φανερώθηκε πως δεν διατηρεί την κρυσταλλικότητα της κάτω από το επίπεδο 80% RH, ενώ από τις εντάσεις που υπήρχαν στα επίπεδα σχετικής υγρασίας 95%, 90% και 85% δεν ήταν ικανοποιητικές, ώστε να είναι εφικτή η ταυτοποίηση του κρυσταλλικού πολυμόρφου.

#### 2.4.4.2 Συλλογή XRPD δεδομένων υπό μεταβαλλόμενη σχετική υγρασία σε πολυκρυσταλλικά δείγματα της ανθρώπινης ινσουλίνης, απουσία προσδότη με αρχικό pH 7.00

Η επίδραση της σχετικής υγρασίας, μελετήθηκε σε ένα ακόμα ρομβοεδρικό κρυσταλλικό πολυμόρφο  $R3$ , αυτή τη φορά με μοριακή διαμόρφωση  $T_3R_3^f$ , που εμφανίζεται σε αρχικό pH 7.00, με δύο σειρές πειραμάτων (Σειρές  $A_1$  και  $A_2$ ). Η ορισθείσα θερμοκρασία για την διεξαγωγή της μελέτης των σχετικών υγρασιών ήταν οι 21°C, η θερμοκρασία δωματίου. Κάθε σειρά αποτελούνταν από 4 κύκλους ομαλής μεταβολής της σχετικής υγρασίας με επίπεδο εκκίνηση το 95%, με την αφυδάτωση να ακολουθείται από την ενυδάτωση, τα χαρακτηριστικά των οποίων παρατίθενται στον **πίνακα 2.11**.



**Πίνακας 2.11.** Τα χαρακτηριστικά των κύκλων μεταβολής της σχετικής υγρασίας για κάθε σειρά  $pH_{(initial)}=7.00$ .

| Σειρά A <sub>1</sub>   | Αφυδάτωση | Ενυδάτωση | Βήμα RH% | Χρόνος Αναμονής | Scans/RH level |
|------------------------|-----------|-----------|----------|-----------------|----------------|
| 1 <sup>ος</sup> Κύκλος | 95% → 75% | 75% → 95% | 5%       | 60 minutes      | 8              |
| 2 <sup>ος</sup> Κύκλος | 95% → 75% | 75% → 95% | 5%       | 60 minutes      | 8              |
| 3 <sup>ος</sup> Κύκλος | 95% → 75% | 75% → 95% | 5%       | 60 minutes      | 8              |
| 4 <sup>ος</sup> Κύκλος | 95% → 50% | 50% → 95% | 5%, 10%  | 60 minutes      | 6              |
| Σειρά A <sub>2</sub>   | Αφυδάτωση | Ενυδάτωση | Βήμα RH% | Χρόνος Αναμονής | Scans/RH level |
| 1 <sup>ος</sup> Κύκλος | 95% → 75% | 75% → 95% | 5%       | 60 minutes      | 8              |
| 2 <sup>ος</sup> Κύκλος | 95% → 75% | 75% → 95% | 5%       | 60 minutes      | 8              |
| 3 <sup>ος</sup> Κύκλος | 95% → 75% | 75% → 95% | 5%       | 60 minutes      | 8              |
| 4 <sup>ος</sup> Κύκλος | 95% → 50% | 50% → 95% | 5%, 10%  | 60 minutes      | 6              |

Τα scans που συλλέχθηκαν από κάθε επίπεδο σχετικής υγρασίας συγκρίθηκαν ένα προς ένα μεταξύ τους είτε με Overplot στο υπολογιστικό πακέτο HighScore Plus είτε μέσω της εφαρμογής WinPlotR, και όσα είχαν την ίδια ποιότητα εντάσεων συνδυάστηκαν (*merge*) σε ένα μοναδικό dataset, αντιπροσωπευτικό για το επίπεδο υγρασίας από το οποίο συλλέχθηκαν. Ακολούθησε η ανάλυση κατά Pawley, όπως περιεγράφηκε στο υποκεφάλαιο 2.3.8, μέσω του κρυσταλλογραφικού υπολογιστικού πακέτου HighScore, καθιστώντας εφικτή την καταγραφή μεταβολών σε επίπεδο μοναδιαίας κυψελίδας. Συγκεκριμένα, για κάθε επίπεδο σχετικής υγρασίας, υπολογίστηκαν οι πλεγματικές σταθερές και ο όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας αποκαλύπτοντας πως επιδρά το περιβάλλον υγρασίας σε επίπεδο μοναδιαίας κυψελίδας.

## 2.5 Αποτελέσματα

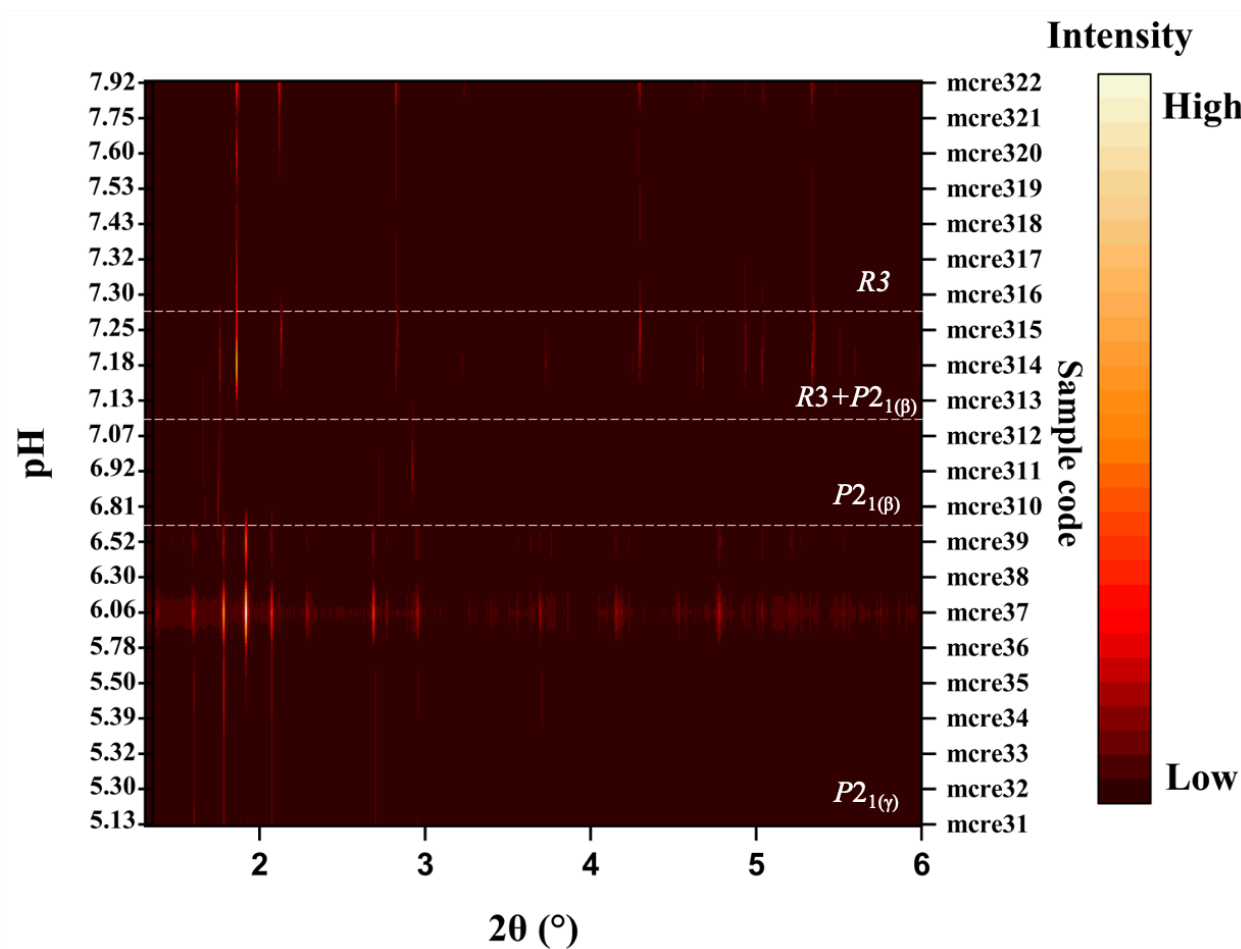
### 2.5.1 Πολυμορφισμός της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδότη m-cresol

Οι τέσσερις σειρές κρυστάλλωσης της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του φαινολικού προσδότη meta-cresol, τα πειράματα περίθλασης ακτίνων-X από τα πολυκρυσταλλικά δείγματα (XRPD) που προέκυψαν, καθώς και η πρωταρχική ανάλυση των μοτίβων περίθλασης, επέτρεψαν την μελέτη του κρυσταλλικού και μοριακού πολυμορφισμού των δημιουργηθέντων κρυσταλλικών συμπλόκων. Οι κύριες κρυσταλλικές φάσεις που εμφανίστηκαν ήταν τρεις, καθώς και συνυπάρξεις μεταξύ αυτών, υπό την μεταβλητή παράμετρο του pH.

#### 3<sup>η</sup> Σειρά δειγμάτων ανθρώπινης ινσουλίνης και m-cresol

Η 3<sup>η</sup> Σειρά δειγμάτων εξετάστηκε σε ένα εύρος τελικών τιμών του pH από 5.13 έως και 7.92, ενώ ο διαλύτης για τον προσδότη ήταν το δις-απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O). Στην συγκεκριμένη σειρά ανιχνεύτηκαν τρία κρυσταλλικά πολύμορφα, δύο μονοκλινούς συμμετρίας ( $P2_{1(\gamma)}$  και  $P2_{1(\beta)}$ ) και ένα ρομβοεδρικής συμμετρίας  $R3$ . Σε ένα μικρό αριθμό δειγμάτων σημειώθηκε και συνύπαρξη μεταξύ των φάσεων της μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_{1(\beta)}$  και της ρομβοεδρικής συμμετρίας. Η κατανομή των κρυσταλλικών πολυμόρφων ως προς τις διαφορετικές τιμές pH δύναται να συνδυαστούν ως

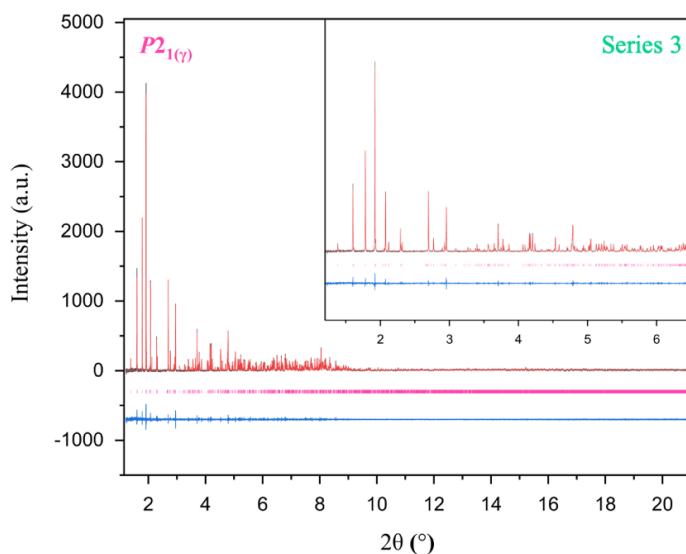
πληροφορίες σε ένα διάγραμμα επιφανείας (*surface plot*), το οποίο αποτελεί μία κάτοψη των εντάσεων διαδοχικών μοτίβων περίθλασης των πολυκρυσταλλικών δειγμάτων της σειράς συναρτήσει της γωνίας  $2\theta$  (Εικόνα 2.17).



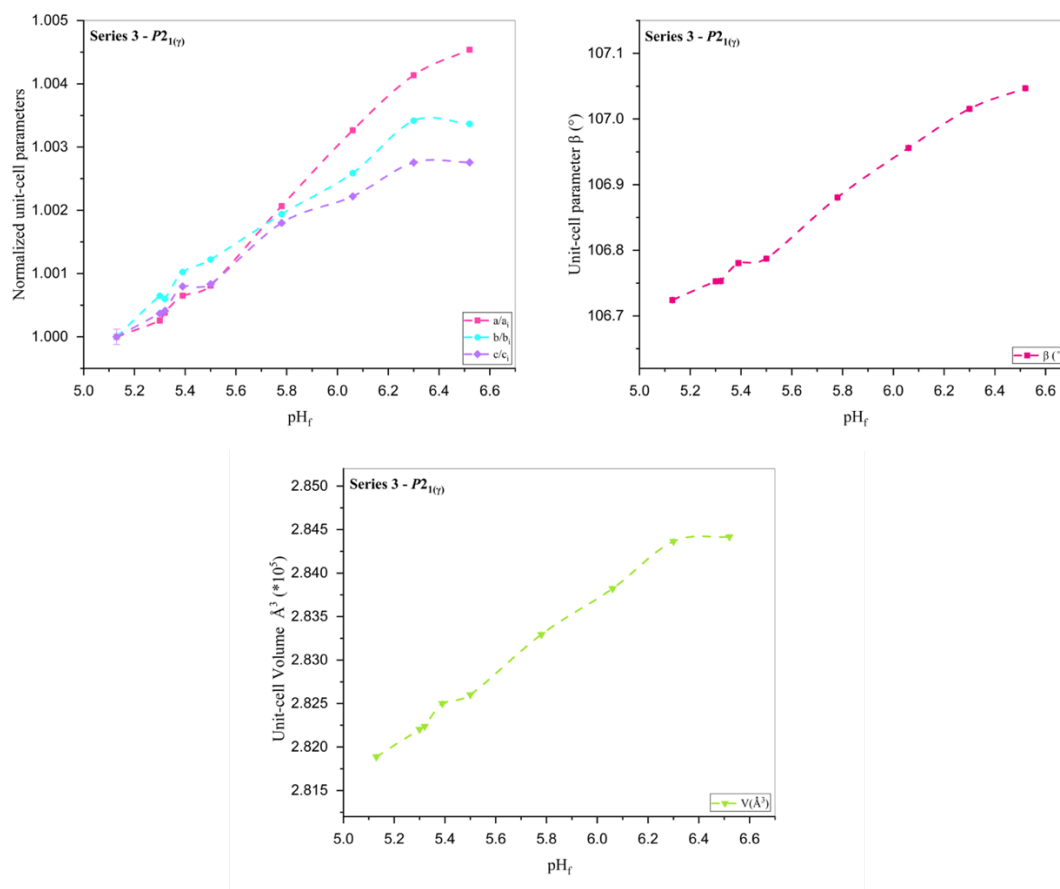
**Εικόνα 2.13.** Διάγραμμα επιφανείας δεδομένων XRPD δειγμάτων ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη m-cresol ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) της 3<sup>ης</sup> Σειράς. Κατά σειρά αυξανόμενου pH παρατηρούνται τρία κρυσταλλικά πολύμορφα  $P2_{1(\gamma)}$ ,  $P2_{1(\beta)}$ ,  $R3$ . Η συλλογή δεδομένων έγινε στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF ( $\lambda=1.3007899(8)$  Å) σε θερμοκρασία δωματίου.

Στο εύρος pH από 5.13 έως 6.52 ανιχνεύτηκε το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_{1(\gamma)}$  με ενδεικτικές πλεγματικές σταθερές  $a=87.1891(4)$  Å,  $b=70.2834(3)$  Å,  $c=48.1697(2)$  Å και  $\beta=106.7873(9)^\circ$ . Ακολούθως, σε εύρος pH από 6.81 έως και 7.07 ταυτοποιήθηκε το κρυσταλλικό πολύμορφο, επίσης μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_{1(\beta)}$  με πλεγματικές σταθερές  $a=62.5633(4)$  Å,  $b=61.9169(3)$  Å,  $c=47.9195(3)$  Å και  $\beta=111.2689(1)^\circ$ . Ακολούθησε ένα εύρος pH (7.13-7.25) στο οποίο σημειώθηκε συνύπαρξη του κρυσταλλικού πολυμόρφου μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_{1(\beta)}$  και της αμέσως επόμενης κρυσταλλικής φάσης ρομβοεδρικής συμμετρίας  $R3$ . Προς βασικότερα pH και συγκεκριμένα στο εύρος 7.30-7.92 εμφανίζεται το κρυσταλλικό πολύμορφο ρομβοεδρικής συμμετρίας με πλεγματικές σταθερές  $a=b=79.8387(2)$  Å και  $c=40.7111(2)$  Å, τιμές στις οποίες απαντάται η  $R_6$  μοριακή διαμόρφωση.

## Πολύμορφο Μονοκλινούς Συμμετρίας $P2_1(\gamma)$

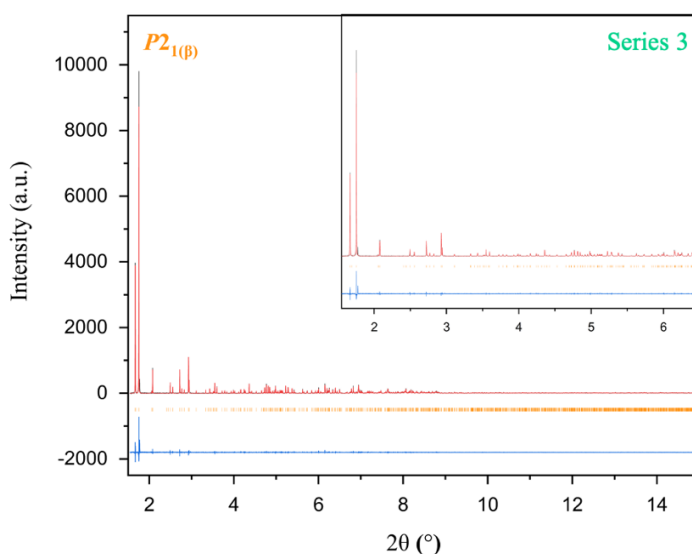


**Εικόνα 2.14.** Διαγραμματική απεικόνιση της ανάλυσης Pawley του μοτίβου περίθλασης του δείγματος mcre35 της ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη m-cresol σε  $\text{pH}_f$  5.50. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι ροζ κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_1(\gamma)$ . Οι πλεγματικές σταθερές όπως προέκυψαν από την ανάλυση είναι  $a=87.189(3)$  Å,  $b=70.2834(2)$  Å,  $c=48.1697(1)$  Å,  $\beta=106.7873(1)^\circ$ , και οι δείκτες αξιοπιστίας  $\chi^2=1.34896$  και  $R_{wp}=3.81\%$ .

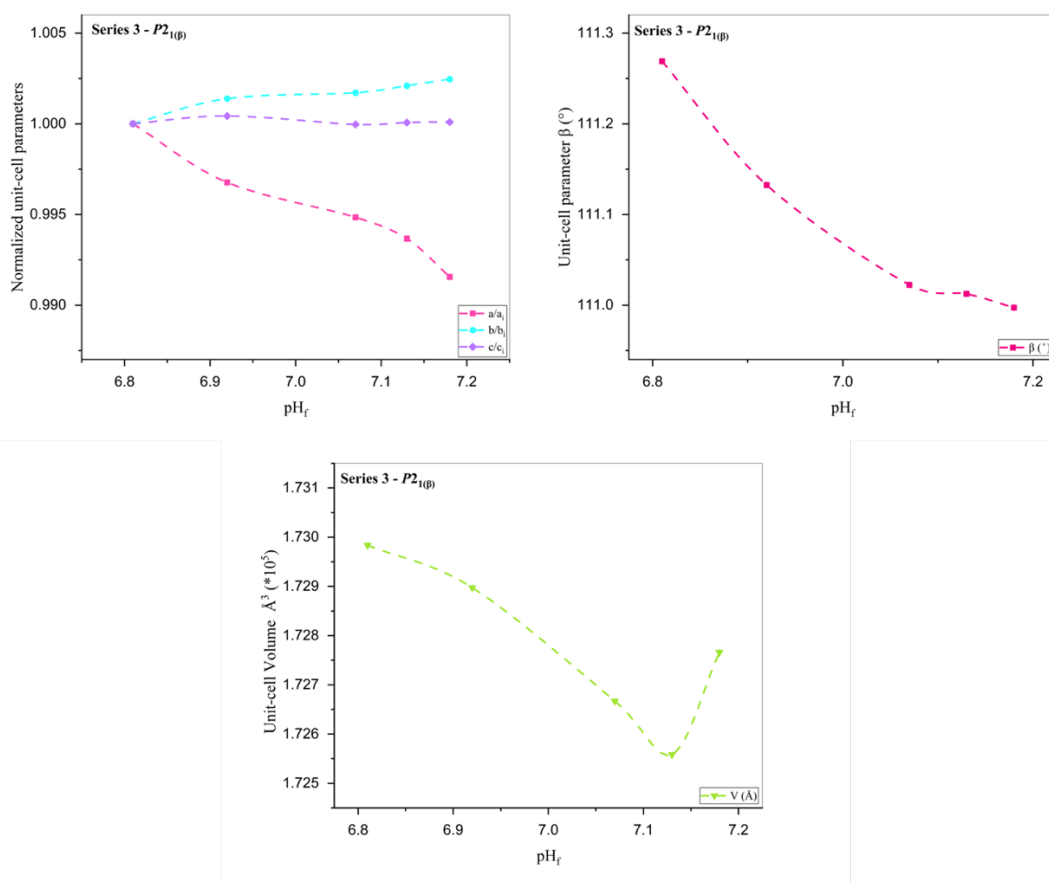


**Εικόνα 2.15.** Στο ανώτερο πάνελ δεξιά παρατίθεται το διάγραμμα των κανονικοποιημένων τιμών των πλεγματικών σταθερών  $a$ ,  $b$ ,  $c$  και στην συνέχεια στα δεξιά το διάγραμμα με τις μη κανονικοποιημένες τιμές της γωνίας  $\beta$ , ενώ στο κάτω πάνελ το διάγραμμα με τις μη κανονικοποιημένες τιμές του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας, όπως προέκυψαν από την Pawley ανάλυση όλων των σετ δεδομένων της σειράς 3 στα οποία απαντάται το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_1(\gamma)$ .

## Πολύμορφο Μονοκλινούς Συμμετρίας $P2_1(\beta)$

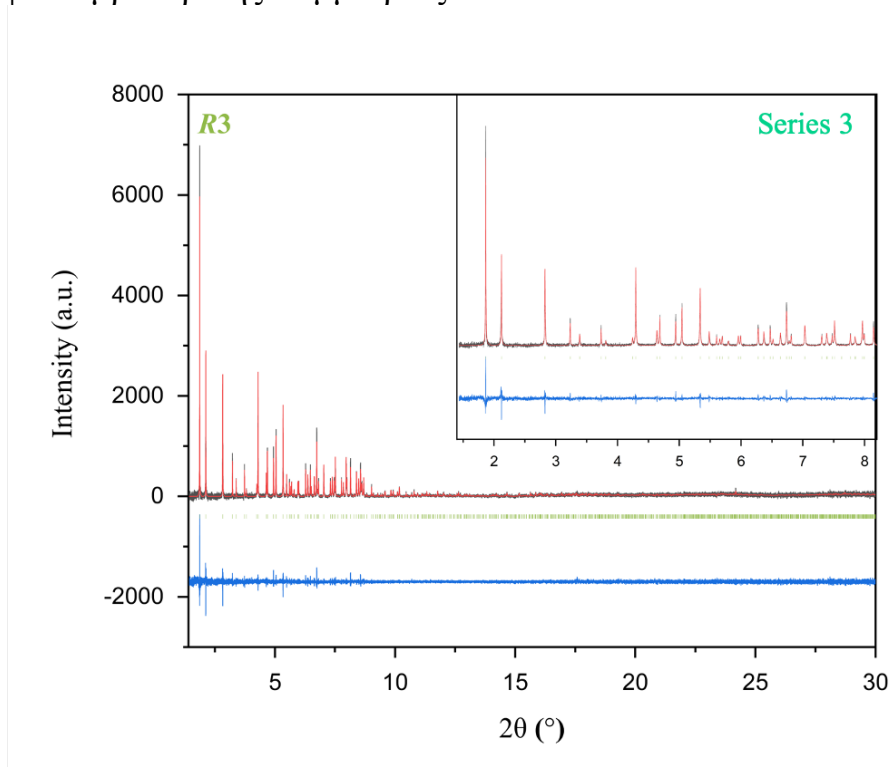


**Εικόνα 2.16.** Διαγραμματική απεικόνιση της ανάλυσης Pawley του μοτίβου περίθλασης του δείγματος mcre310 της ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη m-cresol σε pH<sub>f</sub> 6.81. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι πορτοκαλί κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_1(\beta)$ . Οι πλεγματικές σταθερές όπως προέκυψαν από την ανάλυση είναι  $a=62.5633(3)$  Å,  $b=61.9168(2)$  Å,  $c=47.9195(2)$  Å,  $\beta=111.2689(1)^\circ$ , και οι δείκτες αξιοπιστίας  $\chi^2=1.37451$  και  $R_{wp}=5.00\%$ .

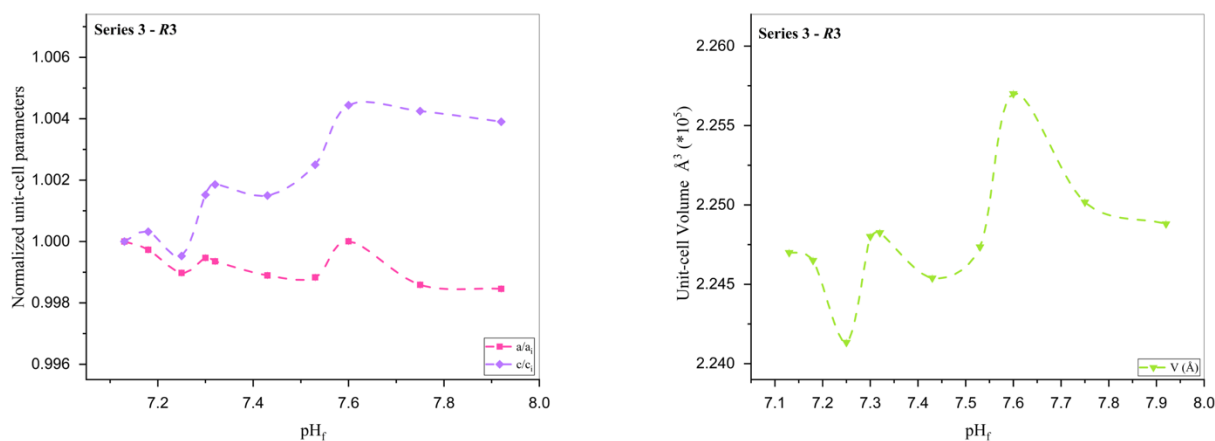


**Εικόνα 2.17.** Στο ανώτερο πάνελ δεξιά παρατίθεται το διάγραμμα των κανονικοποιημένων τιμών των πλεγματικών σταθερών  $a$ ,  $b$ ,  $c$  και στην συνέχεια στα δεξιά το διάγραμμα με τις μη κανονικοποιημένες τιμές της γωνίας  $\beta$ , ενώ στο κάτω πάνελ το διάγραμμα με τις μη κανονικοποιημένες τιμές του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας, όπως προέκυψαν από την Pawley ανάλυση όλων των σετ δεδομένων της σειράς 3 στα οποία απαντάται το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_1(\beta)$ .

## Πολύμορφο Ρομβοεδρικής Συμμετρίας *R3*



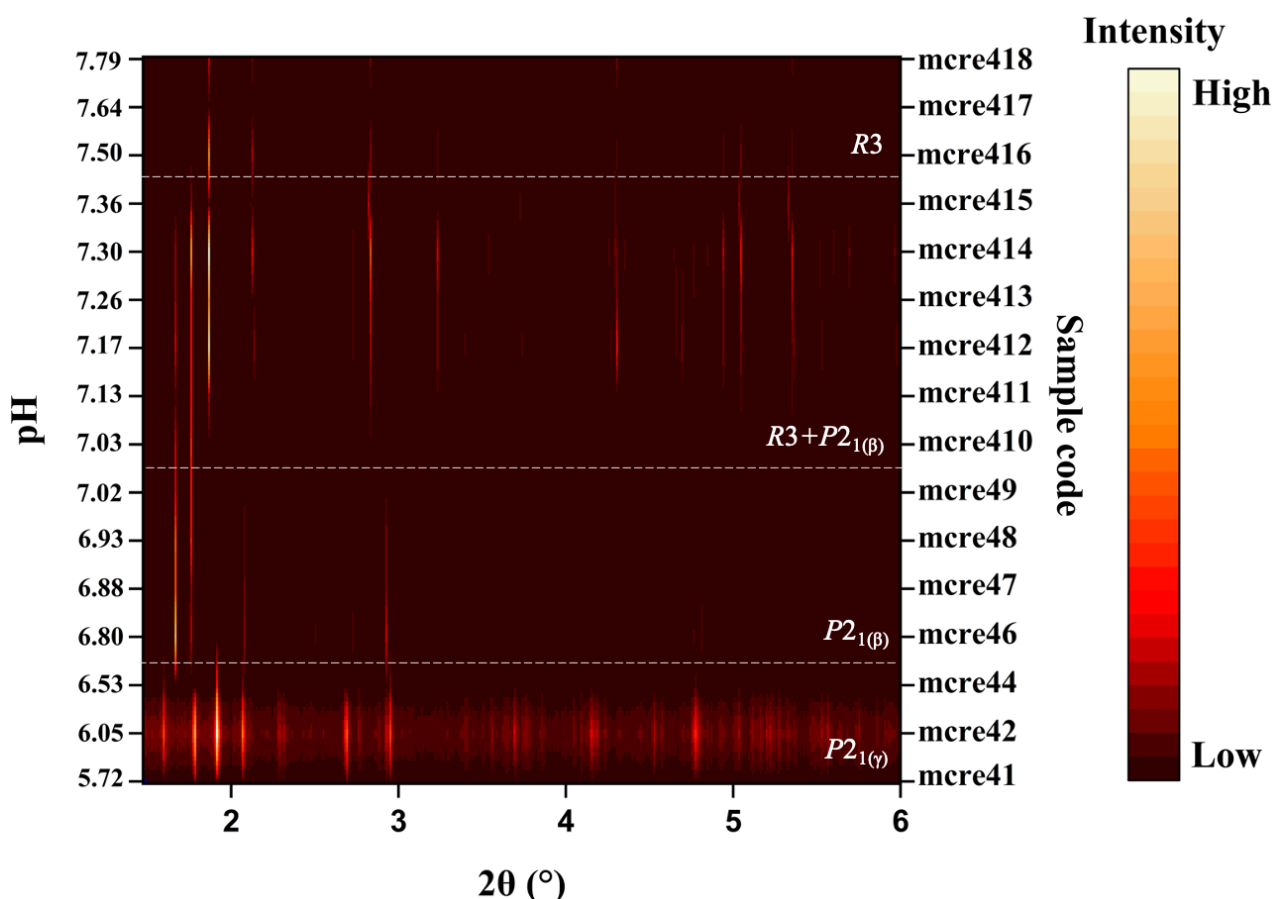
**Εικόνα 2.18.** Διαγραμματική απεικόνιση της ανάλυσης Pawley του μοτίβου περίθλασης του δείγματος mcre322 της ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη m-cresol σε  $\text{pH}_f$  7.92. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι πράσινες κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο *R3*. Οι πλεγματικές σταθερές όπως προέκυψαν από την ανάλυση είναι  $a=b=78.8087(2)$  Å,  $c=40.7680(4)$  Å, και οι δείκτες αξιοπιστίας  $\chi^2=1.13454$  και  $R_{wp}=4.52\%$ .



**Εικόνα 2.19.** Διαγραμματική απεικόνιση στα αριστερά των κανονικοποιημένων τιμών των πλεγματικών σταθερών  $a$ , και  $c$  και ακολούθως στα δεξιά των μη κανονικοποιημένων τιμών του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας, όπως προέκυψαν από την Pawley ανάλυση όλων των σετ δεδομένων της σειράς 3 στα οποία απαντάται το κρυσταλλικό πολύμορφο *R3*.

#### 4<sup>η</sup> Σειρά δειγμάτων ανθρώπινης ινσουλίνης και m-cresol

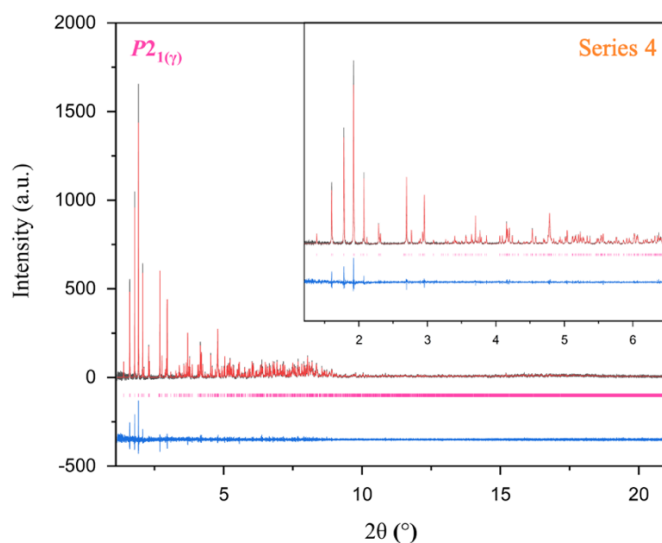
Η 4<sup>η</sup> Σειρά δειγμάτων εξετάστηκε σε ένα εύρος τελικών τιμών του pH από 5.72 έως και 7.79, ενώ ο διαλύτης για τον προσδέτη ήταν η αιθανόλη. Στην συγκεκριμένη σειρά ανιχνεύτηκαν, επίσης, τρία κρυσταλλικά πολύμορφα, δύο μονοκλινούς συμμετρίας ( $P2_1(\gamma)$  και  $P2_1(\beta)$ ) και ένα ρομβοεδρικής συμμετρίας  $R3$ . Σε ένα μικρό αριθμό δειγμάτων σημειώθηκε και συνύπαρξη μεταξύ των φάσεων της μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_1(\beta)$  και της ρομβοεδρικής συμμετρίας. Η κατανομή των κρυσταλλικών πολυμόρφων ως προς τις διαφορετικές τιμές pH αποτυπώνεται στο ακόλουθο διάγραμμα επιφανείας (*surface plot*), το οποίο αποτελεί την κάτοψη των εντάσεων των διαδοχικών μοτίβων περίθλασης των πολυκρυσταλλικών δειγμάτων της σειράς συναρτήσει της γωνίας  $2\theta$  (Εικόνα 2.24).



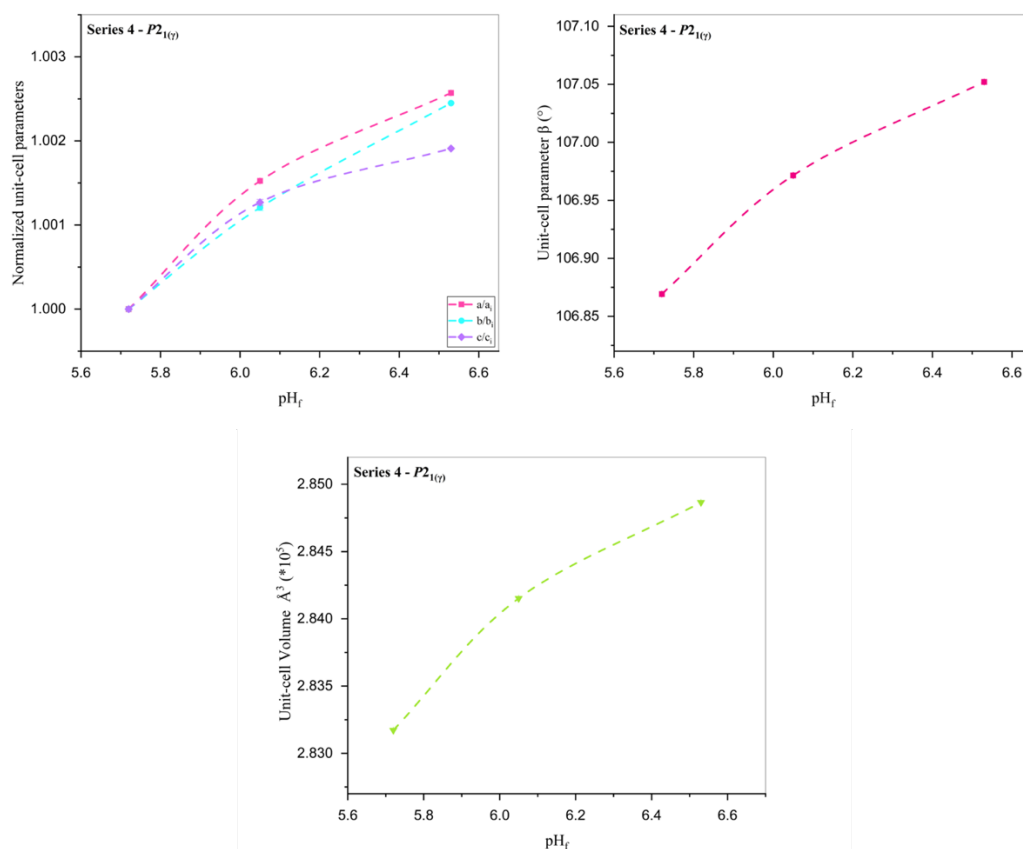
**Εικόνα 2.20.** Διάγραμμα επιφανείας δεδομένων XRPD δειγμάτων ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη m-cresol (ethanol) της 4<sup>ης</sup> Σειράς. Κατά σειρά αυξανόμενου pH παρατηρούνται τρία κρυσταλλικά πολύμορφα  $P2_1(\gamma)$ ,  $P2_1(\beta)$ ,  $R3$ . Η συλλογή δεδομένων έγινε στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF ( $\lambda=1.3007899(8)$  Å) σε θερμοκρασία δωματίου.

Στο εύρος pH από 5.72 έως 6.53 ανιχνεύτηκε το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_1(\gamma)$  με ενδεικτικές πλεγματικές σταθερές  $a=87.2950(9)$  Å,  $b=70.3230(6)$  Å,  $c=48.2020(5)$  Å και  $\beta=106.8692(2)^\circ$ . Ακολούθως, σε εύρος pH από 6.80 έως και 7.02 ταυτοποιήθηκε το κρυσταλλικό πολύμορφο, επίσης μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_1(\beta)$  με πλεγματικές σταθερές  $a=62.2501(4)$  Å,  $b=61.9604(3)$  Å,  $c=47.8741(3)$  Å και  $\beta=111.1017(2)^\circ$ . Ακολούθησε ένα εύρος pH (7.03-7.36) στο οποίο σημειώθηκε συνύπαρξη του κρυσταλλικού πολυμόρφου μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_1(\beta)$  και της αμέσως επόμενης κρυσταλλικής φάσης ρομβοεδρικής συμμετρίας  $R3$ . Προς βασικότερα pH και συγκεκριμένα στο εύρος 7.50-7.79 εμφανίζεται το κρυσταλλικό πολύμορφο ρομβοεδρικής συμμετρίας με πλεγματικές σταθερές  $a=b=79.7753(2)$  Å και  $c=40.6005(2)$  Å, τιμές στις οποίες απαντάται η  $R_6$  μοριακή διαμόρφωση.

## Πολύμορφο Μονοκλινούς Συμμετρίας $P2_1(\gamma)$



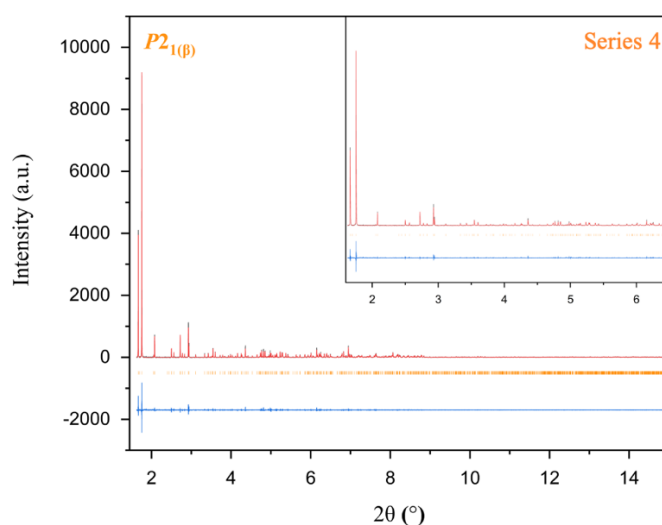
**Εικόνα 2.21.** Διαγραμματική απεικόνιση της ανάλυσης Pawley του μοτίβου περίθλασης του δείγματος mcre41 της ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη m-cresol σε  $\text{pH}_f$  5.72. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι ροζ κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_1(\gamma)$ . Οι πλεγματικές σταθερές όπως προέκυψαν από την ανάλυση είναι  $a=87.2949(8)$  Å,  $b=70.3229(6)$  Å,  $c=48.202(4)$  Å,  $\beta=106.8692(2)^\circ$ , και οι δείκτες αξιοπιστίας  $\chi^2=1.44488$  και  $R_{wp}=4.55\%$ .



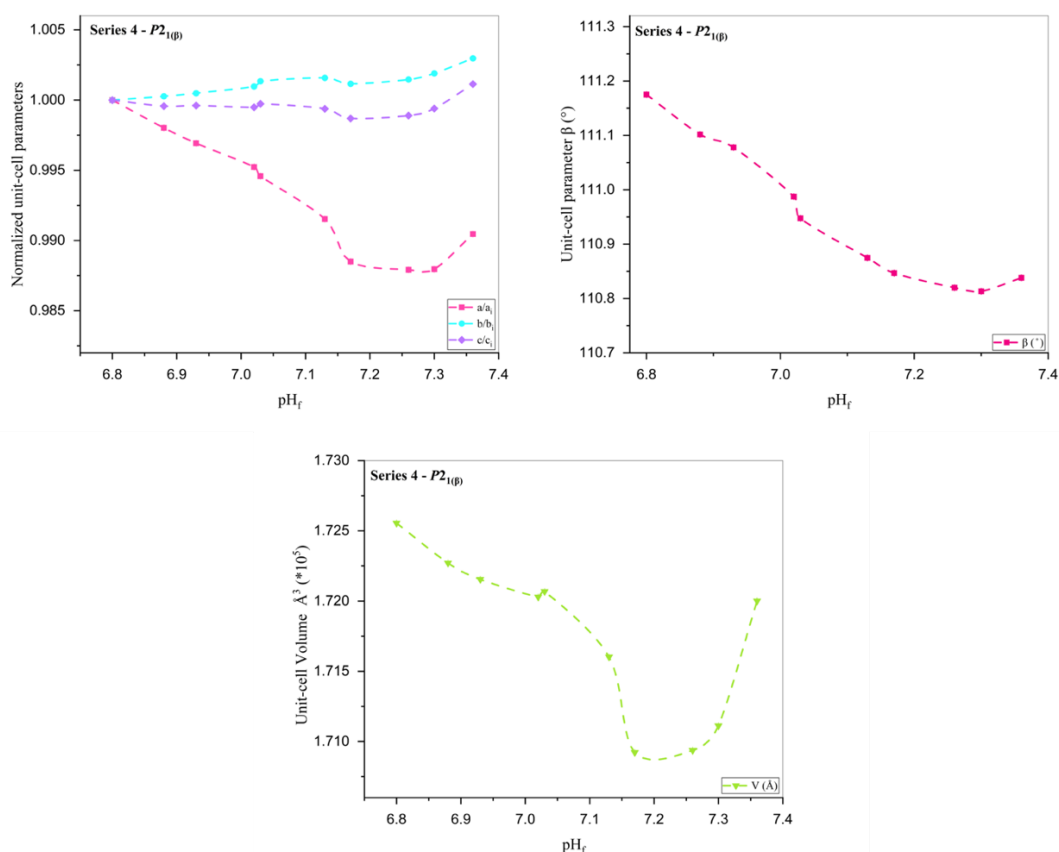
**Εικόνα 2.22.** Στο ανώτερο πάνελ δεξιά παρατίθεται το διάγραμμα των κανονικοποιημένων τιμών των πλεγματικών σταθερών  $a$ ,  $b$ ,  $c$  και στην συνέχεια στα δεξιά το διάγραμμα με τις μη κανονικοποιημένες τιμές της γωνίας  $\beta$ , ενώ στο κάτω πάνελ το διάγραμμα με τις μη κανονικοποιημένες τιμές του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας, όπως προέκυψαν από την Pawley ανάλυση όλων των σετ δεδομένων της σειράς 4 στα οποία απαντάται το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_1(\gamma)$ .



## Πολύμορφο Μονοκλινούς Συμμετρίας $P2_1(\beta)$

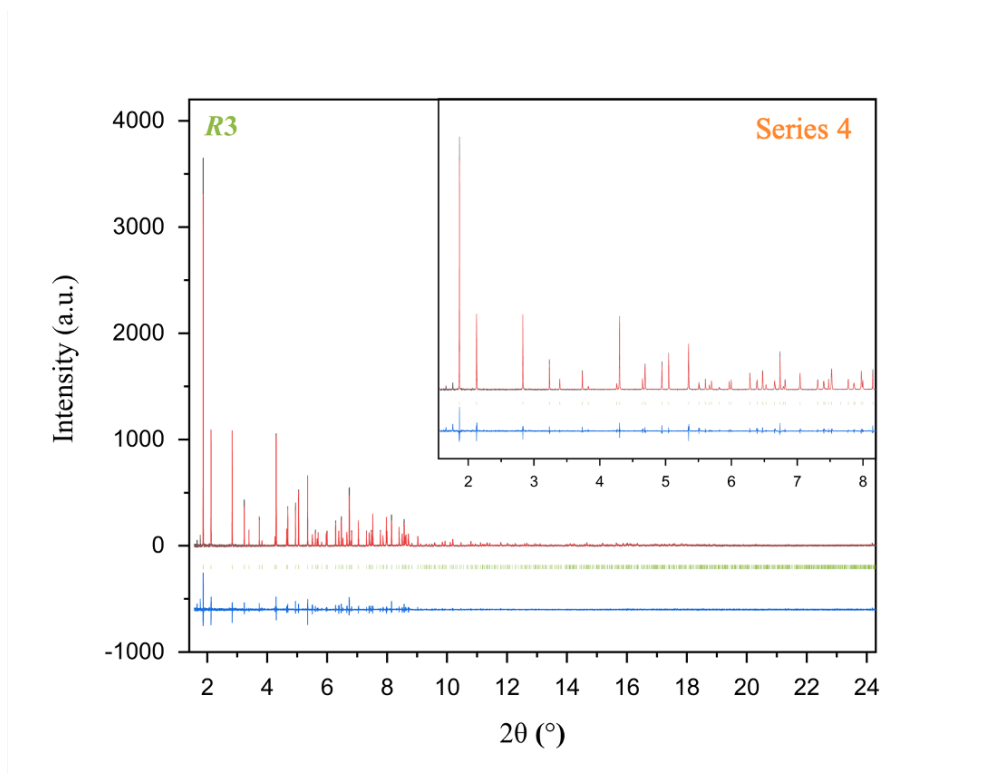


**Εικόνα 2.23.** Διαγραμματική απεικόνιση της ανάλυσης Pawley του μοτίβου περίθλασης του δείγματος mcre46 της ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη m-cresol σε  $\text{pH}_f$  6.80. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι πορτοκαλί κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_1(\beta)$ . Οι πλεγματικές σταθερές όπως προέκυψαν από την ανάλυση είναι  $a=62.3734(4)$  Å,  $b=70.3229(6)$  Å,  $c=48.2020(4)$  Å,  $\beta=111.1751(1)^\circ$ , και οι δείκτες αξιοπιστίας  $\chi^2=1.34253$  και  $R_{wp}=5.90\%$ .

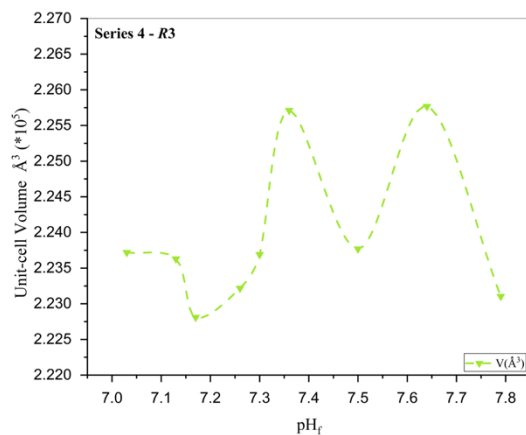
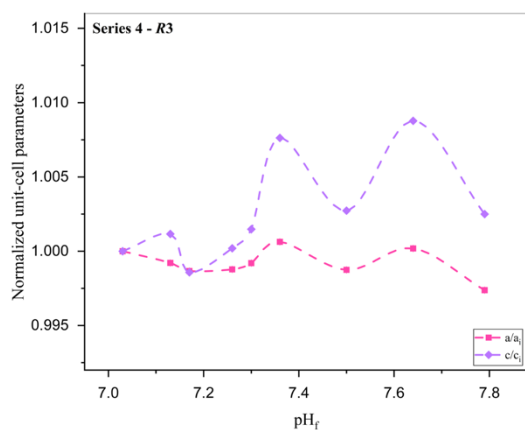


**Εικόνα 2.24.** Στο ανώτερο πάνελ δεξιά παρατίθεται το διάγραμμα των κανονικοποιημένων τιμών των πλεγματικών σταθερών  $a$ ,  $b$ ,  $c$  και στην συνέχεια στα δεξιά το διάγραμμα με τις μη κανονικοποιημένες τιμές της γωνίας  $\beta$ , ενώ στο κάτω πάνελ το διάγραμμα με τις μη κανονικοποιημένες τιμές του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας, όπως προέκυψαν από την Pawley ανάλυση όλων των σετ δεδομένων της σειράς 4 στα οποία απαντάται το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_1(\beta)$ .

## Πολύμορφο Ρομβοεδρικής Συμμετρίας *R3*



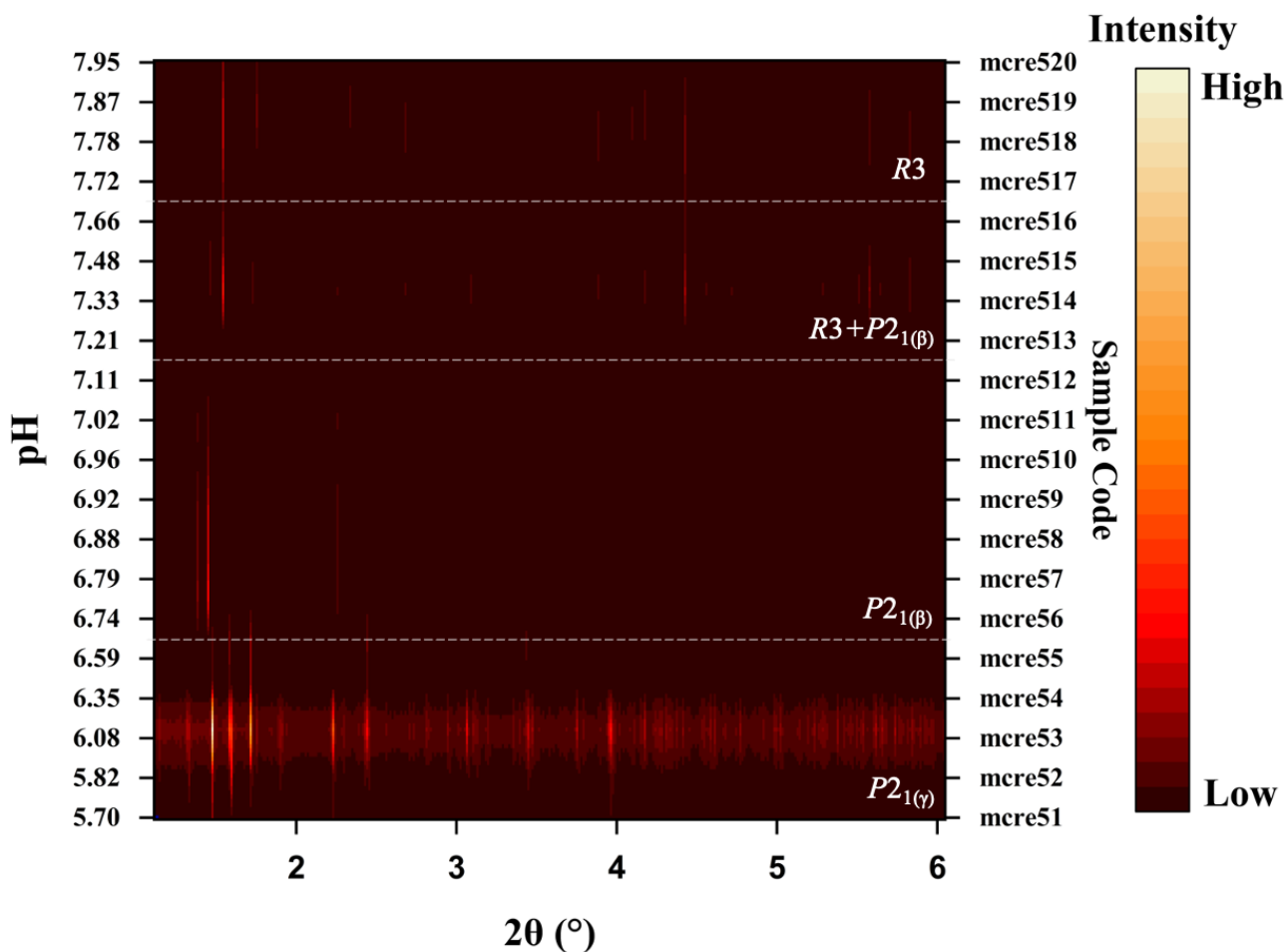
**Εικόνα 2.25.** Διαγραμματική απεικόνιση της ανάλυσης Pawley του μοτίβου περίθλασης του δείγματος mcre416 της ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη m-cresol σε  $\text{pH}_f$  7.50. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι πράσινες κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο *R3*. Οι πλεγματικές σταθερές όπως προέκυψαν από την ανάλυση είναι  $a=b=79.7753(1)$  Å,  $c=40.6005(2)$  Å, και οι δείκτες αξιοπιστίας  $\chi^2=1.32901$  και  $R_{wp}=5.97\%$ .



**Εικόνα 2.26.** Διαγραμματική απεικόνιση στα αριστερά των κανονικοποιημένων τιμών των πλεγματικών σταθερών  $a$ , και  $c$  και ακολούθως στα δεξιά των μη κανονικοποιημένων τιμών του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας, όπως προέκυψαν από την Pawley ανάλυση όλων των σετ δεδομένων της σειράς 4 στα οποία απαντάται το κρυσταλλικό πολύμορφο *R3*.

## 5<sup>η</sup> Σειρά δειγμάτων ανθρώπινης ινσουλίνης και m-cresol

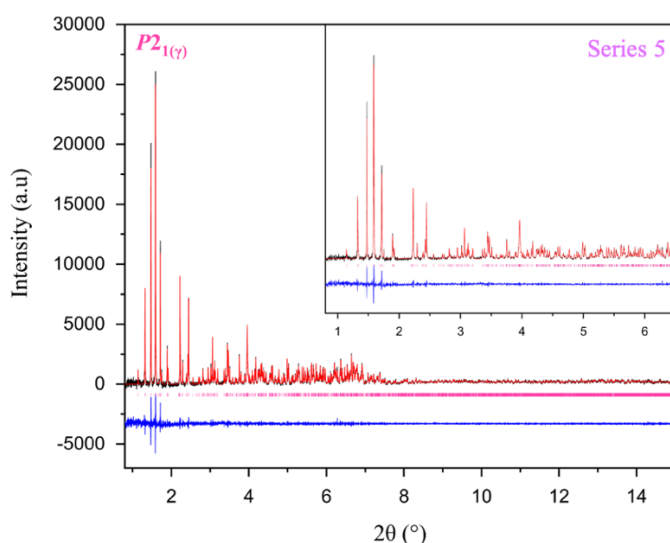
Η 5<sup>η</sup> Σειρά δειγμάτων εξετάστηκε σε ένα εύρος τελικών τιμών του pH από 5.70 έως και 7.95, ενώ ο διαλύτης για τον προσδέτη ήταν η αιθανόλη. Στην συγκεκριμένη σειρά ανιχνεύτηκαν, επίσης, τρία κρυσταλλικά πολύμορφα, δύο μονοκλινούς συμμετρίας ( $P2_1(\gamma)$  και  $P2_1(\beta)$ ) και ένα ρομβοεδρικής συμμετρίας  $R3$ . Σε ένα μικρό αριθμό δειγμάτων σημειώθηκε και συνύπαρξη μεταξύ των φάσεων της μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_1(\beta)$  και της ρομβοεδρικής συμμετρίας. Η κατανομή των κρυσταλλικών πολυμόρφων ως προς τις διαφορετικές τιμές pH αποτυπώνεται στο ακόλουθο διάγραμμα επιφανείας (*surface plot*), το οποίο αποτελεί την κάτοψη των εντάσεων των διαδοχικών μοτίβων περίθλασης των πολυκρυσταλλικών δειγμάτων της σειράς συναρτήσει της γωνίας  $2\theta$  (Εικόνα 2.31).



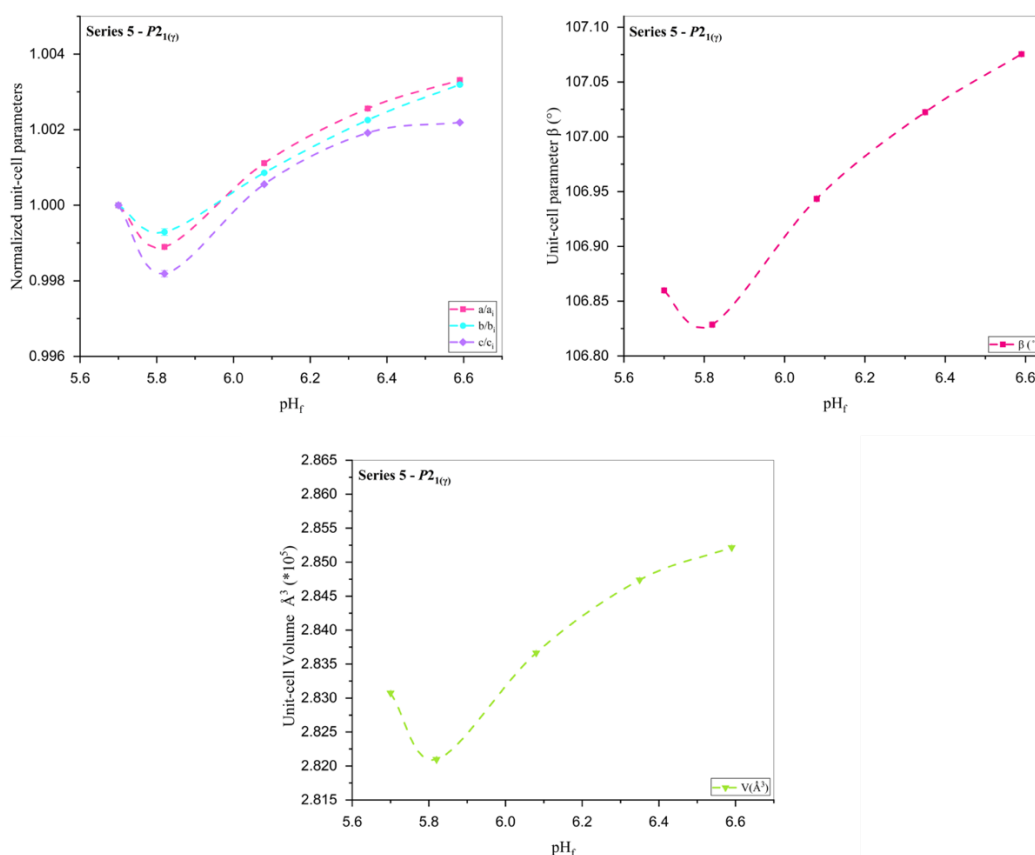
**Εικόνα 2.27.** Διάγραμμα επιφανείας δεδομένων XRPD δειγμάτων ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη m-cresol (ethanol) της 5<sup>ης</sup> σειράς. Κατά σειρά αυξανόμενου pH παρατηρούνται τρία κρυσταλλικά πολύμορφα  $P2_1(\gamma)$ ,  $P2_1(\beta)$ ,  $R3$ . Η συλλογή δεδομένων έγινε στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF ( $\lambda=1.078169$  (3) Å) σε θερμοκρασία δωματίου.

Στο εύρος pH από 5.70 έως 6.59 ανιχνεύτηκε το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_1(\gamma)$  με ενδεικτικές πλεγματικές σταθερές  $a=87.2669(9)$  Å,  $b=70.3089(6)$  Å,  $c=48.2083(4)$  Å και  $\beta=106.8598(2)^\circ$ . Ακολούθως, σε εύρος pH από 6.74 έως και 7.11 ταυτοποιήθηκε το κρυσταλλικό πολύμορφο, επίσης μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_1(\beta)$  με πλεγματικές σταθερές  $a=62.3436(4)$  Å,  $b=61.9763(3)$  Å,  $c=47.9096(3)$  Å και  $\beta=111.1350(1)^\circ$ . Ακολούθησε ένα εύρος pH (7.21-7.48) στο οποίο σημειώθηκε συνύπαρξη του κρυσταλλικού πολυμόρφου μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_1(\beta)$  και της αμέσως επόμενης κρυσταλλικής φάσης ρομβοεδρικής συμμετρίας  $R3$ . Προς βασικότερα pH και συγκεκριμένα στο εύρος 7.66-7.95 εμφανίζεται το κρυσταλλικό πολύμορφο ρομβοεδρικής συμμετρίας με πλεγματικές σταθερές  $a=b=79.8216(2)$  Å και  $c=40.6795(2)$  Å, τιμές στις οποίες απαντάται η  $R_6$  μοριακή διαμόρφωση. Το τελευταίο δείγμα της σειράς με κωδικό mcre520 είχε χαμηλής εντάσεως κορυφές (*weak diffraction*), ώστε να μην είναι εφικτή η ανάλυση.

## Πολύμορφο Μονοκλινούς Συμμετρίας $P2_1(\gamma)$

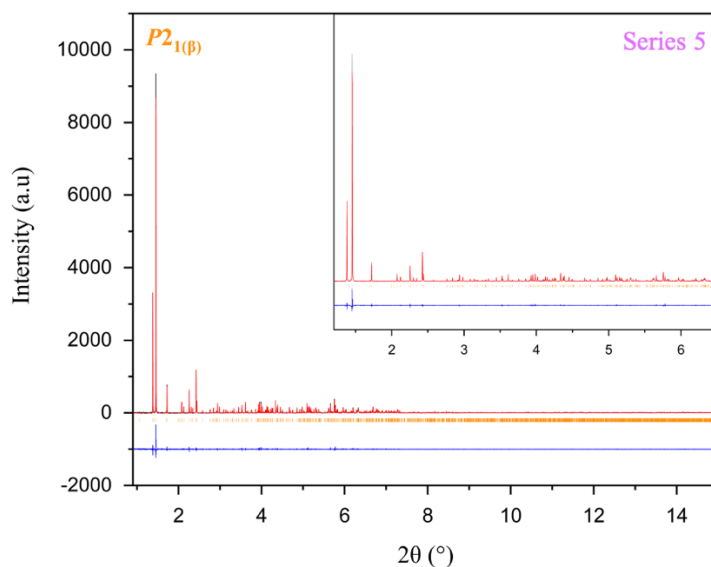


**Εικόνα 2.28.** Διαγραμματική απεικόνιση της ανάλυσης Pawley του μοτίβου περίθλασης του δείγματος mcrs53 της ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη m-cresol σε  $\text{pH}_f$  6.08. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι ροζ κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_1(\gamma)$ . Οι πλεγματικές σταθερές όπως προέκυψαν από την ανάλυση είναι  $a=87.364(2)$  Å,  $b=70.369(1)$  Å,  $c=48.2351(9)$  Å,  $\beta=106.9434(4)^\circ$ , και οι δείκτες αξιοπιστίας  $\chi^2=1.82064$  και  $R_{wp}=3.47\%$ .

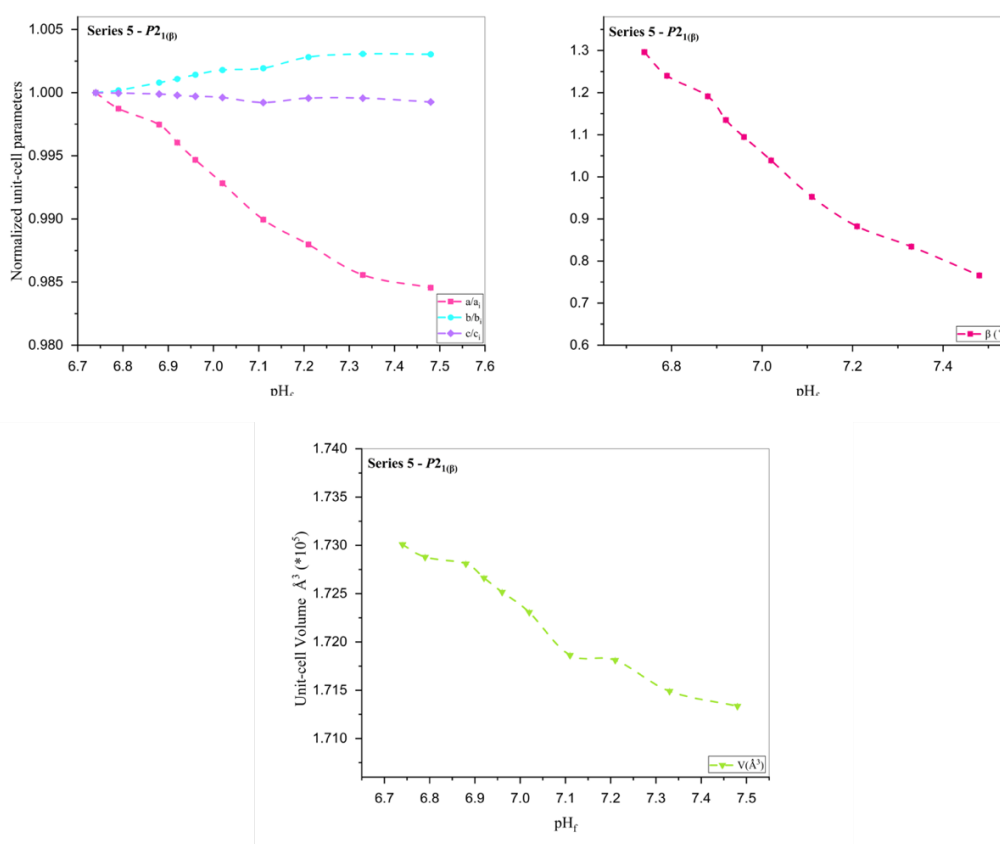


**Εικόνα 2.29.** Στο ανώτερο πάνελ δεξιά παρατίθεται το διάγραμμα των κανονικοποιημένων τιμών των πλεγματικών σταθερών  $a$ ,  $b$ ,  $c$  και στην συνέχεια στα δεξιά το διάγραμμα με τις μη κανονικοποιημένες τιμές της γωνίας  $\beta$ , ενώ στο κάτω πάνελ το διάγραμμα με τις μη κανονικοποιημένες τιμές του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας, όπως προέκυψαν από την Pawley ανάλυση όλων των σετ δεδομένων της σειράς 5 στα οποία απαντάται το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_1(\gamma)$ .

## Πολύμορφο Μονοκλινούς Συμμετρίας $P2_1(\beta)$

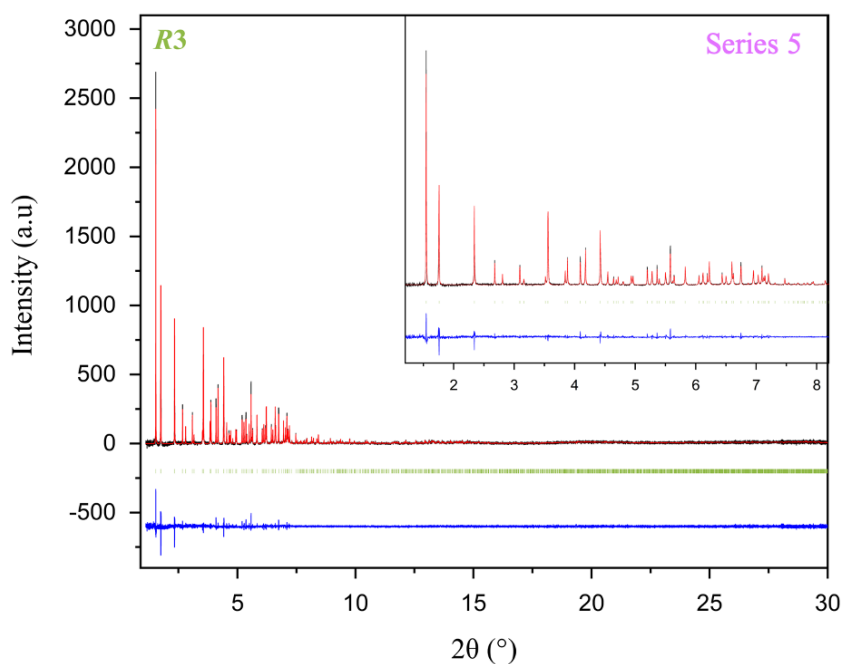


**Εικόνα 2.30.** Διαγραμματική απεικόνιση της ανάλυσης Pawley του μοτίβου περίθλασης του δείγματος mcrs59 της ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη m-cresol σε  $\text{pH}_f$  6.92. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι πορτοκαλί κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_1(\beta)$ . Οι πλεγματικές σταθερές όπως προέκυψαν από την ανάλυση είναι  $a=62.3436(4)$  Å,  $b=61.9763(3)$  Å,  $c=47.9096(3)$  Å,  $\beta=111.1350(1)^\circ$ , και οι δείκτες αξιοπιστίας  $\chi^2=1.4086$  και  $R_{wp}=4.99\%$ .

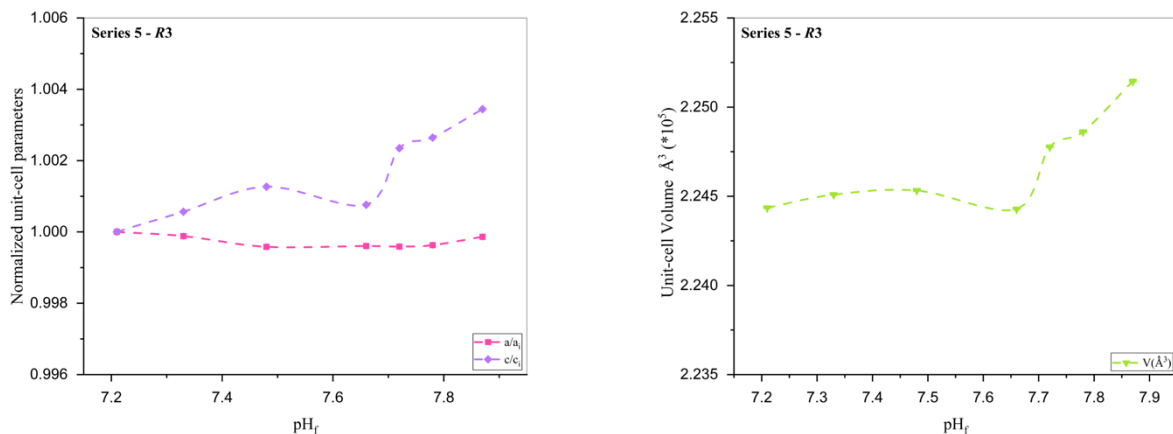


**Εικόνα 2.31.** Στο ανώτερο πάνελ δεξιά παρατίθεται το διάγραμμα των κανονικοποιημένων τιμών των πλεγματικών σταθερών  $a$ ,  $b$ ,  $c$  και στην συνέχεια στα δεξιά το διάγραμμα με τις μη κανονικοποιημένες τιμές της γωνίας  $\beta$ , ενώ στο κάτω πάνελ το διάγραμμα με τις μη κανονικοποιημένες τιμές του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας, όπως προέκυψαν από την Pawley ανάλυση όλων των σετ δεδομένων της σειράς 5 στα οποία απαντάται το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_1(\beta)$ .

## Πολύμορφο Ρομβοεδρικής Συμμετρίας *R3*



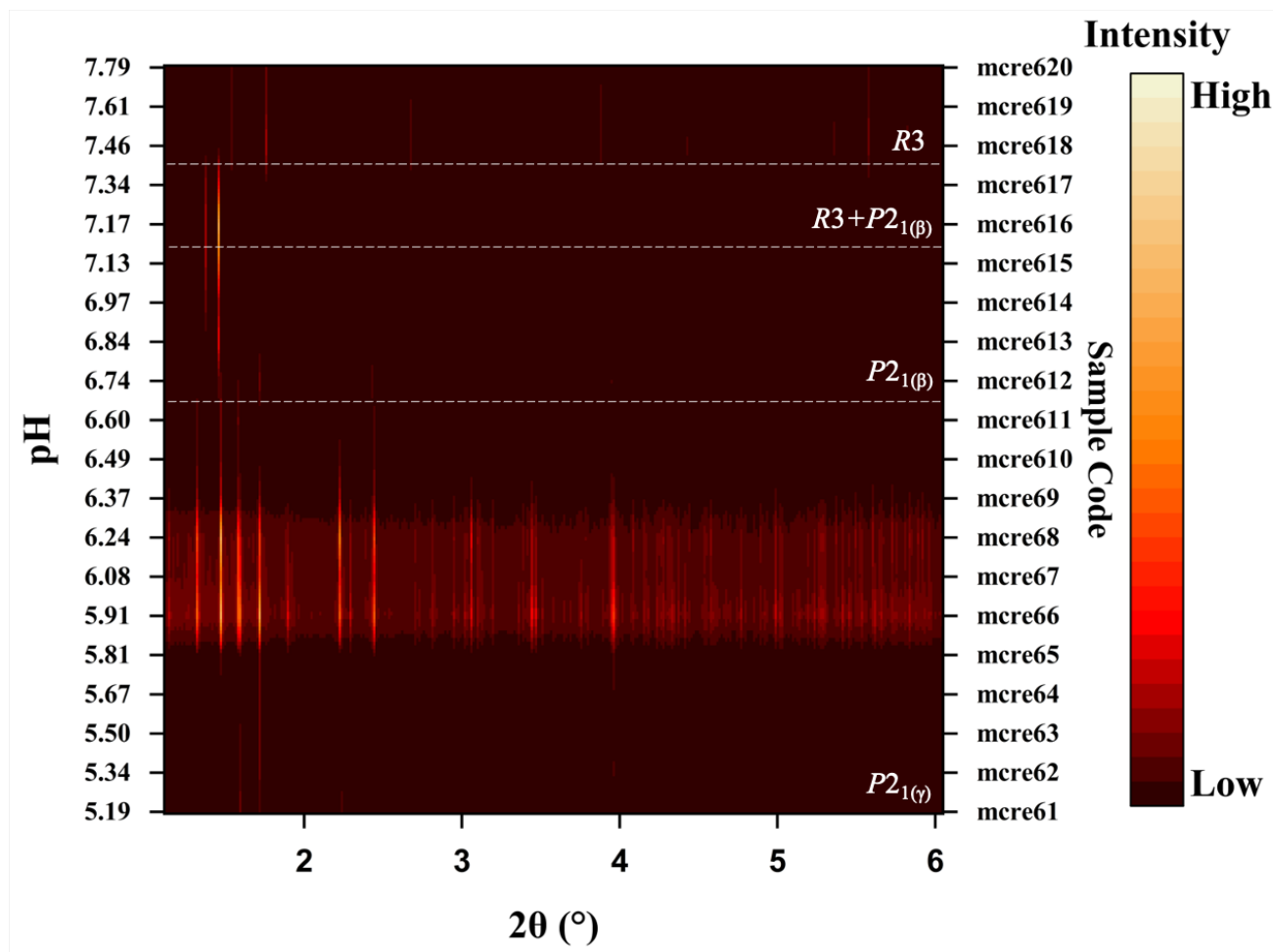
**Εικόνα 2.32.** Διαγραμματική απεικόνιση της ανάλυσης Pawley του μοτίβου περίθλασης του δείγματος mcre518 της ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη m-cresol σε  $\text{pH}_f$  7.78. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι πράσινες κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο *R3*. Οι πλεγματικές σταθερές όπως προέκυψαν από την ανάλυση είναι  $a=b=79.8234(5)$  Å,  $c=40.7496(5)$  Å, και οι δείκτες αξιοπιστίας  $\chi^2=1.43613$  και  $R_{wp}=3.61\%$ .



**Εικόνα 2.33.** Διαγραμματική απεικόνιση στα αριστερά των κανονικοποιημένων τιμών των πλεγματικών σταθερών  $a$ , και  $c$  και ακολούθως στα δεξιά των μη κανονικοποιημένων τιμών του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας, όπως προέκυψαν από την Pawley ανάλυση όλων των σετ δεδομένων της σειράς 5 στα οποία απαντάται το κρυσταλλικό πολύμορφο *R3*.

## 6<sup>η</sup> Σειρά δειγμάτων ανθρώπινης ινσουλίνης και m-cresol

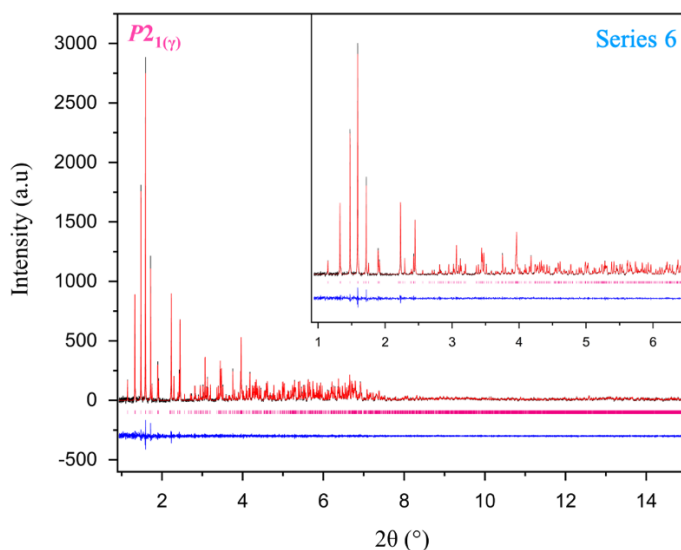
Η 6<sup>η</sup> Σειρά δειγμάτων εξετάστηκε σε ένα εύρος τελικών τιμών του pH από 5.19 έως και 7.79, ενώ ο διαλύτης για τον προσδότη ήταν το DMSO. Στην συγκεκριμένη σειρά ανιχνεύτηκαν, επίσης, τρία κρυσταλλικά πολύμορφα, δύο μονοκλινούς συμμετρίας ( $P2_1(\gamma)$  και  $P2_1(\beta)$ ) και ένα ρομβοεδρικής συμμετρίας  $R3$ . Σε ένα μικρό αριθμό δειγμάτων σημειώθηκε και συνύπαρξη μεταξύ των φάσεων της μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_1(\beta)$  και της ρομβοεδρικής συμμετρίας. Η κατανομή των κρυσταλλικών πολυμόρφων ως προς τις διαφορετικές τιμές pH αποτυπώνεται στο ακόλουθο διάγραμμα επιφανείας (*surface plot*), το οποίο αποτελεί την κάτοψη των εντάσεων των διαδοχικών μοτίβων περίθλασης των πολυκρυσταλλικών δειγμάτων της σειράς συναρτήσει της γωνίας  $2\theta$  (Εικόνα 2.38).



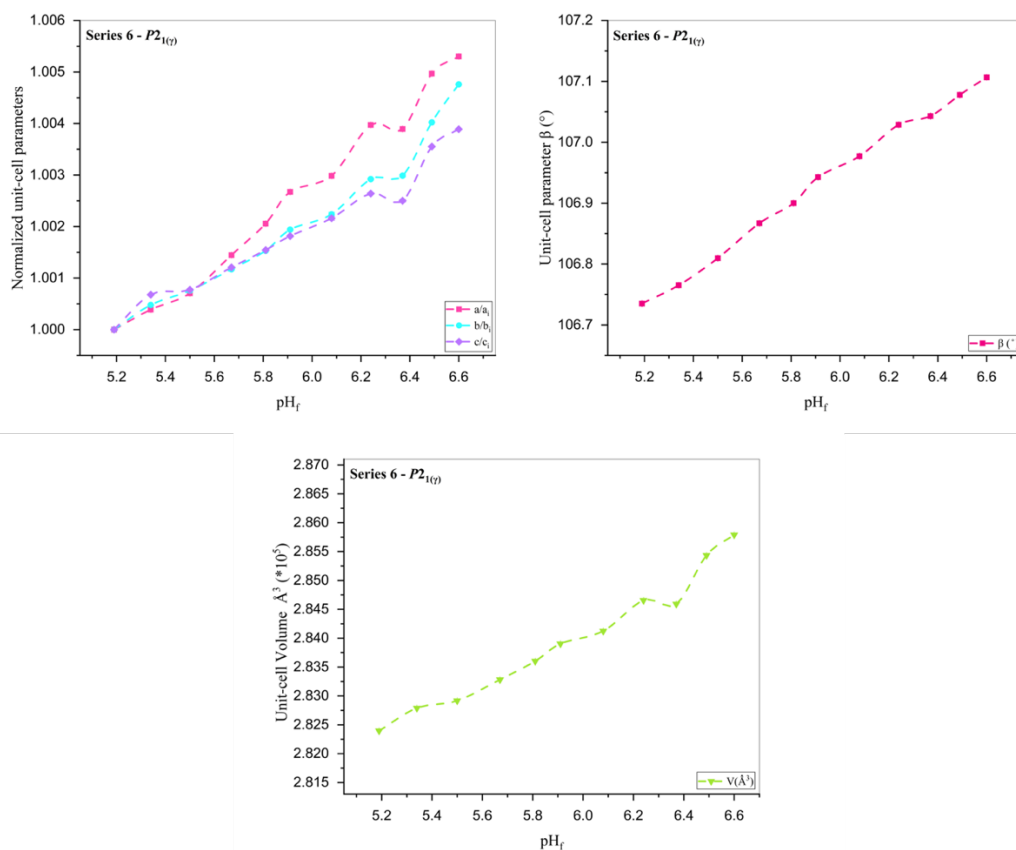
**Εικόνα 2.34.** Διάγραμμα επιφανείας δεδομένων XRPD δειγμάτων ινσουλίνης παρουσία του προσδότη m-cresol (DMSO) της 6<sup>ης</sup> Σειράς. Κατά σειρά αυξανόμενου pH παρατηρούνται τρία κρυσταλλικά πολύμορφα  $P2_1(\gamma)$ ,  $P2_1(\beta)$ ,  $R3$ . Η συλλογή δεδομένων έγινε στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF ( $\lambda=1.078169$  (3) Å) σε θερμοκρασία δωματίου.

Στο εύρος pH από 5.19 έως 6.60 ανιχνεύτηκε το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_1(\gamma)$  με ενδεικτικές πλεγματικές σταθερές  $a=87.1852(9)$  Å,  $b=70.2836(6)$  Å,  $c=48.1979(5)$  Å και  $\beta=106.7652(2)^\circ$ . Ακολούθως, σε εύρος pH από 6.74 έως και 7.13 ταυτοποιήθηκε το κρυσταλλικό πολύμορφο, επίσης μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_1(\beta)$  με πλεγματικές σταθερές  $a=62.3197(6)$  Å,  $b=61.9538$  (4) Å,  $c=47.9180(4)$  Å και  $\beta=111.2516(2)^\circ$ . Ακολούθησε ένα εύρος pH (7.17-7.34) στο οποίο σημειώθηκε συνύπαρξη του κρυσταλλικού πολυμόρφου μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_1(\beta)$  και της αμέσως επόμενης κρυσταλλικής φάσης  $R3$  ρομβοεδρικής συμμετρίας. Προς βασικότερα pH και συγκεκριμένα στο εύρος 7.46-7.79 εμφανίζεται το κρυσταλλικό πολύμορφο ρομβοεδρικής συμμετρίας με πλεγματικές σταθερές  $a=b=79.8890(2)$  Å και  $c=40.7139(2)$  Å, τιμές στις οποίες απαντάται η  $R_6$  μοριακή διαμόρφωση.

## Πολύμορφο Μονοκλινούς Συμμετρίας $P2_1(\gamma)$



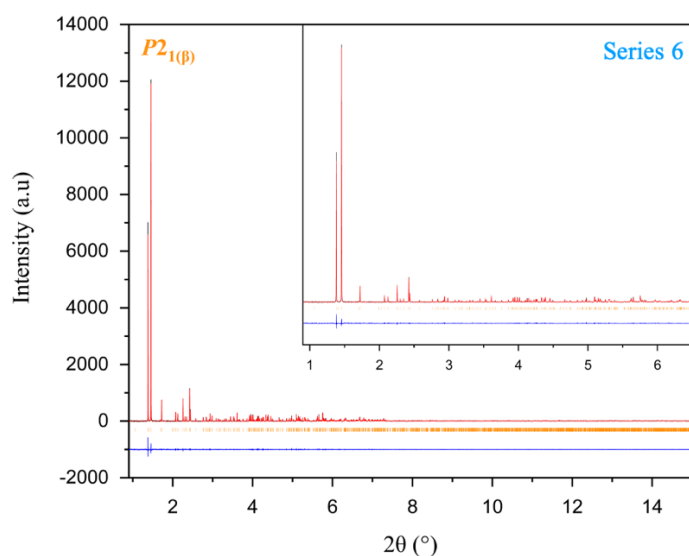
**Εικόνα 2.35.** Διαγραμματική απεικόνιση της ανάλυσης Pawley του μοτίβου περίθλασης του δείγματος mcre65 της ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη m-cresol σε  $\text{pH}_f$  5.81. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι ροζ κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_1(\gamma)$ . Οι πλεγματικές σταθερές όπως προέκυψαν από την ανάλυση είναι  $a=87.331(1)$  Å,  $b=70.3574(8)$  Å,  $c=48.2396(6)$  Å,  $\beta=106.8999(3)^\circ$ , και οι δείκτες αξιοπιστίας  $\chi^2=1.59923$  και  $R_{wp}=3.20\%$ .



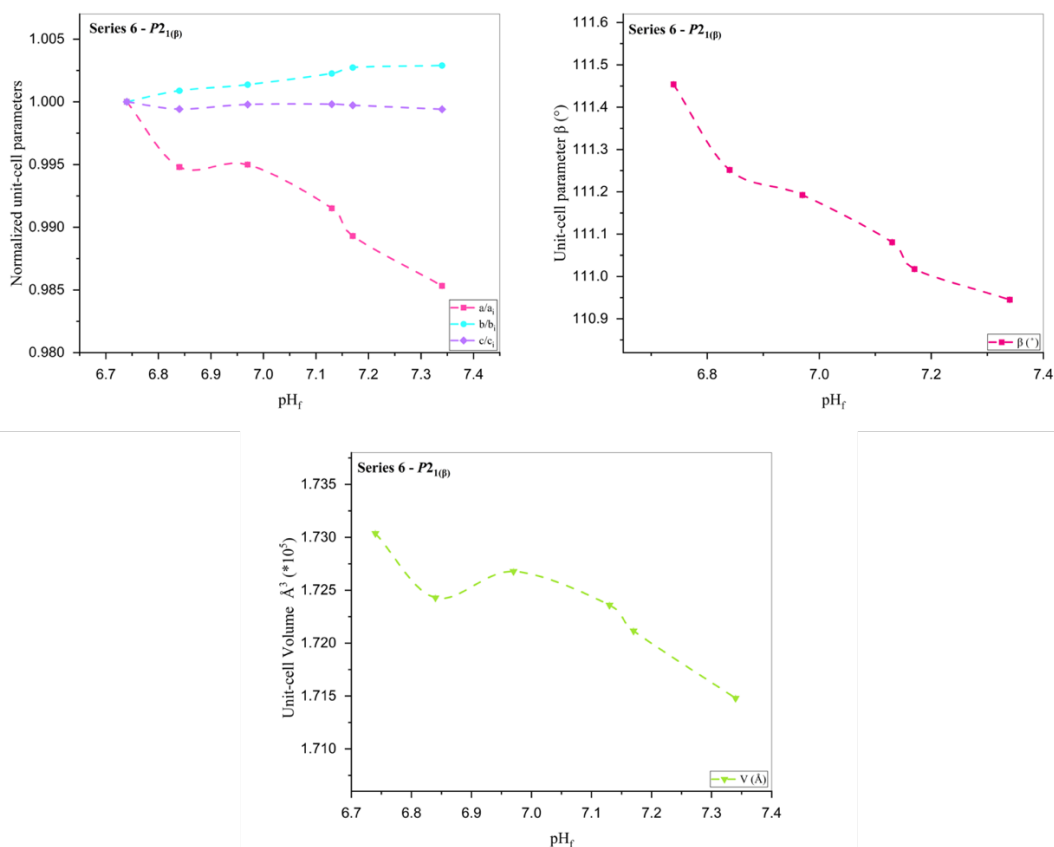
**Εικόνα 2.36.** Στο ανώτερο πάνελ δεξιά παρατίθεται το διάγραμμα των κανονικοποιημένων τιμών των πλεγματικών σταθερών  $a$ ,  $b$ ,  $c$  και στην συνέχεια στα δεξιά το διάγραμμα με τις μη κανονικοποιημένες τιμές της γωνίας  $\beta$ , ενώ στο κάτω πάνελ το διάγραμμα με τις μη κανονικοποιημένες τιμές του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας, όπως προέκυψαν από την Pawley ανάλυση όλων των σετ δεδομένων της σειράς 6 στα οποία απαντάται το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_1(\gamma)$ .



## Πολύμορφο Μονοκλινούς Συμμετρίας $P2_1(\beta)$

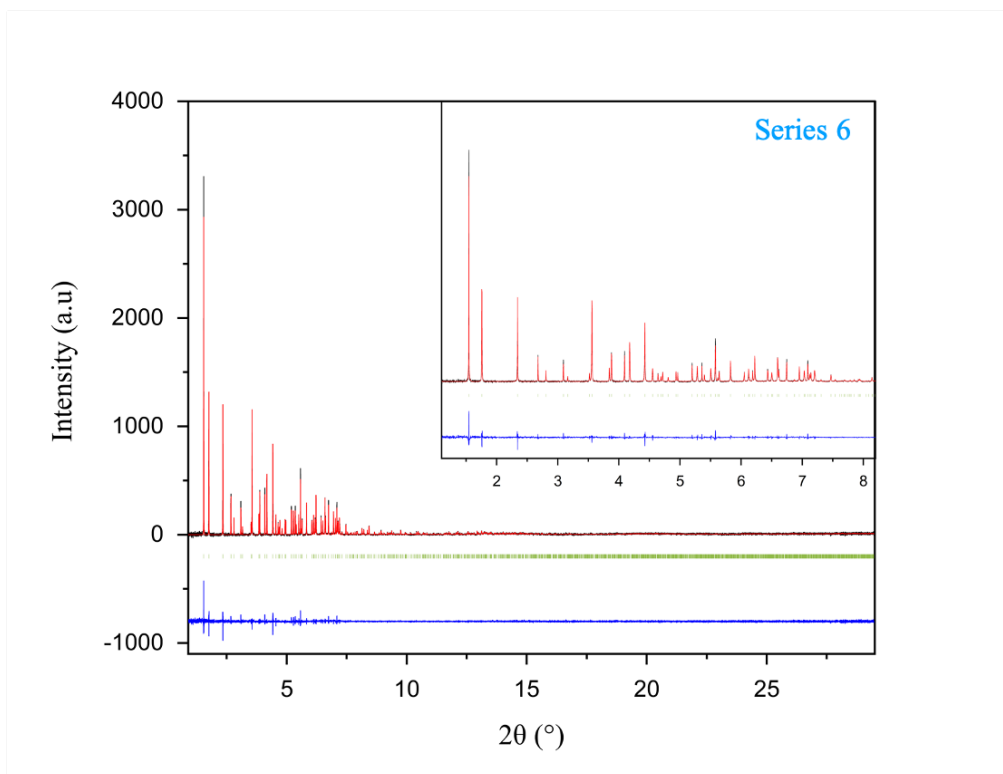


**Εικόνα 2.37.** Διαγραμματική απεικόνιση της ανάλυσης Pawley του μοτίβου περίθλασης του δείγματος mcre614 της ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη m-cresol σε  $\text{pH}_f$  6.97. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι πορτοκαλί κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_1(\beta)$ . Οι πλεγματικές σταθερές όπως προέκυψαν από την ανάλυση είναι  $a=62.3316(5)$  Å,  $b=61.9835(3)$  Å,  $c=47.9359(3)$  Å,  $\beta=111.1924(1)^\circ$ , και οι δείκτες αξιοπιστίας  $\chi^2=1.40762$  και  $R_{wp}=4.69\%$ .

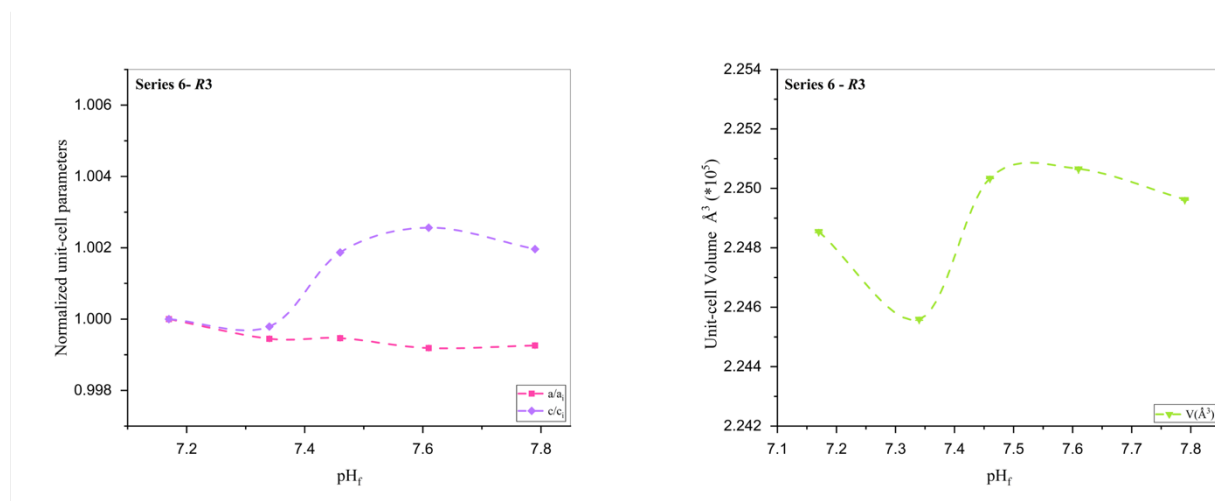


**Εικόνα 2.38.** Στο ανώτερο πάνελ δεξιά παρατίθεται το διάγραμμα των κανονικοποιημένων τιμών των πλεγματικών σταθερών  $a$ ,  $b$ ,  $c$  και στην συνέχεια στα δεξιά το διάγραμμα με τις μη κανονικοποιημένες τιμές της γωνίας  $\beta$ , ενώ στο κάτω πάνελ το διάγραμμα με τις μη κανονικοποιημένες τιμές του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας, όπως προέκυψαν από την Pawley ανάλυση όλων των σετ δεδομένων της σειράς 6 στα οποία απαντάται το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_1(\beta)$ .

## Πολύμορφο Ρομβοεδρικής Συμμετρίας $R3$

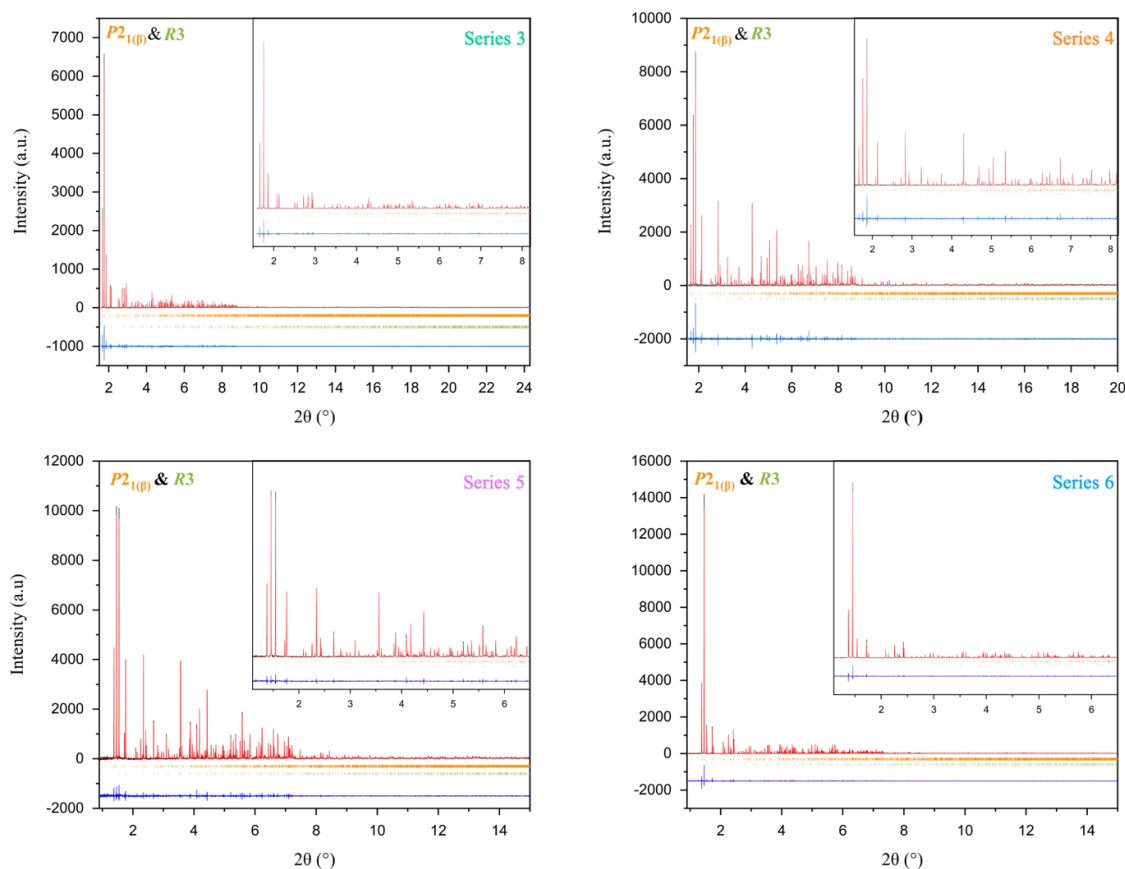


**Εικόνα 2.39.** Διαγραμματική απεικόνιση της ανάλυσης Pawley του μοτίβου περίθλασης του δείγματος mcre620 της ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη m-cresol σε  $\text{pH}_f$  7.79. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι πράσινες κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $R3$ . Οι πλεγματικές σταθερές όπως προέκυψαν από την ανάλυση είναι  $a=b=79.8726(3)$  Å,  $c=40.7178(3)$  Å, και οι δείκτες αξιοπιστίας  $\chi^2=1.44157$  και  $R_{wp}=4.08\%$ .



**Εικόνα 2.40.** Διαγραμματική απεικόνιση στα αριστερά των κανονικοποιημένων τιμών των πλεγματικών σταθερών  $a$ , και  $c$  και ακολούθως στα δεξιά των μη κανονικοποιημένων τιμών του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας, όπως προέκυψαν από την Pawley ανάλυση όλων των σετ δεδομένων της σειράς 6 στα οποία απαντάται το κρυσταλλικό πολύμορφο  $R3$

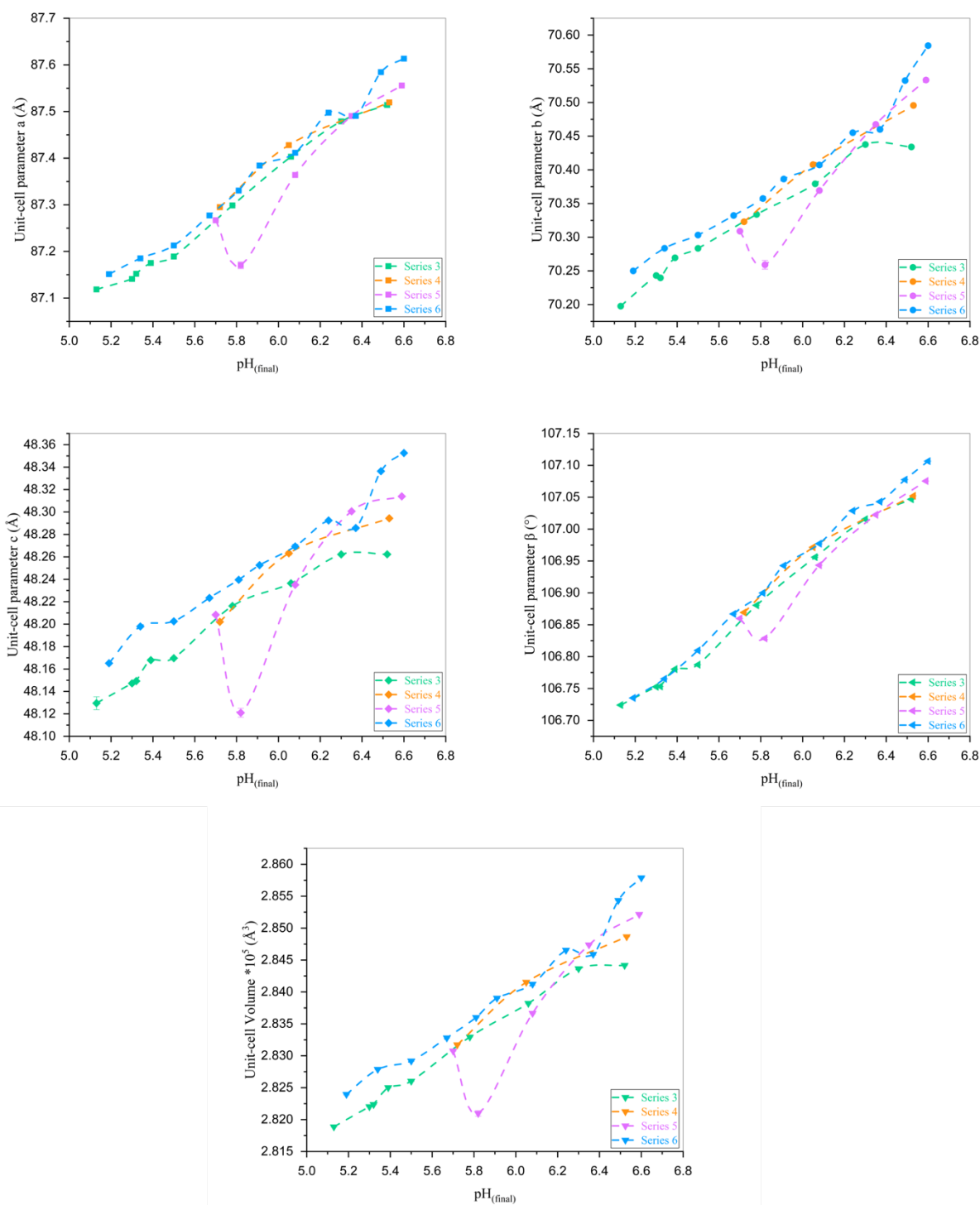
## Συνύπαρξη πολυμόρφων Μονοκλινούς Συμμετρίας $P2_{1(\beta)}$ και Ρομβοεδρικής Συμμετρίας $R3$



**Εικόνα 2.41.** Στο πάνω πάνελ εικόνων (αριστερά) διαγραμματική απεικόνιση της ανάλυσης Pawley του μοτίβου περίθλασης του δείγματος mcre313 της ανθράκινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη m-cresol σε pH<sub>f</sub> 7.13. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι πορτοκαλί κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_{1(\beta)}$ , ενώ οι πράσινες κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $R3$ . Οι πλεγματικές σταθερές, όπως προέκυψαν από την ανάλυση κατά Pawley για το πολύμορφο  $P2_{1(\beta)}$  είναι  $a=62.1669(2)$  Å,  $b=62.0467(1)$  Å,  $c=47.9227(2)$  Å,  $\beta=111.0125(1)^\circ$ , ενώ για το πολύμορφο  $R3$  οι πλεγματικές σταθερές, όπως προέκυψαν από την ανάλυση είναι  $a=b=79.9321(4)$  Å,  $c=40.6095(4)$  Å, και οι δείκτες αξιοπιστίας  $\chi^2=1.46079$  και  $R_{wp}=5.13\%$ . Στο πάνω πάνελ εικόνων (δεξιά) ανάλυση κατά Pawley του μοτίβου περίθλασης του δείγματος mcre414 της ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη m-cresol σε pH<sub>f</sub> 7.30. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι πορτοκαλί κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_{1(\beta)}$ , ενώ οι πράσινες κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $R3$ . Οι πλεγματικές σταθερές, όπως προέκυψαν από την ανάλυση για το πολύμορφο  $P2_{1(\beta)}$  είναι  $a=61.6221(6)$  Å,  $b=62.0616(3)$  Å,  $c=47.8660(4)$  Å,  $\beta=^\circ$ , ενώ για το πολύμορφο  $R3$  οι πλεγματικές σταθερές, όπως προέκυψαν από την ανάλυση κατά Pawley είναι  $a=b=79.8112(2)$  Å,  $c=40.5498(2)$  Å, και οι δείκτες αξιοπιστίας  $\chi^2=1.3436$  και  $R_{wp}=5.99\%$ .

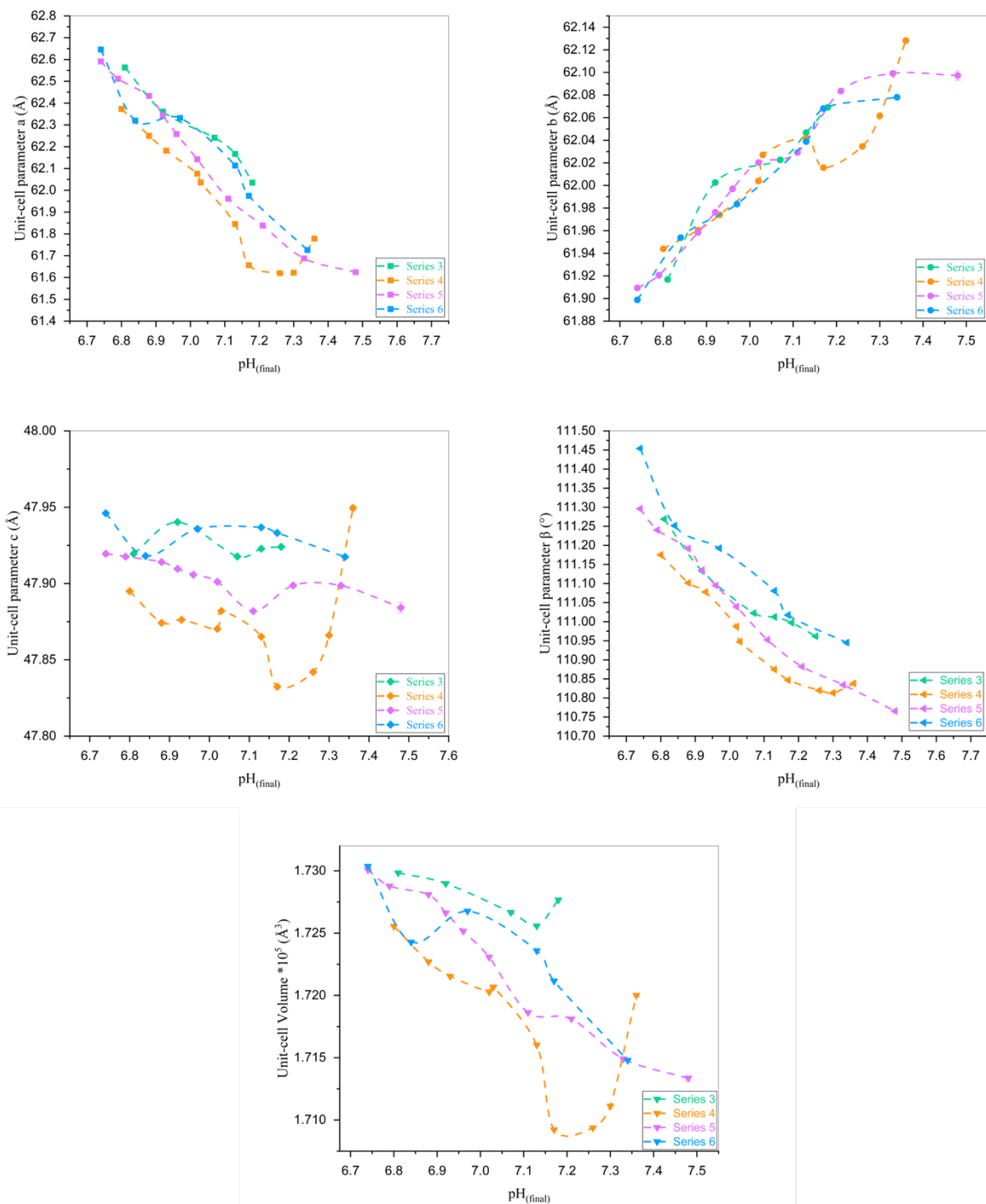
Στο κάτω πάνελ εικόνων (αριστερά) ανάλυση κατά Pawley του μοτίβου περίθλασης του δείγματος mcre513 της ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη m-cresol σε pH<sub>f</sub> 7.21. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι πορτοκαλί κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_{1(\beta)}$ , ενώ οι πράσινες κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $R3$ . Οι πλεγματικές σταθερές, όπως προέκυψαν από την ανάλυση κατά Pawley για το πολύμορφο  $P2_{1(\beta)}$  είναι  $a=61.8384(7)$  Å,  $b=62.0836(5)$  Å,  $c=47.8987(5)$  Å,  $\beta=110.8822(2)^\circ$ , ενώ για το πολύμορφο  $R3$  οι πλεγματικές σταθερές, όπως προέκυψαν από την ανάλυση κατά Pawley είναι  $a=b=79.8531(3)$  Å,  $c=40.6420(3)$  Å, και οι δείκτες αξιοπιστίας  $\chi^2=1.59878$  και  $R_{wp}=4.49\%$ . Στο κάτω πάνελ εικόνων (δεξιά) ανάλυση του μοτίβου περίθλασης του δείγματος mcre616 της ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη m-cresol σε pH<sub>f</sub> 7.17. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι πορτοκαλί κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $P2_{1(\beta)}$ , ενώ οι πράσινες κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $R3$ . Οι πλεγματικές σταθερές, όπως προέκυψαν από την ανάλυση για το πολύμορφο  $P2_{1(\beta)}$  είναι  $a=61.9749(2)$  Å,  $b=62.0681(2)$  Å,  $c=47.9332(2)$  Å,  $\beta=111.0174(7)^\circ$ , ενώ για το πολύμορφο  $R3$  οι πλεγματικές σταθερές, όπως προέκυψαν από την ανάλυση κατά Pawley είναι  $a=b=79.9318(5)$  Å,  $c=40.6379(5)$  Å, και οι δείκτες αξιοπιστίας  $\chi^2=1.61464$  και  $R_{wp}=4.08\%$ .

Πολύμορφο Μονοκλινούς Συμμετρίας  $P2_1(\gamma)$  συνδυαστικά από τις σειρές S3, S4, S5, S6.



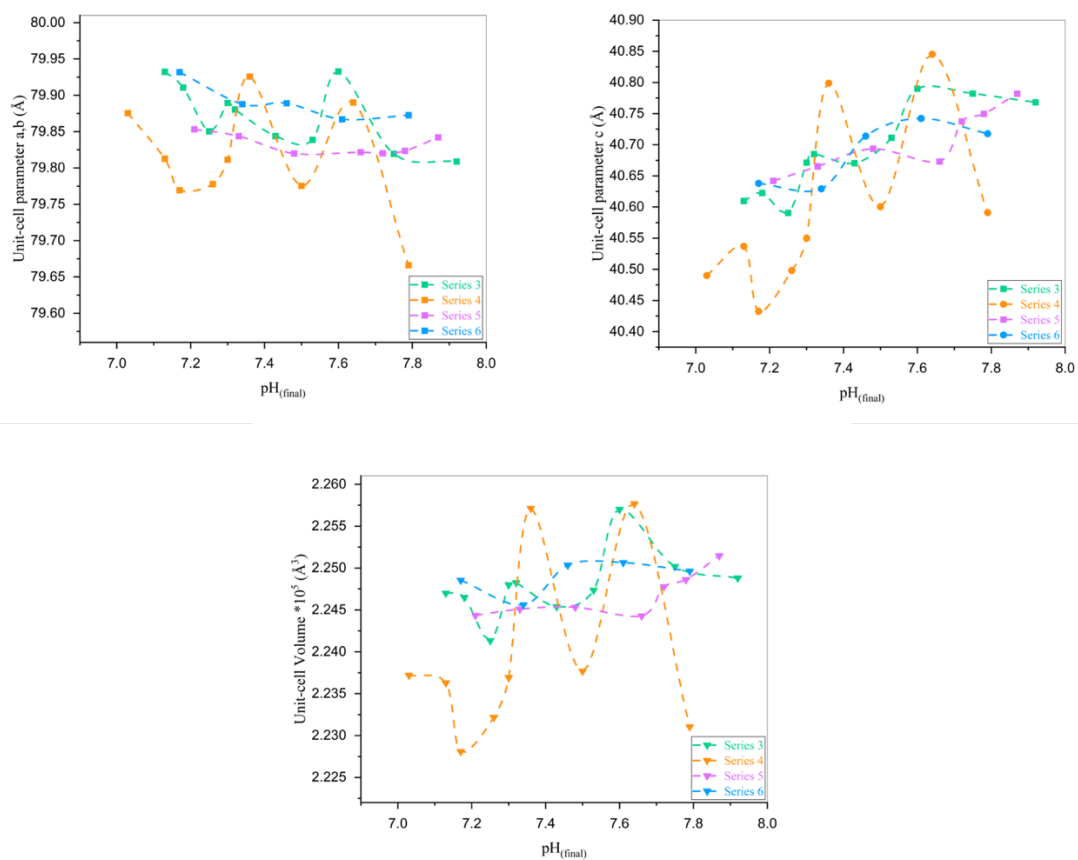
**Εικόνα 2.42.** Μη κανονικοποιημένες οι τιμές των πλεγματικών σταθερών  $a$ ,  $b$ ,  $c$ , της γωνίας  $\beta$ , καθώς και του όγκου  $V$ , των σειρών 3, 4, 5 και 6 για το πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_1(\gamma)$ .

Πολύμορφο Μονοκλινούς Συμμετρίας  $P2_1(\beta)$  συνδυαστικά από τις σειρές S3, S4, S5, S6.



**Εικόνα 2.43.** Μη κανονικοποιημένες οι τιμές των πλεγματικών σταθερών *a*, *b*, *c*, της γωνίας  $\beta$ , καθώς και του όγκου *V*, των σειρών 3, 4, 5 και 6 για το πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_1(\beta)$ .

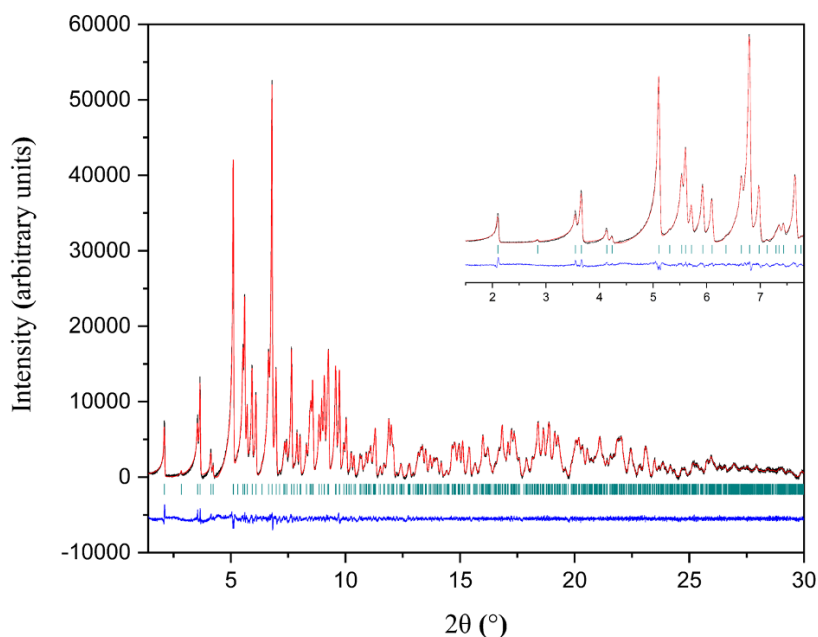
Πολύμορφο Ρομβοεδρικής Συμμετρίας R3 συνδυαστικά από τις σειρές S3, S4, S5, S6.



**Εικόνα 2.44.** Μη κανονικοποιημένες οι τιμές των πλεγματικών σταθερών  $a$  και  $c$ , καθώς και του όγκου  $V$ , των σειρών 3, 4, 5 και 6 για το πολύμορφο ρομβοεδρικής συμμετρίας R3.

## 2.5.2 Πολυμορφισμός της ανθρώπινης ινσουλίνης απουσία προσδέτη με $\text{pH}_{(\text{initial})}$ 5.50

Ο πολυμορφισμός της ανθρώπινης ινσουλίνης απουσία προσδέτη και σε αρχικό  $\text{pH}$  5.50, μελετήθηκε σε δύο σειρές *in situ* κρυσταλλογραφικών πειραμάτων μεταβαλλόμενης σχετικής υγρασίας, με κάθε σειρά να περιλαμβάνει δύο κύκλους αφυδάτωσης και επανενυδάτωσης του δείγματος. Στο συγκεκριμένο  $\text{pH}$  εμφανίζεται το κρυσταλλικό πολύμορφο ρομβοεδρικής συμμετρίας  $R3$ , μοριακής διαμόρφωσης  $T_6$ . Για την επιβεβαίωση πως έχει κρυσταλλωθεί το πολύμορφο στόχος προηγήθηκε μία μέτρηση σε capillary και η πρωταρχική ανάλυση των δεδομένων περίθλασης απέδωσαν την ύπαρξη του επιθυμητού κρυσταλλικού πολυμόρφου.

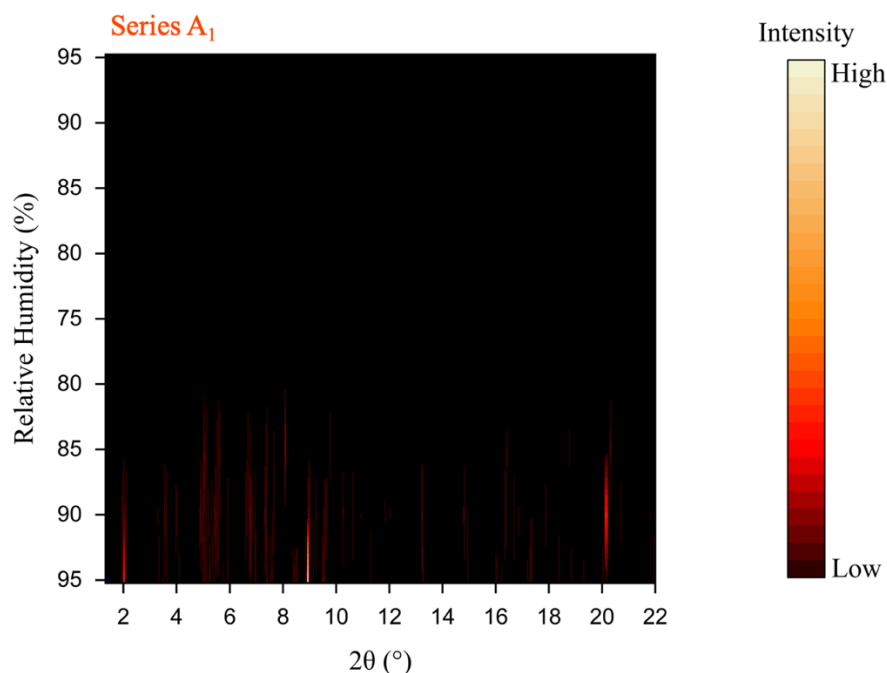


**Εικόνα 2.45.** Διαγραμματική απεικόνιση της ανάλυσης Pawley του μοτίβου περίθλασης του δείγματος HI\_nI\_T6 της ανθρώπινης ινσουλίνης κρυσταλλωμένης απουσία προσδέτη σε  $\text{pH}$  6.07. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι τικκουάζ κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $R3$  μοριακής διαμόρφωσης  $T_6$ . Οι πλεγματικές σταθερές όπως προέκυψαν από την ανάλυση κατά Pawley είναι  $a=b=82.9470(5)$  Å,  $c=34.0303(3)$  Å, και οι δείκτες αξιοπιστίας  $\chi^2=1.64509$  και  $R_{wp}=1.11\%$ .

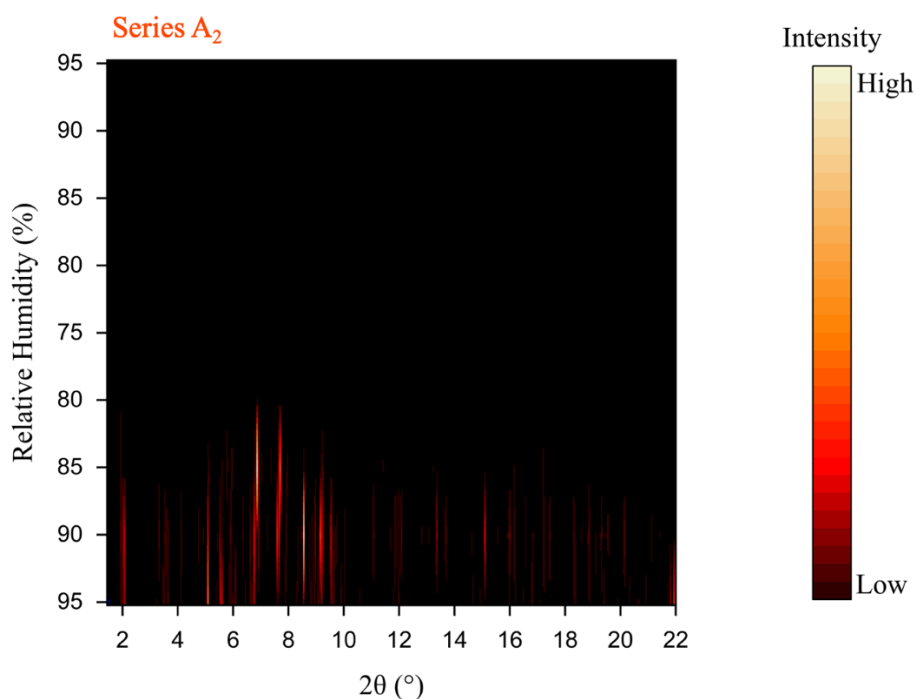
Η δεικτοδότηση και η ανάλυση κατά Pawley, επιβεβαίωσαν το κρυσταλλικό πολύμορφο ρομβοεδρικής συμμετρίας  $R3$  και οι πλεγματικές σταθερές της μοναδιαίας κυψελίδας, όπως προέκυψαν από την πρωταρχική ανάλυση είναι  $a=b=82.9470(5)$  και  $c=34.0300(3)$ , τιμές πλεγματικών στις οποίες απαντάται η μοριακή διαμόρφωση  $T_6$ .

Αμέσως μετά την επιβεβαίωση του κρυσταλλικού πολυμόρφου στόχου, ακολούθησαν οι δύο σειρές πειραμάτων περίθλασης υπό μεταβαλλόμενη σχετική υγρασία. Ωστόσο, το δείγμα έχασε την κρυσταλλικότητα του, ήδη, από τα πρώτα τρία επίπεδα υγρασίας της αφυδάτωσης, ώστε μέχρι το 80% να μην λαμβάνεται καμία ένταση, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από τις δύο σειρές πειραμάτων. Οι δύο κύκλοι αφυδάτωσης και ενυδάτωσης αποσκοπούσαν στο να εξεταστεί ενδεχόμενη επανάκαμψη του κρυστάλλου, γεγονός που δεν επιβεβαιώθηκε. Οι μεταβολές των εντάσεων του κρυσταλλικού πολυμόρφου που εξετάστηκε, ως προς τις διαφορετικές τιμές σχετικής υγρασίας, δύναται να αποδοθούν σε ένα διάγραμμα επιφανείας (*surface plot*), το οποίο αποτελεί μία κάτοψη των εντάσεων διαδοχικών μοτίβων περίθλασης συναρτήσει της γωνίας  $2\theta$  (Εικόνες 2.50, 2.51, 2.52, 2.53). Ακολουθούν τα διαγράμματα επιφανείας των και των δύο σειρών, περιλαμβάνοντας τα τέσσερα

πρώτα επίπεδα αφυδάτωσης, δεδομένου ότι μετά το 80%, όπως διαφαίνεται δεν λαμβάνεται σήμα περίθλασης.

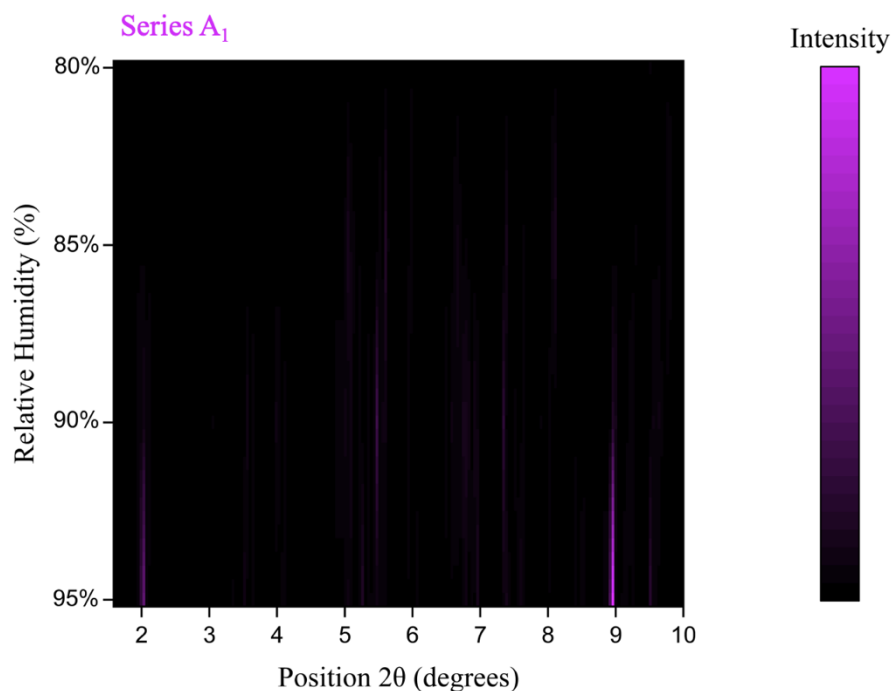


**Εικόνα 2.46.** Διάγραμμα επιφανείας δεδομένων XRPD δειγμάτων ινσουλίνης απουσία προσδέτη της A<sub>1</sub> Σειράς του πρώτου κύκλου συλλογής δεδομένων. Κατά σειρά ελαττούμενης σχετικής υγρασίας παρατηρείται προοδευτική μείωση των εντάσεων, ενώ από το 80% RH παύει να λαμβάνεται σήμα περίθλασης. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στον θάλαμο υγρασίας MHC-trans του εργαστηριακού περιθλασιμέτρου ( $\lambda=1.540585$  (3) Å).

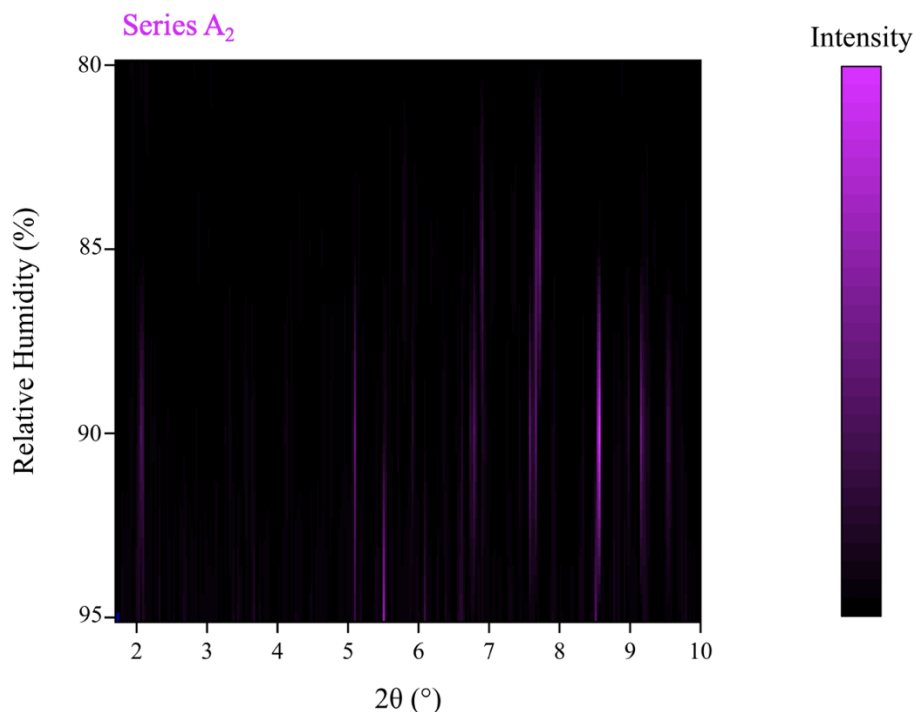


**Εικόνα 2.47.** Διάγραμμα επιφανείας δεδομένων XRPD δειγμάτων ινσουλίνης απουσία προσδέτη της A<sub>2</sub> Σειράς του πρώτου κύκλου συλλογής δεδομένων. Κατά σειρά ελαττούμενης σχετικής υγρασίας παρατηρείται προοδευτική μείωση των εντάσεων, ενώ από το 80% RH παύει να λαμβάνεται σήμα περίθλασης. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στον θάλαμο υγρασίας MHC-trans του εργαστηριακού περιθλασιμέτρου ( $\lambda=1.540585$  (3) Å).





**Εικόνα 2.48.** Διάγραμμα επιφανείας δεδομένων XRPD δειγμάτων ινσουλίνης απουσία προσδέτη της  $A_1$  Σειράς, μόνο για τα τέσσερα πρώτα επίπεδα της αφυδάτωσης του πρώτου κύκλου. Κατά σειρά ελαττούμενης σχετικής υγρασίας παρατηρείται προοδευτική μείωση των εντάσεων, μέχρι που στο 80% RH δεν λαμβάνεται, πλέον, σήμα περίθλασης. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στον θάλαμο υγρασίας MHC-trans του εργαστηριακού περιθλασιμέτρου ( $\lambda=1.540585$  (3) Å).



**Εικόνα 2.49.** Διάγραμμα επιφανείας δεδομένων XRPD δειγμάτων ινσουλίνης απουσία προσδέτη της  $A_2$  Σειράς μόνο για τα τέσσερα πρώτα επίπεδα της αφυδάτωσης του πρώτου κύκλου.. Κατά σειρά ελαττούμενης σχετικής υγρασίας παρατηρείται προοδευτική μείωση των εντάσεων, μέχρι που στο 80% RH δεν λαμβάνεται, πλέον, σήμα περίθλασης. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στον θάλαμο υγρασίας MHC-trans του εργαστηριακού περιθλασιμέτρου ( $\lambda=1.540585$  (3) Å).

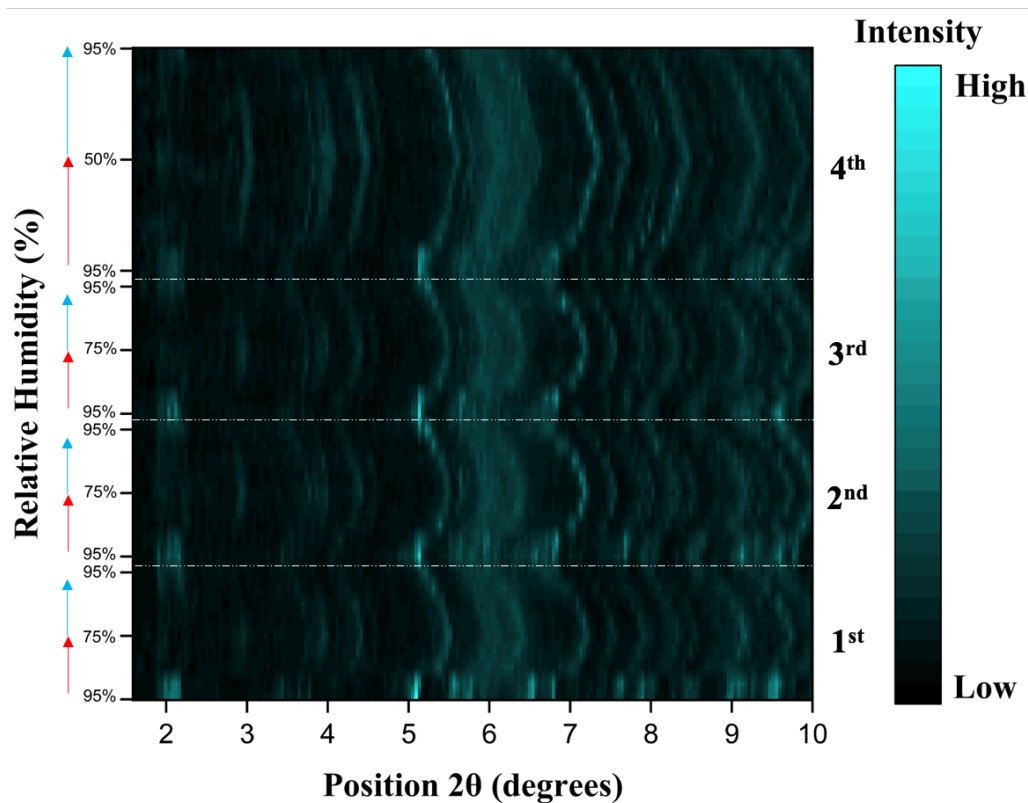
### 2.5.3 Πολυμορφισμός της ανθρώπινης ινσουλίνης απουσία προσδέτη με $\text{pH}_{(\text{initial})}$ 7.00

Ο πολυμορφισμός της ανθρώπινης ινσουλίνης απουσία προσδέτη και σε αρχικό  $\text{pH}$  7.00, μελετήθηκε σε δύο σειρές *in situ* κρυσταλλογραφικών πειραμάτων μεταβαλλόμενης σχετικής υγρασίας, με κάθε σειρά να περιλαμβάνει τέσσερις κύκλους αφυδάτωσης και επανενυδάτωσης του δείγματος. Στο συγκεκριμένο  $\text{pH}$  εμφανίζεται, συνήθως, το κρυσταλλικό πολύμορφο ρομβοεδρικής συμμετρίας  $R3$ , μοριακής διαμόρφωσης  $T_3R_3^f$ .

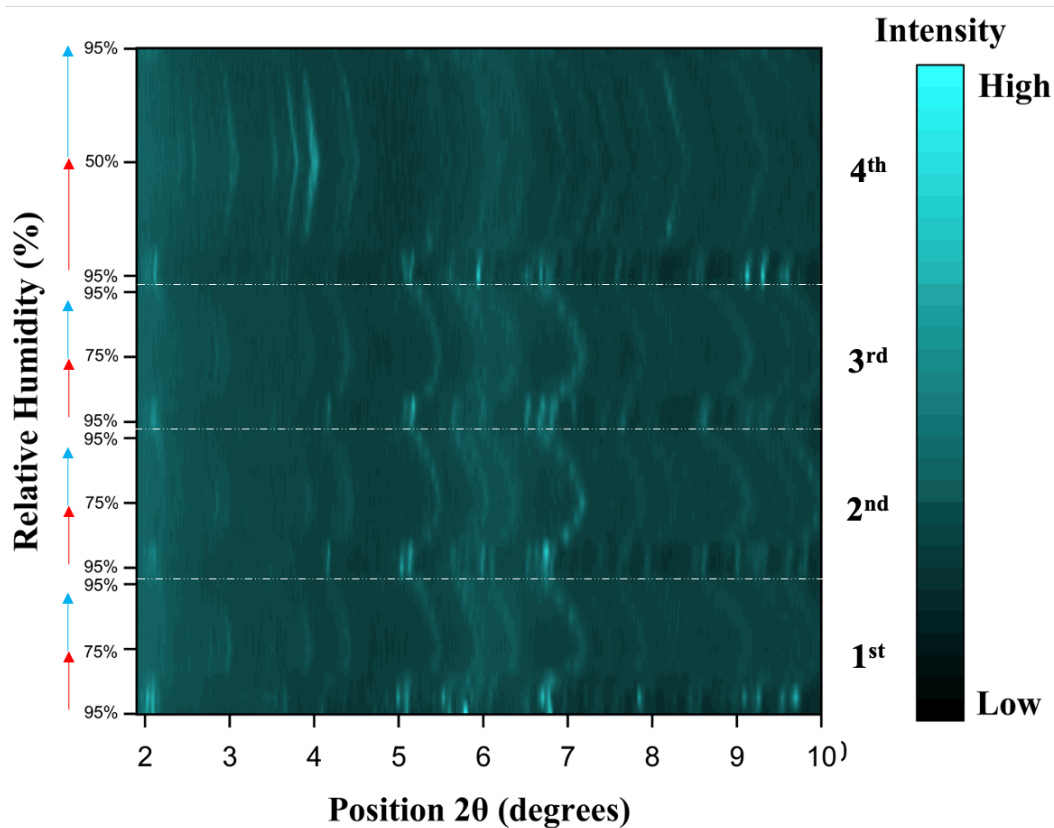
Για το συγκεκριμένο πειραματικό μέρος δεν ήταν εφικτές μετρήσεις σε *capillary*, λόγω βλάβης του περιθλασιμέτρου στην διάταξη του *capillary mode*, με αποτέλεσμα να προχωρήσει το πείραμα απευθείας στην κρυσταλλογραφική μελέτη υπό μεταβαλλόμενη σχετική υγρασία. Το γεγονός αυτό δυσκόλεψε αρκετά την ανάλυση, καθώς αποδείχθηκε στην πορεία της ανάλυσης πως υπήρξε συνύπαρξη δύο φάσεων. Με βεβαιότητα βρέθηκε το κρυσταλλικό πολύμορφο ρομβοεδρικής συμμετρίας  $R3$  και μοριακής διαμόρφωσης  $T_3R_3^f$ , ενώ για την δεύτερη συνυπάρχουσα κρυσταλλική φάση, η οποία ήταν υπαρκτή σε μικρότερο ποσοστό στην πρώτη σειρά και σε μεγαλύτερο στην δεύτερη, τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι πρόκειται για το, επίσης, ρομβοεδρικής συμμετρίας κρυσταλλικό πολύμορφο, αλλά μοριακής διαμόρφωσης  $T_6$ . Η ισχυρότερη ένδειξη πως πρόκειται για την φάση  $R3$ , διαμόρφωσης  $T_6$  είναι πως η πλειονότητα των εντάσεων της συνυπάρχουσας φάσης εξαφανίζονται κάτω από το επίπεδο σχετικής υγρασίας 80%, όπως ακριβώς επιβεβαιώθηκε από το προαναφερθέν πείραμα. Όταν επιδιορθώθηκε η βλάβη επαναλήφθηκε σε ένα Erppendorf η συνθήκη και μετά την ολοκλήρωση του πειράματος περίθλασης και της ανάλυσης κατά Pawley αποδείχθηκε πως, όντως, στο συγκεκριμένο  $\text{pH}$  συνυπάρχουν δύο ειδών κρυσταλλικά πολύμορφα ρομβοεδρικής συμμετρίας, αλλά σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις, την  $R3(T_3R_3^f)$  και την  $R3(T_6)$ .

Η ανάλυση κατά Pawley, επειδή, ακριβώς, υπήρχε συνυπάρχουσα φάση, πραγματοποιήθηκε σε στάδια ανιχνεύοντας πρώτα τις κορυφές που ανήκουν στο κρυσταλλικό πολύμορφο ρομβοεδρικής συμμετρίας  $R3$  και μοριακής διαμόρφωσης  $T_3R_3^f$ , από μοτίβα περίθλασης από παρελθοντικά δεδομένα προερχόμενα μόνο από την συγκεκριμένη φάση και μετά ακολούθησε η προσπάθεια η ταύτιση της θεωρητικής γραφικής παράστασης, να γίνει μόνο για τις επιλεγμένες πειραματικές εντάσεις. Με αυτόν τον τρόπο ήταν εφικτή η εύρεση των πλεγματικών σταθερών που αφορούσαν μόνο την φάση που ήταν ο αρχικός στόχος και την εξαγωγή συμπερασμάτων για την επίδραση που είχε η υγρασία στο συγκεκριμένο πολύμορφο.

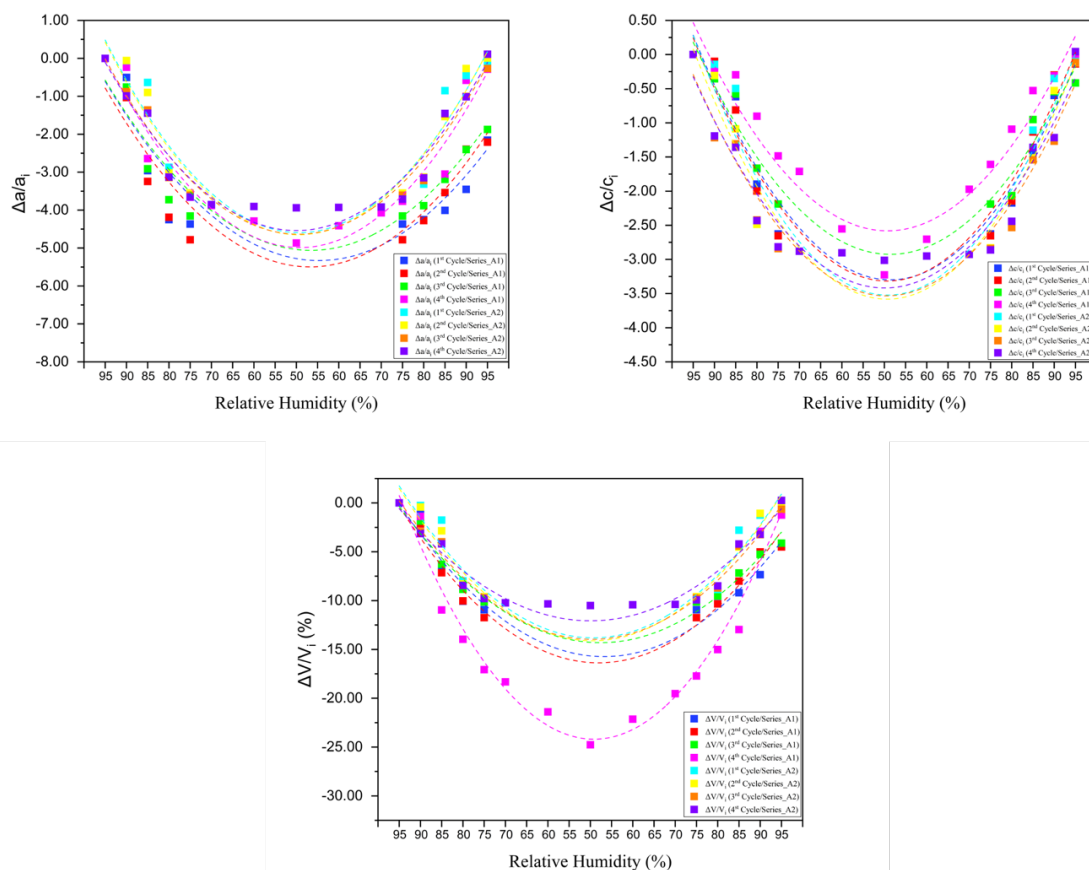
Η επίδραση της υγρασίας στο κρυσταλλικό πολύμορφο που εξετάστηκε ως προς τις διαφορετικές τιμές σχετικής υγρασίας αποδίδεται για κάθε σειρά σε ένα διάγραμμα επιφανείας (*surface plot*), το οποίο αποτελεί μία κάτοψη των εντάσεων διαδοχικών μοτίβων περίθλασης συναρτήσει της γωνίας  $2\theta$ , όπου περιλαμβάνει όλους του κύκλους μεταβολών της σχετικής υγρασίας που υποβλήθηκε το δείγμα (Εικόνες 2.54, 2.55).



**Εικόνα 2.50.** Διάγραμμα επιφανείας δεδομένων XRPD δειγμάτων ινσουλίνης απουσία προσδέτη της Α<sub>1</sub> Σειράς. Στον άξονα y παρατίθενται κατά σειρά όλοι οι κύκλοι αφυδάτωσης και ενυδάτωσης της σειράς. Η συλλογή δεδομένων έγινε στον θάλαμο υγρασίας MHC-trans του εργαστηριακού περιθλασιμέτρου ( $\lambda=1.540585$  (3) Å).



**Εικόνα 2.51.** Διάγραμμα επιφανείας δεδομένων XRPD δειγμάτων ινσουλίνης απουσία προσδέτη της Α<sub>2</sub> Σειράς. Στον άξονα y παρατίθενται κατά σειρά όλοι οι κύκλοι αφυδάτωσης και ενυδάτωσης της σειράς. Η συλλογή δεδομένων έγινε στον θάλαμο υγρασίας MHC-trans του εργαστηριακού περιθλασιμέτρου ( $\lambda=1.540585$  (3) Å).

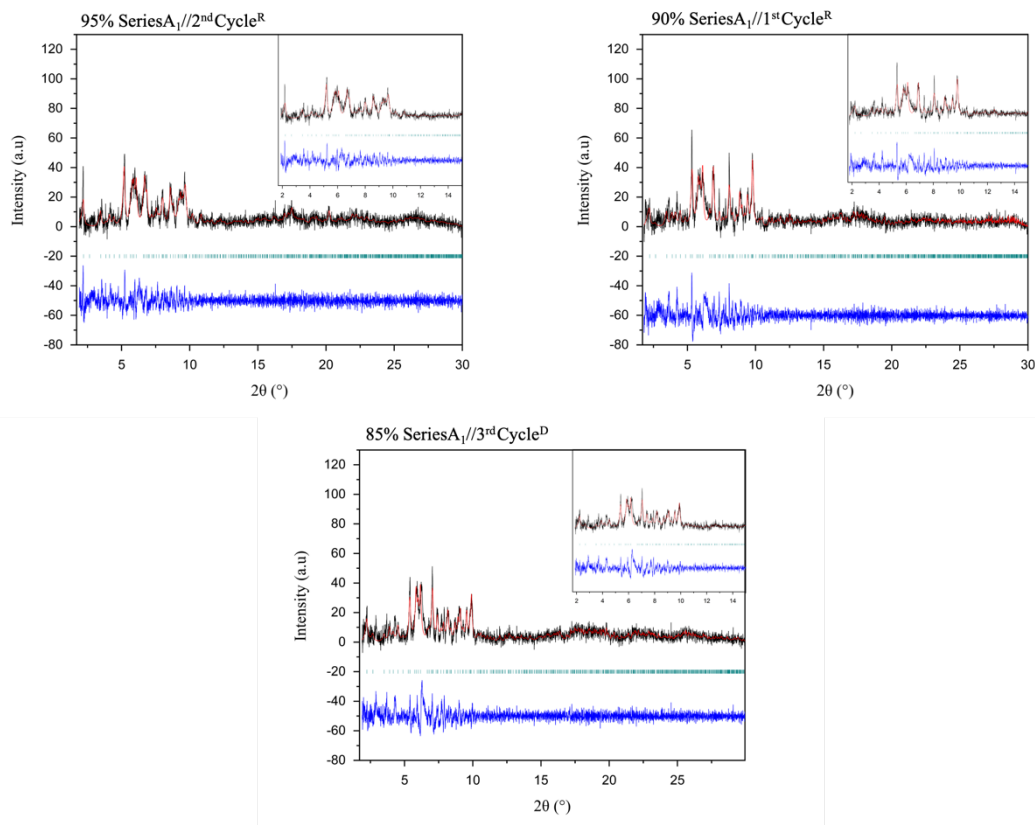


**Εικόνα 2.52.** Διαγράμματα των επί τοις % μεταβολών των πλεγματικών σταθερών  $\Delta a/a_i$  (πάνω αριστερά),  $\Delta c/c_i$  (πάνω δεξιά), καθώς και του όγκου  $\Delta V/V_i$  (κάτω) για τους τέσσερις κύκλους ομαλής μεταβολής της σχετικής υγρασίας και των δυο σειρών  $A_1$  και  $A_2$ .

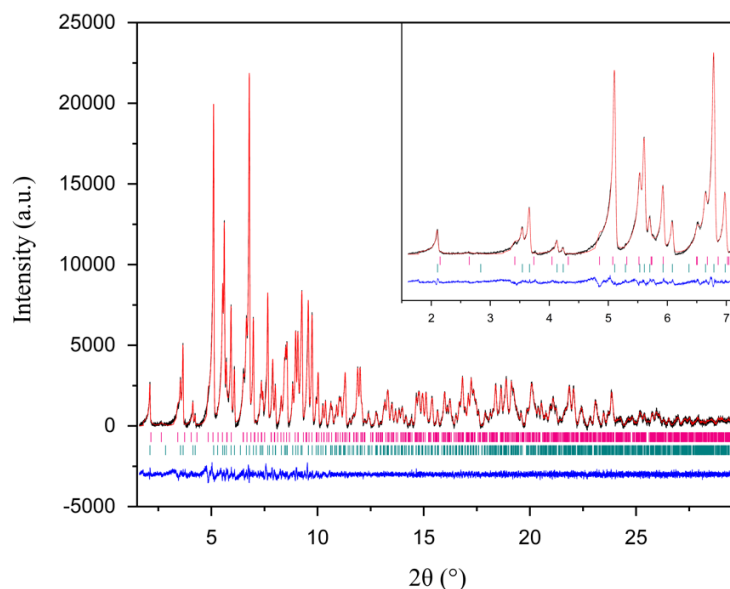
**Πίνακας 2.12.** Οι επί τοις % μεταβολές  $[(x_i - x_1)/x_1 \cdot 100\%]$  των πλεγματικών σταθερών  $\Delta a/a_i$ ,  $\Delta c/c_i$  και  $\Delta V/V_i$ , που σημειώνονται κατά την αφυδάτωση των τεσσάρων κύκλων ομαλής μεταβολής της σχετικής υγρασίας κάθε σειράς.

| Σειρά | Κύκλος                    | $\Delta a/a_i$ (%) | $\Delta c/c_i$ (%) | $\Delta V/V_i$ (%) |
|-------|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| $A_1$ | 1 <sup>ος</sup> (95%→75%) | - 4.37             | - 2.63             | -10.94             |
|       | 2 <sup>ος</sup> (95%→75%) | - 4.78             | - 2.65             | - 11.74            |
|       | 3 <sup>ος</sup> (95%→75%) | - 4.16             | - 2.19             | - 10.15            |
|       | 4 <sup>ος</sup> (95%→50%) | - 4.87             | - 3.23             | - 24.76            |
| $A_2$ | 1 <sup>ος</sup> (95%→75%) | - 3.63             | - 2.83             | - 9.75             |
|       | 2 <sup>ος</sup> (95%→75%) | - 3.54             | - 2.83             | - 9.61             |
|       | 3 <sup>ος</sup> (95%→75%) | - 3.61             | - 2.84             | -9.73              |
|       | 4 <sup>ος</sup> (95%→50%) | - 3.94             | - 3.02             | - 10.51            |

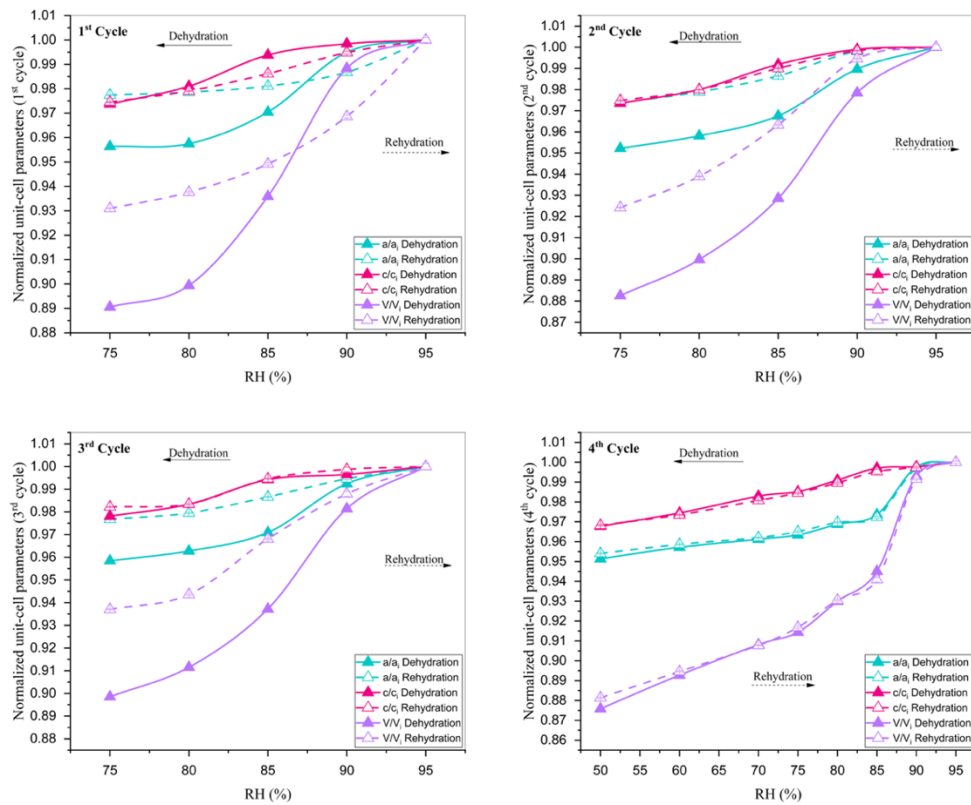
Η ανάλυση Pawley, επέτρεψε την εύρεση των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας σε κάθε επίπεδο υγρασίας και από την συγκέντρωση των αποτελεσμάτων από όλους τους κύκλους της ομαλής αφυδάτωσης και επανενυδάτωσης προκύπτει ότι η αφυδάτωση επιδρά σημαντικά στην μοναδιαία κυψελίδα προκαλώντας την σμίκρυνση αυτής. Εντούτοις, κατά την επανενυδάτωση του δείγματος η μοναδιαία κυψελίδα φαίνεται να επανακάμπτει, αλλά μόνο μερικώς. Στις γενικότερες παρατηρήσεις τόσο ο άξονας  $a$ , όσο και ο άξονας  $c$  φαίνεται να παρουσιάζουν παρόμοιο ποσοστό μεταβολής από τον έναν κύκλο στον επόμενο κατά την αφυδάτωση, με την μεγαλύτερη ποσοστιαία μεταβολή και στις δύο σειρές να σημειώνεται στην αφυδάτωση του τέταρτου κύκλου.



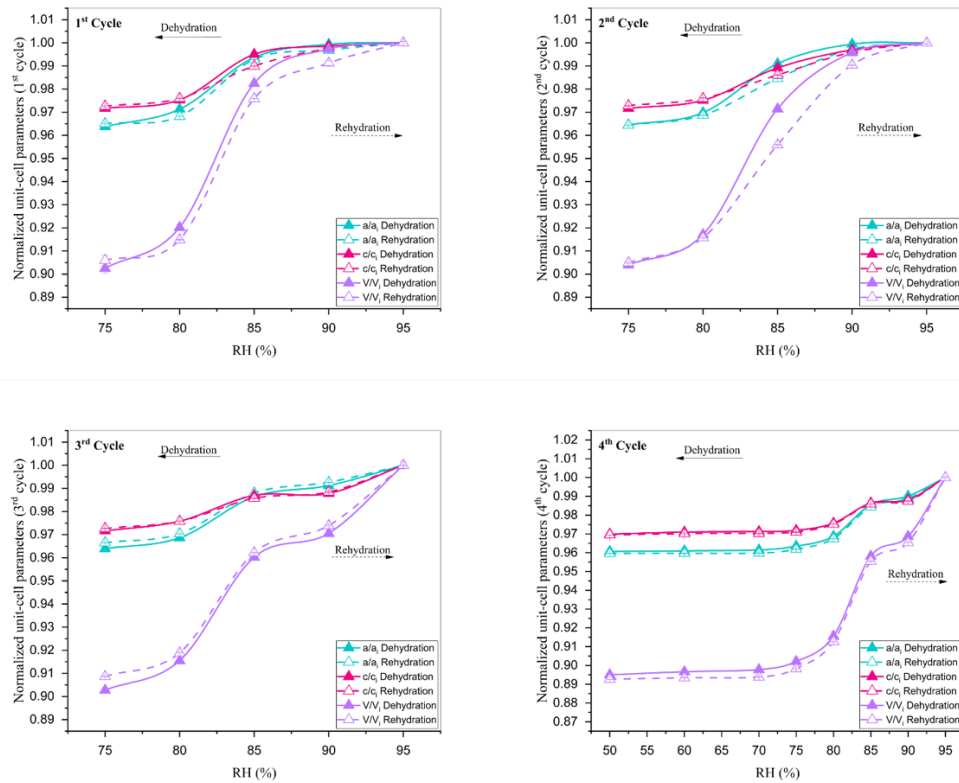
**Εικόνα 2.53.** Διαγράμματα Pawley των δεδομένων XRPD της Ανθρώπινης Ινσουλίνης για ενδεικτικά επίπεδα υγρασίας. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι σκούρες πράσινες κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $R3(T_3R_3^f)$ .



**Εικόνα 2.54.** Διάγραμμα Pawley του μοτίβου περίθλασης του δείγματος επαλήθευσης της ανθρώπινης ινσουλίνης απουσία προσδέτη σε pH<sub>i</sub> 7.00 και pH<sub>f</sub> 6.93. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι ροζ κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $R3$ , μοριακής διαμόρφωσης ( $T_3R_3^f$ ), ενώ οι πράσινες κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο  $R3(T_6)$ . Οι πλεγματικές σταθερές, όπως προέκυψαν από την ανάλυση κατά Pawley για το πολύμορφο  $R3$  ( $T_3R_3^f$ ), είναι  $a=b=81.2951(5)\text{\AA}$ ,  $c=37.4986(2)\text{\AA}$ , ενώ για το πολύμορφο  $R3(T_6)$  οι πλεγματικές σταθερές, όπως προέκυψαν από την ανάλυση είναι  $a=b=82.9299(6)\text{\AA}$ ,  $c=34.1611(4)\text{\AA}$ , και οι δείκτες αξιοπιστίας  $\chi^2=1.43516$  και  $R_{wp}=1.33\%$ .



**Εικόνα 2.55.** Διαγράμματα μεταβολής των κανονικοποιημένων πλεγματικών σταθερών  $a/a_i$ ,  $c/c_i$  και  $V/V_i$  ανά κύκλο τόσο κατά την αφυδάτωση όσο και κατά την ενυδάτωση των τεσσάρων κύκλων ομαλής μεταβολής της σχετικής υγρασίας της σειράς  $A_1$ . Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε ως προς το 95% της αφυδάτωσης για τα επίπεδα RH της αφυδάτωσης και ως προς το 95% της ενυδάτωσης για τα επίπεδα RH της ενυδάτωσης.



**Εικόνα 2.56.** Διαγράμματα μεταβολής των κανονικοποιημένων πλεγματικών σταθερών  $a/a_i$ ,  $c/c_i$  και  $V/V_i$  ανά κύκλο τόσο κατά την αφυδάτωση όσο και κατά την ενυδάτωση των τεσσάρων κύκλων ομαλής μεταβολής της σχετικής υγρασίας της σειράς  $A_2$ . Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε ως προς το 95% της αφυδάτωσης για τα επίπεδα RH της αφυδάτωσης και ως προς το 95% της ενυδάτωσης για τα επίπεδα RH της ενυδάτωσης.

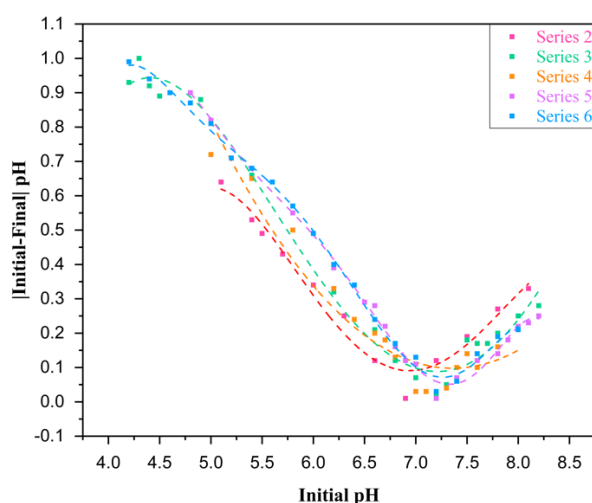
## 2.6 Συμπεράσματα

Η ανθρώπινη ινσουλίνη είναι μία πρωτεΐνη που έχει μελετηθεί εκτενώς και συνεχίζει να αποτελεί αντικείμενο εντατικής μελέτης για την ερευνητική ομάδα Βιοχημείας, Δομικής Βιολογίας και Κρυσταλλογραφίας Ακτίνων-Χ, ενώ, μάλιστα, έχει δημιουργηθεί ένας χάρτης πολυμόρφων συναρτήσει της μεταβλητής παραμέτρου του pH για κάθε προσδέτη που έχει μελετηθεί, και ο οποίος ανανεώνεται διαρκώς. Η αναζήτηση, βέβαια, νέων πολυμόρφων είναι μία διαρκής πρόκληση, δεδομένου ότι οι παράγοντες καθίζησης και οι τεχνικές κρυστάλλωσης αν εφαρμοστούν, ακόμη, και με ελάχιστες τροποποιήσεις μεταβάλλουν σημαντικά το διάγραμμα φάσης του υπό εξέταση συμπλόκου ινσουλίνης-προσδέτη.

Η αξία των κρυσταλλικών πολυμόρφων της ανθρώπινης ινσουλίνης καθορίζεται από την δυναμική της χρησιμότητάς τους, καθώς όσα πληρούν ορισμένες προϋποθέσεις δύναται να αποτελέσουν υποψήφια για την δημιουργία φαρμακευτικών σκευασμάτων. Στα προαπαιτούμενα συμπεριλαμβάνονται το αποδοτικό «πακετάρισμα» υψηλής συγκέντρωσης της ινσουλίνης στον μικρότερο δυνατό όγκο. Επιπροσθέτως, οι προαναφερθείς ιδιότητες είναι αναγκαίο να φέρονται από μικροκρυστάλλους ικανούς να μεταφέρονται απρόσκοπτα διαμέσου του αγγειακού συστήματος. Οι παράγοντες, εν συνεχεία, που διερευνώνται ιδιαίτερα για να επάγουν την δημιουργία πολυμόρφων με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά είναι οι οργανικοί προσδέτες, κυρίως τα φαινολικά παράγωγα που προσδένονται στις φαινολικές θέσεις (phenolic pockets) της ινσουλίνης και επάγουν σταθερότερες μοριακές διαμορφώσεις ( $R_6$ ) (Dunn, 2005). Η ενίσχυση της ανθεκτικότητας του κρυσταλλικού συμπλόκου δεν είναι το μόνο προτέρημα των οργανικών προσδετών, καθώς προσδίδουν επιπλέον ιδιότητες στις οποίες περιλαμβάνονται η αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση.

### 2.6.1 Πολυμορφισμός του συμπλόκου [ανθρώπινη ινσουλίνη-m-cresol]

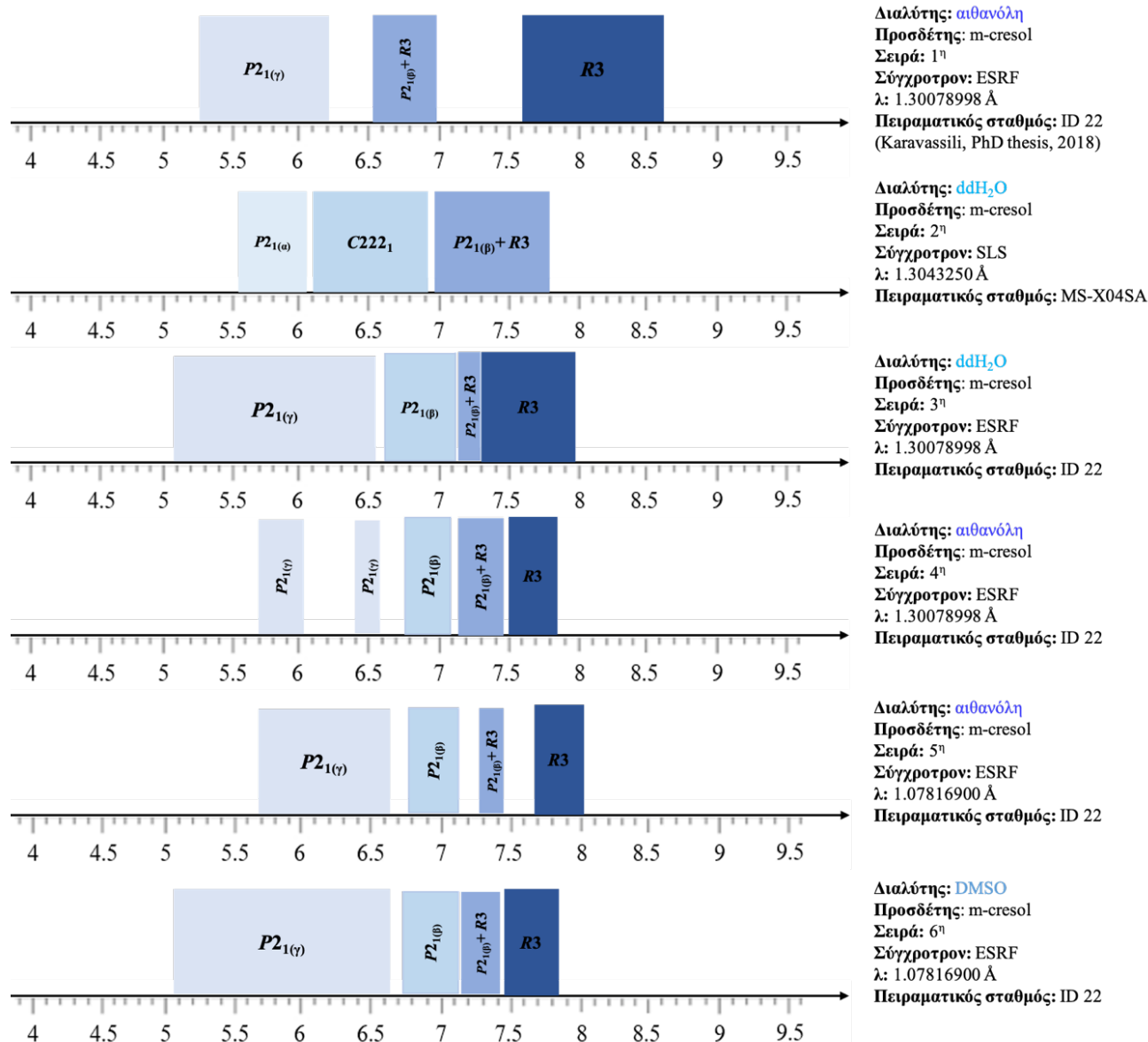
Οι τέσσερις σειρές κρυστάλλωσης της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη m-cresol εξετάστηκαν ως προς την μεταβλητή παράμετρο του pH και με την επιπρόσθετη διαφοροποίηση του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε, ως το περιβάλλον διάλυσης του προσδέτη. Για την σειρά 3 ο διαλύτης για την m-cresol ήταν το ddH<sub>2</sub>O, για τις σειρές 4 και 5 η αιθανόλη, ενώ για την 6<sup>η</sup> σειρά το DMSO. Μία από τις πρώτες παρατηρήσεις που πραγματοποιήθηκαν αφορούσε την μεταβολή του pH που σημειώθηκε σε κάθε πειραματική σειρά, με τα αποτελέσματα να φανερώνουν παρόμοια μεταβολή για κάθε διαλύτη.



**Εικόνα 2.57.** Διαγράμματα μεταβολής pH σε όλα τα δείγματα κάθε πειραματικής σειράς συγκρυστάλλωσης της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη m-cresol. Στο διάγραμμα παρατίθεται και η μεταβολή που σημειώνεται του pH για δείγματα παλαιότερης πειραματικής σειράς (Series 2) που ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης ήταν το ddH<sub>2</sub>O.



Στην συνέχεια, από την ανάλυση κατά Pawley, βρέθηκαν τα κρυσταλλικά πολύμορφα των δειγμάτων της εκάστοτε πειραματικής σειράς. Με μικρές διαφοροποιήσεις ως προς το τελικό pH, ξεκινώντας από το πιο όξινο προς το πιο βασικό, εμφανίστηκαν με την σειρά τα εξής τρία κρυσταλλικά πολύμορφα, δύο μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_{1(\gamma)}$  και  $P2_{1(\beta)}$  και ένα ρομβοεδρικής συμμετρίας  $R3$ . Να σημειωθεί ότι σε ένα μικρό εύρος pH πριν την εμφάνιση καθαρής της κρυσταλλικής φάσης  $R3$ , παρατηρείται συνύπαρξη μεταξύ των φάσεων  $P2_{1(\beta)}$  και  $R3$ .



**Εικόνα 2.58.** Διαγραμματική απεικόνιση των κρυσταλλικών φάσεων συναρτήσει του pH για κάθε πειραματική σειρά που έχει πραγματοποιηθεί για το σύμπλοκο της ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδέτη m-cresol.

Αρχικά, να διευκρινιστεί, πως από την στιγμή που το μοτίβο των εμφανιζόμενων κρυσταλλικών πολυμόρφων των συμπλόκων της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία της m-cresol [ $P2_{1(\gamma)}$ ,  $P2_{1(\beta)}$  και  $R3(R_6)$ ], συναρτήσει του pH, διαφέρει σημαντικά από το αντίστοιχο μοτίβο πολυμόρφων της ανθρώπινης ινσουλίνης απουσία προσδέτη [ $R3(T_6)$ ,  $R3(T_3R_3^f)$ , και  $I213$ ], συνάγεται το συμπέρασμα πως έχει πραγματοποιηθεί η πρόσδεση της m-cresol στο εξαμερές της ινσουλίνης. Εν συνέχεια, αναφορικά με τα αποτελέσματα της Pawley ανάλυσης και τις παρατηρήσεις που σημειώθηκαν για τις πλεγματικές σταθερές και τον όγκο της μοναδιαίας κυψελίδας, μεταξύ των διαφορετικών σετ δεδομένων, φανερώνονται όμοιες μεταβολές και για τα τρία κρυσταλλικά πολύμορφα των τεσσάρων σειρών που εξετάστηκαν.

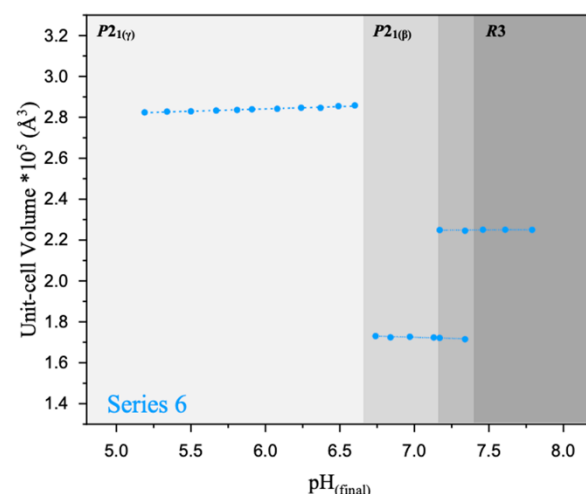
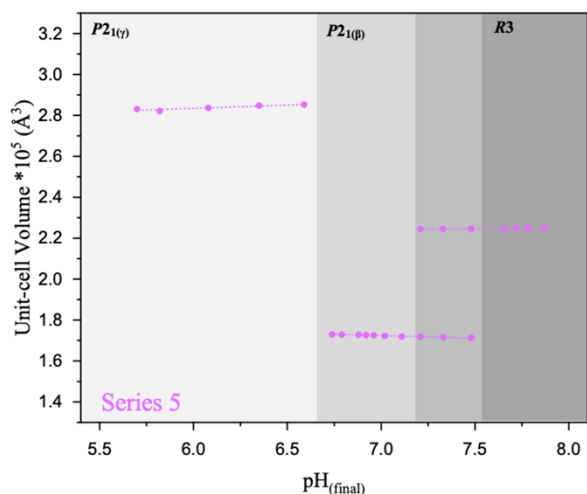
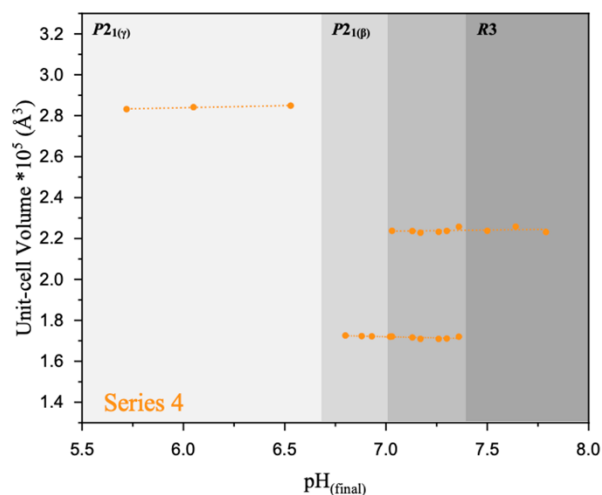
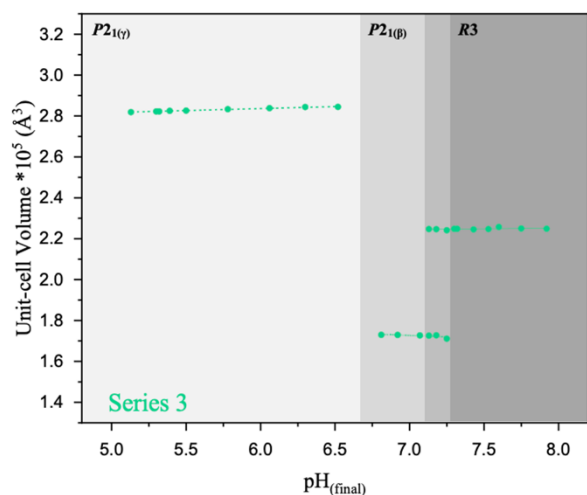


Συγκεκριμένα, για το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_1(\gamma)$  με την αύξηση της τιμής του pH, οι πλεγματικές σταθερές  $a$ ,  $b$ ,  $c$ , καθώς και η γωνία  $\beta$  μεταβάλλονται ισοτροπικά και αυξάνονται, γεγονός που επιβεβαιώνεται και στην επακόλουθη αύξηση του όγκου. Δύο εξαιρέσεις σημειώνονται μόνο, στην 5<sup>η</sup> σειρά το mcre52 και στην 6<sup>η</sup> σειρά το mcre69 τα οποία είχαν συνολικά μικρότερη μοναδιαία κυψελίδα, σε σχέση με τα υπόλοιπα *datasets*. Σε μία παρατήρηση των μοτίβων περίθλασης των δύο αυτών σετ δεδομένων με το αμέσως προηγούμενο του, καθένα ξεχωριστά, τα δύο αναφερόμενα *datasets* (mcre52 και mcre69) φανερώνεται πως είναι ελαφρώς μετατοπισμένα προς μικρότερες γωνίες  $2\theta$ , γεγονός που δικαιολογεί την μεταβολή αυτή. Επιπροσθέτως, από την σύγκριση των μη κανονικοποιημένων τιμών όλων των πλεγματικών σταθερών και του όγκου, σε κοινά διαγράμματα σημειώνεται ότι στη σειρά 6 (με περιβάλλον διάλυσης της m-cresol το DMSO) εμφανίζεται η μεγαλύτερη μοναδιαία κυψελίδα, σε όλες τις τιμές pH εμφάνισης του κρυσταλλικού πολυμόρφου  $P2_1(\gamma)$ .

Ακολούθως, για το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_1(\beta)$ , με την αύξηση του pH η πλεγματική σταθερά  $a$  μειώνεται, η  $c$  παραμένει σχετικά σταθερή, ενώ η  $b$  αυξάνεται, υποδηλώνοντας μία ανισοτροπική μεταβολή μεταξύ των πλεγματικών σταθερών  $a$  και  $b$ . Σχετικά με την γωνία  $\beta$  και τον όγκο της μοναδιαίας κυψελίδας παρουσιάζουν, επίσης, μείωση κατά την αύξηση του pH. Από την επακόλουθη σύγκριση μεταξύ των μη κανονικοποιημένων τιμών του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας συναρτήσει του pH των σετ δεδομένων των τεσσάρων σειρών, τα αποτελέσματα δείχνουν μία μεγαλύτερου όγκου μοναδιαία κυψελίδα σε όλο το εύρος τιμών pH στην σειρά 3 (ddH<sub>2</sub>O) ακολουθεί η σειρά 6 (DMSO) και τέλος οι σειρές 5 (*ethanol*) και 4 (*ethanol*). Να σημειωθεί πως για πρώτη φορά βρέθηκε η  $P2_1(\beta)$  ως μοναδική φάση και όχι σε συνύπαρξη με το πολύμορφο ρομβοεδρικής συμμετρίας.

Για το τρίτο κατά σειρά εμφάνισης κρυσταλλικό πολύμορφο  $R3$ , η αύξηση του pH οδηγεί στην ανισοτροπική μεταβολή μεταξύ των πλεγματικών σταθερών  $a(=b)$  και  $c$ , με την πρώτη να μειώνεται και την δεύτερη να αυξάνεται, ενώ ο συνολικός όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας αυξάνεται. Παρόλα αυτά, όπως διαφαίνεται και από τα διαγράμματα των μη κανονικοποιημένων τιμών για την  $R3$ , χρειάζονται μία εκτενέστερη μελέτη, καθώς στις σειρές 3 και 4 παρουσιάζονται αρκετά σετ δεδομένων να μην εμφανίζουν ομαλή μεταβολή πλεγματικών. Μάλιστα, συγκεκριμένα για το dataset mcre320 που παρουσιάζει και την μεγαλύτερη μεταβολή, από στο ίδιο το περιθλασίγραμμα του εν συγκρίσει με τα αντίστοιχα *datasets* ρομβοεδρικής συμμετρίας της ίδιας σειράς, οι εντάσεις ήταν μετατοπισμένες προς μικρότερες γωνίες  $2\theta$ , άρα και η μοναδιαία κυψελίδα αναμένεται να φέρει μεγαλύτερες τιμές πλεγματικών σταθερών, όπως και αποδείχθηκε.

Στο σημείο αυτό να τονιστεί, μία ιδιαίτερη συνθήκη που χαρακτηρίζει τα διαγράμματα φάσεων του συμπλόκου της ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδότη m-cresol, την συνύπαρξη των φάσεων  $P2_1(\beta)$  και  $R3$ . Η συνύπαρξη των δύο προαναφερθέντων κρυσταλλικών πολυμόρφων χαρακτηρίζεται από μία αστάθεια. Είθισται με την αύξηση του pH η μονοκλινούς συμμετρίας μοναδιαία κυψελίδα να μειώνεται σε όγκο και να αυξάνεται ο όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας ρομβοεδρικής συμμετρίας. Βέβαια, η συνύπαρξη είναι μία συνθήκη μετάβασης και υπάρχουν σετ δεδομένων που δεν ακολουθούν πάντοτε την αναμενόμενη πορεία. Βάσει των αποτελεσμάτων των πειραματικών δεδομένων οι σειρές 4 και 5 (*ethanol*), εμφανίζουν τα περισσότερα σετ δεδομένων με συνύπαρξη φάσεων, ακολουθεί η 3<sup>η</sup> σειρά (ddH<sub>2</sub>O) και τέλος 6<sup>η</sup> σειρά (DMSO).



Εικόνα 2.59. Ο όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας κάθε πολυμόρφου συναρτήσει του  $pH_{(final)}$ .

Από την σύγκριση των διαγραμμάτων φάσης από όλες τις σειρές που έχουν πραγματοποιηθεί ως σήμερα για το σύμπλοκο της ινσουλίνης με τον προσδότη m-cresol η μόνη διαφοροποίηση, η οποία αποτέλεσε και έναυσμα για την περεταίρω διερεύνηση της παραμέτρου του διαλύτη του προσδότη, είναι η σειρά 2 στην οποία διαλύτης ήταν το νερό. Στην περίπτωση της 2<sup>ης</sup> πειρατικής σειράς εμφανίστηκαν τα πολύμορφα  $P21(\alpha)$ ,  $C222_1$  και συνύπαρξη των φάσεων  $P21(\beta)$  και  $R3$ . Ωστόσο η 3<sup>η</sup> σειρά δεν επιβεβαίωσε αυτό το μοτίβο κρυσταλλικών φάσεων, ενώ εφαρμόστηκε το ίδιο ακριβώς πρωτόκολλο. Η διαφοροποίηση αυτή πιθανολογείται να οφείλεται στην μέτρια διάλυση της m-cresol (η οποία είναι σε διαλυτή μορφή) στο ddH<sub>2</sub>O, σε θερμοκρασία δωματίου, με άμεση απόρροια να διαχωρίζεται το ένα υγρό από το άλλο και να διέφερε τελικά η κατανομή του προσδότη και κατά επέκταση η συγκέντρωση του, τόσο στο αρχικό διάλυμα, όσο και στο διάλυμα των παραγόντων καθίζησης. Εντούτοις, η ύπαρξη του κρυσταλλικού πολυμόρφου ορθορομβικής συμμετρίας  $C222_1$ , με διαλύτη για την m-cresol το ddH<sub>2</sub>O έχει επιβεβαιωθεί, παρελθοντικά, από Single Crystal πείραμα σε κρύσταλλο που αναπτύχθηκε με την μέθοδο διάχυσης ατμών, καθημένης σταγόνας, στις συνθήκες [pH 5.30, 2mM ZnAc<sub>2</sub>, 0.4M PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, 9mM NaSCN] (Papaefthymiou, MSc, 2024), επομένως, ο συγκεκριμένος διαλύτης χρειάζεται περεταίρω διερεύνηση.

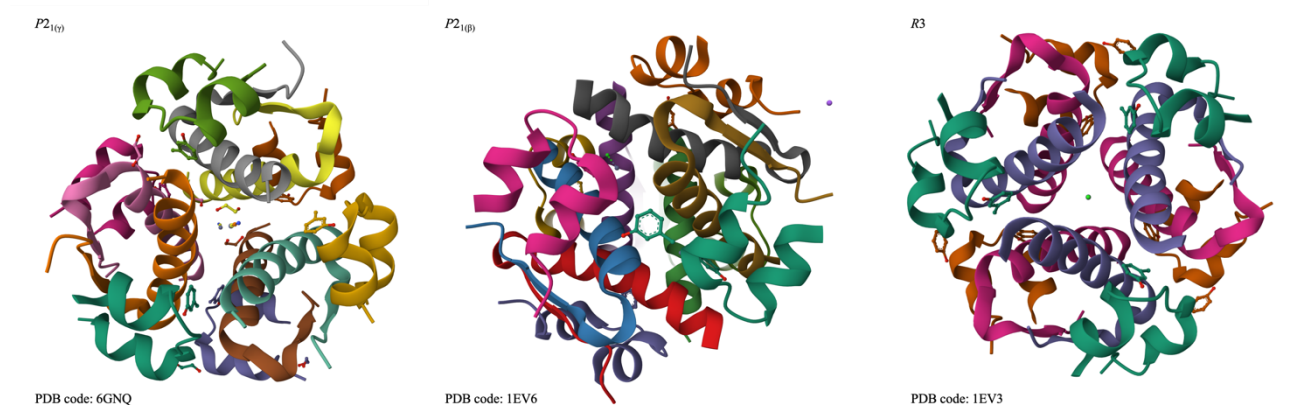
Εν συνεχεία, από την πραγματοποίηση της κρυστάλλωσης διάχυσης ατμών με την διάταξη της καθημένης σταγόνας, που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας στις 29/04/25, κρύσταλλος που αναπτύχθηκε στις συνθήκες [pH 7.80, 3mM ZnAc<sub>2</sub>, 0.5M PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, 9mM NaSCN και

25mM meta-cresol (DMSO)] συλλέχθηκε και μετρήθηκε στον πειραματικό σταθμό ID23-2. Προς το παρόν είναι γνωστό από ένα πρωταρχικό *indexing*, με αυτοματοποιημένες μεθόδους δεικτοδότησης, πως πιθανά επρόκειτο για έναν κρύσταλλο μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_{1(\beta)}$ . Το εύρημα αυτό αποτέλεσε το έναυσμα να δοκιμαστεί και ως επιπλέον διαλύτης το DMSO για την meta-cresol, στην πειραματική σειρά 6, για την δημιουργία πολυκρυσταλλικών δειγμάτων, με την μέθοδο batch, ώστε να μελετηθεί εκτενέστερα η επιπρόσθετη, αυτή, παράμετρος συναρτήσεως του pH. Βέβαια, όπως συμπεραίνεται από τις σειρές 3, 4, 5, και 6 για την μέθοδο batch, φαίνεται να μην επηρεάζει το περιβάλλον διάλυση του προσδέτη το μοτίβο των εμφανιζόμενων πολυμόρφων, αλλά να μεταβάλλει μόνο τα εύρη pH εμφάνισής τους.

Η επιρροή που ασκεί το περιβάλλον διάλυσης του προσδέτη στον κρυσταλλικό πολυμορφισμό φαίνεται να εξαρτάται κυρίως από την εφαρμοζόμενη τεχνική κρυστάλλωσης. Ο λόγος να έγκειται πιθανά, στις αναλογίες όγκων. Στην περίπτωση των batch κρυσταλλώσεων το νερό, που αποτελεί και τον διαλύτη της πρωτεΐνης, λαμβάνει τον μεγαλύτερο όγκο, ενώ ο όγκος που καταλαμβάνει ο διαλύτης του προσδέτη είναι πολύ μικρότερος συγκριτικά, γεγονός που δικαιολογεί την μικρή επίδραση. Αντιθέτως, στην περίπτωση της διάχυσης ατμών, όπου οι όγκοι είναι μικρότεροι, η επίδραση και της μικρότερης αλλαγής δύναται να έχει μεγάλο αντίκτυπο.

**Πίνακας 2.13.** Οι επιλυμένες δομές για το σύμπλοκο της ανθρώπινης ινσουλίνης με τον φαινολικό προσδέτη meta-cresol.

| Protein          | Crystal System | Space Group       | B-chain configuration | a(Å)  | b(Å)   | c(Å)   | $\beta(^{\circ})$ | Matthews coefficient | PDB reference                     |
|------------------|----------------|-------------------|-----------------------|-------|--------|--------|-------------------|----------------------|-----------------------------------|
| HI & meta-cresol | Monoclinic     | $P2_{1(\gamma)}$  | R <sub>6</sub>        | 47.67 | 70.36  | 84.74  | 105.21            | 2.05                 | 6GNQ (Karavassili et al., 2020)   |
| HI & meta-cresol | Monoclinic     | $P2_{1(\beta)}$   | R <sub>6</sub>        | 61.25 | 61.74  | 47.47  | 111.32            | 2.40                 | 1EV6 (Smith et al., 2000)         |
| HI & meta-cresol | Rhombohedral   | R3                | R <sub>6</sub>        | 78.87 | 78.87  | 39.47  | 90                | 2.03                 | 1EV3 (Smith et al., 2000)         |
| HI & meta-cresol | Rhombohedral   | R3                | R <sub>6</sub>        | 78.68 | 78.68  | 39.88  | 90                | 2.05                 | (91BB) (Papaefthymiou, MSc, 2024) |
| HI & meta-cresol | Orthorhombic   | C222 <sub>1</sub> | R <sub>6</sub>        | 58.97 | 219.42 | 224.57 | 90                | 3.48                 | (Papaefthymiou, MSc, 2024)        |



**Εικόνα 2.60.** Από τα αριστερά προς τα δεξιά απεικονίζονται οι δομές, των τριών χαρακτηριστικών πολυμόρφων του συμπλόκου της ανθρώπινης παρουσία του προσδέτη meta-cresol, αρχικά του κρυσταλλικού πολυμόρφου μονοκλινούς συμμετρίας  $P2_{1(\gamma)}$  [PDB code: 6GNQ (Karavassili et al., 2020)], ενδιάμεσως του κρυσταλλικού πολυμόρφου  $P2_{1(\beta)}$  [PDB code: 1EV6 (Smith et al., 2000)], και δεξιά του πολυμόρφου ρομβοεδρικής συμμετρίας R3 και μοριακής διαμόρφωσης R<sub>6</sub> [PDB code: 1EV3 (Smith et al., 2000)].

## 2.6.2 Επίδραση της σχετικής υγρασίας στα κρυσταλλικά πολύμορφα $R3(T_6)$ και $R3(T_3R_3^f)$

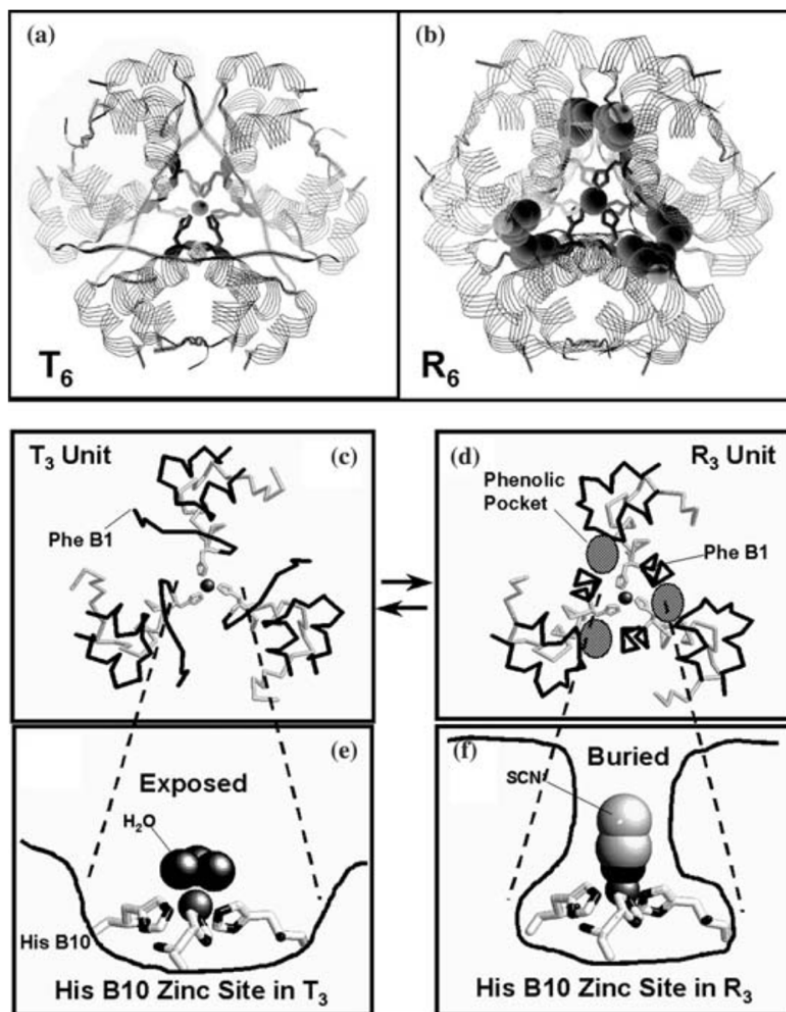
Οι *in situ* κρυσταλλογραφικές μελέτες υπό την ελεγχόμενη ομαλή μεταβολή της σχετικής υγρασίας, που πραγματοποιήθηκαν και για τα δύο κρυσταλλικά πολύμορφα της ανθρώπινης ινσουλίνης κρυσταλλωμένα απουσία προσδέτη, αποκάλυψαν την αξία της μοριακής διαμόρφωσης. Από την θεωρία είναι γνωστό, ότι η μοριακή διαμόρφωση  $T_6$  είναι η λιγότερο σταθερή και η  $R_6$  η σταθερότερη με την  $T_3R_3^f$  να είναι μία ενδιάμεσης σταθερότητας διαμόρφωση. Η σταθερότητα σχετίζεται με την διαμόρφωση της β-αλυσίδας η οποία όταν λαμβάνει εκτεταμένη διαμόρφωση στα αμινοξέα B<sub>1</sub>-B<sub>8</sub> αφήνει εκτεθειμένα τα αμινοξέα εντός της δομής και επιρρεπή σε μεταβολές του περιβάλλοντος. Στην περίπτωση της  $T_3R_3^f$ , τα τρία μονομερή λαμβάνουν T διαμόρφωση, όπως στην  $T_6$ , ενώ στα άλλα τρία μονομερή τα αμινοξέα B<sub>1</sub>-B<sub>3</sub> έχουν εκτεταμένη διαμόρφωση και τα B<sub>4</sub>-B<sub>8</sub> ελικοειδή διαμόρφωση,  $R^f$ , προσδίδοντας στο εξαμερές μία επιπλέον σταθερότητα, λόγω αποτελεσματικότερης θωράκισης των ιόντων ψευδαργύρου εντός του εξαμερούς.

Σε πρωταρχικό επίπεδο, τα αποτελέσματα των πειραμάτων περίθλασης αποκάλυψαν την ευαισθησία στις διακυμάνσεις της υγρασίας για το πολύμορφο  $R3(T_6)$ , καθώς από την αφυδάτωση του πρώτου κύκλου και των δύο υπό εξέταση σειρών, το 85% ήταν και το τελευταίο επίπεδο υγρασίας το οποίο έδωσε σήμα περίθλασης. Το κρυσταλλικό δείγμα αφυδατώθηκε ως και το 75%, και ακολούθησε ενυδάτωση αυτού μέχρι το 95%. Σε καμία από τις μετρήσεις που ακολούθησαν δεν λήφθηκε σήμα περίθλασης, ούτε κατά την ενυδάτωση, γεγονός που φανερώνει πως το δείγμα έχασε ολοκληρωτικά την κρυσταλλικότητα του, χωρίς δυνατότητα επανακάμψης. Η πλήρης κατάρρευση των κρυστάλλων, ήδη, από το επίπεδο υγρασίας 80% επιβεβαιώθηκε και στις δύο πειραματικές σειρές. Επιπροσθέτως, κατά την σύγκριση των μοτίβων περίθλασης όλων των σετ δεδομένων που έδωσαν σήμα περίθλασης (επίπεδα 95%, 90% και 85%) με το μοτίβο περίθλασης από την μέτρηση capillary, είχαν κοινές εντάσεις, απουσίαζαν, όμως, αρκετές, ενώ εμφανίζονταν και άλλες που δεν εξηγούνταν ως προς θέση και ένταση από το πολύμορφο  $R3(T_6)$ . Το γεγονός αυτό, δυνητικά, υποδηλώνει ότι οι κρύσταλλοι περνούν από στάδια ασταθών καταστάσεων πριν την ολική κατάρρευσή τους.

Στην περίπτωση, εν συνεχεία, του πολυμόρφου  $R3(T_3R_3^f)$ , από την πρωταρχική παρατήρηση των μοτίβων περίθλασης όλων των σετ δεδομένων, της κάθε σειράς ξεχωριστά, διαπιστώθηκε κατά την αφυδάτωση μετατόπιση των γωνιακών θέσεων των κορυφών προς μεγαλύτερες γωνίες  $2\theta$ , ενώ το αντίστροφο φαινόμενο σημειώθηκε κατά την ενυδάτωση, θέτοντας τις πρώτες ενδείξεις για την ισοτροπική μεταβολή των πλεγματικών σταθερών. Η επιβεβαίωση της αρχικής υπόθεσης πραγματοποιήθηκε από τα αποτελέσματα της ανάλυσης Pawley και την εξαγωγή των πλεγματικών σταθερών της μοναδιαίας κυψελίδας για κάθε επίπεδο υγρασίας. Σύμφωνα, λοιπόν, με τα συλλεχθέντα αποτελέσματα, αποδεικνύεται η ισοτροπική μεταβολή των πλεγματικών σταθερών  $a(=b)$  και  $c$ , με μείωση αυτών κατά την αφυδάτωση, και αντιθέτως, αύξηση κατά την ενυδάτωση. Κατά την αφυδάτωση παρατηρήθηκε συστολή της μοναδιαίας κυψελίδας, που υπαγορεύεται από την επακόλουθη μείωση των πλεγματικών σταθερών  $a$  και  $c$ , συνεπώς και του όγκου  $V$ , ενώ η ενυδάτωση έχει την αντίστροφη επίδραση.

Οι τρεις πρώτοι κύκλοι περιλάμβαναν την ομαλή αφυδάτωση από το 95% έως και το 75% και την επακόλουθη ενυδάτωση μέχρι και το 95%, ενώ ο τέταρτος είχε ως κατώτερο επίπεδο αφυδάτωσης το 50% και επανενυδάτωση στο 95%. Από τον πρώτο κύκλο σημειώνεται σημαντική μείωση των εντάσεων με εντονότερη την εξασθένηση από το επίπεδο υγρασίας 80%. Βέβαια, το σήμα επανακάμπτει κατά την ενυδάτωση, αλλά σε κάθε κύκλο το 95% της αφυδάτωσης διαφέρει με το 95% της ενυδάτωσης, όπου στην ενυδάτωση το σήμα είναι ασθενέστερο και οι γωνιακές θέσεις μετατοπισμένες, έστω και με μικρή απόκλιση, προς μεγαλύτερες γωνίες  $2\theta$ . Η συνθήκη αυτή είναι δηλωτική της μη πλήρους επανακάμψης της μοναδιαίας κυψελίδας. Το δείγμα, όπως φανερώνεται από τον τέταρτο κύκλο, διατήρησε την κρυσταλλικότητα του μέχρι και το επίπεδο 50%, με αρκετά

υποβαθμισμένη την ποιότητα του σήματος περίθλασης, ενώ κατά την ενυδάτωση επανήλθε μερικώς. Συνολικά τα συμπεράσματα επιβεβαιώθηκαν και από τις δύο πειραματικές σειρές.



**Εικόνα 2.61.** Στην επάνω εικόνα παρατίθεται αριστερά το εξαμερές T<sub>6</sub> διαμόρφωσης χωρίς προσδότη και το εξαμερές δεξιά R<sub>6</sub> διαμόρφωσης παρουσία του προσδότη m-cresol. Το εξαμερές της ινσουλίνης μπορεί να θεωρηθεί ως ένα τριμερές από διμερή, οπότε στην κάτω εικόνα παρατίθενται μόνο τα μονομερή χάριν διευκόλυνσης αριστερά της T διαμόρφωσης (c) και δεξιά της R (d). Οι πλευρικές αλυσίδες His B10 εμφανίζονται σε αναπαράσταση stick και τα ιόντα Zn<sup>2+</sup> εμφανίζονται ως μαύρες μπάλες. Η μετατόπιση κατά 30° του PheB1 στην αλλοστερική μετάβαση από σπείρα σε έλικα υποδεικνύεται στα (c) και (d), οι φαινολικοί θύλακες υποδεικνύονται ως διαγραμμισμένα ελλειψοειδή στο (d). Στο κατώτερο τμήμα παρατίθενται τα (e) και (f) τα οποία είναι κινούμενα σχέδια που απεικονίζουν την οκταεδρική σε τετραεδρική γεωμετρία ένταξης, λόγω αλλαγής στη θέση HisB10, καθώς το T<sub>3</sub> (e) μετατρέπεται σε R<sub>3</sub> στο σύμπλοκο SCN<sup>-</sup> (f). Το Zn<sup>2+</sup> εντάσσεται με τρεις ομάδες ιμιδαζόλης HisB10 και με τρία νερά στο (e) ή με το SCN<sup>-</sup> στο (f) (δομή που προέρχεται από το 2TCI.PDB, Whittingham et al., 1995). Οι συνεχείς γραμμές αντιπροσωπεύουν την επιφάνεια της πρωτεΐνης, μιας εκτεθειμένης μεταλλικής θέσης στο (e) και μιας θαμμένης θέσης στο (f).

Η διαφορά στα αποτελέσματα μεταξύ του πολύμορφου R<sub>3</sub>(T<sub>6</sub>) και του πολυμόρφου R<sub>3</sub>(T<sub>3</sub><sup>f</sup>), δύναται να εξηγηθεί, αν εξεταστούν οι δύο μοριακές διαμορφώσεις. Στην περίπτωση της μοριακής διαμόρφωσης T<sub>6</sub>, ο ψευδάργυρος συντάσσεται με τρεις ομάδες ιμιδαζόλης HisB10 και με τρία μόρια νερού, σε οκταεδρική γεωμετρία ένταξης. Η μη θωράκιση των ιόντων ψευδαργύρου, σε αυτήν την διάταξη, καθιστά τα ιόντα του μετάλλου εκτεθειμένα στον διαλύτη και κατά επέκταση, επιρρεπή στις επιφερόμενες μεταβολές. Οι ασθενείς αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των αναφερόμενων μορίων, που συμμετέχουν στην διαδικασία ένταξης, σε μία απότομη αλλαγή του ένυδρου περιβάλλοντος τους δύναται να διαταράξει την ισορροπία τους, να εξασθενίσουν οι δυνάμεις που διατηρούν τα μόρια σε γεωμετρία ένταξης, το μέταλλο να εκτεθεί σε μη ευνοϊκές συνθήκες για την διατήρηση του εξαμερούς και να επέλθει τελικά η κατάρρευση του εξαμερούς.

Στην ειδική περίπτωση του πολυμόρφου  $R3(T_3R_3^f)$ , στα 3 εκ των 6 μονομερών (τα αμινοξέα B<sub>1</sub>-B<sub>3</sub>) λαμβάνουν T διαμόρφωση και τα αμινοξέα B<sub>4</sub>-B<sub>8</sub> αποκτούν R<sup>f</sup> διαμόρφωση (*f: frayed*), ενώ τα άλλα τρία μονομερή έχουν στα αμινοξέα B<sub>1</sub>-B<sub>8</sub> εκτεταμένη διαμόρφωση T διαμόρφωση. Ακόμα, και αυτή η μικρή διαφοροποίηση στο ήμισυ του εξαμερούς προσδίδει μεγαλύτερη σταθερότητα στο εξαμερές διαφυλάσσοντας αποτελεσματικότερα τι ιόντα ψευδαργύρου εντός του εξαμερούς. Η ελίκωση των αμινοξέων στα R<sup>f</sup> μονομερή συμβάλλει τόσο στην προστασία των ίδιων και των πλευρικών τους ομάδων, όσο και στην διασφάλιση των μείζονων κοιλοτήτων του εξαμερούς, εμποδίζοντας ίσως και την ανεξέλεγκτη είσοδο ή απώλειας νερού, λόγω των στενότερων υδρόφοβων κοιλοτήτων που σχηματίζονται.

## 2.7 Συζήτηση

Η δυναμική αξία των κρυσταλλικών πολυμόρφων και των μοριακών διαμορφώσεων της ανθρώπινης ινσουλίνης αποτελούν πρόσφορο έδαφος για ενδελεχή έρευνα. Η βελτίωση των, ήδη, επιλυμένων κρυσταλλικών δομών, η εύρεση νέων πολυμόρφων και ο έλεγχος της ανθεκτικότητας τους, υπό την επίδραση διαφόρων φυσικοχημικών παραμέτρων είναι θεμελιώδους σημασίας για την ανίχνευση πιθανών υποψήφιων κρυσταλλικών φαρμακευτικών σκευασμάτων. Στόχος είναι κυρίως κρύσταλλοι, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από υψηλό πακετάρισμα της ινσουλίνης στον μικρότερο δυνατό όγκο και με χαμηλή περιεκτικότητα σε διαλύτη.

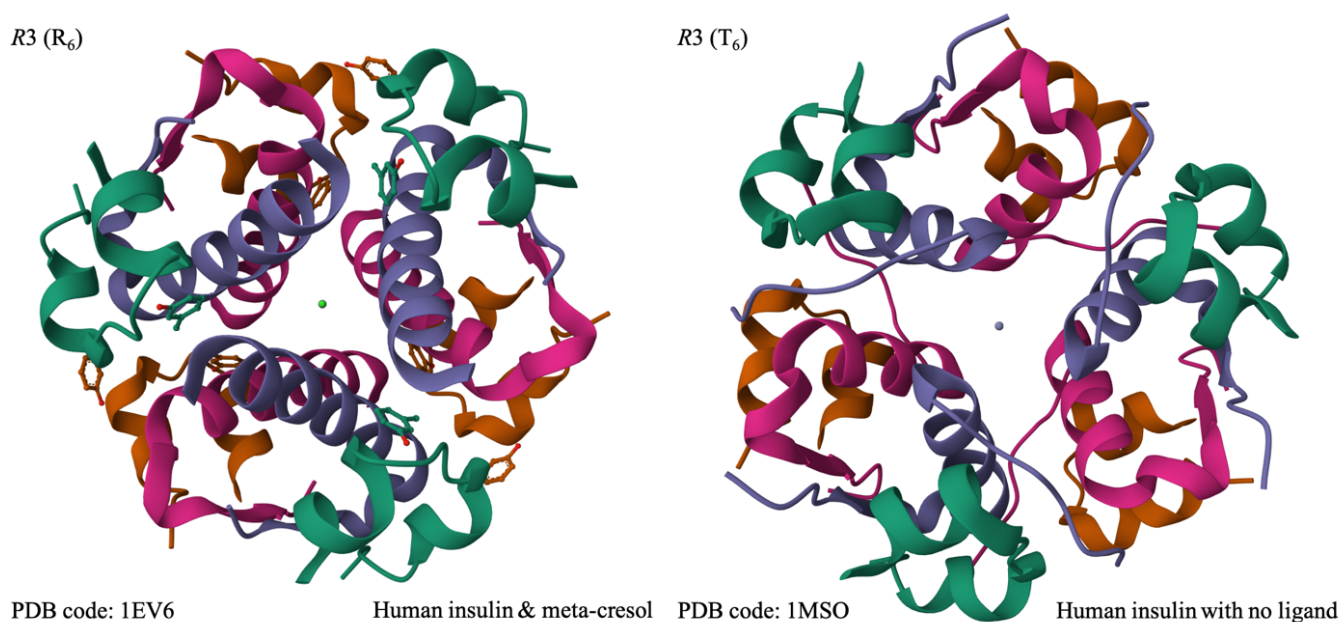
Οι κρύσταλλοι επιλέγονται, καθώς προσομοιάζουν τον φυσικό τρόπο αποθήκευσης της ινσουλίνης στον ανθρώπινο οργανισμό, όπου και αποθηκεύονται με την μορφή κρυσταλλικών εξαμερών εντός των παγκρεατικών κυττάρων, και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος κατόπιν μοριακής σηματοδότησης σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας. Η χρήση οργανικών προσδετών, κυρίως, φαινολικών παραγώγων επάγουν την δημιουργία της σταθερότερης εκ των μοριακών διαμορφώσεων, την R<sub>6</sub>, κατά την πρόσδεση τους στις φαινολικές θέσεις, επιτρέποντας την αποτελεσματικότερη προάπσιση των ιόντων ψευδαργύρου. Στον ανθρώπινο οργανισμό απαντώνται τα κρυσταλλικά εξαμερή είτε σε T<sub>6</sub> διαμόρφωση, είτε σε  $(T_3R_3^f)$  διαμόρφωση, καθώς εντός των εκκριτικών κοκκίων δεν υπάρχει αλλοστερικό σύμπλοκο να επάγει την R<sub>6</sub> διαμόρφωση (Smith et al., 2000). Για τον λόγο αυτό κρύσταλλοι με την R<sub>6</sub> μοριακή διαμόρφωση, αποτελούν το επίκεντρο των μελετών, καθώς δύναται με το στερεοχημικό προβάδισμα σταθερότητας να παρατείνουν την διάρκεια της δράσης τους εντός του οργανισμού στον οποίο δίδονται, με πιθανό τον περιορισμό των χορηγούμενων δόσεων σε διαβητικούς ασθενείς.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε ο κρυσταλλικός πολυμορφισμός για το σύμπλοκο της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη meta-cresol, σε τέσσερις πειραματικές σειρές αναδεικνύοντας την σταθερότητα που παρουσιάζει το υπό μελέτη αυτό σύμπλοκο στην εμφάνιση τριών κρυσταλλικών φάσεων, σε ένα συγκεκριμένο εύρος τιμών pH, με το τελευταίο να επηρεάζεται σε μικρό βαθμό από το περιβάλλον διάλυσης του προσδέτη. Δόθηκαν ισχυρές ενδείξεις, πως ο διαλύτης του προσδέτη επιδρά στον κρυσταλλικό πολυμορφισμό κυρίως σε κρυσταλλώσης που αφορούν μικρό όγκο, όπως η μέθοδος της διάχυσης ατμών. Παράλληλα, για πολυκρυσταλλικά δείγματα φανερώνεται ως ενδιαφέρουσα η μελέτη του κρυσταλλικού πολυμορφισμού, υπό την μεταβλητή παράμετρο του pH, αλλά με διαφορετική τελική συγκέντρωση του προσδέτη στο διάλυμα κρυστάλλωσης. Ακόμη, μία νέα ερευνητική κατεύθυνση που τίθεται προς διερεύνηση είναι οι κρυσταλλώσεις με την μέθοδο *seeding*, όχι μόνο σε κρυστάλλους ινσουλίνης υποβαθμισμένης ποιότητας, αλλά και σε ήδη γνωστά κρυσταλλικά πολύμορφα για τον έλεγχο της επίδρασης της νεότερης αυτής μεθόδου.

Ακόμη, ελέγχθηκαν ως προς την σταθερότητα τους τα κρυσταλλικά πολύμορφα  $R3(T_6)$  και  $R3(T_3R_3^f)$ , της ανθρώπινης ινσουλίνης απουσία προσδέτη. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι δηλωτικά της ουσιαστικής αξίας που διαδραματίζει η μοριακή διαμόρφωση για την σταθερότητα του εξαμερούς. Το κρυσταλλικό πολύμορφο R3 με την λιγότερο σταθερή μοριακή διαμόρφωση T<sub>6</sub> χάνει



την κρυσταλλικότητα του από το 80% της αφυδάτωσης και δεν επανέρχεται ακόμα και μετά την ενυδάτωση. Στην συνέχεια, το κρυσταλλικό πολύμορφο  $R3$  και μοριακής διαμόρφωσης  $T_3R_3^f$ , που είναι ενδιάμεσης σταθερότητας, διαπιστώθηκε πως διατηρεί την κρυσταλλικότητα του ακόμη μέχρι το επίπεδο σχετικής υγρασίας 50%, με σαφή βέβαια υποβάθμιση της ποιότητας του κρυστάλλου, ενώ επανέρχεται κατά την ενυδάτωση, αλλά όχι πλήρως. Επιπροσθέτως, το συγκεκριμένο κρυσταλλικό πολύμορφο παρουσίασε ισοτροπική μεταβολή των πλεγματικών σταθερών  $a(=b)$  και  $c$ , όπως ακριβώς και το πολύμορφο ρομβοεδρικής συμμετρίας και μοριακής διαμόρφωσης  $R_6$  του συμπλόκου ανθρώπινης ινσουλίνης με την *m*-cresol (Paraefthymiou, MSc, 2024; Kontarinis, Paraefthymiou et al., in press). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με το κρυσταλλικό πολύμορφο  $R3$  μοριακής διαμόρφωσης  $R_6$  του συμπλόκου της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη *m*-nitrophenol (Kontarinis, MSc, 2024; Kontarinis, Paraefthymiou et al., in press).



**Εικόνα 2.62.** Αριστερά απεικονίζεται η δομή του πολυμόρφου ρομβοεδρικής συμμετρίας  $R3$  και μοριακής διαμόρφωσης  $R_6$  του συμπλόκου της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη *meta*-cresol [PDB code: 1EV3 (Smith et al., 2000)], ενώ στα δεξιά η δομή του πολυμόρφου ρομβοεδρικής συμμετρίας  $R3$  και μοριακής διαμόρφωσης  $T_6$  της ανθρώπινης ινσουλίνης απουσίας προσδέτη [PDB code: 1MSO (Smith et al., 2003)].

Η ερευνητική ομάδα Βιοχημείας, Δομικής Βιολογίας και Κρυσταλλογραφίας Ακτίνων-Χ αξιοποιώντας τον θάλαμο ελεγχόμενης μεταβολής τόσο της θερμοκρασίας, όσο και της υγρασίας (*MHC-trans humidity chamber*) της εταιρείας Anton Paar, που δύναται να προσαρτηθεί στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο, διεξάγει ολοκληρωμένες *in-situ* κρυσταλλογραφικές σε πολυκρυσταλλικά δείγματα της ανθρώπινης ινσουλίνης για ήδη γνωστά κρυσταλλικά πολύμορφα. Στόχος η αποκρυπτογράφηση της ανθεκτικότητας των κρυσταλλικών πολυμόρφων και της επίδρασης των φυσικών παραμέτρων της υγρασίας και της θερμοκρασίας σε επίπεδο μοναδιαίας κυψελίδας. Από τα πρώτα κιόλας αποτελέσματα φανερώνεται η διαφορά στην ανταπόκριση για το εκάστοτε πολύμορφο. Η συγκέντρωση περισσότερων αποτελεσμάτων για το σύνολο των γνωστών πολυμόρφων θα αποκαλύψει τους παράγοντες στους οποίους οφείλονται οι διαφορετικές αντιδράσεις των κρυστάλλων σε σχέση με την μεταβολή παραμέτρων του περιβάλλοντος τους. Η γνώση που συλλέγεται θα μπορέσει να αξιοποιηθεί για την αποτελεσματικότερη παραγωγή, μεταφορά και αποθήκευση κρυσταλλικών φαρμάκων, ώστε να μην υποβαθμίζεται η ποιότητα τους και κατά συνέπεια η λειτουργικότητά τους.

**Πίνακας 2.14.** Αποτελέσματα από τα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί ως σήμερα για την ανθρώπινη ινσουλίνη υπό μεταβαλλόμενη σχετική υγρασία.

| Protein & Ligand        | Crystal System | Space Group   | B-chain configuration | a(Å)             | b(Å)             | c(Å)             | $\beta(^{\circ})$ | V(Å <sup>3</sup> ) | Minimum RH level of Tolerance | Reference                    |
|-------------------------|----------------|---------------|-----------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|-------------------------------|------------------------------|
| HI & meta-cresol        | Rhombohedral   | $R\bar{3}$    | $R_6$                 | De (↓)<br>Re (↑) | De (↓)<br>Re (↑) | De (↓)<br>Re (↑) | 90                | De (↓)<br>Re (↑)   | 70%<br>Test to 70%            | (Papaeftymiou, MSc, 2024)    |
| HI & m-nitrophenol      | Rhombohedral   | $R\bar{3}$    | $R_6$                 | De (↓)<br>Re (↑) | De (↓)<br>Re (↑) | De (↑)<br>Re (↓) | 90                | De (↑)<br>Re (↓)   | 70%<br>Test to 50%            | (Kontarinis, MSc, 2024)      |
| HI & 4-chlororesorcinol | Monoclinic     | $P2_1(\beta)$ | $R_6$                 | De (↓)<br>Re (↑) | De (↓)<br>Re (↑) | De (↑)<br>Re (↓) | De (↓)<br>Re (↑)  | De (↓)<br>Re (↑)   | 50%<br>Test to 50%            | (Konstantopoulos, MSc, 2025) |
| HI & 4-bromoresorcinol  | Monoclinic     | $P2_1(\beta)$ | $R_6$                 | De (↓)<br>Re (↑) | De (↓)<br>Re (↑) | De (↓)<br>Re (↑) | De (↓)<br>Re (↑)  | De (↓)<br>Re (↑)   | 50%<br>Test to 50%            | (Koutoulas MSc, 2025)        |
| HI                      | Rhombohedral   | $R\bar{3}$    | $T_6$                 | -                | -                | -                | -                 | -                  | 85%<br>Test to 75%            | (Kafetzi, MSc, 2025)         |
| HI                      | Rhombohedral   | $R\bar{3}$    | $T_3R_3^f$            | De (↓)<br>Re (↑) | De (↓)<br>Re (↑) | De (↓)<br>Re (↑) | 90                | De (↓)<br>Re (↑)   | 50%<br>Test to 50%            | (Kafetzi, MSc, 2025)         |



### 3. Μελέτη της επίδρασης της σχετικής υγρασίας στη HEWL

Η **λυσοζύμη** (*lysozyme*) είναι ένα ένζυμο που ανακαλύφθηκε από τον *Alexander Fleming* περί το 1922, κατά την διεξαγωγή πειραμάτων που πραγματοποιούσε. Το ένζυμο, ονομάστηκε κατά αυτό τον τρόπο λόγω της ικανότητάς του να «λύει», να διασπά δηλαδή, το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων. Στην ιστορική αξία της λυσοζύμης σημαντικό είναι να προστεθεί πως αποτελεί το πρώτο ένζυμο του οποίου προσδιορίστηκε η τρισδιάστατη δομή με την μέθοδο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ και του οποίου οι ιδιότητες εξηγήθηκαν σε ατομικό επίπεδο (Phillips, 1966). Η λυσοζύμη θεωρείται ένα «φυσικό» αντιβιοτικό και απαντάται σε αρκετούς διαφορετικούς οργανισμούς. Αρχικά, ανακαλύφθηκε στην ανθρώπινη ρινική βλέννα και, αργότερα, εντοπίστηκε σε πολλούς ιστούς του ανθρώπινου σώματος, κυρίως σε περιοχές που έρχονται σε άμεση επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον όπως στο δέρμα, στους οφθαλμούς, καθώς και στην αναπνευστική και γαστρεντερική οδό. Εκτός από τον άνθρωπο, η λυσοζύμη εμφανίζεται και σε άλλους οργανισμούς του ζωικού βασιλείου, καθώς και σε πολλούς φυτικούς οργανισμούς, ενώ οι μεγαλύτερες ποσότητες εντοπίζονται στο ασπράδι του αυγού της όρνιθας.

#### 3.1 Ρόλος Λυσοζύμης

Η λυσοζύμη, γνωστή, επίσης, και με τα ονόματα μουραμιδάση ή N-ακετυλομουραμική υδρολάση, είναι μία μικρή κατιονική πρωτεΐνη μοριακού βάρους της τάξεως των 14 kDa. Η δράση της έχει διττή φύση, εφόσον λειτουργεί είτε άμεσα καταστρέφοντας το βακτηριακό τοίχωμα, είτε έμμεσα ενεργοποιώντας αυτολυτικά ένζυμα που καταλύουν την διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος εκ των ένδον, δηλαδή από τα ίδια τα βακτήρια (Ganz, 2006).

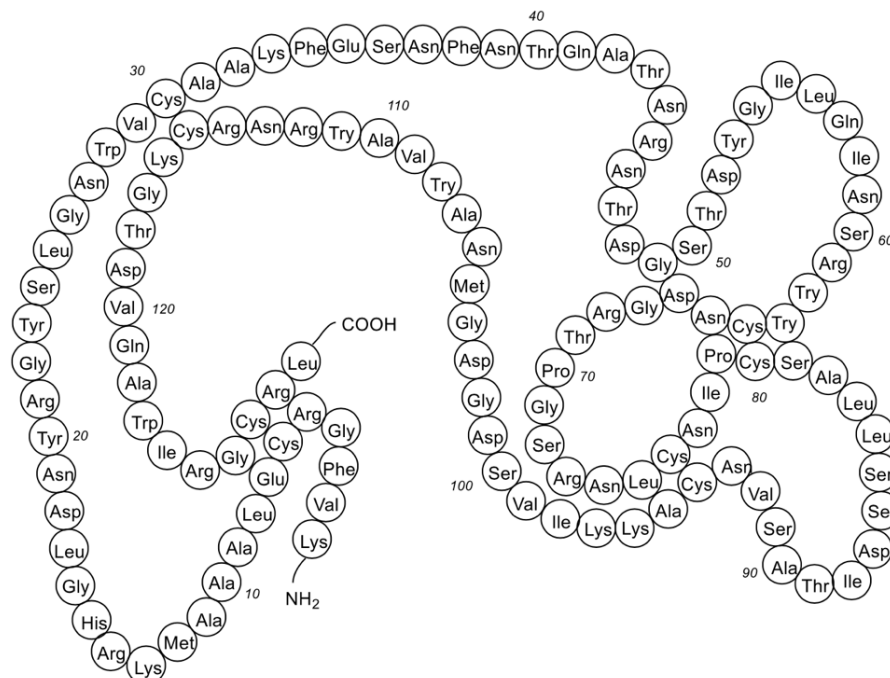
Στόχος του ενζύμου είναι η πεπτιδογλυκάνη, γνωστή και ως μуреϊνη, που αποτελεί και το υπόστρωμα του. Η πεπτιδογλυκάνη δομείται από μονάδες N-ακετυλο-γλυκοζαμίνης (NAG) και N-ακετυλο-μουραμικού οξέος (NAM), που συνδέονται μεταξύ τους με  $\beta(1,4)$  γλυκοζιτικούς δεσμούς. Το μόριο της πεπτιδογλυκάνης είναι δομικό συστατικό του βακτηριακού τοιχώματος, προσδίδοντας του ωσμωτική αντίσταση και καθορίζοντας ως ένα σημαντικό βαθμό το σχήμα του. Η λυσοζύμη, λοιπόν, υδρολύει τον δεσμό μεταξύ του C<sub>1</sub> της μονάδας NAM και του C<sub>4</sub> της μονάδας NAG, καταστρέφοντας μερικώς ή ολικώς το κυτταρικό τοίχωμα, με τον θάνατο του βακτηρίου να επέρχεται, λόγω άρσης της ωσμωτικής του ρύθμισης (Ganz, 2006).

##### 3.1.1 Δομή Λυσοζύμης

Η πλειοψηφία των πειραμάτων που αφορούν δομικό κρυσταλλικό πολυμορφισμό, αξιοποιεί τη λυσοζύμη που προέρχεται από το ασπράδι του αυγού της όρνιθας (Hen Egg White Lysozyme), και διατίθεται σε μεγάλες ποσότητες. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελείται από 129 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 14.3kDa, ενώ διαθέτει τέσσερις δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι συμβάλλουν στην σταθερότητα του μορίου. Η αμινοξική αλληλουχία του ενζύμου αυτού διατηρεί σε υψηλό ποσοστό την ομολογία του ανάμεσα σε διαφορετικά είδη και, ιδίως όσον αναφορά τις λειτουργικές περιοχές του, οι οποίες φαίνεται να είναι και οι πιο εξελικτικά συντηρημένες. Ιδιαίτερο στοιχείο της λυσοζύμης αποτελεί η δομή της, και ειδικότερα η σταθερότητα που παρουσιάζει ακόμα και όταν υπόκειται σε ένα μεγάλο και διαφορετικό εύρος συνθηκών. Αυτή η ιδιαιτερότητα την καθιστά ιδανικό μόριο για κρυσταλλογραφικές μελέτες (Tullio, 2015).

Η δομή αυτής της κατιονικής πρωτεΐνης χαρακτηρίζεται από μία βαθιά εσοχή (αμινοξέα Asp 87- Arg114) η οποία διαχωρίζει το μόριο σε δύο τομείς, ενώ η σύνδεση των δύο τομέων επιτυγχάνεται από μία  $\alpha$ -έλικα. Η εσοχή που τους διαχωρίζει αποτελεί και το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ο πρώτος τομέας περιλαμβάνει τα αμινοξέα 40-88 και έχει δομή αντιπαράλληλου  $\beta$  πτυχωτού φύλλου, ενώ ο δεύτερος συνιστάται από τις ομάδες αμινοξέων 1-39 και 88-129 και στην μεγαλύτερη έκταση του τείνει προς την ελικοειδή μορφή (Lesnierowski and Kijowski, 2004; Tullio, 2015). Η διαμόρφωση της

λυσοζύμης ακολουθεί την αρχή που στηρίζεται στην δημιουργία μίας εξωτερικής υδρόφιλης επιφάνειας και μίας εσωτερικής υδρόφοβης περιοχής. Εν κατακλείδι, το μόριο της λυσοζύμης παρουσιάζει υψηλή σταθερότητα και θερμική αντοχή, στοιχεία που φαίνεται να οφείλονται στους τέσσερεις δισουλφιδικούς δεσμούς που απαντώνται στην πολυπεπτιδική αλυσίδα.



Εικόνα 3.1. Πρωτοταγής δομή της ινσουλίνης (Ferraboschi, P., Ciceri, S. and Grisenti, P. (2021)).

## 3.2 Επίδραση Φυσικών Παραμέτρων στην

### 3.2.1 Υλικά και Μέθοδοι

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αντικείμενο μελέτης αποτέλεσε ακόμη ένα μόριο η λυσοζύμη από το ασπράδι του αυγού της όρνιθας. Ακολουθήθηκε η ίδια συνθήκη κρυστάλλωσης και για τις πέντε σειρές πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν για τον έλεγχο της επίδρασης τις σχετικής υγρασίας στο κρυσταλλικό πολύμορφο στόχος  $P4_32_12$ . Στην παρούσα διπλωματική εργασία παρατίθενται μόνο οι σειρές και οι κύκλοι που αφορούν σε ομαλές μεταβολές αφυδάτωσης και ενυδάτωσης του κρυσταλλικού δείγματος.

### 3.2.2 Πειράματα κρυστάλλωσης με την μέθοδο Batch

Τα πειράματα κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκαν με την χρήση λυοφιλοποιημένης λυσοζύμης από το ασπράδι του αυγού της όρνιθας. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 5 σειρές πειραμάτων κρυστάλλωσης, στο πλαίσιο μία εκτεταμένης ερευνητικής εργασίας για την μελέτη του κρυσταλλικού πολυμορφισμού της λυσοζύμης σε διαφορετικά μοτίβα επιπέδων σχετικής υγρασίας. Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία περιλαμβάνει τα αποτελέσματα που προήλθαν μόνο από τα μοτίβα ομαλών μεταβολών υγρασίας. Να σημειωθεί, ότι και οι πέντε σειρές κρυσταλλώσεων πραγματοποιήθηκαν για πειράματα συλλογής δεδομένων περίθλασης από το εργαστηριακό περίθλασίμετρο, στον εξειδικευμένο θάλαμο ελεγχόμενης μεταβολής θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας MCH-trans. Για την εξασφάλιση αρκετής ποσότητας για την πλήρη κάλυψη με κρυσταλλικό ίζημα ειδικού δειγματοφορέα δημιουργήθηκαν 4 δείγματα της ίδιας συνθήκης για κάθε σειρά. Η

συνθήκη για κάθε σειρά πειραμάτων είναι η ίδια και το εφαρμοζόμενο πρωτόκολλο παρατίθεται ακολούθως.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία του διαλύματος των παραγόντων καθίζησης με την προσθήκη των κατάλληλων όγκων πυκνού διαλύματος χλωριούχου νατρίου (NaCl), πολυμερούς PEG-6000, οξικού νατρίου (NaOAc), καθώς και ddH<sub>2</sub>O για την επίτευξη τελικού όγκου διαλύματος 2 ml. Ακολούθως, παρασκευάστηκε το διάλυμα της πρωτεΐνης με τελική συγκέντρωση της λυσοζύμης 200 mg/ml και τελικού όγκου διαλύματος 2 ml. Στην συνέχεια παρασκευάστηκε το διάλυμα των παραγόντων καθίζησης, όπως παρατίθεται στον ακόλουθο πίνακα:

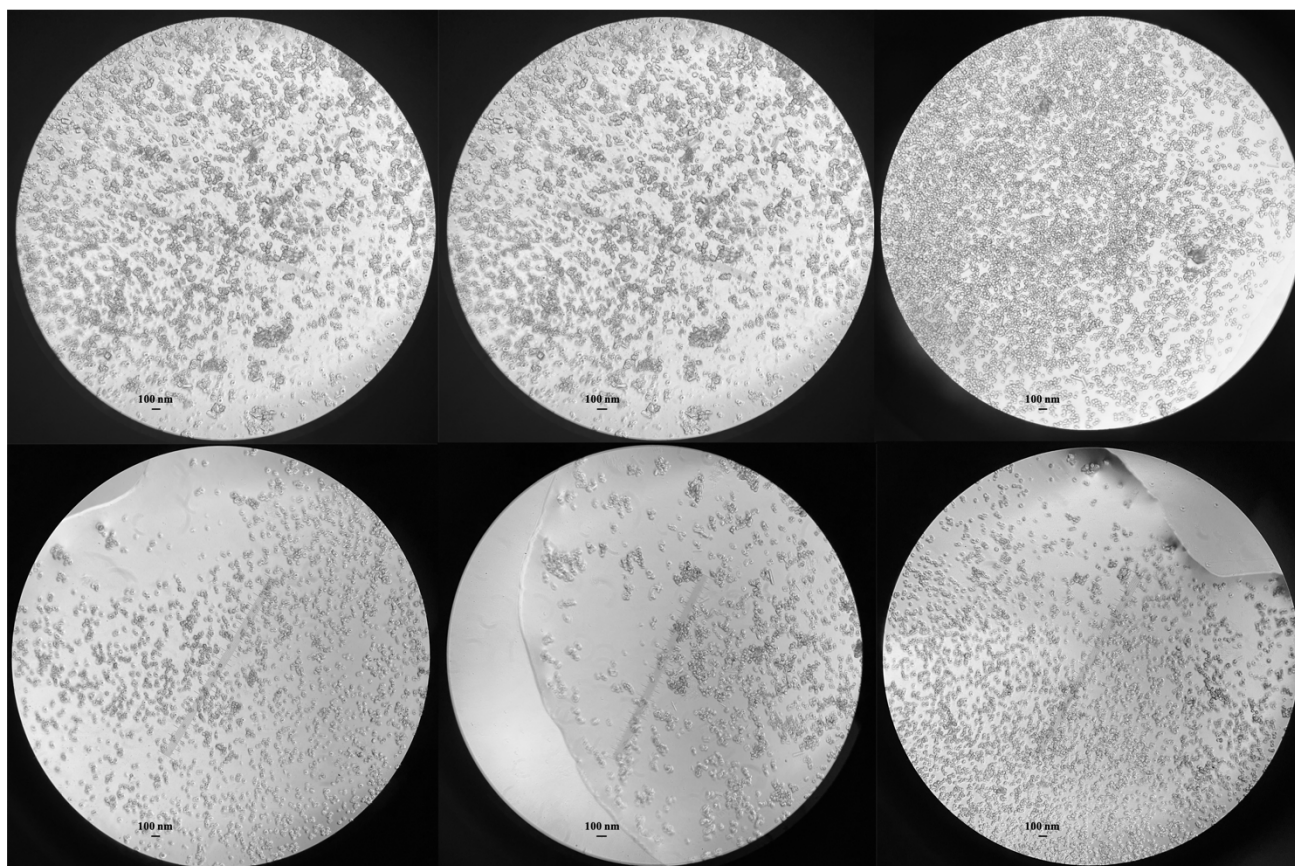
**Πίνακας 3.1.** Διάλυμα παραγόντων καθίζησης.

| Precipitant Solution  |        |          |        | V <sub>(τελικό)</sub> = 1.500 ml |
|-----------------------|--------|----------|--------|----------------------------------|
|                       | NaCl   | PEG-6000 | NaOAc  | ddH <sub>2</sub> O               |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις | 5M     | 60% w/v  | 1M     |                                  |
| Αρχικός όγκος         | 900 µl | 500 µl   | 75 µl  | 25 µl                            |
| Τελικές συγκεντρώσεις | 3 M    | 20% w/v  | 0.05 M |                                  |

Για την δημιουργία του εκάστοτε διαλύματος κρυστάλλωσης, με σκοπό την δημιουργία των πολυκρυσταλλικών δειγμάτων αναμείχθηκαν 0.25 ml του διαλύματος παραγόντων καθίζησης με 0. 25 ml του διαλύματος της πρωτεΐνης σε ένα σωληνάκι τύπου Eppendorf των 1.5 ml. Οι τελικές συγκεντρώσεις του εκάστοτε δείγματος για κάθε σειρά παρατίθενται στον ακόλουθο **πίνακα 3.2.**

**Πίνακας 3.2.** Διάλυμα κρυστάλλωσης.

| Crystallization mix   |       |          |         | V <sub>(τελικό)</sub> = 0.5 ml |
|-----------------------|-------|----------|---------|--------------------------------|
|                       | NaCl  | PEG-6000 | NaOAc   | HEWL                           |
| Αρχικές Συγκεντρώσεις | 3 M   | 20% w/v  | 0.05 M  | 200 mg/ml                      |
| Αρχικός όγκος         |       | 0.25 ml  |         | 0.25 ml                        |
| Τελικές συγκεντρώσεις | 1.5 M | 10% w/v  | 0.025 M | 100 mg/ml                      |



**Εικόνα 3.2.** Μικροσκοπική παρατήρηση των κρυστάλλων της HEWL, όπως προέκυψαν, από την εφαρμογή του πρωτοκόλλου κρυστάλλωσης, που αναγράφεται στο κεφάλαιο 3.2.2..

### 3.2.3 Συλλογή δεδομένων περίθλασης

Οι *in-situ* κρυσταλλογραφικές μετρήσεις μεταβαλλόμενης σχετικής υγρασίας πραγματοποιήθηκαν στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο (X'Pert Pro, Malvern Panalytical). Το εργαστηριακό περιθλασίμετρο του τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Πατρών είναι εφικτό να λάβει δύο διαφορετικές διατάξεις, την διάταξη που δέχεται *capillaries* (*capillary spinner stage*) και την διάταξη που φέρει τον θάλαμο ελεγχόμενης μεταβολής τόσο της θερμοκρασίας όσο και της υγρασίας (*MHC-trans humidity chamber*) της εταιρείας Anton Paar. Το συγκεκριμένο περιθλασίμετρο παράγει ακτινοβολία  $K_{\alpha}$  του χαλκού ( $CuK_{\alpha}$ ) με μήκος κύματος  $\lambda = 1.540585 (3) \text{ \AA}$ . Τα κύρια μέρη της οργανολογίας, δηλαδή η πηγή ακτίνων-X, τα ειδικά κάτοπτρα εστίασης της δέσμης, ο δειγματοφορέας και ο ανιχνευτής (PIXcel<sup>1D</sup>), απαντώνται σε γεωμετρική διάταξη Debye-Scherrer.

Το εργαστηριακό περιθλασίμετρο δύναται να προσαρμοστεί με ορισμένους μηχανικούς χειρισμούς σε *humidity mode*. Σε αυτή την περίπτωση, η προετοιμασία του δείγματος είναι διαφορετική, εφόσον το *capillary spinner* δίνει τη θέση του στον θάλαμο υγρασίας MCH-trans (*Multi-sample Humidity Chamber*), ο οποίος επιτρέπει την ελεγχόμενη μεταβολή τόσο της υγρασίας όσο και της θερμοκρασίας, δεδομένου ότι διαθέτει και μία επιπλέον μονάδα ελέγχου της θερμοκρασίας (TCU 60M Control Unit). Τα εύρη των υγρασιών που μπορεί να διαχειριστεί ο θάλαμος είναι πάντοτε εξαρτώμενα από την ορισθείσα θερμοκρασία και για το εύρος θερμοκρασιών (20°C- 60°C), το αποδεκτό εύρος διακύμανσης των σχετικών υγρασιών είναι 5%-95%. Εντός του θαλάμου υπάρχει μία ροδέλα που φέρει θέσεις για τους δειγματοφορείς. Για την διάταξη αυτή χρησιμοποιείται άλλος τύπο δειγματοφορέα, συγκεκριμένα σε ένα μεταλλικό δακτύλιο τοποθέτησης πολυμερούς (*kapton holder*) τοποθετείται το κρυσταλλικό υλικό σε ειδικό φύλλο από πολυμερές (*kapton foil*). Για να επιτευχθεί το βέλτιστο πάκτωμα των κρυστάλλων, τα δοχεία τύπου Eppendorf φυγοκεντρώνονται στις 2000 rpm

για 5 λεπτά. Στην περίπτωση της HEWL απαιτήθηκαν μόνο 3 Eppendorf, δεδομένου ότι η συγκεκριμένη κρυστάλλωση αποδίδει πολύ κρυσταλλικό υλικό.

Για την διερεύνηση της επιρροής που ασκεί η μεταβολή της σχετικής υγρασίας στο κρυσταλλικό πολυμόρφου  $P4_32_12$ , μελετήθηκε με πέντε σειρές πειραμάτων. Η ορισθείσα θερμοκρασία για την διεξαγωγή της μελέτης των σχετικών υγρασιών ήταν οι 21°C, η θερμοκρασία δωματίου. Κάθε σειρά αποτελούνταν από διαφορετικό αριθμό κύκλων, με το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό ότι στην περίπτωση αυτή διεξήχθησαν και πειράματα όπου το μοτίβο μεταβολών δεν ακολουθούσε ομαλή πορεία, αλλά σκαμπανεβάσματα. Ωστόσο, στην παρούσα διπλωματική εργασία παρατίθενται μόνο οι κύκλοι στους οποίους πραγματοποιήθηκε ομαλή μεταβολή των επιπέδων σχετικής υγρασίας.

**Πίνακας 3.3.** Τα χαρακτηριστικά των κύκλων ελεγχόμενων μεταβολών της σχετικής υγρασίας για κάθε σειρά.

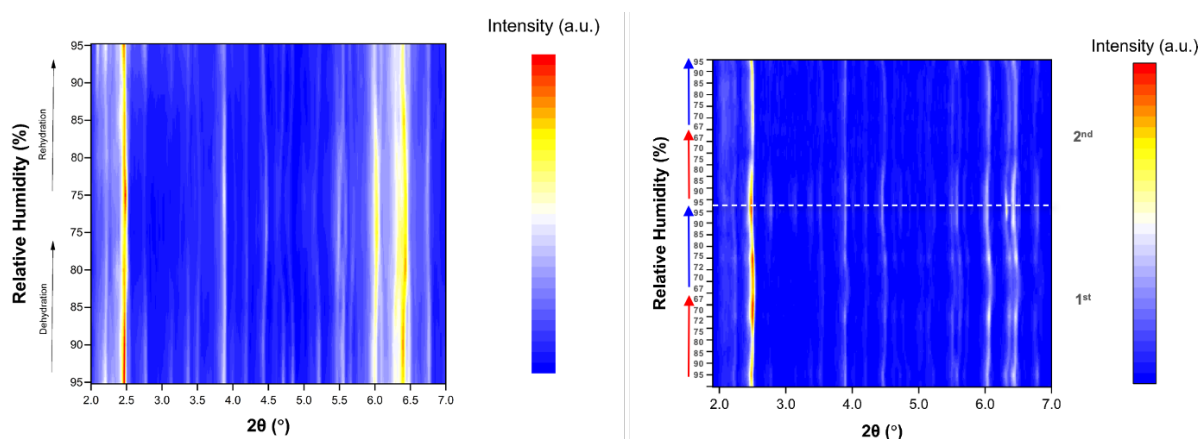
| Σειρά 1                | Αφυδάτωση         | Ενυδάτωση | Βήμα RH%       | Χρόνος Αναμονής | Scans/RH level |
|------------------------|-------------------|-----------|----------------|-----------------|----------------|
| 1 <sup>ος</sup> Κύκλος | 95% → 75%         | 75% → 95% | 5%             | 120 minutes     | 20             |
| Σειρά 2                | Αφυδάτωση         | Ενυδάτωση | Βήμα RH%       | Χρόνος Αναμονής | Scans/RH level |
| 1 <sup>ος</sup> Κύκλος | 95% → 67%         | 67% → 95% | 5%, 3%, 2%     | 60 minutes      | 10             |
| 2 <sup>ος</sup> Κύκλος | 95% → 67%         | 67% → 95% | 5%, 3%         | 60 minutes      | 5              |
| Σειρά 3                | Αφυδάτωση         | Ενυδάτωση | Βήμα RH%       | Χρόνος Αναμονής | Scans/RH level |
| 1 <sup>ος</sup> Κύκλος | Μη ομαλή μεταβολή |           | 7%, 5%         | 120 minutes     | 5              |
| 2 <sup>ος</sup> Κύκλος | Μη ομαλή μεταβολή |           | 7%, 5%         | 120 minutes     | 5              |
| Σειρά 4                | Αφυδάτωση         | Ενυδάτωση | Βήμα RH%       | Χρόνος Αναμονής | Scans/RH level |
| 1 <sup>ος</sup> Κύκλος | Μη ομαλή μεταβολή |           | 7%, 5%         | 120 minutes     | 5              |
| 2 <sup>ος</sup> Κύκλος | Μη ομαλή μεταβολή |           | 7%, 5%         | 120 minutes     | 5              |
| Σειρά 5                | Αφυδάτωση         | Ενυδάτωση | Βήμα RH%       | Χρόνος Αναμονής | Scans/RH level |
| 1 <sup>ος</sup> Κύκλος | Μη ομαλή μεταβολή |           | 7%, 5%         | 120 minutes     | 5              |
| 2 <sup>ος</sup> Κύκλος | Μη ομαλή μεταβολή |           | 7%, 5%         | 120 minutes     | 5              |
| 3 <sup>ος</sup> Κύκλος | Μη ομαλή μεταβολή |           | 7%, 5%         | 120 minutes     | 5              |
| 4 <sup>ος</sup> Κύκλος | Μη ομαλή μεταβολή |           | 7%, 5%         | 120 minutes     | 5              |
| 5 <sup>ος</sup> Κύκλος | 95% → 75%         | 75% → 95% | 5%             | 120 minutes     | 5              |
| 6 <sup>ος</sup> Κύκλος | 95% → 51%         | 51% → 95% | 5%, 4%, 2%, 1% | 120 minutes     | 5              |
| 7 <sup>ος</sup> Κύκλος | 95% → 30%         | 30% → 95% | 10%, 5%, 2%    | 90 minutes      | 5              |

Τα scans που συλλέχθηκαν από κάθε επίπεδο σχετικής υγρασίας συγκρίθηκαν ένα προς ένα μεταξύ τους είτε με Overplot στο υπολογιστικό πακέτο HighScore Plus είτε μέσω της εφαρμογής WinPlotR, και όσα είχαν την ίδια ποιότητα εντάσεων συνδυάστηκαν (merge) σε ένα μοναδικό dataset, αντιπροσωπευτικό για το επίπεδο υγρασίας από το οποίο συλλέχθηκαν. Ακολούθησε η ανάλυση κατά Pawley, όπως περιεγράφηκε στο υποκεφάλαιο 2.3.8, μέσω του κρυσταλλογραφικού υπολογιστικού

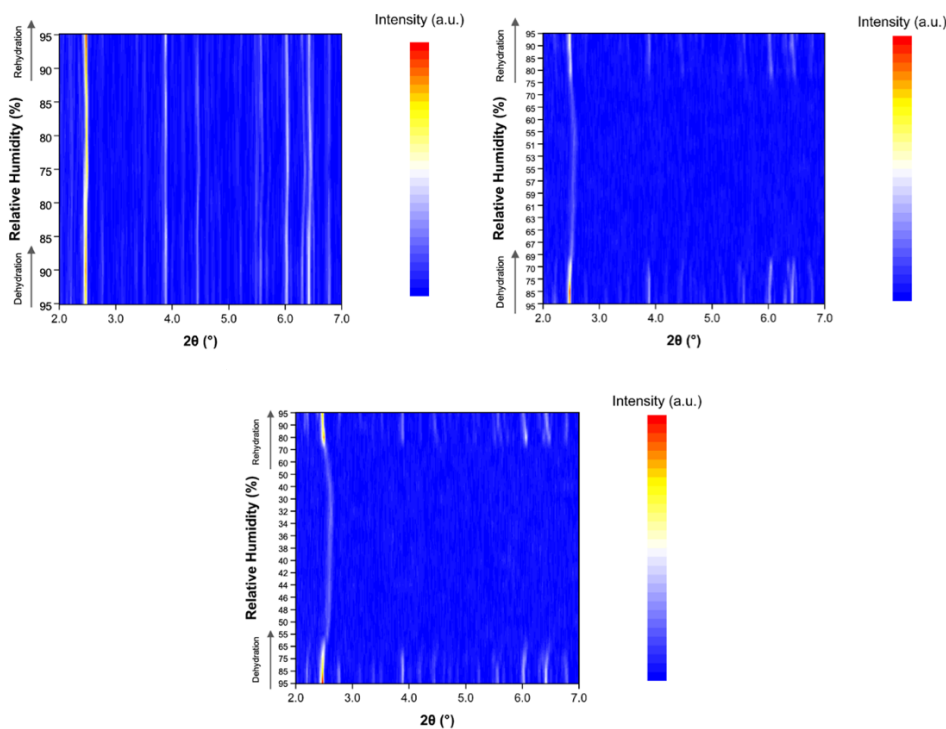
πακέτου HighScore καθιστώντας εφικτή την καταγραφή μεταβολών σε επίπεδο μοναδιαίας κυψελίδας. Συγκεκριμένα, για κάθε επίπεδο σχετικής υγρασίας, υπολογίστηκαν οι πλεγματικές σταθερές και ο όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας επιτρέποντας μία πρωταρχική ανάλυση, και αποκαλύπτοντας πως επιδρά το περιβάλλον υγρασίας σε επίπεδο μοναδιαίας κυψελίδας.

### 3.3 Αποτελέσματα

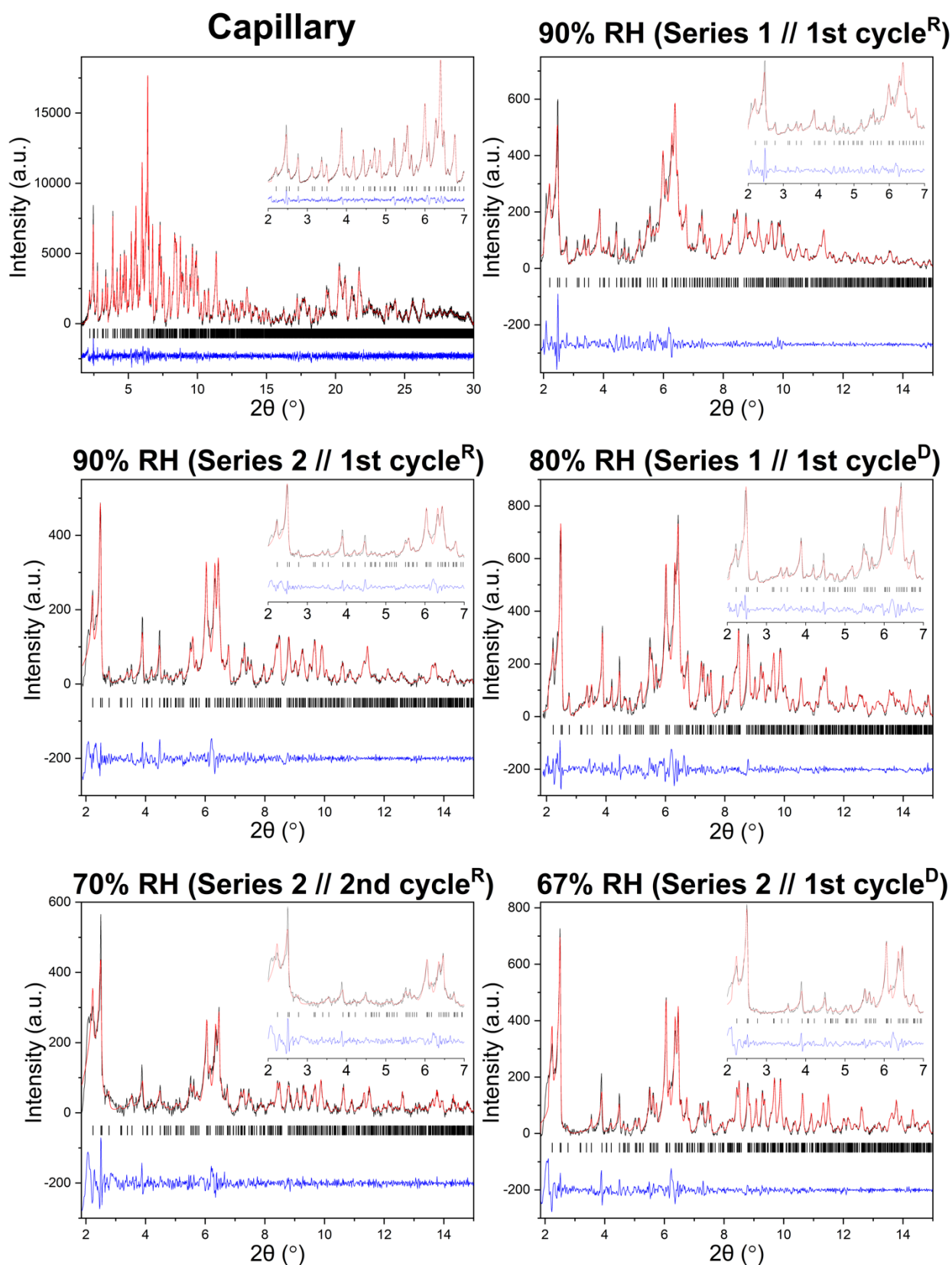
Η επίδραση της υγρασίας στο κρυσταλλικό πολύμορφο τετραγωνικής συμμετρίας που εξετάστηκε ως προς τις διαφορετικές τιμές σχετικής υγρασίας, μόνο για τις ομαλές μεταβολές, αποδίδεται για κάθε σειρά σε ένα διάγραμμα επιφανείας (*surface plot*), το οποίο αποτελεί μία κάτοψη των εντάσεων διαδοχικών μοτίβων περιήλασης συναρτήσει της γωνίας  $2\theta$ , όπου περιλαμβάνει όλους του κύκλους μεταβολών της σχετικής υγρασίας που υποβλήθηκε το δείγμα. (Εικόνα 3.4)



**Εικόνα 3.3.** Διάγραμμα επιφανείας δεδομένων XRPD δειγμάτων λυσοζύμης αριστερά της Σειράς 1 και δεξιά της Σειράς 2. Στον άξονα y παρατίθενται κατά σειρά οι κύκλοι ομαλής μεταβολής αφυδάτωσης και ενυδάτωσης για την εκάστοτε πειραματική σειρά. Η συλλογή δεδομένων έγινε στον θάλαμο υγρασίας MHC-trans του εργαστηριακού περιθλασιμέτρου ( $\lambda=1.540585$  (3) Å).

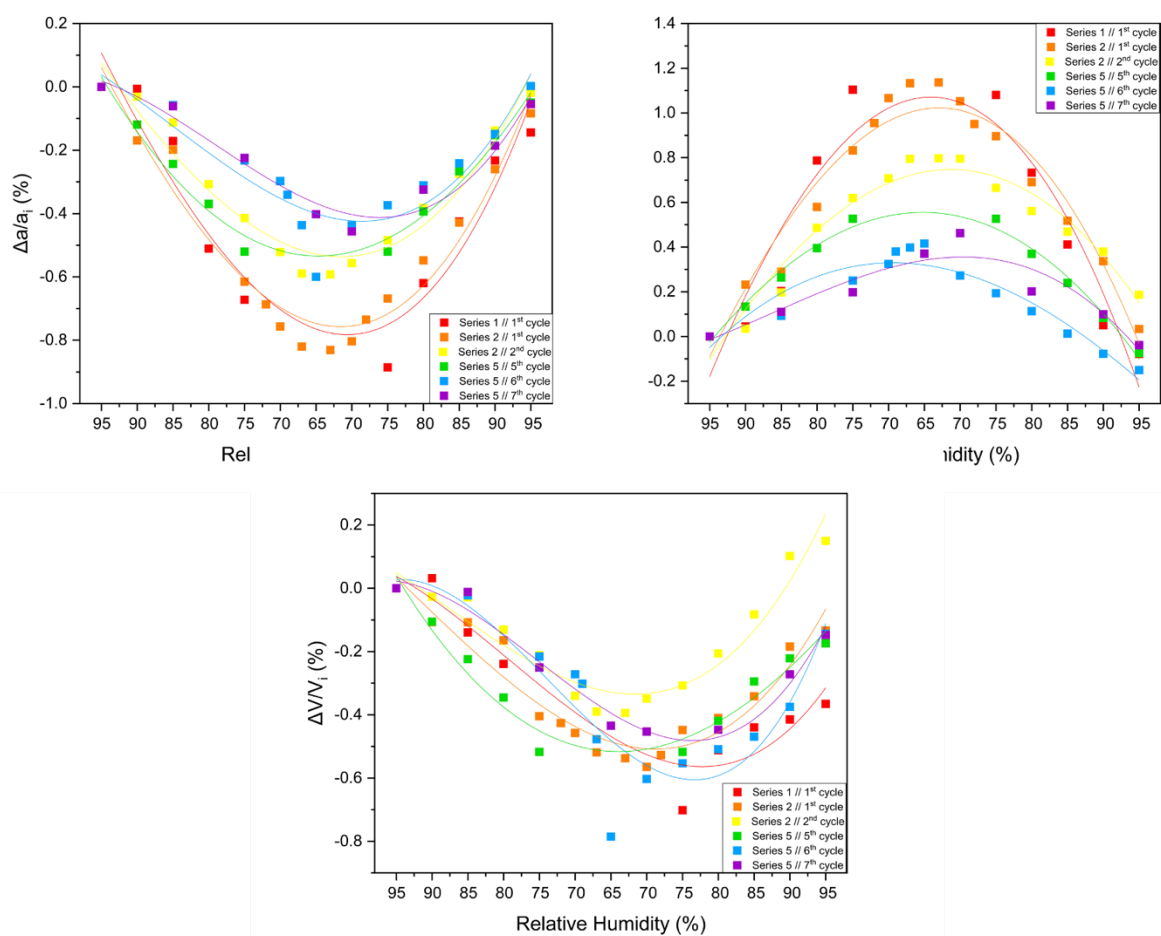


**Εικόνα 3.4.** Διάγραμμα επιφανείας δεδομένων XRPD δειγμάτων λυσοζύμης της Σειράς 5, αριστερά δίδεται ο 5<sup>ος</sup> κύκλος, ενδιάμεσως ο 6<sup>ος</sup> κύκλος και δεξιά ο 7<sup>ος</sup> κύκλος. Στον άξονα y παρατίθενται τα διαφορετικά επίπεδα της σχετικής υγρασίας της ομαλής μεταβολής αφυδάτωσης και ενυδάτωσης για την εκάστοτε πειραματική σειρά. Η συλλογή δεδομένων έγινε στον θάλαμο υγρασίας MHC-trans του εργαστηριακού περιθλασιμέτρου ( $\lambda=1.540585$  (3) Å).



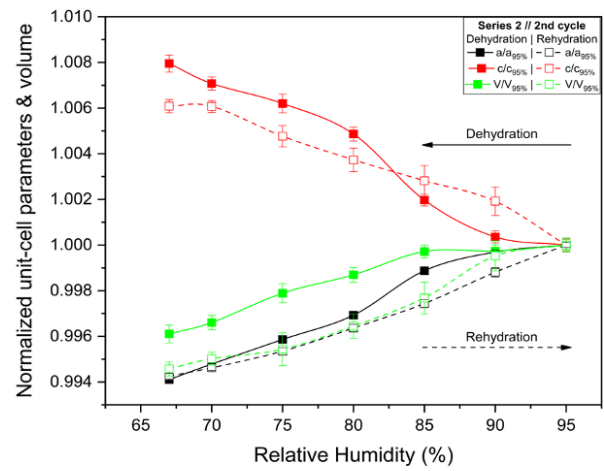
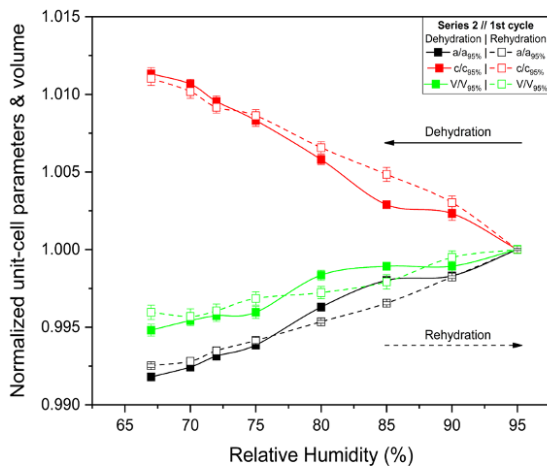
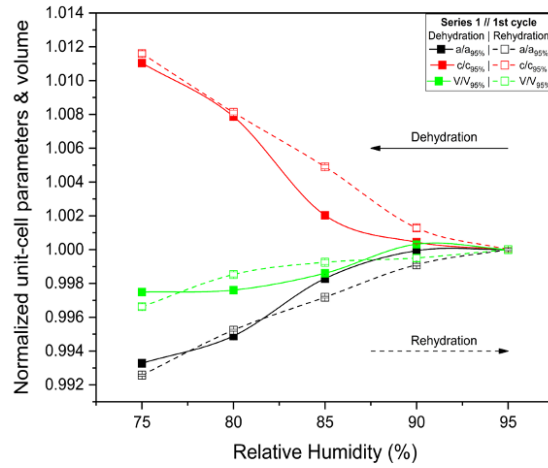
**Εικόνα 3.5.** Αναλύσεις Pawley των δεδομένων XRPD της HEWL για ενδεικτικά επίπεδα υγρασίας. Η μαύρη και η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύουν την πειραματική και την θεωρητική καμπύλη αντίστοιχα, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί την μεταξύ τους διαφορά. Οι πράσινες κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, για το κρυσταλλικό πολύμορφο P4<sub>3</sub>2<sub>1</sub>2.



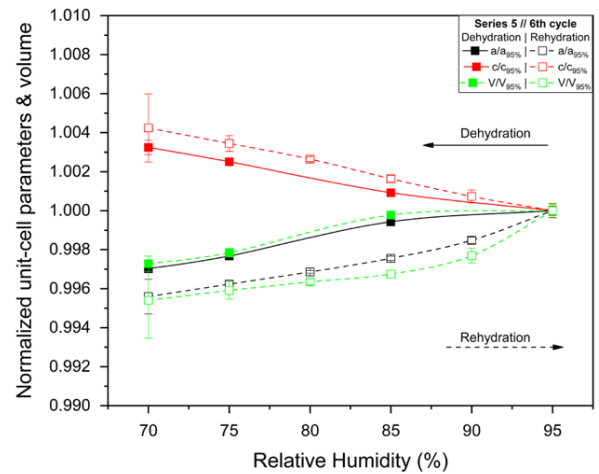
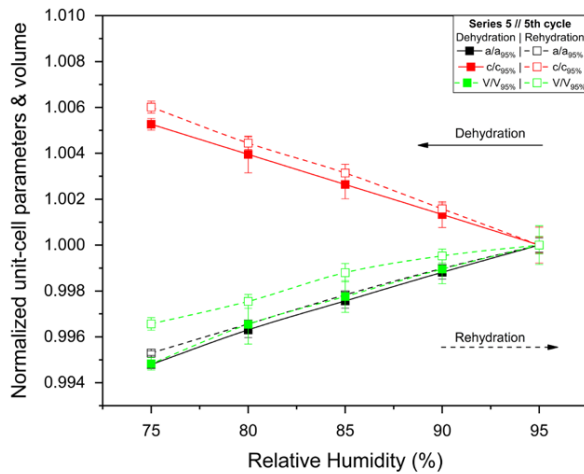


**Εικόνα 3.6.** Διαγράμματα των επί τοις % μεταβολών των πλεγματικών σταθερών  $\Delta a/a_i$  (πάνω αριστερά),  $\Delta c/c_i$  (πάνω δεξιά), καθώς και του όγκου  $\Delta V/V_i$  (κάτω) για τους κύκλους ομαλής μεταβολής της σχετικής υγρασίας (Σειρές 1, 2 και 5).





**Εικόνα 3.7.** Διαγράμματα μεταβολής των κανονικοποιημένων πλεγματικών σταθερών  $a/a_i$ ,  $c/c_i$  και  $V/V_i$  τόσο κατά την αφυδάτωση, όσο και κατά την ενυδάτωση του μοναδικού κύκλου (πάνω) της σειράς 1, καθώς και του 1<sup>ου</sup> (αριστερά) και 2<sup>ου</sup> (δεξιά) κύκλου ομαλής μεταβολής της σχετικής υγρασίας της σειράς 2. Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε ως προς το 95% της αφυδάτωσης και ως προς το 95% της ενυδάτωσης για τα επίπεδα RH της ενυδάτωσης.

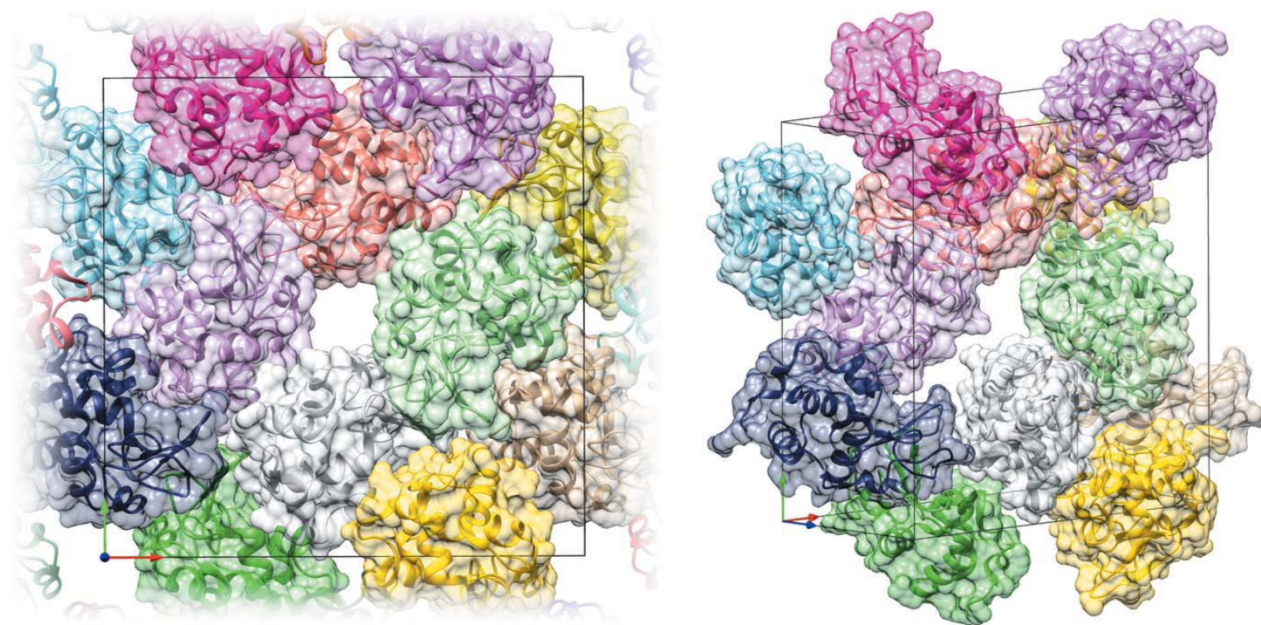


**Εικόνα 3.8.** Διαγράμματα μεταβολής των κανονικοποιημένων πλεγματικών σταθερών  $a/a_i$ ,  $c/c_i$  και  $V/V_i$  τόσο κατά την αφυδάτωση, όσο και κατά την ενυδάτωση του 5<sup>ου</sup> (αριστερά) και 6<sup>ου</sup> (δεξιά) κύκλου ομαλής μεταβολής της σχετικής υγρασίας της σειράς 5. Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε ως προς το 95% της αφυδάτωσης και ως προς το 95% της ενυδάτωσης για τα επίπεδα RH της ενυδάτωσης.

### 3.4 Συμπεράσματα & Συζήτηση

Η *in-situ* κρυσταλλογραφική μελέτη του κρυσταλλικού πολυμόρφου τετραγωνικής ( $P4_32_12$ ) λυσοζύμης από το ασπράδι του αυγού της όρνιθας (HEWL), υπό ελεγχόμενη μεταβολή της σχετικής υγρασίας, τόσο σε κύκλους ομαλών, όσο και μη ομαλών μεταβολών αφυδάτωσης και ενυδάτωσης, αποκαλύπτουν μια αδιαμφισβήτητη ανθεκτική πρωτεΐνη, αναφορικά με την συγκεκριμένη κρυσταλλική συμμετρία. Η ανθεκτικότητα επιβεβαιώθηκε σε πέντε πειραματικές σειρές, δύο ομαλών μεταβολών, δύο μη ομαλών μεταβολών και μία, την τελευταία, που συνδυάζει και τους δύο τύπους μεταβολών. Ακόμη, στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, εξετάζοντας τους κύκλους μόνο των ομαλών μεταβολών της σχετικής υγρασίας, επαληθεύτηκαν αποτελέσματα από πειράματα που είχαν πραγματοποιηθεί και στο παρελθόν για το συγκεκριμένο κρυσταλλικό πολύμορφο. (Logotheti et al., 2019).

Η δεικτοδότηση και η ανάλυση Pawley, επέτρεψαν την εξαγωγή συμπερασμάτων που αφορούν την επίδραση της σχετικής υγρασίας στο κρυσταλλικό πολύμορφο. Αρχικά, να τονιστεί ότι διατηρείται η κρυσταλλική συμμετρία του πολυμόρφου, με το *Space Group* να παραμένει το ίδιο  $P4_32_12$ . Η μοναδιαία κυψελίδα, ωστόσο, φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά. Συγκεκριμένα, κατά την σταδιακή αφυδάτωση παρατηρείται μείωση της πλεγματικής σταθεράς  $a$  και αύξηση της πλεγματικής σταθεράς  $c$ , ενώ οι αντίστροφες παρατηρήσεις πραγματοποιούνται κατά την ενυδάτωση. Για τον όγκο της μοναδιαίας κυψελίδας διαπιστώθηκε μείωση των τιμών της κατά την αφυδάτωση, και αντίστροφα αύξηση κατά την ενυδάτωση. Η αύξηση της πλεγματικής σταθεράς  $c$  πιθανά οφείλεται στο γεγονός πως ένα κανάλι διαλύτη βρίσκεται κατά μήκος του άξονα  $c$  και οι αλλαγές της σχετικής υγρασίας δύναται να επιδράσουν στην κατανομή των μορίων νερού εντός του διαλύου. Ο βαθμός της επιρροής σχετίζεται με τις μεταβολές που σημειώνονται σε επίπεδο ασθενών αλληλεπιδράσεων.



**Εικόνα 3.9.** Μοριακό πακετάρισμα της τετραγωνικής συμμετρίας μοναδιαίας κυψελίδας της HEWL (PDB code 1jis). Η κρυσταλλική δομή αναπαρίσταται με την μορφή κορδέλας, με τις μαύρες γραμμές να αντιστοιχούν στους άξονες της μοναδιαίας κυψελίδας, το οποίο περιέχει οκτώ μόρια. Στην αριστερή εικόνα διαφαίνεται το γραμμικό κανάλι, το οποίο διασχίζει απευθείας τον κρύσταλλο παράλληλα προς τον άξονα  $c$  (κάθετα στην σελίδα). Στα δεξιά απεικονίζεται περιστρεφόμενη όψη του μοντέλου. Τα κόκκινα, πράσινα και μπλε βέλη αντιστοιχούν στους άξονες  $a$ ,  $b$  και  $c$ , αντίστοιχα (Datta et al., 2001; Logotheti et al., 2019).

Από το σύνολο των αποτελεσμάτων που συλλέχθηκαν, το συγκεκριμένο κρυσταλλικό πολύμορφο της HEWL φανέρωσε εξαιρετική ανθεκτικότητα. Όταν το κρυσταλλικό πολύμορφο εξετάστηκε στη σειρά 2 σε δύο κύκλους ομαλής αφυδάτωσης και επακόλουθης επανενυδάτωσης απέδιδε σήμα περίθλασης έως και το επίπεδο υγρασίας 67%, ικανοποιητικών εντάσεων. Εντούτοις, όταν εξετάστηκε στην 5<sup>η</sup> σειρά μετά από τέσσερις κύκλους μη ομαλών μεταβολών της σχετικής υγρασίας και έναν ομαλής (5<sup>ος</sup> κύκλος: 95%-75%-95%) το σήμα άρχισε να εξασθενεί σημαντικά ήδη από το επίπεδο σχετικής υγρασίας 69%. Η εξασθένιση αυτή οφείλεται στην εκτεταμένη μηχανική καταπόνηση του δείγματος σε συνεχείς διακυμάνσεις της σχετικής υγρασίας και των της συσσώρευσης βλαβών λόγω ακτινοβολίας.

Εν συνεχεία, οι κύκλοι 6 και 7 της 5<sup>ης</sup> σειράς αποσκοπούσαν στην εύρεση του κατώτατου ορίου αντοχής του κρυσταλλικού πολυμόρφου. Οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν φανέρωσαν πως σήμα περίθλασης, αν και εξασθενημένο, συλλέγεται ως και το κατώτερο επίπεδο σχετική υγρασίας, το 30% (κύκλος 7<sup>ος</sup>). Ακολούθησε επανενυδάτωσης του δείγματος και από το επίπεδο σχετικής υγρασίας 70% το σήμα περίθλασης που συλλέγεται, είναι ισχυρότερο, υποδηλώνοντας επανάκαμψη της κρυσταλλικότητας του πολυμόρφου. Να σημειωθεί πως σε όλους του κύκλους ομαλής μεταβολής που εξετάστηκαν, οι επιδράσεις της αφυδάτωσης αναιρούνται ως ένα μεγάλο βαθμό κατά την ενυδάτωση, αλλά όχι πλήρως. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με πειράματα που έχουν εξαχθεί και στο παρελθόν για το ίδιο κρυσταλλικό πολύμορφο (Logotheti et al., 2019; Trampari *et al.*, 2018).

Η αξία της μελέτης της σχετικής υγρασίας βασίζεται στην κατανομή των μορίων νερού, τα οποία διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην δομή και κατά επέκταση στην λειτουργία των μορίων. Μία μικρή μεταβολή στο περιβάλλον της πρωτεΐνης δύναται να έχει μεγάλο αντίκτυπο στην αναδίπλωση της και στα μετέπειτα στάδια της δράσης της. Τα κρυσταλλικά πολύμορφα μίας πρωτεΐνης δύναται να προσφέρουν μία άμεση αποτύπωση της επίδρασης της σχετικής υγρασίας σε ένα υπό εξέταση πολύμορφο, μέσω των πειραμάτων περίθλασης, δίδοντας τις πρώτες βασικές πληροφορίες που αφορούν στην δομή. Εκτεταμένες μελέτες σε πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα ή ως συντηρητικά φαρμάκων είναι σημαντικές για την εύρεση των ορίων ανθεκτικότητας στα κρυσταλλικά τους πολύμορφα, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι κρύσταλλοι δύναται να είναι πιο ανθεκτικοί από τις πρωτεΐνες σε διαλυτή μη κρυσταλλική μορφή. Οι συλλεχθείσες πληροφορίες δύναται να φανούν χρήσιμες για την βέλτιστη ρύθμιση του περιβάλλοντος παρασκευής, συσκευασίας και συντήρησης ενός φαρμακευτικού σκευάσματος.

## 4. Παράρτημα

### 4.1 Πολυκρυσταλλικά δείγματα ΗΙ παρουσία του προσδέτη m-cresol

**Πίνακας 4.1.** Οι πλεγματικές σταθερές και οι αντίστοιχες τιμές pH για τα δείγματα της 3<sup>ης</sup> Σειράς κρυσταλλώσεων της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη m-cresol, όπως εξήχθησαν από την ανάλυση Pawley, μέσω του HighScore Plus. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF [ $\lambda=1.30084(2)$  Å] σε θερμοκρασία δωματίου.

| Series 3 | pH              |                 | Space               | Unit-Cell Parameters |            |            |             |              | Statistics                              |         |          |
|----------|-----------------|-----------------|---------------------|----------------------|------------|------------|-------------|--------------|-----------------------------------------|---------|----------|
| Sample   | pH <sub>i</sub> | pH <sub>f</sub> | Group               | a (Å)                | b (Å)      | c (Å)      | $\beta$ (°) | $\gamma$ (°) | V (*10 <sup>5</sup> ) (Å <sup>3</sup> ) | Rwp     | $\chi^2$ |
| mcre3.1  | 4.2             | 5.13            | P2 <sub>1</sub> (γ) | 87.118(1)            | 70.1976(8) | 48.130(6)  | 106.7241(3) | 90           | 2.81887(3)                              | 4.45178 | 1.20262  |
| mcre3.2  | 4.3             | 5.3             |                     | 87.1409(5)           | 70.2431(4) | 48.1472(3) | 106.7527(1) | 90           | 2.82203(3)                              | 5.75471 | 1.28938  |
| mcre3.3  | 4.4             | 5.32            |                     | 87.1520(6)           | 70.2396(4) | 48.1493(3) | 106.7532(2) | 90           | 2.82236(3)                              | 5.72051 | 1.23294  |
| mcre3.4  | 4.5             | 5.39            |                     | 87.1753(4)           | 70.2695(3) | 48.1679(2) | 106.7804(1) | 90           | 2.82500(2)                              | 4.72755 | 1.40283  |
| mcre3.5  | 4.6             | 5.5             |                     | 87.1891(4)           | 70.2834(3) | 48.1697(2) | 106.7873(1) | 90           | 2.82601(2)                              | 3.81442 | 1.34896  |
| mcre3.6  | 4.9             | 5.78            |                     | 87.2987(6)           | 70.3338(4) | 48.2162(3) | 106.8805(1) | 90           | 2.832939(3)                             | 4.36927 | 1.30222  |
| mcre3.7  | 5.4             | 6.06            |                     | 87.403(1)            | 70.379(1)  | 48.2364(8) | 106.9560(3) | 90           | 2.83821(7)                              | 4.21038 | 1.19497  |
| mcre3.8  | 5.8             | 6.3             |                     | 87.479(1)            | 70.4375(8) | 48.2622(6) | 107.0155(3) | 90           | 2.84364(6)                              | 4.97013 | 1.26997  |
| mcre3.9  | 6.2             | 6.52            |                     | 87.514(1)            | 70.4340(9) | 48.2623(3) | 107.0468(3) | 90           | 2.84417(7)                              | 6.33849 | 1.17659  |
| mcre3.10 | 6.6             | 6.81            | P2 <sub>1</sub> (β) | 62.5633(4)           | 61.9169(3) | 47.9195(3) | 111.2689(1) | 90           | 1.72983(2)                              | 4.99765 | 1.37451  |
| mcre3.11 | 6.8             | 6.92            |                     | 62.3610(4)           | 62.0027(2) | 47.9402(2) | 111.1325(1) | 90           | 1.72897(1)                              | 5.04553 | 1.44404  |
| mcre3.12 | 7               | 7.07            |                     | 62.2409(2)           | 62.0226(2) | 47.9177(2) | 111.0224(1) | 90           | 1.72666(1)                              | 5.86129 | 1.27881  |
| mcre3.13 | 7.1             | 7.13            | P2 <sub>1</sub> (β) | 62.1670(3)           | 62.0467(2) | 47.9228(2) | 111.0125(1) | 90           | 1.72558(1)                              | 5.12665 | 1.46079  |
| mcre3.14 | 7.2             | 7.18            | R3                  | 79.9322(5)           | 79.9322(5) | 40.6096(4) | 90          | 120          | 2.24699(3)                              |         |          |
|          |                 |                 | P2 <sub>1</sub> (β) | 62.0352(1)           | 62.0691(8) | 47.924(1)  | 110.9973(4) | 90           | 1.7277(5)                               | 5.21179 | 1.39421  |
|          |                 |                 | R3                  | 79.9107(2)           | 79.9107(2) | 40.6224(2) | 90          | 120          | 2.24649(1)                              |         |          |
| mcre3.15 | 7.3             | 7.25            | P2 <sub>1</sub> (β) | 62.301(3)            | 61.392(4)  | 47.906(2)  | 110.9616(9) | 90           | 1.71100(2)                              | 5.88045 | 1.47961  |
| mcre3.16 | 7.4             | 7.3             | R3                  | 79.8504(3)           | 79.8504(3) | 40.5904(2) | 90          | 120          | 2.24133(2)                              |         |          |
|          |                 |                 |                     | 79.8895(2)           | 79.8895(2) | 40.6713(2) | 90          | 120          | 2.24801(1)                              |         |          |
|          |                 |                 |                     | 79.8803(2)           | 79.8803(2) | 40.6850(1) | 90          | 120          | 2.24825(1)                              | 5.40345 | 1.24507  |
| mcre3.17 | 7.5             | 7.32            | R3                  | 79.8438(2)           | 79.8438(2) | 40.6704(2) | 90          | 120          | 2.24539(1)                              | 5.92972 | 1.46036  |
| mcre3.18 | 7.6             | 7.43            |                     | 79.8386(2)           | 79.8386(2) | 40.7111(2) | 90          | 120          | 2.24735(1)                              | 5.61204 | 1.23025  |
| mcre3.19 | 7.7             | 7.53            |                     | 79.9327(3)           | 79.9327(3) | 40.7899(3) | 90          | 120          | 2.25700(2)                              | 6.34065 | 1.29077  |
| mcre3.20 | 7.8             | 7.6             | R3                  | 79.8194(2)           | 79.8194(2) | 40.7820(2) | 90          | 120          | 2.25018(1)                              | 5.73899 | 1.2287   |
| mcre3.21 | 8               | 7.75            |                     | 79.8088(4)           | 79.8088(4) | 40.7680(5) | 90          | 120          | 2.24880(4)                              | 4.52267 | 1.13454  |
| mcre3.22 | 8.2             | 7.92            |                     |                      |            |            |             |              |                                         |         |          |

**Πίνακας 4.2.** Οι πλεγματικές σταθερές και οι αντίστοιχες τιμές pH για τα δείγματα της 4<sup>ης</sup> Σειράς κρυσταλλώσεων της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδότη m-cresol, όπως εξήχθησαν από την ανάλυση Pawley, μέσω του HighScore Plus. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF [ $\lambda=1.30084(2)$  Å] σε θερμοκρασία δωματίου.

| Series 4 | pH              |                 | Space Group         | Unit-Cell Parameters |             |            |             |       | Statistics                              |         |                |
|----------|-----------------|-----------------|---------------------|----------------------|-------------|------------|-------------|-------|-----------------------------------------|---------|----------------|
| Sample   | pH <sub>i</sub> | pH <sub>f</sub> |                     | a (Å)                | b (Å)       | c (Å)      | β (°)       | γ (°) | V (*10 <sup>5</sup> ) (Å <sup>3</sup> ) | Rwp     | χ <sup>2</sup> |
| mcre4.1  | 5               | 5.72            | P2 <sub>1</sub> (γ) | 87.2950(9)           | 70.3230(6)  | 48.2021(5) | 106.8692(2) | 90    | 2.83172(5)                              | 4.5537  | 1.44488        |
| mcre4.2  | 5.4             | 6.05            |                     | 87.428(3)            | 70.408(2)   | 48.263(2)  | 106.9715(7) | 90    | 2.84152(2)                              | 4.7998  | 1.21361        |
| mcre4.4  | 6.2             | 6.53            |                     | 87.5196(5)           | 70.4956(3)  | 48.2944(3) | 107.0521(1) | 90    | 2.84865(3)                              | 7.85992 | 1.28689        |
| mcre4.6  | 6.6             | 6.8             |                     | 62.3734(4)           | 61.9439(3)  | 47.8950(3) | 111.1751(1) | 90    | 1.72555(2)                              | 5.90224 | 1.34253        |
| mcre4.7  | 6.7             | 6.88            | P2 <sub>1</sub> (β) | 62.2501(4)           | 61.9604(2)  | 47.8742(3) | 111.1017(1) | 90    | 1.72270(2)                              | 6.28082 | 1.15495        |
| mcre4.8  | 6.8             | 6.93            |                     | 62.1820(4)           | 61.9740(3)  | 47.8762(3) | 111.0779(1) | 90    | 1.72155(2)                              | 6.22658 | 1.23924        |
| mcre4.9  | 6.9             | 7.02            |                     | 62.0764(4)           | 62.0040(2)  | 47.8703(2) | 110.9873(1) | 90    | 1.72029(2)                              | 6.70894 | 1.21786        |
| mcre4.10 | 7               | 7.03            | P2 <sub>1</sub> (β) | 62.0358(4)           | 62.0271(2)  | 47.8820(3) | 110.9475(1) | 90    | 1.72068(2)                              | 6.06628 | 1.17413        |
|          |                 |                 | R3                  | 79.875(1)            | 79.875(1)   | 40.4899(9) | 90          | 120   | 2.23720(6)                              |         |                |
| mcre4.11 | 7.1             | 7.13            | P2 <sub>1</sub> (β) | 61.8451(9)           | 62.0417(6)  | 47.8652(6) | 110.8747(3) | 90    | 1.71603(4)                              | 7.58382 | 1.18078        |
|          |                 |                 | R3                  | 79.8127(4)           | 79.8128(4)  | 40.5370(3) | 90          | 120   | 2.23628(2)                              |         |                |
| mcre4.12 | 7.2             | 7.17            | P2 <sub>1</sub> (β) | 61.656(1)            | 62.0157(6)  | 47.8324(7) | 110.8467(3) | 90    | 1.70922(4)                              | 6.9688  | 1.18046        |
|          |                 |                 | R3                  | 79.76939(3)          | 79.76939(3) | 40.4325(3) | 90          | 120   | 2.22809(2)                              |         |                |
| mcre4.13 | 7.3             | 7.26            | P2 <sub>1</sub> (β) | 61.620(1)            | 62.0345(8)  | 47.8420(9) | 110.8199(4) | 90    | 1.70937(5)                              | 7.63307 | 1.26629        |
|          |                 |                 | R3                  | 79.7778(4)           | 79.7778(4)  | 40.4980(4) | 90          | 120   | 2.23217(2)                              |         |                |
| mcre4.14 | 7.4             | 7.3             | P2 <sub>1</sub> (β) | 61.6222(7)           | 62.0616(4)  | 47.8661(5) | 110.8132(2) | 90    | 1.71112(3)                              | 5.99417 | 1.3436         |
|          |                 |                 | R3                  | 79.8113(2)           | 79.8113(2)  | 40.5499(3) | 90          | 120   | 2.23691(2)                              |         |                |
| mcre4.15 | 7.5             | 7.36            | P2 <sub>1</sub> (β) | 61.778(2)            | 62.128(2)   | 47.950(2)  | 110.8381(7) | 90    | 1.7200(1)                               | 9.58424 | 1.19035        |
|          |                 |                 | R3                  | 79.9259(3)           | 79.9259(3)  | 40.7988(3) | 90          | 120   | 2.25711(2)                              |         |                |
| mcre4.16 | 7.6             | 7.5             |                     | 79.7753(2)           | 79.7753(2)  | 40.6005(2) | 90          | 120   | 2.23769(1)                              | 5.97291 | 1.32901        |
| mcre4.17 | 7.8             | 7.64            | R3                  | 79.8900(5)           | 79.8900(5)  | 40.8453(5) | 90          | 120   | 2.25766(3)                              | 10.1426 | 1.06708        |
| mcre4.18 | 8               | 7.79            |                     | 79.6660(3)           | 79.6660(3)  | 40.5910(3) | 90          | 120   | 2.23104(2)                              | 6.57853 | 1.16797        |

**Πίνακας 4.3.** Οι πλεγματικές σταθερές και οι αντίστοιχες τιμές pH για τα δείγματα της 5<sup>ης</sup> Σειράς κρυσταλλώσεων της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη m-cresol, όπως εξήχθησαν από την ανάλυση Pawley, μέσω του HighScore Plus. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF [ $\lambda=1.07816(2)$  Å] σε θερμοκρασία δωματίου.

| Series 5 | pH              |                 | Space Group         | Unit-Cell Parameters |            |            |             |       | Statistics                              |         |                |
|----------|-----------------|-----------------|---------------------|----------------------|------------|------------|-------------|-------|-----------------------------------------|---------|----------------|
| Sample   | pH <sub>i</sub> | pH <sub>f</sub> |                     | a (Å)                | b (Å)      | c (Å)      | β (°)       | γ (°) | V (*10 <sup>5</sup> ) (Å <sup>3</sup> ) | Rwp     | χ <sup>2</sup> |
| mcre5.1  | 4.80            | 5.70            | P2 <sub>1</sub> (γ) | 87.2669(9)           | 70.3089(6) | 48.2083(4) | 106.8598(2) | 90    | 2.83075(4)                              | 3.43751 | 2.14673        |
| mcre5.2  | 5.00            | 5.82            |                     | 87.1704(7)           | 70.259(7)  | 48.1210(4) | 106.829(2)  | 90    | 2.8210(4)                               | 6.82743 | 2.15305        |
| mcre5.3  | 5.40            | 6.08            |                     | 87.364(2)            | 70.369(1)  | 48.2351(9) | 106.9434(4) | 90    | 2.83665(9)                              | 3.47377 | 1.82064        |
| mcre5.4  | 5.80            | 6.35            |                     | 87.4902(6)           | 70.4675(3) | 48.3006(3) | 107.0225(1) | 90    | 2.84740(3)                              | 3.34491 | 1.85641        |
| mcre5.5  | 6.20            | 6.59            |                     | 87.5558(5)           | 70.5333(3) | 48.3140(3) | 107.0754(1) | 90    | 2.85215(3)                              | 3.373   | 1.89872        |
| mcre5.6  | 6.40            | 6.74            |                     | 62.5912(5)           | 61.9093(3) | 47.9195(3) | 111.2961(2) | 90    | 1.73008(2)                              | 4.29164 | 1.68198        |
| mcre5.7  | 6.50            | 6.79            |                     | 62.5117(5)           | 61.9207(4) | 47.9176(3) | 111.2401(2) | 90    | 1.72879(2)                              | 4.47016 | 1.52959        |
| mcre5.8  | 6.60            | 6.88            | P2 <sub>1</sub> (β) | 62.4329(4)           | 61.9582(3) | 47.9141(3) | 111.1914(1) | 90    | 1.72810(2)                              | 4.02822 | 1.58939        |
| mcre5.9  | 6.70            | 6.92            |                     | 62.3436(4)           | 61.9763(3) | 47.9096(3) | 111.1350(1) | 90    | 1.72663(2)                              | 4.98717 | 1.4086         |
| mcre5.10 | 6.80            | 6.96            |                     | 62.2582(3)           | 61.9970(2) | 47.9058(3) | 111.0947(1) | 90    | 1.72517(2)                              | 4.24671 | 1.55831        |
| mcre5.11 | 6.90            | 7.02            |                     | 62.1422(5)           | 62.0203(3) | 47.9013(3) | 111.0391(1) | 90    | 1.72308(2)                              | 6.39496 | 1.96871        |
| mcre5.12 | 7.00            | 7.11            |                     | 61.9619(6)           | 62.0291(4) | 47.8819(4) | 110.9525(1) | 90    | 1.71862(3)                              | 6.75415 | 1.50803        |
| mcre5.13 | 7.20            | 7.21            |                     | 61.8384(7)           | 62.0836(5) | 47.8987(5) | 110.8822(2) | 90    | 1.71812(3)                              | 4.49303 | 1.59878        |
| mcre5.14 | 7.40            | 7.33            | R3                  | 79.8532(3)           | 79.8532(3) | 40.6420(3) | 90          | 120   | 2.24435(2)                              |         |                |
|          |                 |                 | P2 <sub>1</sub> (β) | 61.6877(5)           | 62.0992(3) | 47.8986(3) | 110.8342(1) | 90    | 1.71490(2)                              | 4.46594 | 1.72536        |
| mcre5.15 | 7.60            | 7.48            | R3                  | 79.8437(3)           | 79.8437(3) | 40.6651(3) | 90          | 120   | 2.24509(2)                              |         |                |
|          |                 |                 | P2 <sub>1</sub> (β) | 61.624(4)            | 62.097(4)  | 47.884(3)  | 110.766(1)  | 90    | 1.7134(2)                               | 5.8431  | 1.63564        |
| mcre5.16 | 7.80            | 7.66            | R3                  | 79.8199(4)           | 79.8199(4) | 40.6936(4) | 90          | 120   | 2.24532(2)                              |         |                |
|          |                 |                 |                     | 79.8216(2)           | 79.8216(2) | 40.6730(2) | 90          | 120   | 2.24428(1)                              | 3.95524 | 1.55093        |
| mcre5.17 | 7.90            | 7.72            | R3                  | 79.8202(2)           | 79.8202(2) | 40.7375(3) | 90          | 120   | 2.24776(2)                              | 2.92223 | 1.65401        |
| mcre5.18 | 8.00            | 7.78            |                     | 79.8234(5)           | 79.8234(5) | 40.7496(5) | 90          | 120   | 2.24861(3)                              | 3.61165 | 1.43613        |
| mcre5.19 | 8.10            | 7.87            |                     | 79.8421(3)           | 79.8421(3) | 40.7820(3) | 90          | 120   | 2.25145(2)                              | 4.64783 | 1.44209        |
| mcre5.20 | 8.20            | 7.95            | Weak Diffraction    |                      |            |            |             |       |                                         |         |                |

**Πίνακας 4.4.** Οι πλεγματικές σταθερές και οι αντίστοιχες τιμές pH για τα δείγματα της 6<sup>ης</sup> Σειράς κρυσταλλώσεων της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη m-cresol, όπως εξήχθησαν από την ανάλυση Pawley, μέσω του HighScore Plus. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF [ $\lambda=1.07816(2)$  Å] σε θερμοκρασία δωματίου.

| Series 6 | pH              |                 | Space Group     | Unit-Cell Parameters |            |            |              |              |                                         | Statistics |          |
|----------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------|------------|------------|--------------|--------------|-----------------------------------------|------------|----------|
| Sample   | pH <sub>i</sub> | pH <sub>f</sub> |                 | a (Å)                | b (Å)      | c (Å)      | $\beta$ (°)  | $\gamma$ (°) | V (*10 <sup>3</sup> ) (Å <sup>3</sup> ) | Rwp        | $\chi^2$ |
| mcre6.1  | 4.20            | 5.19            | P21( $\gamma$ ) | 87.151(2)            | 70.250(1)  | 48.165(1)  | 106.7352(5)  | 90           | 2.82396(9)                              | 3.49457    | 1.77085  |
| mcre6.2  | 4.40            | 5.34            |                 | 87.1851(9)           | 70.2836(7) | 48.1979(5) | 106.7652(2)  | 90           | 2.82788(5)                              | 3.63016    | 1.74563  |
| mcre6.3  | 4.60            | 5.50            |                 | 87.213(1)            | 70.3032(8) | 48.2025(6) | 106.8097(3)  | 90           | 2.82917(6)                              | 3.68916    | 1.69751  |
| mcre6.4  | 4.80            | 5.67            |                 | 87.278(1)            | 70.3323(7) | 48.2234(6) | 106.8669(3)  | 90           | 2.83281(6)                              | 3.59715    | 1.68801  |
| mcre6.5  | 5.00            | 5.81            |                 | 87.331(1)            | 70.3574(7) | 48.2396(6) | 106.8999(3)  | 90           | 2.83601(6)                              | 3.20417    | 1.59923  |
| mcre6.6  | 5.20            | 5.91            |                 | 87.384(2)            | 70.386(1)  | 48.2526(9) | 106.9428(4)  | 90           | 2.83904(9)                              | 3.33282    | 1.70911  |
| mcre6.7  | 5.40            | 6.08            |                 | 87.412(3)            | 70.407(3)  | 48.269(2)  | 106.9772(8)  | 90           | 2.8412(2)                               | 3.8709     | 1.70637  |
| mcre6.8  | 5.60            | 6.24            |                 | 87.498(1)            | 70.455(1)  | 48.2925(8) | 107.0288(3)  | 90           | 2.84654(8)                              | 4.06703    | 1.72047  |
| mcre6.9  | 5.80            | 6.37            |                 | 87.491(2)            | 70.460(2)  | 48.286(1)  | 107.0430(5)  | 90           | 2.8459(1)                               | 6.62577    | 1.68689  |
| mcre6.10 | 6.00            | 6.49            |                 | 87.5844(8)           | 70.5325(5) | 48.3364(4) | 107.0776(2)  | 90           | 2.85434(4)                              | 3.81663    | 1.77307  |
| mcre6.11 | 6.20            | 6.60            | P21( $\beta$ )  | 87.6133(7)           | 70.5843(5) | 48.3526(4) | 107.1066(2)  | 90           | 2.85790(4)                              | 3.85689    | 1.75299  |
| mcre6.12 | 6.40            | 6.74            |                 | 62.6453(5)           | 61.8988(4) | 47.9461(3) | 111.4538(2)  | 90           | 1.73037(2)                              | 6.15213    | 2.48102  |
| mcre6.13 | 6.60            | 6.84            |                 | 62.3197(6)           | 61.9538(4) | 47.9181(4) | 111.2516(2)  | 90           | 1.72428(3)                              | 5.80884    | 1.54176  |
| mcre6.14 | 6.80            | 6.97            |                 | 62.3316(5)           | 61.9835(3) | 47.9359(3) | 111.1924(1)  | 90           | 1.72677(2)                              | 4.69349    | 1.40762  |
| mcre6.15 | 7.00            | 7.13            | P21( $\beta$ )  | 62.1136(3)           | 62.0388(2) | 47.9368(2) | 111.08080(1) | 90           | 1.72359(1)                              | 5.49713    | 1.6932   |
| mcre6.16 | 7.20            | 7.17            |                 | 61.9749(2)           | 62.0681(2) | 47.9332(2) | 111.01740(7) | 90           | 1.721162(9)                             | 4.08184    | 1.61464  |
| mcre6.17 | 7.40            | 7.34            | R3              | 79.9318(5)           | 79.9318(5) | 40.6380(5) | 90           | 120          | 2.24855(3)                              | 4.68724    | 1.79471  |
|          |                 |                 | P21( $\beta$ )  | 61.7260(5)           | 62.0780(4) | 47.9175(4) | 110.9450(2)  | 90           | 1.71479(2)                              |            |          |
|          |                 |                 | R3              | 79.8877(4)           | 79.8877(4) | 40.6294(5) | 90           | 120          | 2.24560(3)                              |            |          |
| mcre6.18 | 7.60            | 7.46            | R3              | 79.8891(2)           | 79.8891(2) | 40.7139(2) | 90           | 120          | 2.25034(1)                              | 4.44715    | 1.67541  |
| mcre6.19 | 7.80            | 7.61            |                 | 79.8669(2)           | 79.8669(2) | 40.7422(2) | 90           | 120          | 2.25065(1)                              | 4.27982    | 1.56059  |
| mcre6.20 | 8.00            | 7.79            |                 | 79.8726(3)           | 79.8726(3) | 40.7178(3) | 90           | 120          | 2.24962(2)                              | 4.08114    | 1.44157  |



## 4.2 Κύκλοι μεταβολής της σχετικής υγρασίας – HI\_n1 ( $T_3R_3^f$ )

Σειρά A<sub>1</sub>

| Cycle           | 21 °C       | RH% | Space Group | Unit-cell parameters |           |           |    |    |           |                                         | Rwp     | x²      |
|-----------------|-------------|-----|-------------|----------------------|-----------|-----------|----|----|-----------|-----------------------------------------|---------|---------|
|                 |             |     |             | a                    | b         | c         | α  | β  | γ         | V (*10 <sup>5</sup> ) (Å <sup>3</sup> ) |         |         |
| 1 <sup>st</sup> | Dehydration | 95  | R3          | 80.462(8)            | 80.462(8) | 37.562(7) |    |    |           | 2.1061(5)                               | 5.22831 | 2.20586 |
|                 |             | 90  |             | 80.06(1)             | 80.06(1)  | 37.502(9) |    |    | 2.0816(6) | 4.98596                                 | 2.06305 |         |
|                 |             | 85  |             | 78.08(5)             | 78.08(5)  | 37.33(2)  | 90 | 90 | 120       | 1.971(2)                                | 3.57473 | 1.38366 |
|                 |             | 80  |             | 77.042(6)            | 77.042(6) | 36.850(4) |    |    | 1.8942(3) | 4.04839                                 | 1.56422 |         |
|                 |             | 75  |             | 76.90(1)             | 76.90(1)  | 36.576(5) |    |    | 1.8756(4) | 4.23492                                 | 1.61154 |         |
|                 | Rehydration | 75  |             | 76.95(1)             | 76.95(1)  | 36.576(5) |    |    | 1.8756(4) | 4.23492                                 | 1.61154 |         |
|                 |             | 80  |             | 77.04(2)             | 77.04(2)  | 36.746(8) |    |    | 1.8889(6) | 4.2377                                  | 1.61864 |         |
|                 |             | 85  |             | 77.24(2)             | 77.24(2)  | 37.01(1)  | 90 | 90 | 120       | 1.9123(9)                               | 3.84809 | 1.48495 |
|                 |             | 90  |             | 77.68(2)             | 77.68(2)  | 37.34(2)  |    |    | 1.951(1)  | 3.4252                                  | 1.34163 |         |
|                 |             | 95  |             | 78.727(3)            | 78.727(3) | 37.53(3)  |    |    | 2.015(2)  | 3.44557                                 | 1.40381 |         |

| Cycle           | 21 °C       | RH% | Space Group | Unit-cell parameters |           |           |    |    |     |                                         | Rwp     | x <sup>2</sup> |
|-----------------|-------------|-----|-------------|----------------------|-----------|-----------|----|----|-----|-----------------------------------------|---------|----------------|
|                 |             |     |             | a                    | b         | c         | α  | β  | γ   | V (*10 <sup>5</sup> ) (Å <sup>3</sup> ) |         |                |
| 2 <sup>nd</sup> | Dehydration | 95  | R3          | 80.03(2)             | 80.03(2)  | 37.54(1)  | 90 | 90 | 120 | 2.0821(7)                               | 5.91303 | 2.41892        |
|                 |             | 90  |             | 79.20(3)             | 79.20(3)  | 37.50(4)  |    |    |     | 2.037(2)                                | 4.53642 | 1.83715        |
|                 |             | 85  |             | 77.43(2)             | 77.43(2)  | 37.24(1)  |    |    |     | 1.9333(7)                               | 3.72166 | 1.44639        |
|                 |             | 80  |             | 76.677(8)            | 76.677(8) | 36.790(5) |    |    |     | 1.8732(3)                               | 4.238   | 1.64717        |
|                 |             | 75  |             | 76.200(7)            | 76.200(7) | 36.544(4) |    |    |     | 1.8377(3)                               | 4.54482 | 1.73095        |
|                 | Rehydration | 75  |             | 76.200(7)            | 76.200(7) | 36.544(4) | 90 | 90 | 120 | 1.8376(3)                               | 4.54482 | 1.73095        |
|                 |             | 80  |             | 76.606(7)            | 76.606(7) | 36.735(3) |    |    |     | 1.8670(2)                               | 4.45572 | 1.70584        |
|                 |             | 85  |             | 77.20(1)             | 77.20(1)  | 37.115(7) |    |    |     | 1.9154(5)                               | 4.13144 | 1.59551        |
|                 |             | 90  |             | 78.11(1)             | 78.11(1)  | 37.428(7) |    |    |     | 1.9776(5)                               | 3.67971 | 1.44519        |
|                 |             | 95  |             | 78.25(4)             | 78.25(4)  | 37.49(4)  |    |    |     | 1.988(3)                                | 3.69703 | 1.46469        |

| Cycle           | 21 °C       | RH% | Space Group | Unit-cell parameters |          |           |    |    |     |                            | Rwp     | χ²      |
|-----------------|-------------|-----|-------------|----------------------|----------|-----------|----|----|-----|----------------------------|---------|---------|
|                 |             |     |             | a                    | b        | c         | α  | β  | γ   | V (*10 <sup>5</sup> ) (Å³) |         |         |
| 3 <sup>rd</sup> | Dehydration | 95  | R3          | 79.88(2)             | 79.88(2) | 37.45(2)  |    |    |     | 2.070(1)                   | 4.65556 | 1.91286 |
|                 |             | 90  |             | 79.27(1)             | 79.27(1) | 37.32(1)  |    |    |     | 2.0313(9)                  | 4.38861 | 1.77407 |
|                 |             | 85  |             | 77.56(2)             | 77.56(2) | 37.23(1)  | 90 | 90 | 120 | 1.9398(9)                  | 3.58449 | 1.38161 |
|                 |             | 80  |             | 76.91(1)             | 76.91(1) | 36.830(7) |    |    |     | 1.8866(5)                  | 4.23287 | 1.62474 |
|                 |             | 75  |             | 76.56(1)             | 76.56(1) | 36.633(7) |    |    |     | 1.8597(5)                  | 4.27516 | 1.62167 |
|                 | Rehydration | 75  |             | 76.56(1)             | 76.56(1) | 36.633(7) |    |    |     | 1.8597(5)                  | 4.27516 | 1.62167 |
|                 |             | 80  |             | 76.78(2)             | 76.78(2) | 36.680(9) |    |    |     | 1.8726(6)                  | 4.30107 | 1.63797 |
|                 |             | 85  |             | 77.33(1)             | 77.33(1) | 37.097(6) | 90 | 90 | 120 | 1.92131(5)                 | 4.0263  | 1.5298  |
|                 |             | 90  |             | 77.96(3)             | 77.96(3) | 37.25(4)  |    |    |     | 1.961(2)                   | 3.82054 | 1.48001 |
|                 |             | 95  |             | 78.39(4)             | 78.39(4) | 37.30 (5) |    |    |     | 1.985(3)                   | 3.47756 | 1.39073 |



| Cycle           | 21 °C       | RH% | Space Group | Unit-cell parameters |           |           |          |         |          |                                         | Rwp     | x <sup>2</sup> |
|-----------------|-------------|-----|-------------|----------------------|-----------|-----------|----------|---------|----------|-----------------------------------------|---------|----------------|
|                 |             |     |             | a                    | b         | c         | $\alpha$ | $\beta$ | $\gamma$ | V (*10 <sup>5</sup> ) (Å <sup>3</sup> ) |         |                |
| 4 <sup>th</sup> | Dehydration | 95  | R3          | 78.90(4)             | 78.90(4)  | 36.99(4)  | 90       | 90      | 120      | 1.994(2)                                | 4.61976 | 1.40238        |
|                 |             | 90  |             | 78.72(1)             | 78.72(1)  | 36.90(2)  |          |         |          | 1.980(1)                                | 4.56974 | 1.37325        |
|                 |             | 85  |             | 76.82(4)             | 76.82(4)  | 36.88(3)  |          |         |          | 1.885(2)                                | 4.46099 | 1.33817        |
|                 |             | 80  |             | 76.437(9)            | 76.437(9) | 36.652(6) |          |         |          | 1.8546(4)                               | 4.90595 | 1.4425         |
|                 |             | 75  |             | 76.02(3)             | 76.02(3)  | 36.44(1)  |          |         |          | 1.8234(9)                               | 4.99393 | 1.46602        |
|                 |             | 70  |             | 75.84(1)             | 75.84(1)  | 36.353(8) |          |         |          | 1.8109(5)                               | 4.93495 | 1.44344        |
|                 |             | 60  |             | 75.52(2)             | 75.52(2)  | 36.041(8) |          |         |          | 1.7802(6)                               | 4.92862 | 1.42102        |
|                 |             | 50  |             | 75.06(1)             | 75.06(1)  | 35.793(8) |          |         |          | 1.7466(5)                               | 4.9334  | 1.41924        |
|                 | Rehydration | 50  | R3          | 75.06(1)             | 75.06(1)  | 35.793(8) | 90       | 90      | 120      | 1.7466(5)                               | 4.93346 | 1.41926        |
|                 |             | 60  |             | 75.42(2)             | 75.42(2)  | 35.986(7) |          |         |          | 1.7728(5)                               | 4.94471 | 1.42738        |
|                 |             | 70  |             | 75.69(1)             | 75.69(1)  | 36.256(7) |          |         |          | 1.7989(4)                               | 5.30416 | 1.54146        |
|                 |             | 75  |             | 75.93(3)             | 75.93(3)  | 36.39(1)  |          |         |          | 1.8169(9)                               | 5.15713 | 1.51338        |
|                 |             | 80  |             | 76.29(2)             | 76.29(2)  | 36.58(1)  |          |         |          | 1.8440(9)                               | 4.98561 | 1.47059        |
|                 |             | 85  |             | 76.49(3)             | 76.49(3)  | 36.79(4)  |          |         |          | 1.865(2)                                | 4.67609 | 1.38228        |
|                 |             | 90  |             | 78.45(1)             | 78.45(1)  | 36.87(1)  |          |         |          | 1.9650(8)                               | 4.4649  | 1.33241        |
|                 |             | 95  |             | 78.68(1)             | 78.68(1)  | 36.97(2)  |          |         |          | 1.9817(1)                               | 4.10618 | 1.24578        |

## Σειρά A<sub>2</sub>

| Cycle           | 21 °C       | RH% | Space Group | Unit-cell parameters |           |           |    |    |     |                                         | Rwp     | χ²      |
|-----------------|-------------|-----|-------------|----------------------|-----------|-----------|----|----|-----|-----------------------------------------|---------|---------|
|                 |             |     |             | a                    | b         | c         | α  | β  | γ   | V (*10 <sup>5</sup> ) (Å <sup>3</sup> ) |         |         |
| 1 <sup>st</sup> | Dehydration | 95  | R3          | 79.549(6)            | 79.549(6) | 37.519(5) | 90 | 90 | 120 | 2.0561(3)                               | 8.94535 | 3.23341 |
|                 |             | 90  |             | 79.499(9)            | 79.499(9) | 37.466(7) |    |    |     | 2.0506(4)                               | 9.70878 | 3.5494  |
|                 |             | 85  |             | 79.04(4)             | 79.04(4)  | 37.33(3)  |    |    |     | 2.020(2)                                | 4.5102  | 1.54657 |
|                 |             | 80  |             | 77.26(5)             | 77.26(5)  | 36.59(4)  |    |    |     | 1.892(3)                                | 4.30916 | 1.46006 |
|                 |             | 75  |             | 76.66(1)             | 76.66(1)  | 36.456(7) |    |    |     | 1.856(5)                                | 4.35869 | 1.44709 |
|                 | Rehydration | 75  |             | 76.66(1)             | 76.66(1)  | 36.456(7) | 90 | 90 | 120 | 1.856(5)                                | 4.35869 | 1.44709 |
|                 |             | 80  |             | 76.909(4)            | 76.909(4) | 36.579(4) |    |    |     | 1.8738(2)                               | 4.44897 | 1.49425 |
|                 |             | 85  |             | 78.870(3)            | 78.870(3) | 37.103(2) |    |    |     | 1.9988(1)                               | 4.41415 | 1.53237 |
|                 |             | 90  |             | 79.19(6)             | 79.19(6)  | 37.39(2)  |    |    |     | 2.030(2)                                | 3.81315 | 1.33178 |
|                 |             | 95  |             | 79.44(3)             | 79.44(3)  | 37.48(1)  |    |    |     | 2.048(1)                                | 3.84756 | 1.35653 |

| Cycle           | 21 °C       | RH% | Space Group | Unit-cell parameters |           |           |    |    |     |                                         | Rwp     | χ <sup>2</sup> |
|-----------------|-------------|-----|-------------|----------------------|-----------|-----------|----|----|-----|-----------------------------------------|---------|----------------|
|                 |             |     |             | a                    | b         | c         | α  | β  | γ   | V (*10 <sup>5</sup> ) (Å <sup>3</sup> ) |         |                |
| 2 <sup>nd</sup> | Dehydration | 95  | R3          | 79.466(9)            | 79.466(9) | 37.507(9) | 90 | 90 | 120 | 2.0513(5)                               | 7.31565 | 2.58973        |
|                 |             | 90  |             | 79.42(1)             | 79.42(1)  | 37.39(1)  |    |    |     | 2.0426(9)                               | 6.95387 | 2.47029        |
|                 |             | 85  |             | 78.751(9)            | 78.751(9) | 37.100(4) |    |    |     | 1.9926(3)                               | 4.19285 | 1.44501        |
|                 |             | 80  |             | 77.06(1)             | 77.06(1)  | 36.58(1)  |    |    |     | 1.8812(7)                               | 4.36503 | 1.48093        |
|                 |             | 75  |             | 76.65(1)             | 76.65(1)  | 36.446(9) |    |    |     | 1.8542(6)                               | 4.91474 | 1.65219        |
|                 | Rehydration | 75  |             | 76.65(1)             | 76.65(1)  | 36.446(9) | 90 | 90 | 120 | 1.8542(6)                               | 4.91474 | 1.65219        |
|                 |             | 80  |             | 76.980(9)            | 76.980(9) | 36.563(7) |    |    |     | 1.8764(4)                               | 4.46193 | 1.51254        |
|                 |             | 85  |             | 78.247(9)            | 78.247(9) | 36.941(3) |    |    |     | 1.9587(3)                               | 4.47886 | 1.54445        |
|                 |             | 90  |             | 79.25(1)             | 79.25(1)  | 37.310(6) |    |    |     | 2.0294(4)                               | 3.88098 | 1.36702        |
|                 |             | 95  |             | 79.47(2)             | 79.47(2)  | 37.463(9) |    |    |     | 2.0491(7)                               | 3.82513 | 1.35592        |

| Cycle           | 21 °C       | RH% | Space Group | Unit-cell parameters |           |           |    |    |     |                                         | Rwp     | χ²      |
|-----------------|-------------|-----|-------------|----------------------|-----------|-----------|----|----|-----|-----------------------------------------|---------|---------|
|                 |             |     |             | a                    | b         | c         | α  | β  | γ   | V (*10 <sup>5</sup> ) (Å <sup>3</sup> ) |         |         |
| 3 <sup>rd</sup> | Dehydration | 95  | R3          | 79.46(3)             | 79.46(3)  | 37.48(6)  | 90 | 90 | 120 | 2.050(3)                                | 6.64726 | 2.41744 |
|                 |             | 90  |             | 78.77(3)             | 78.77(3)  | 37.02(4)  |    |    |     | 1.989(2)                                | 6.72331 | 2.37932 |
|                 |             | 85  |             | 78.382(4)            | 78.382(4) | 36.989(4) |    |    |     | 1.9680(2)                               | 4.12024 | 1.4202  |
|                 |             | 80  |             | 76.97(2)             | 76.97(2)  | 36.571(9) |    |    |     | 1.8762(7)                               | 4.4373  | 1.4855  |
|                 |             | 75  |             | 76.596(8)            | 76.596(8) | 36.414(2) |    |    |     | 1.8501(2)                               | 4.44438 | 1.47138 |
|                 | Rehydration | 75  |             | 76.596(8)            | 76.596(8) | 36.414(2) | 90 | 90 | 120 | 1.8501(2)                               | 4.44438 | 1.47138 |
|                 |             | 80  |             | 76.905(5)            | 76.905(5) | 36.529(9) |    |    |     | 1.8710(5)                               | 4.25512 | 1.42345 |
|                 |             | 85  |             | 78.299(4)            | 78.299(4) | 36.901(3) |    |    |     | 1.9592(2)                               | 4.4282  | 1.52061 |
|                 |             | 90  |             | 78.666(5)            | 78.666(5) | 37.003(8) |    |    |     | 1.9831(5)                               | 3.91362 | 1.35268 |
|                 |             | 95  |             | 79.251(3)            | 79.251(3) | 37.44(3)  |    |    |     | 2.0362(2)                               | 3.87298 | 1.35479 |

| Cycle           | 21 °C       | RH% | Space Group | Unit-cell parameters |           |           |          |         |          |                                         | Rwp      | x <sup>2</sup> |
|-----------------|-------------|-----|-------------|----------------------|-----------|-----------|----------|---------|----------|-----------------------------------------|----------|----------------|
|                 |             |     |             | a                    | b         | c         | $\alpha$ | $\beta$ | $\gamma$ | V (*10 <sup>5</sup> ) (Å <sup>3</sup> ) |          |                |
| 4 <sup>th</sup> | Dehydration | 95  | R3          | 79.44(1)             | 79.44(1)  | 37.460(8) | 90       | 90      | 120      | 2.0473(5)                               | 10.61055 | 2.88004        |
|                 |             | 90  |             | 78.65(1)             | 78.65(1)  | 37.014(5) |          |         |          | 1.9830(4)                               | 6.59075  | 1.75732        |
|                 |             | 85  |             | 78.292(3)            | 78.292(3) | 36.952(3) |          |         |          | 1.9615(2)                               | 4.4445   | 1.1784         |
|                 |             | 80  |             | 76.953(8)            | 76.953(8) | 36.549(9) |          |         |          | 1.874(5)                                | 5.30315  | 1.36945        |
|                 |             | 75  |             | 76.536(7)            | 76.536(7) | 36.406(8) |          |         |          | 1.847(4)                                | 5.21127  | 1.33849        |
|                 |             | 70  |             | 76.376(8)            | 76.376(8) | 36.381(4) |          |         |          | 1.8380(3)                               | 5.5625   | 1.42559        |
|                 |             | 60  |             | 76.34(2)             | 76.34(2)  | 36.37(2)  |          |         |          | 1.8356(9)                               | 6.19006  | 1.59267        |
|                 |             | 50  |             | 76.310(4)            | 76.310(4) | 36.331(1) |          |         |          | 1.8322(1)                               | 6.8747   | 1.77165        |
|                 | Rehydration | 50  |             | 76.310(4)            | 76.310(4) | 36.331(1) | 90       | 90      | 120      | 1.8322(1)                               | 6.8747   | 1.77165        |
|                 |             | 60  |             | 76.319(9)            | 76.319(9) | 36.355(8) |          |         |          | 1.8338(5)                               | 6.34794  | 1.62995        |
|                 |             | 70  |             | 76.33(2)             | 76.33(2)  | 36.364(7) |          |         |          | 1.8346(3)                               | 5.91364  | 1.51609        |
|                 |             | 75  |             | 76.492(8)            | 76.492(8) | 36.39(1)  |          |         |          | 1.8439(5)                               | 5.48992  | 1.41693        |
|                 |             | 80  |             | 76.94(1)             | 76.94(1)  | 36.545(6) |          |         |          | 1.8734(4)                               | 5.36292  | 1.39118        |
|                 |             | 85  |             | 78.286(6)            | 78.286(6) | 36.951(2) |          |         |          | 1.9612(2)                               | 5.24063  | 1.37453        |
|                 |             | 90  |             | 78.634(8)            | 78.634(8) | 37.005(6) |          |         |          | 1.9815(4)                               | 4.79258  | 1.27099        |
|                 |             | 95  |             | 79.53(2)             | 79.53(2)  | 37.477(7) |          |         |          | 2.0527(6)                               | 5.16719  | 1.4063         |

### 4.3 Κύκλοι ομαλής μεταβολής της υγρασίας - HEWL

| Series 1              |             | RH% | Space Group                      | Unit-Cell Parameters |           |           |                     | Statistics |                |
|-----------------------|-------------|-----|----------------------------------|----------------------|-----------|-----------|---------------------|------------|----------------|
| Cycle                 | 21 °C       |     |                                  | a (Å)                | b (Å)     | c (Å)     | V (Å <sup>3</sup> ) | Rwp (%)    | χ <sup>2</sup> |
| 1 <sup>st</sup> Cycle | Dehydration | 95  | P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2 | 79.316(7)            | 79.316(7) | 38.399(4) | 2.4157(3)           | 2.6811     | 4.10036        |
|                       |             | 90  |                                  | 79.311(4)            | 79.311(4) | 38.416(4) | 2.4165(2)           | 2.9038     | 3.58015        |
|                       |             | 85  |                                  | 79.180(3)            | 79.180(3) | 38.477(4) | 2.4123(3)           | 2.5653     | 3.14556        |
|                       |             | 80  |                                  | 78.912(3)            | 78.912(3) | 38.701(4) | 2.4099(3)           | 2.7318     | 3.40868        |
|                       |             | 75  |                                  | 78.783(4)            | 78.783(4) | 38.823(6) | 2.4096(4)           | 2.8354     | 3.56294        |
|                       | Rehydration | 75  |                                  | 78.614(5)            | 78.614(5) | 38.814(6) | 2.3987(4)           | 2.5584     | 3.63856        |
|                       |             | 80  |                                  | 78.824(5)            | 78.824(5) | 38.680(5) | 2.4033(4)           | 2.4938     | 3.51557        |
|                       |             | 85  |                                  | 78.979(4)            | 78.979(4) | 38.557(5) | 2.4051(3)           | 2.5222     | 3.44913        |
|                       |             | 90  |                                  | 79.131(6)            | 79.131(6) | 38.418(7) | 2.4057(5)           | 2.3246     | 3.10779        |
|                       |             | 95  |                                  | 79.202(5)            | 79.202(5) | 38.369(6) | 2.4069(4)           | 2.6468     | 3.59992        |

| Series 2              |             | RH% | Space Group                      | Unit-Cell Parameters |           |           |                     | Statistics          |                |
|-----------------------|-------------|-----|----------------------------------|----------------------|-----------|-----------|---------------------|---------------------|----------------|
| Cycle                 | 21 °C       |     |                                  | a (Å)                | b (Å)     | c (Å)     | V (Å <sup>3</sup> ) | R <sub>wp</sub> (%) | χ <sup>2</sup> |
| 1 <sup>st</sup> Cycle | Dehydration | 95  | P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2 | 79.005(7)            | 79.005(7) | 38.315(9) | 2.3915(6)           | 2.3708              | 3.34094        |
|                       |             | 90  |                                  | 78.871(7)            | 78.871(7) | 38.40(2)  | 2.389(1)            | 2.3159              | 3.04021        |
|                       |             | 85  |                                  | 78.848(4)            | 78.848(4) | 38.426(6) | 2.3889(4)           | 2.2755              | 3.49812        |
|                       |             | 80  |                                  | 78.712(6)            | 78.712(6) | 38.54(1)  | 2.3876(8)           | 2.2150              | 3.00056        |
|                       |             | 75  |                                  | 78.519(6)            | 78.519(6) | 38.63(1)  | 2.3818(9)           | 2.3194              | 3.07853        |
|                       |             | 72  |                                  | 78.462(7)            | 78.462(7) | 38.68(1)  | 2.3813(9)           | 2.1488              | 3.00246        |
|                       |             | 70  |                                  | 78.407(6)            | 78.407(6) | 38.72(1)  | 2.3806(7)           | 2.2779              | 2.82820        |
|                       |             | 67  |                                  | 78.357(6)            | 78.357(6) | 38.745(1) | 2.3791(9)           | 2.3660              | 3.67287        |
|                       | Rehydration | 67  |                                  | 78.348(9)            | 78.348(9) | 38.75(2)  | 2.379(1)            | 1.7951              | 2.98301        |
|                       |             | 70  |                                  | 78.37(2)             | 78.37(2)  | 38.72(2)  | 2.378(1)            | 1.8161              | 2.95428        |
|                       |             | 72  |                                  | 78.42(2)             | 78.42(2)  | 38.68(1)  | 2.379(1)            | 1.8785              | 2.97503        |
|                       |             | 75  |                                  | 78.48(2)             | 78.48(2)  | 38.66(1)  | 2.381(1)            | 2.1950              | 3.36201        |
|                       |             | 80  |                                  | 78.572(7)            | 78.572(7) | 38.58(1)  | 2.3818(9)           | 2.7911              | 3.61154        |
|                       |             | 85  |                                  | 78.666(8)            | 78.666(8) | 38.51(2)  | 2.383(1)            | 2.4440              | 3.35033        |
|                       |             | 90  |                                  | 78.799(7)            | 78.799(7) | 38.44(2)  | 2.387(1)            | 2.2248              | 3.10327        |
|                       |             | 95  |                                  | 78.939(5)            | 78.939(5) | 38.328(9) | 2.3883(6)           | 2.3823              | 3.36950        |

| Series 2              | 21 °C       | RH% | Space Group                      | Unit-Cell Parameters |           |           |                     | Statistics          |                |
|-----------------------|-------------|-----|----------------------------------|----------------------|-----------|-----------|---------------------|---------------------|----------------|
| Cycle                 |             |     |                                  | a (Å)                | b (Å)     | c (Å)     | V (Å <sup>3</sup> ) | R <sub>wp</sub> (%) | χ <sup>2</sup> |
| 2 <sup>nd</sup> Cycle | Dehydration | 95  | P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2 | 78.920(6)            | 78.920(6) | 38.295(9) | 2.3851(6)           | 2.9307              | 3.01392        |
|                       |             | 90  |                                  | 78.895(6)            | 78.895(6) | 38.31(1)  | 2.3845(6)           | 2.6990              | 2.92179        |
|                       |             | 85  |                                  | 78.831(8)            | 78.831(8) | 38.37(1)  | 2.3845(7)           | 2.8614              | 2.79924        |
|                       |             | 80  |                                  | 78.677(9)            | 78.677(9) | 38.48(1)  | 2.3820(8)           | 2.8430              | 2.71439        |
|                       |             | 75  |                                  | 78.59(1)             | 78.59(1)  | 38.53(2)  | 2.380(1)            | 2.4748              | 2.23291        |
|                       |             | 70  |                                  | 78.508(9)            | 78.508(9) | 38.57(1)  | 2.3770(7)           | 2.5249              | 2.37471        |
|                       |             | 67  |                                  | 78.45(1)             | 78.45(1)  | 38.60(1)  | 2.3758(9)           | 2.4456              | 2.43462        |
|                       | Rehydration | 67  |                                  | 78.452(9)            | 78.452(9) | 38.60(1)  | 2.3757(7)           | 2.5148              | 2.61336        |
|                       |             | 70  |                                  | 78.480(9)            | 78.480(9) | 38.60(1)  | 2.3768(7)           | 2.7113              | 2.79964        |
|                       |             | 75  |                                  | 78.54(1)             | 78.54(1)  | 38.55(2)  | 2.378(2)            | 2.7016              | 2.82793        |
|                       |             | 80  |                                  | 78.62(1)             | 78.62(1)  | 38.51(2)  | 2.380(1)            | 2.8167              | 2.94764        |
|                       |             | 85  |                                  | 78.70(1)             | 78.70(1)  | 38.47(3)  | 2.383(2)            | 2.9768              | 3.05847        |
|                       |             | 90  |                                  | 78.81(1)             | 78.81(1)  | 38.44(2)  | 2.388(2)            | 2.7832              | 2.68239        |
|                       |             | 95  |                                  | 78.905(8)            | 78.905(8) | 38.37(1)  | 2.389(7)            | 2.5308              | 2.52326        |

| Series 5              | 21 °C       | RH% | Space Group                      | Unit-Cell Parameters |           |          |                     | Statistics          |                |
|-----------------------|-------------|-----|----------------------------------|----------------------|-----------|----------|---------------------|---------------------|----------------|
| Cycle                 |             |     |                                  | a (Å)                | b (Å)     | c (Å)    | V (Å <sup>3</sup> ) | R <sub>wp</sub> (%) | χ <sup>2</sup> |
| 5 <sup>th</sup> Cycle | Dehydration | 95  | P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2 | 78.90(2)             | 78.90(2)  | 38.27(3) | 2.382(2)            | 7.9265              | 1.91826        |
|                       |             | 90  |                                  | 78.80(2)             | 78.80(2)  | 38.32(2) | 2.380(2)            | 7.4998              | 2.29471        |
|                       |             | 85  |                                  | 78.70(2)             | 78.70(2)  | 38.37(2) | 2.377(2)            | 7.1226              | 2.17622        |
|                       |             | 80  |                                  | 78.60(2)             | 78.60(2)  | 38.42(3) | 2.374(2)            | 6.7021              | 2.03848        |
|                       |             | 75  |                                  | 78.485(8)            | 78.485(8) | 38.47(1) | 2.3696(7)           | 5.8652              | 1.74263        |
|                       | Rehydration | 75  |                                  | 78.485(8)            | 78.485(8) | 38.47(1) | 2.3696(7)           | 5.8652              | 1.74263        |
|                       |             | 80  |                                  | 78.585(9)            | 78.585(9) | 38.41(1) | 2.3720(7)           | 5.8608              | 1.75512        |
|                       |             | 85  |                                  | 78.68(1)             | 78.68(1)  | 38.36(1) | 2.3749(9)           | 5.8863              | 1.75605        |
|                       |             | 90  |                                  | 78.78(1)             | 78.78(1)  | 38.30(1) | 2.3766(7)           | 6.1268              | 1.83229        |
|                       |             | 95  |                                  | 78.86(1)             | 78.86(1)  | 38.24(1) | 2.3777(9)           | 6.8477              | 2.04481        |

| Series 5              | 21 °C       | RH% | Space Group                      | Unit-Cell Parameters |           |           |                     | Statistics          |                |
|-----------------------|-------------|-----|----------------------------------|----------------------|-----------|-----------|---------------------|---------------------|----------------|
| Cycle                 |             |     |                                  | a (Å)                | b (Å)     | c (Å)     | V (Å <sup>3</sup> ) | R <sub>wp</sub> (%) | χ <sup>2</sup> |
| 6 <sup>th</sup> Cycle | Dehydration | 95  | P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2 | 78.835(8)            | 78.835(8) | 38.256(9) | 2.3776(6)           | 5.2699              | 1.64013        |
|                       |             | 85  |                                  | 78.789(5)            | 78.789(5) | 38.292(4) | 2.3771(3)           | 5.7532              | 1.75147        |
|                       |             | 75  |                                  | 78.651(6)            | 78.651(6) | 38.352(8) | 2.3725(5)           | 5.2711              | 1.61392        |
|                       |             | 70  |                                  | 78.60(1)             | 78.60(1)  | 38.38(1)  | 2.3711(9)           | 5.0455              | 1.53376        |
|                       |             | 69  |                                  | 78.57(6)             | 78.57(6)  | 38.40(6)  | 2.370(4)            | 4.7016              | 1.24388        |
|                       |             | 67  |                                  | 78.5(1)              | 78.5(1)   | 38.4(1)   | 2.369(8)            | 4.6218              | 1.21219        |
|                       |             | 65  |                                  | 78.4(2)              | 78.4(2)   | 38.4(1)   | 2.36(1)             | 4.8081              | 0.96272        |
|                       |             | 63  |                                  | 77.1(1)              | 77.1(1)   | 39.4(2)   | 2.35(1)             | 4.7142              | 1.23536        |
|                       |             | 61  |                                  | 76.9(2)              | 76.9(2)   | 39.5(2)   | 2.35(1)             | 4.7516              | 1.26330        |
|                       |             | 59  |                                  | 76.7(1)              | 76.7(1)   | 39.5(2)   | 2.33(1)             | 4.7099              | 1.22748        |

|             |    |           |           |           |           |        |         |
|-------------|----|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|---------|
|             | 57 | 76.5(1)   | 76.5(1)   | 39.6(3)   | 2.32(2)   | 4.7015 | 1.24347 |
|             | 55 | 76.48(9)  | 76.48(9)  | 39.7(2)   | 2.324(9)  | 4.4308 | 1.12891 |
|             | 53 | 76.4(1)   | 76.4(1)   | 39.8(3)   | 2.32(2)   | 4.6962 | 1.21367 |
|             | 51 | 76.35(8)  | 76.35(8)  | 39.9(1)   | 2.324(6)  | 4.4753 | 1.11396 |
| Rehydration | 51 | 76.35(8)  | 76.35(8)  | 39.9(1)   | 2.324(6)  | 4.4753 | 1.11396 |
|             | 55 | 77.154(5) | 77.154(5) | 39.74(1)  | 2.3655(7) | 4.7628 | 1.21478 |
|             | 60 | 77.2(1)   | 77.2(1)   | 39.4(3)   | 2.35(2)   | 4.8178 | 1.26076 |
|             | 65 | 77.2(1)   | 77.2(1)   | 39.2(3)   | 2.34(2)   | 4.7277 | 1.22985 |
|             | 70 | 78.49(7)  | 78.49(7)  | 38.36(7)  | 2.363(5)  | 4.4314 | 1.13214 |
|             | 75 | 78.54(1)  | 78.54(1)  | 38.33(2)  | 2.364(1)  | 4.5799 | 1.17352 |
|             | 80 | 78.589(5) | 78.589(5) | 38.299(5) | 2.3655(3) | 4.7336 | 1.24442 |
|             | 85 | 78.644(9) | 78.644(9) | 38.261(7) | 2.3664(5) | 4.8624 | 1.28715 |
|             | 90 | 78.72(1)  | 78.72(1)  | 38.23(1)  | 2.3687(9) | 4.9396 | 1.49713 |
|             | 95 | 78.84(1)  | 78.84(1)  | 38.20(1)  | 2.3742(9) | 4.9311 | 1.50288 |

| Series 5              | 21 °C       | RH%       | Space Group                      | Unit-Cell Parameters |           |           |                     | Statistics          |                |
|-----------------------|-------------|-----------|----------------------------------|----------------------|-----------|-----------|---------------------|---------------------|----------------|
| Cycle                 |             |           |                                  | a (Å)                | b (Å)     | c (Å)     | V (Å <sup>3</sup> ) | R <sub>wp</sub> (%) | χ <sup>2</sup> |
| 7 <sup>th</sup> Cycle | Dehydration | 95        | P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2 | 78.86(1)             | 78.86(1)  | 38.276(9) | 2.3801(7)           | 6.3991              | 2.02202        |
|                       |             | 85        |                                  | 78.808(5)            | 78.808(5) | 38.318(5) | 2.3798(3)           | 6.2779              | 1.92898        |
|                       |             | 75        |                                  | 78.68(2)             | 78.68(2)  | 38.35(3)  | 2.374(2)            | 5.2830              | 1.62768        |
|                       |             | 65        |                                  | 78.54(4)             | 78.54(4)  | 38.42(6)  | 2.370(4)            | 4.4937              | 1.21794        |
|                       |             | 55        |                                  | 78.9(6)              | 78.9(6)   | 38.7(3)   | 2.40(2)             | 4.8659              | 1.28534        |
|                       |             | 50        |                                  | 78.8(9)              | 78.8(9)   | 38.6(5)   | 2.40(4)             | 5.1345              | 1.41557        |
|                       |             | 48        |                                  | 78.7(8)              | 78.7(8)   | 38.30(6)  | 2.37(3)             | 4.9435              | 1.33453        |
|                       |             | 46        |                                  | 78.8(5)              | 78.8(5)   | 38.1(2)   | 2.37(2)             | 4.9106              | 1.34259        |
|                       |             | 44        |                                  | 78.880(5)            | 78.880(5) | 38.298(5) | 2.38(4)             | 4.7820              | 1.20855        |
|                       |             | 42        |                                  | 78.880(4)            | 78.880(4) | 38.298(7) | 2.383(1)            | 4.7520              | 1.22046        |
|                       |             | 40        |                                  | 78.9(6)              | 78.9(6)   | 38.3(3)   | 2.38(2)             | 4.9714              | 1.27883        |
|                       |             | 38        |                                  | 78.88(8)             | 78.88(8)  | 38.30(5)  | 2.383(4)            | 5.0447              | 1.26480        |
|                       |             | 36        |                                  | 78.88(5)             | 78.88(5)  | 38.3(2)   | 2.38(1)             | 5.1134              | 1.29548        |
|                       |             | 34        |                                  | 78.879(2)            | 78.879(2) | 38.298(7) | 2.3829(5)           | 5.0764              | 1.29038        |
|                       |             | 32        |                                  | 78.9(1)              | 78.9(1)   | 36.99(4)  | 2.302(5)            | 4.7800              | 1.20236        |
|                       |             | 30        |                                  | 79.0(2)              | 79.0(2)   | 36.90(5)  | 2.304(5)            | 4.7258              | 1.19252        |
|                       | Rehydration | 30        |                                  | 79.0(2)              | 79.0(2)   | 36.90(5)  | 2.304(5)            | 4.7258              | 1.19252        |
|                       |             | 40        |                                  | 79.9(1)              | 79.9(1)   | 37.09(4)  | 2.370(4)            | 4.5760              | 1.16525        |
|                       |             | 50        |                                  | 80.14(4)             | 80.14(4)  | 37.49(3)  | 2.408(2)            | 4.5562              | 1.17829        |
|                       |             | 60        |                                  | 79.84(9)             | 79.84(9)  | 37.83(6)  | 2.411(5)            | 4.8580              | 1.33108        |
| 70                    |             | 78.5(2)   | 78.5(2)                          | 38.5(1)              | 2.369(9)  | 4.7183    | 1.46921             |                     |                |
| 80                    |             | 78.60(1)  | 78.60(1)                         | 38.35(2)             | 2.369(1)  | 5.2450    | 1.63265             |                     |                |
| 90                    |             | 78.710(7) | 78.710(7)                        | 38.314(7)            | 2.3736(4) | 6.1297    | 1.56199             |                     |                |
| 95                    |             | 78.81(1)  | 78.81(1)                         | 38.26(1)             | 2.3766(8) | 6.3366    | 1.83760             |                     |                |

## 5. Βιβλιογραφία

- Ahrens, E. R., Gossain, V. V., & Rovner, D. R. (1986). Human insulin. *Postgraduate Medicine*, 80(1), 181–187. <https://doi.org/10.1080/00325481.1986.11699459>
- Alam, U., et al. (2014). General aspects of diabetes mellitus. In *Diabetes and the nervous system* (pp. 211–222). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-53480-4.00015-1>
- Alberts, B. (2017). *Molecular biology of the cell*. CRC Press.
- Ameh, E. S. (2019). A review of basic crystallography and X-ray diffraction applications. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 105(7–8), 3289–3302. <https://doi.org/10.1007/s00170-019-04508-1>
- Aquilanti, G., et al. (2014). Instrumentation at synchrotron radiation beamlines. In *Synchrotron radiation* (pp. 65–104). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55315-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55315-8_3)
- Artioli, G. (2014). Powder diffraction and synchrotron radiation. In *Synchrotron radiation* (pp. 319–336). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55315-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55315-8_10)
- Atakisi, H., Moreau, D. W., & Thorne, R. E. (2018). Effects of protein-crystal hydration and temperature on side-chain conformational heterogeneity in monoclinic lysozyme crystals. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 74(4), 264–278. <https://doi.org/10.1107/S2059798318000207>
- Athanasiadou, M., Papaefthymiou, C., Kontarinis, A., Spiliopoulou, M., Koutoulas, D., Konstantopoulos, M., Kafetzi, S., Barlos, K., Barlos, K. K., Dadivanyan, N., Beckers, D., Degen, T., Fitch, A. N., & Margiolaki, I. (2024). Structural evolution of the pharmaceutical peptide octreotide upon controlled relative humidity and temperature variation. *SynBio*, 2(2), 205–222. <https://doi.org/10.3390/synbio2020012>
- Atkins, P. (2017). *Atkins' physical chemistry*. Oxford University Press.
- Badawi, M. I. (2013). Left-handed material: New era of future metamaterials for biomedical applications. *Journal of Biophysics and Biomedical Sciences*, 6(2), 481–487.
- Bailes, B. K. (2002). Examination: Diabetes mellitus and its chronic complications. *AORN Journal*, 76(2), 283–286. [https://doi.org/10.1016/S0001-2092\(06\)61066-1](https://doi.org/10.1016/S0001-2092(06)61066-1)
- Baskaran, S., & Hurley, T. D. (2010). *Basal state form of yeast glycogen synthase* [Data set]. RCSB PDB. <https://doi.org/10.2210/pdb3naz/pdb>
- Bergmann, J., Oksanen, E., & Ryde, U. (2022). Combining crystallography with quantum mechanics. *Current Opinion in Structural Biology*, 72, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2021.07.002>
- Bergamaschi, A., et al. (2010). The Mythen detector for X-ray powder diffraction experiments at the Swiss Light Source. *Journal of Synchrotron Radiation*, 17(5), 653–668. <https://doi.org/10.1107/S0909049510026051>
- Bergamo, A., & Sava, G. (2023). Pharmacological modulation of host immunity with hen egg white lysozyme (HEWL)—A review. *Molecules*, 28(13), 5027. <https://doi.org/10.3390/molecules28135027>

Birnbaum, D. T., et al. (1996). Hierarchical modeling of phenolic ligand binding to 2Zn–insulin hexamers. *Biochemistry*, 35(17), 5366–5378. <https://doi.org/10.1021/bi9600557>

PhysicsOpenLab. (2017, August 2). *Bremsstrahlung radiation*. <https://physicsopenlab.org/2017/08/02/bremsstrahlung-radiation/>

Brönnimann, C., Bühler, C., Eikenberry, E. F., Horisberger, R., Hülsen, G., Schmitt, B., Schulze-Briese, C., Suzuki, M., Tomizaki, T., Toyokawa, H., & Wagner, A. (2004). Protein crystallography with the Pilatus 1M detector at the Swiss Light Source. *Synchrotron Radiation News*, 17(2), 23–30. <https://doi.org/10.1080/08940880408603082>

Cianci, M., et al. (2017). P13, the EMBL macromolecular crystallography beamline at the low-emittance Petra III ring for high- and low-energy phasing with variable beam focusing. *Journal of Synchrotron Radiation*, 24(1), 323–332. <https://doi.org/10.1107/S1600577516016465>

QuantumStudy. (n.d.). *Characteristics X-rays line spectrum*. <https://www.quantumstudy.com/characteristics-x-rays-line-spectrum/>

Cervellino, A., et al. (2016). X-ray powder diffraction characterization of nanomaterials. In *X-ray and neutron techniques for nanomaterials characterization* (pp. 545–608). [https://doi.org/10.1007/978-3-662-48606-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-662-48606-1_10)

Chayen, N. E., & Saridakis, E. (2008). Protein crystallization: From purified protein to diffraction-quality crystal. *Nature Methods*, 5(2), 147–153. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.203>

D’Arcy, A., et al. (2014). Microseed matrix screening for optimization in protein crystallization: What have we learned? *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 70(9), 1117–1126. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14015507>

Datta, S., Biswal, B. K., & Vijayan, M. (2001). The effect of stabilizing additives on the structure and hydration of proteins: A study involving tetragonal lysozyme. *Acta Crystallographica Section D*, 57(11), 1614–1620. <https://doi.org/10.1107/S090744490101280X>

Dauter, Z., & Wlodawer, A. (2015). On the accuracy of unit-cell parameters in protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 71(11), 2217–2226. <https://doi.org/10.1107/S1399004715015503>

Dejoie, C., et al. (2018). Combining a nine-crystal multi-analyser stage with a two-dimensional detector for high-resolution powder X-ray diffraction. *Journal of Applied Crystallography*, 51(6), 1721–1733. <https://doi.org/10.1107/S1600576718014589>

Dobson, C. M. (2019). Biophysical techniques in structural biology. *Annual Review of Biochemistry*, 88(1), 25–33. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111947>

Dunn, M. F. (2005). Zinc–ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer – A review. *BioMetals*, 18(4), 295–303. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-3685-y>

Ferraboschi, P., Ciceri, S., & Grisenti, P. (2021). Applications of lysozyme, an innate immune defense factor, as an alternative antibiotic. *Antibiotics*, 10(12), 1534. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121534>



- Fili, S., et al. (2015). Human insulin polymorphism upon ligand binding and pH variation: The case of 4-ethylresorcinol. *IUCrJ*, 2(5), 534–544. <https://doi.org/10.1107/S2052252515013159>
- Fitch, A., et al. (2023). ID22 – The high-resolution powder-diffraction beamline at ESRF. *Journal of Synchrotron Radiation*, 30(5), 1003–1012. <https://doi.org/10.1107/S1600577523004915>
- Freedman, R. A., et al. (2014). *College physics*. W. H. Freeman and Company.
- Gálvez-Iriqui, A. C., Plascencia-Jatomea, M., & Bautista-Baños, S. (2020). Lysozymes: Characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 38(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-6>
- Ganz, T. (2006). Lysozyme. In *Encyclopedia of respiratory medicine* (pp. 649–653). <https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00228-3>
- García-Ruiz, J. M., Otálora, F., & García-Caballero, A. (2016). The role of mass transport in protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 72(2), 96–104. <https://doi.org/10.1107/S2053230X16000030>
- xrd.co. (2017, February 25). *Geometry of crystals – Characteristic features of crystalline materials*. <https://xrd.co/crystal-geometries-lattices-miller-indices/>
- Gough, S. C. L. (2007). A review of human and analogue insulin trials. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 77(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2006.10.015>
- Gozzo, F., et al. (2006). The instrumental resolution function of synchrotron radiation powder diffractometers in the presence of focusing optics. *Journal of Applied Crystallography*, 39(3), 347–357. <https://doi.org/10.1107/S0021889806009319>
- Gozzo, F., et al. (2010). Instrumental profile of Mythen detector in Debye-Scherrer geometry. *Zeitschrift für Kristallographie*, 225(12), 616–624. <https://doi.org/10.1524/zkri.2010.1345>
- Guo, S., et al. (2022). Research on a tunable monochromatic X-rays source in (5–40) keV. *Applied Radiation and Isotopes*, 181, 110096. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2022.110096>
- Guthrie, R. A., & Guthrie, D. W. (2004). Pathophysiology of diabetes mellitus. *Critical Care Nursing Quarterly*, 27(2), 113–125. <https://doi.org/10.1097/00002727-200404000-00003>
- Held, J., & van Smaalen, S. (2014). The active site of hen egg-white lysozyme: Flexibility and chemical bonding. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70(4), 1136–1146. <https://doi.org/10.1107/S1399004714001928>
- Karavassili, F. (2018). *Implementation and development of X-ray and electron diffraction methods for the structural characterisation of nanocrystalline materials* [Doctoral dissertation, University of Patras]. <http://hdl.handle.net/10889/11514>
- Karavassili, F., Triandafillidis, D. P., Valmas, A., Spiliopoulou, M., Fili, S., Kontou, P., Bowler, M. W., Von Dreele, R. B., Fitch, A., & Margiolaki, I. (2023). The T2 structure of polycrystalline cubic human insulin. *Protein Data Bank*. <https://doi.org/10.2210/pdb7qac/pdb>
- Karavassili, F., Valmas, A., Margiolaki, I., Fitch, A. N., Gozzo, F., Schiltz, M., & Von Dreele, R. B. (2012). Structural studies of human insulin cocrystallized with phenol or resorcinol via powder

diffraction. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 68(12), 1632–1641. <https://doi.org/10.1107/s0907444912039339>

Karavassili, F., Valmas, A., Margiolaki, I., Raptopoulou, C. P., Gozzo, F., Schiltz, M., Fitch, A. N., & Von Dreele, R. B. (2017). In quest for improved drugs against diabetes: The added value of X-ray powder diffraction methods. *Biomolecules*, 7(4), 63. <https://doi.org/10.3390/biom7030063>

Karavassili, F., Valmas, A., Triandafillidis, D. P., Gkolfi, P., & Margiolaki, I. (2020). Exploring the complex map of insulin polymorphism: A novel crystalline form in the presence of m-cresol. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 76(4), 366–374. <https://doi.org/10.1107/s2059798320002545>

Karavassilia, F., & Margiolaki, I. (2016). Macromolecular powder diffraction: Ready for genuine biological problems. *Protein & Peptide Letters*, 23(3), 232–241. <https://doi.org/10.2174/0929866523666160120152839>

Kassel, S. W. E. (n.d.). *Sample tubes and accessories*. Hilgenberg GmbH. <https://www.hilgenberg-gmbh.de/en/products/test-tubes/sample-tubes/>

Kato, K., & Shigeta, K. (2021). High-precision X-ray total scattering measurements using a high-accuracy detector system. *Condensed Matter*, 7(1), 2. <https://doi.org/10.3390/condmat7010002>

Klein-Seetharaman, J., Vizgaudis, W., & Kumar, L. (2021). Structure-based survey of ligand binding in the human insulin receptor [Preprint]. <https://doi.org/10.22541/au.162245427.70273837/v1>

Kojima, M., Abe, S., & Ueno, T. (2022). Engineering of protein crystals for use as solid biomaterials. *Biomaterials Science*, 10(2), 354–367. <https://doi.org/10.1039/d1bm01752g>

Kontarinis, A., Papaefthymiou, C., Kafetzi, S., Konstantopoulos, M., Koutoulas, D., Nanao, M. H., & Margiolaki, I. (2025). Exploring humidity effects on polycrystalline human insulin–ligand complexes: preliminary crystallographic insights. *Journal of Applied Crystallography*, 58(6). <https://doi.org/10.1107/S1600576725007484>

Konstantopoulos, M. (2025). *Combined use of biophysical and biochemical methods for the structural characterization of pharmaceutical proteins and peptides* [Master's thesis, University of Ioannina]. (in press).

Kontarinis, E. (2024). *Production and structural study of protein macromolecules of pharmaceutical interest* [Master's thesis, University of Patras]. <https://hdl.handle.net/10889/28489>

Koutoulas, D. (2025). *Structural and Functional Analysis of Viral Proteins and Pharmaceutical Targets* [Master's thesis, University of Patras]. (in press).

Kumari, P., Kumari, M., & Kashyap, H. K. (2020). How pure and hydrated reline deep eutectic solvents affect the conformation and stability of lysozyme: Insights from atomistic molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 124(52), 11919–11927. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c09873>

Lahey-Rudolph, J. M., Schönherr, R., Jeffries, C. M., Blanchet, C. E., Boger, J., Ferreira Ramos, A. S., Riekehr, W. M., Triandafillidis, D.-P., Valmas, A., Margiolaki, I., Svergun, D., & Redecke, L. (2020). Rapid screening of *in cellulo* grown protein crystals via a small-angle X-ray scattering/X-ray

- powder diffraction synergistic approach. *Journal of Applied Crystallography*, 53(5), 1169–1180. <https://doi.org/10.1107/s1600576720010687>
- Landsberg, M. J., & Hankamer, B. (2007). Symmetry: A guide to its application in 2D electron crystallography. *Journal of Structural Biology*, 160(3), 332–343. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.07.002>
- Lee, A. Y., Erdemir, D., & Myerson, A. S. (2019). Crystals and crystal growth. In *Handbook of industrial crystallization* (pp. 32–75). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781139026949.002>
- Leslie, A. G. (2006). Integration of macromolecular diffraction data. In *International tables for crystallography* (pp. 212–217). <https://doi.org/10.1107/97809553602060000675>
- Liu, M., et al. (2018). Biosynthesis, structure, and folding of the insulin precursor protein. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 20(S2), 28–50. <https://doi.org/10.1111/dom.13378>
- Liu, X., et al. (2023). The global, regional, and national burden and trends of maternal hemorrhage from 1990 to 2019: A systematic analysis from the 2019 global burden of disease study [Preprint]. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4463543>
- Logotheti, S., et al. (2019). Unit-cell response of tetragonal hen egg white lysozyme upon controlled relative humidity variation. *Journal of Applied Crystallography*, 52(4), 816–827. <https://doi.org/10.1107/s1600576719009919>
- Margaritondo, G. (2014). Characteristics and properties of synchrotron radiation. In *Synchrotron radiation* (pp. 29–63). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55315-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55315-8_2)
- Margiolaki, I., Fitch, A. N., Wright, J. P., Fox, G. C., & Von Dreele, R. B. (2007). Powder diffraction studies on proteins: An overview of data collection approaches. *Tenth European Powder Diffraction Conference*, 1–14. <https://doi.org/10.1524/9783486992540-004>
- Margiolaki, I., Wright, J. P., Fitch, A. N., Von Dreele, R. B., & Fox, G. C. (2013). High-resolution powder X-ray data reveal the T6 hexameric form of bovine insulin. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(6), 978–990. <https://doi.org/10.1107/s0907444913003867>
- McPherson, A. (2009). *Introduction to macromolecular crystallography* (2nd ed.). John Wiley & Sons.
- Mertens, H. D. T., & Svergun, D. I. (2010). Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *Journal of Structural Biology*, 172(1), 128–141. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.06.012>
- MRC 2 Well UVXPO. (n.d.). *Hampton Research*. <https://hamptonresearch.com/product-MRC-2-Well-UVXPO-692.html>
- Nanao, M., et al. (2022). ID23-2: An automated and high-performance microfocus beamline for macromolecular crystallography at the ESRF. Corrigendum. *Journal of Synchrotron Radiation*, 29(3), 928–929. <https://doi.org/10.1107/s1600577522002818>
- Norrman, M., Schluckebier, G., Rask, L., Havelund, S., & Jonassen, I. (2006). Characterization of insulin microcrystals using powder diffraction and multivariate data analysis. *Journal of Applied Crystallography*, 39(3), 391–400. <https://doi.org/10.1107/s0021889806011058>

- Norrman, M., & Schluckebier, G. (2007). Crystallographic characterization of two novel crystal forms of human insulin induced by chaotropic agents and a shift in pH. *BMC Structural Biology*, 7(1), 83. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-83>
- Paraefthymiou, C. (2024). *Structural studies of pharmaceutical proteins & peptides for the development of drugs with improved biochemical and physicochemical properties* [Master's thesis, University of Patras]. <https://hdl.handle.net/10889/28499>
- Poynting, J. H. (1883). On the transfer of energy in the electromagnetic field. *Proceedings of the Royal Society of London*, 36(228–231), 186–187. <https://doi.org/10.1098/rspl.1883.0096>
- Rahuel-Clermont, S., et al. (1997). Mechanisms of stabilization of the insulin hexamer through allosteric ligand interactions. *Biochemistry*, 36(19), 5837–5845. <https://doi.org/10.1021/bi963038q>
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Quinn, M. E. (Eds.). (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients* (6th ed.). American Pharmacist Association.
- Rupp, B. (2010). *Biomolecular crystallography*. Garland Science.
- Schlichting, I. (2015). Serial femtosecond crystallography: The first five years. *IUCrJ*, 2(2), 246–255. <https://doi.org/10.1107/s205225251402702x>
- Schupsky, J. P., Müller, M., & Wirsum, M. (2020). Crystallisation of oxidic gasifier slags [Master's thesis]. <https://doi.org/10.18154/RWTH-2020-10033>
- Seibert, J. A. (2004). X-ray imaging physics for nuclear medicine technologists. Part 1: Basic principles of x-ray production. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 32(3).
- Smith, G. D., Ciszak, E., & Pangborn, W. (1996). A novel complex of a phenolic derivative with insulin: Structural features related to the T → R transition. *Protein Science*, 5(8), 1502–1511. <https://doi.org/10.1002/pro.5560050806>
- Smith, G. D., et al. (2000). The structure of the resorcinol/insulin R6 hexamer [Preprint]. <https://doi.org/10.2210/pdb1evr/pdb>
- Somasundaram, T. (2013). Protein crystallization methods. <http://biophysics.fsu.edu/soma/wp-content/uploads/sites/13/2015/04/ProteinCrystallizationMethods.pdf>
- Spiliopoulou, M., Valmas, A., Triandafillidis, D.-P., Kosinas, C., Fitch, A., Karavassili, F., & Margiolaki, I. (2020). Applications of X-ray powder diffraction in protein crystallography and drug screening. *Crystals*, 10(2), 54. <https://doi.org/10.3390/cryst10020054>
- Spiliopoulou, M., et al. (2020). Rietveld refinement for macromolecular powder diffraction. *Crystal Growth & Design*, 20(12), 8101–8123. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.0c00939>
- Spiliopoulou, M., Valmas, A., et al. (2021). High-throughput macromolecular polymorph screening via an NMR and X-ray powder diffraction synergistic approach: The case of human insulin co-crystallized with resorcinol derivatives. *Journal of Applied Crystallography*, 54(3), 963–975. <https://doi.org/10.1107/s160057672100426x>
- Spiliopoulou, M., et al. (2021). New perspectives in macromolecular powder diffraction using single-photon-counting strip detectors: High-resolution structure of the pharmaceutical peptide octreotide.

*Acta Crystallographica Section A: Foundations and Advances*, 77(3), 186–195. <https://doi.org/10.1107/s2053273321001698>

Tibaldi, J. M. (2014). Evolution of insulin: From human to analog. *The American Journal of Medicine*, 127(10). <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2014.07.005>

Trampari, S., et al. (2018). In situ detection of a novel lysozyme monoclinic crystal form upon controlled relative humidity variation. *Journal of Applied Crystallography*, 51(6), 1671–1683. <https://doi.org/10.1107/s1600576718013936>

Triandafillidis, D.-P., Parthenios, N., Spiliopoulou, M., Valmas, A., Kosinas, C., Gozzo, F., Reinle-Schmitt, M., Beckers, D., Degen, T., Pop, M., Fitch, A. N., Wollenhaupt, J., Weiss, M. S., Karavassili, F., & Margiolaki, I. (2020). Insulin polymorphism induced by two polyphenols: New crystal forms and advances in macromolecular powder diffraction. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 76(11), 1065–1079. <https://doi.org/10.1107/s205979832001195x>

Tullio, V., Spaccapelo, R., & Polimeni, M. (2014). Lysozymes in the animal kingdom. In *Human and mosquito lysozymes* (pp. 45–57). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-09432-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-09432-8_3)

Valmas, A., et al. (2015). Novel crystalline phase and first-order phase transitions of human insulin complexed with two distinct phenol derivatives. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 71(4), 819–828. <https://doi.org/10.1107/s1399004715001376>

Vekilov, P. G. (2012). Phase diagrams and kinetics of phase transitions in protein solutions. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 24(19), 193101. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/24/19/193101>

Vinther, T. N., et al. (2012). Novel covalently linked insulin dimer engineered to investigate the function of insulin dimerization. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030882>

Viterbo, D., & Zanotti, G. (2014). X-ray diffraction by crystalline materials. In *Synchrotron Radiation* (pp. 241–273). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55315-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55315-8_8)

Willmott, P. R., et al. (2013). The materials science beamline upgrade at the Swiss Light Source. *Journal of Synchrotron Radiation*, 20(5), 667–682. <https://doi.org/10.1107/s0909049513018475>

Zheng, H., et al. (2013). The future of crystallography in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 9(2), 125–137. <https://doi.org/10.1517/17460441.2014.872623>

Zink, F. E. (1997). X-ray tubes. *RadioGraphics*, 17(5), 1259–1268. <https://doi.org/10.1148/radiographics.17.5.9308113>

Χαμόδρακας, Σ. (1993) *Θέματα μοριακής βιοφυσικής. Συμμετρία*.