



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ
ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

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

Δομική και λειτουργική ανάλυση ιικών πρωτεϊνών και φαρμακευτικών στόχων

Δημήτριος Κούτουλας

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ
ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

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

Δομική και λειτουργική ανάλυση ιικών πρωτεϊνών και φαρμακευτικών στόχων

Δημήτριος Κούτουλας

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025

Εισαγωγή στο Δι-ιδρυματικό Προγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών (Δ.Π.Μ.Σ.) «Ανοργανη Βιολογική Χημεία»

του κ. Δημητρίου Κούτουλα

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Δρ. Ειρήνη Μαργιωλάκη

Θέμα: «Δομική και λειτουργική ανάλυση ιικών πρωτεϊνών και φαρμακευτικών στόχων »

Ορισμός Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής από την Επιτροπή Προγράμματος Σπουδών (ΕΠΣ):.....^A/...-...-....

1 Δρ. Ειρήνη Μαργιωλάκη, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

2 Δρ. Θεοχάρης Σταματάτος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών

3 Δρ. Σπυρίδων Περλεπές, Ομότιμος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις _____

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.

Ο/Η Γραμματέας

Καθηγητής Σωτήριος Χατζηκακού

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στην ερευνητική ομάδα Βιοχημείας, Δομικής Βιολογίας και Κρυσταλλογραφίας Ακτίνων Χ του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών, στα πλαίσια του Δ.Π.Μ.Σ Ανόργανη Βιολογική Χημεία του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την επιβλέπουσα μου, κα. Μαργιωλάκη Ειρήνη, Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών, που μου έδωσε την ευκαιρία να γνωρίσω το ερευνητικό πεδίο της Δομικής Βιοχημείας εντάσσοντας με στην ερευνητική της ομάδα. Είμαι ευγνώμων για τη συνεχή της καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τις εμπειρίες που μου προσέφερε στον ερευνητικό χώρο του εργαστηρίου αλλά και στο εξωτερικό. Προπαντός, οφείλω να την ευχαριστήσω για το ακέραιο επιστημονικό ήθος, τις αξίες της υπομονής και της επιμονής που μου μεταλαμπάδευσε καθ' όλη την ερευνητική πορεία των σπουδών μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και να εκφράσω την εκτίμηση μου στον κ. Θεοχάρη Σταματάτο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών και στον κ. Σπυρίδωνα Περλεπέ, Ομότιμο Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών, που δέχτηκαν να συγκροτήσουν την Εξεταστική Επιτροπή. Ακόμα, ευχαριστώ τους συντονιστές του μεταπτυχιακού προγράμματος κ. Σωτήριο Χατζηκακού, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και Δρ. Χριστίνα Μπαντή, καθώς και όλους τους διδάσκοντες του προγράμματος για τις πολύτιμες γνώσεις και την υποστήριξη που προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους συνεργάτες από το εξωτερικό, η συμβολή των οποίων ήταν καταλυτική για τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας. Εκ μέρους της ερευνητικής ομάδας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Dr. Detlef Beckers και Dr. Thomas Degen *Malvern Panalytical* για τη διαρκή υποστήριξη στα εργαστηριακά συστήματα περίθλασης, καθώς επίσης τους Dr. Gerd Schluckebier και Dr. Matthias Norrman από τη *Novo Nordisk*, για την παροχή της ανθρώπινης ινσουλίνης και των πρωτοκόλλων κρυστάλλωσης. Επιπροσθέτως, ευχαριστώ τους συνεργάτες μας από το Τμήμα Αρχιτεκτονικής και Λειτουργίας Βιολογικών Μακρομορίων/*Architecture et fonction des macromolécules biologiques* (AFMB) του Πανεπιστημίου *Luminy* της Μασσαλίας, Dr. Bruno Canard, Dr. Nicolas Papageorgiou και Dr. François Ferron για την ευγενική προσφορά των πλασμιδίων και γνωστική καθοδήγηση που έχουν παρέχει στην ερευνητική μας ομάδα. Επιπλέον, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους Dr. Andrew Fitch και Dr. Catherine Dejoie για τη συνεχή καθοδήγηση τους και την αμέριστη στήριξη τους κατά τη διεξαγωγή των μετρήσεων XRPD στον πειραματικό σταθμό ID22 (ESRF), καθώς επίσης την Dr. Cecile Exertier για την ανεκτίμητη συνεισφορά της στο πλαίσιο των κρυσταλλώσεων που διενεργήθηκαν στο Biocrystal Facility σε συνεργασία με το έργο ITACA.SB¹. Σε αυτό το σημείο δεν θα μπορούσα να παραλείψω τη σημαντική στήριξη του Πανεπιστημίου Πατρών, το οποίο είχε καταλυτικό ρόλο στη συνεργασία της ερευνητικής μας ομάδας με την αναφερόμενη εγκατάσταση μέσω παροχής πόρων.

Στα πλαίσια μιας πιο κοντινής απόστασης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών για την παροχή πρόσβασης στο φασματοφωτόμετρο *Multiskan SkyHigh Microplate* και ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Αλέξανδρο Μανιάτη και το μεταπτυχιακό φοιτητή Γεώργιο Κεφάλα για τη στήριξη τους στη χρήση του εξοπλισμού. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την ερευνητική ομάδα Δομικής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών και ιδιαίτερα τον Δρ. Χρήστο Κοσίνα και την υποψήφια διδάκτορα Παναγιώτα Καραμπά για την άψογη συνεργασία στη διεξαγωγή κοινών πειραμάτων SCXRD. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ οφείλω στην Παναγιώτα για την αμέριστη στήριξη, την καθοδήγηση και το ευχάριστο κλίμα που προσέφερε κατά τη συνεργασία μας.

Από τις ευχαριστίες δεν θα μπορούσα να παραλείψω τα μέλη του εργαστηρίου, παλαιά και νυν, που είχα την χαρά και την τιμή να συνεργαστώ κατά τη διεξαγωγή της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Το πιο σημαντικό ευχαριστώ οφείλω να εκφράσω ξεχωριστά στους μεταπτυχιακούς φοιτητές Ματίνα Καφετζή και Μάριο Κωνσταντόπουλο – μεταξύ μας δεν υπάρχουν τα επώνυμα, μόνο ένας γόρδιος δεσμός. Καθ' όλη αυτή την πορεία στο εργαστήριο, από προπτυχιακοί έως και μεταπτυχιακοί, μοιραστήκαμε κοινούς προβληματισμούς, άγχη, σκέψεις, αλλά πάνω απ' όλα εμπειρίες, στιγμές ξεγνοιασιάς και δημιουργήσαμε δικές μας ιστορίες. Αισθάνομαι περήφανος και τυχερός που τους γνώρισα, που μοιράστηκα το πρώτο μου ταξίδι στο εξωτερικό μαζί τους και θεωρώ τη στήριξη τους ευλογία. Αισίως, το κοινό αυτό ακαδημαϊκό ταξίδι κλείνει τον κύκλο του και εύχομαι να συνεχιστεί σε ένα συναρπαστικό κοινό ταξίδι ζωής.

Ένα μεγάλο και ζεστό ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω επίσης στη Χριστίνα Παπαευθυμίου, πλέον μοιρασμένη στα δύο, εκπονώντας το διδακτορικό της στο ESRF, στην πανέμορφη Γκρενόμπλ. Η Χριστίνα με στήριξε χωρίς φειδώ τόσο από κοντά, όσο και εξ αποστάσεως, προσφέροντας πάντα μια ανάλαφρη νότα μέσα στη βοή της δουλειάς, ενώ ζήσαμε αξέχαστες εμπειρίες ξεγνοιασιάς εντός και εκτός εργαστηρίου. Στο πρώτο πείραμα σε εγκατάσταση του εξωτερικού ήταν εκεί, να μας καθοδηγήσει, να μας στηρίξει από την πρώτη στιγμή που πατήσαμε το πόδι μας στους δρόμους της Γκρενόμπλ.

Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω επίσης στα νεότερα μέλη του εργαστηρίου, Άρτεμις Καραπέτη και Μαριάννα Λαμπροπούλου, που είχα την χαρά να συνεργαστώ και να κάνουμε άπειρες συζητήσεις στις ατελείωτες ώρες δουλειάς, καθώς και το Νικόλαο Παγώνη και Νεφέλη Καραγρηγορίου που είχα την ευκαιρία να συναναστραφώ μαζί τους σε ένα ευχάριστο περιβάλλον.

Ωστόσο, δεν θα μπορούσα να ξεχάσω τα παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου. Ο Άγγελος Κονταρίνης ήταν ο πρώτος που με μύησε στην τεχνογνωσία της έκφρασης πρωτεϊνών, με στήριξε καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής του φοίτησης και εξακολούθησε να με στηρίζει αφότου διαχωρίστηκαν οι δρόμοι μας. Είμαι ευγνώμων που ήταν εκεί στα πρώτα μου βήματα. Ευγνώμων δεν θα μπορούσα να μην είμαι επίσης απέναντι στη Δρ. Μαίρη Σπηλιοπούλου, η οποία με καθοδήγησε και με βοήθησε να ξεπεράσω δυσκολίες που αντιμετώπισα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μου. Ο συμβουλευτικός της ρόλος είναι ανεκτίμητος και την ευχαριστώ πολύ για το χρόνο που μου αφιέρωσε.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τους υποψήφιους διδάκτορες Νικολίνα Χαραλάμπους και Γιώργο Καλαμαρά, οι οποίοι παρότι δεν αποτελούν μέλη του εργαστηρίου, ήταν μια ευχάριστη ανάπαυλα από τη δουλειά, ένας προορισμός κατανόησης και στήριξης με την απόσταση ενός μόνο ορόφου. Είμαι ευγνώμων που τους γνώρισα και μου προσέφεραν στιγμές ξεκούρασης, γέλιου αλλά και στήριξη στην απαιτητική καθημερινότητα των μεταπτυχιακών σπουδών.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω τους φίλους μου για τη συνεχή στήριξη και την παρουσία τους στην καθημερινότητα μου, ενώ το μεγαλύτερο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στην οικογένεια μου, η οποία με στήριξε σε αυτή μου την προσπάθεια και μου έδωσε την ευκαιρία να γνωρίσω αγαπημένα άτομα και να βιώσω νέες εμπειρίες – δώρα πανάγαθα.

1. Οι συγγραφείς εκφράζουν τις ευχαριστίες τους στην Biocrystal Facility και στο έργο « Potentiating the Italian Capacity for Structural Biology Services in Instruct Eric ([ITACA.SB](#))» (Αρ. Έργου IR0000009), το οποίο υλοποιείται στο πλαίσιο της πρόσκλησης MUR 3264/2021 PNRR M4/C2/L3.1.1 και χρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση – NextGenerationEU.

Περιεχόμενα

Πρόλογος	5
Περίληψη	10
Abstract	11
I. Εισαγωγή.....	12
I.1 Δομική Βιολογία/Βιοχημεία	12
I.1.1 Το Κρυσταλλογραφικό Πείραμα.....	13
I.2 Έκφραση και Απομόνωση Πρωτεϊνών.....	15
I.2.1 Εργαλεία Ανασυνδυασμένου DNA: Ο Πλασμιδιακός Φορέας Έκφρασης	16
I.2.2 Παρασκευή Δεκτικών Κυττάρων και Μετασχηματισμός	18
I.2.3 Παραγωγή της Πρωτεΐνης-Στόχου.....	21
I.2.3.1 Το T7 Σύστημα Έκφρασης	21
I.2.3.2 Βακτηριακές Καλλιέργειες για την Έκφραση της Πρωτεΐνης-Στόχου	22
I.2.4 Απομόνωση της Πρωτεΐνης-Στόχου.....	23
I.2.4.1 Λύση Βακτηριακών Κυττάρων.....	24
I.2.4.2 Ταχεία Υγρή Χρωματογραφία Πρωτεϊνών (<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> , FPLC)	25
I.2.4.2.1 Χρωματογραφία Συγγενείας με Ακίνητοποιημένο Μέταλλο (<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i> , IMAC).....	26
I.2.4.2.2 Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης (<i>Size Exclusion Chromatography</i> , SEC).....	28
I.2.5 Ηλεκτροφόρηση Πηκτώματος Πολυακρυλαμιδίου με Θεικό Δωδεκυλονάτριο (<i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> , SDS-PAGE)	29
I.2.6 Συμπύκνωση της Πρωτεΐνης και Αλλαγή Διαλύματος Φύλαξης	32
I.2.7 Πέψη με την Πρωτεάση του <i>Tobacco Etch Virus</i> (TEVpro).....	33
I.2.8 Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Πρωτεΐνης – Φασματοφωτομετρική Μέτρηση με NanoDrop	34
I.3 Κρυστάλλωση Πρωτεϊνών	34
I.3.1 Θεμελιώδεις Αρχές Κρυστάλλωσης.....	34
I.3.2 Παράγοντες Κρυστάλλωσης.....	38
I.3.3 Μέθοδοι Κρυστάλλωσης.....	40
I.3.3.1 Μέθοδος Απευθείας Ανάμιξης (<i>Batch</i>).....	40
I.3.3.2 Μέθοδος Διάχυσης Ατμών (<i>Vapor Diffusion</i>).....	41
I.3.3.3 Μέθοδος Ελεγχόμενης Σποράς Κρυστάλλων (<i>Seeding</i>)	41
I.4 Η Δομή των Κρυστάλλων.....	43
I.4.1 Το Κρυσταλλικό Πλέγμα και η Μοναδιαία Κυψελίδα	43
I.4.2 Κρυσταλλικά Συστήματα και Πλέγματα <i>Bravais</i>	44
I.4.3 Διεργασίες Συμμετρίας	45

I.4.4 Ομάδες Συμμετρίας	45
I.4.5 Κρυσταλλογραφικά Επίπεδα	46
I.5 Ακτίνες Χ	47
I.5.1 Παραγωγή Ακτίνων Χ.....	48
I.5.2 Πηγές Ακτίνων Χ.....	48
I.6 Περίθλαση Ακτίνων Χ.....	50
I.6.1 Περίθλαση από Κρυστάλλους.....	50
I.6.1.1 Νόμος του <i>Bragg</i>	50
I.6.1.2 Σφαίρα του <i>Ewald</i>	51
II. Κρυσταλλογραφική Μελέτη Φαρμακευτικών Μορίων	53
II.1 Ινσουλίνη και Διαβήτης.....	53
II.1.1 Βιοσύνθεση και Έκκριση της Ινσουλίνης.....	53
II.1.2 Ινσουλίνη: Δομή και Μοριακές Διαμορφώσεις	55
II.1.3 Η Σημασία της Ινσουλίνης στην Αντιμετώπιση του Διαβήτη	57
II.2 Μελέτη Πολυμορφισμού της Ανθρώπινης Ινσουλίνης	58
II.2.1 Υλικά & Μέθοδοι.....	60
II.2.2 Αποτελέσματα.....	64
II.2.3 Συμπεράσματα – Συζήτηση	68
II.3 Μελέτη της Επίδρασης της Σχετικής Υγρασίας στην Κρυσταλλική Δομή της Ανθρώπινης Ινσουλίνης	69
II.3.1 Υλικά και Μέθοδοι	71
II.3.2 Αποτελέσματα.....	73
II.3.3 Συμπεράσματα-Συζήτηση	79
III. Δομική Μελέτη Ιικών Πρωτεϊνών	81
III.1 Κρυσταλλογραφική Μελέτη της 3C Πρωτεάσης του Ιού <i>Coxsackie B3</i>	81
III.1.1 Ιός <i>Coxsackie B3</i>	81
III.1.1.1 Η Πρωτεάση 3C του Ιού <i>Coxsackie</i> (3Cpro)	83
III.1.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	84
III.1.3 Αποτελέσματα.....	87
III.1.4 Συμπεράσματα – Συζήτηση	91
III.2 Δομική Μελέτη της 3'-5' Εξωνουκλεάσης του Ιού LCMV (LCMV ExoN).....	94
III.2.1 Ιός Λεμφοκυτταρικής Χοριομηνιγγίτιδας (<i>Lymphocytic Choriomeningitis Virus</i> , LCMV)	94
III.2.1.1 Η Νουκλεοπρωτεΐνη (NP) και η 3'-5' Εξωνουκλεάση (ExoN).....	96
III.2.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	97
III.2.3 Αποτελέσματα.....	100
III.2.4 Συμπεράσματα – Συζήτηση	104

IV Επίλογος	106
IV Παράρτημα.....	107
IV.1 Πολυμορφισμός Ανθρώπινης Ινσουλίνης Παρουσία της 4-Βρωμορεσορσινόλης	107
IV.2 Κύκλοι Μεταβολής Υγρασίας – Σύμπλοκο Ινσουλίνης και 4-Βρωμορεσορσινόλης	109
V. Βιβλιογραφία.....	112

Περίληψη

Η παρούσα εργασία πραγματεύεται τη δομική μελέτη βιολογικών μακρομορίων με φαρμακευτικό ενδιαφέρον, με κύριους άξονες την ανθρώπινη ινσουλίνη και επιλεγμένες ικές πρωτεΐνες. Κεντρική μεθοδολογική προσέγγιση συνιστά η μέθοδος κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, με στόχο τη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ δομής και λειτουργίας, καθώς επίσης τη συνεισφορά στον ορθολογικό σχεδιασμό και στη βελτιστοποίηση φαρμακευτικών σκευασμάτων. Στο πλαίσιο μελέτης των φαρμακευτικών μορίων πραγματοποιήθηκε κρυσταλλογραφική μελέτη της ανθρώπινης ινσουλίνης σε σύμπλοκο με τον προσδότη 4-βρωμορεσορσινόλη υπό μεταβαλλόμενες συνθήκες φυσικοχημικού περιβάλλοντος. Σε πρώτο επίπεδο, μελετήθηκε ο πολυμορφισμός του αναφερόμενου ινσουλινικού συμπλόκου συναρτήσει του pH, αξιοποιώντας την τεχνική περίθλασης ακτίνων Χ από πολυκρυσταλλικό δείγμα (*X-ray Powder Diffraction*, XRPD). Η ανάλυση των δεδομένων περίθλασης ανέδειξε την παρουσία πολυμόρφων μονοκλινούς συμμετρίας χαρακτηριζόμενη από τα *space groups* $P2_{1(V)}$, $P2_{1(D)}$ και $P2_{1(B)}$, επιβεβαιώνοντας παλαιότερα ευρήματα (Σπηλιοπούλου, 2023). Σε δεύτερο επίπεδο, διεξήχθη κρυσταλλογραφική μελέτη του πολυμόρφου $P2_{1(B)}$ του συμπλόκου της ανθρώπινης ινσουλίνης με την 4-βρωμορεσορσινόλη, μέσω *in-situ* XRPD μετρήσεων υπο μεταβαλλόμενες συνθήκες σχετικής υγρασίας. Το δείγμα υποβλήθηκε σε επαναλαμβανόμενους κύκλους αφυδάτωσης-ενυδάτωσης, διατηρώντας την κρυσταλλικότητα του έως 50% RH, με τις μεταβολές που υφίστανται οι παράμετροι της μοναδιαίας κυψελίδας να είναι σχετικά αναστρέψιμες. Στο πλαίσιο μελέτης των ικών πρωτεϊνών, εκπονήθηκε δομική μελέτη της πρωτεάσης 3C (3Cpro) του ιού *Coxsackie B3* με στόχο τη βελτίωση των δεδομένων XRPD. Κατόπιν επιτυχούς υπερέκφρασης και απομόνωσης της 3Cpro, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές βελτιστοποίησης των συνθηκών κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης με την αξιοποίηση της τεχνικής της σποράς. Η ανάλυση των δεδομένων XRPD ανέδειξε την παρουσία του πολυμόρφου C2, το οποίο έχει επισημανθεί επίσης σε πρότερες μελέτες (Fili et al., 2016), ενώ μια πρώτη σύγκριση των δεδομένων υποδεικνύει βελτίωση της ποιότητας των δεδομένων περίθλασης. Παράλληλα, διεξήχθη μελέτη της 3'-5' εξωνουκλεάσης του ιού της λεμφοκυτταρικής χοριομηνιγγίτιδας. Η επιτυχής έκφραση και απομόνωση της εξωνουκλεάσης επέτρεψε την πραγματοποίηση δοκιμών κρυστάλλωσης και συγκεκριμένα τη βελτιστοποίηση της αρχικής συνθήκης που απέδωσε το δομικό μοντέλο *8cni* (Σπηλιοπούλου, 2023), αξιοποιώντας την τεχνική της σποράς. Τα πρώτα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η τεχνική της σποράς συμβάλλει σημαντικά στην επίτευξη κρυσταλλικού αποτελέσματος, ενώ επερχόμενα πειράματα περίθλασης ακτίνων Χ αναμένεται να αποσαφηνίσουν την ποιότητα των κρυστάλλων.

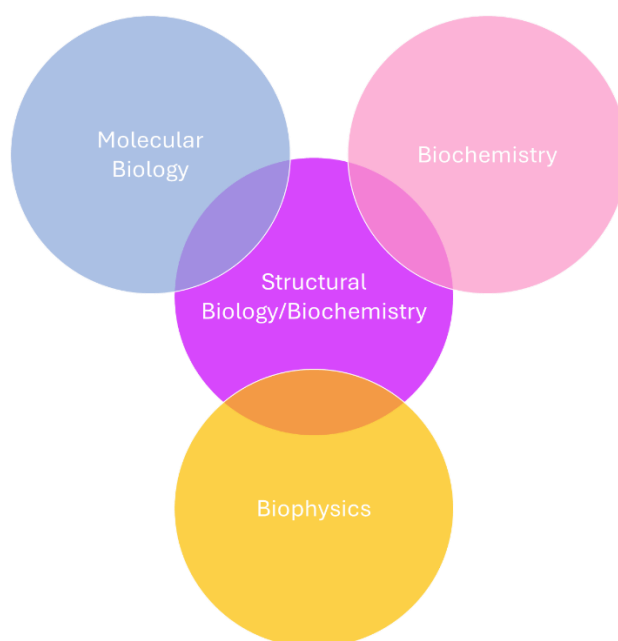
Abstract

The present thesis focuses on the structural investigation of biologically and pharmaceutically macromolecules, with emphasis on human insulin and selected vital proteins. The central methodological approach is X-ray crystallography, aiming to elucidate the relationship between structure and function and to contribute to the rational design and optimization of pharmaceutical formulations. In the framework of pharmaceutical molecules' study, crystallographic investigation of human insulin – 4-bromoresorcinol complex was carried out under varying physicochemical environment. At a first level, the polymorphism of the complex was examined as a function of pH via X-ray Powder Diffraction (XRPD). Data analysis revealed the presence of monoclinic polymorphs corresponding to the space groups $P2_1(\gamma)$, $P2_1(\delta)$ and $P2_1(\beta)$, in agreement with previous findings (Σπηλιοπούλου, 2023). At a second level, crystallographic study of the $P2_1(\beta)$ polymorph of human insulin – 4-bromoresorcinol complex was conducted through in-situ XRPD measurements under varying relative humidity conditions. The sample sustained successive dehydration-rehydration cycles, maintaining crystallinity up to 50% RH, while the unit cell parameters' variations observed during the process were found to be partially reversible. Within the study of viral protein, a structural investigation of the 3C protease (3Cpro) of Coxsackie B3 virus was performed, aiming to improve XRPD data quality. Following successful overexpression and purification of 3Cpro, crystallization optimization trials were conducted using seeding technique. Diffraction analysis confirmed the presence of C2 polymorph, consistent with previous reports (Fili et al., 2016), while initial comparison of data indicates enhanced diffraction quality. Additionally, the 3'-5' exonuclease domain of the Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) was structurally investigated. Successful expression and purification of exonuclease enabled optimization of the crystallization condition that previously yielded to the structural model 8cni (Σπηλιοπούλου, 2023), again employing the seeding technique. Preliminary results suggest that seeding significantly facilitates crystal formation, while upcoming X-ray diffraction experiments are expected to determine the final crystal quality.

I. Εισαγωγή

I.1 Δομική Βιολογία/Βιοχημεία

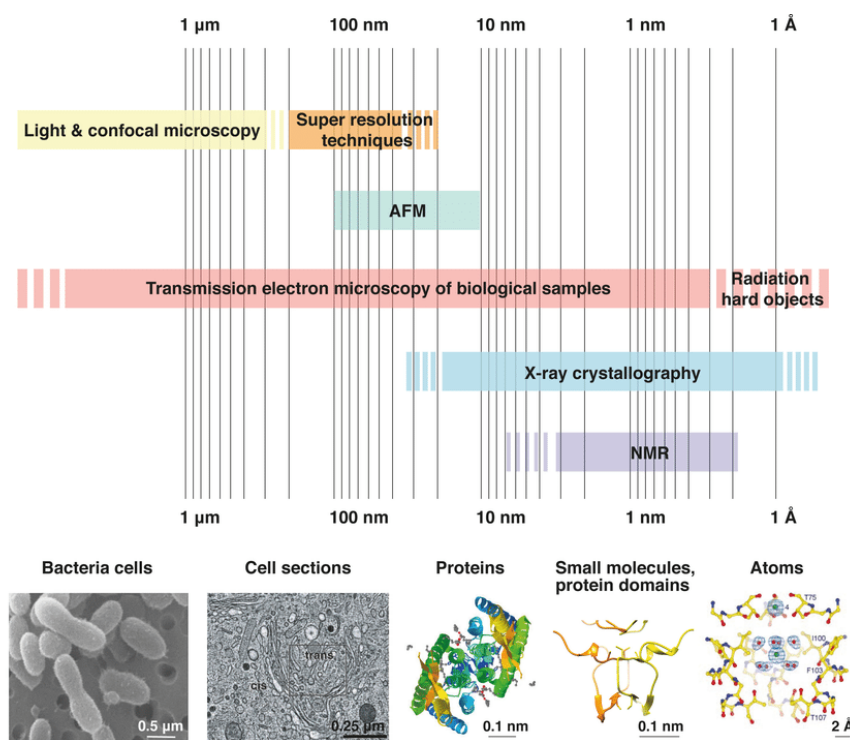
Η **Δομική Βιολογία/Βιοχημεία** (*Structural Biology/Biochemistry*) αποτελεί εξειδικευμένο κλάδο της επιστήμης της Βιολογίας εστιάζοντας στη δομή των βιολογικών μακρομορίων – κυρίως των πρωτεϊνών – καθώς και στη συσχέτιση της με τη λειτουργία τους. Συγκεκριμένα, συνιστά ένα διεπιστημονικό πεδίο αιχμής, το οποίο συνδυάζοντας πτυχές της Βιολογίας, της Χημείας και της Φυσικής, αποσκοπεί στην αποσαφήνιση της οργάνωσης και του τρόπου αλληλεπίδρασης και λειτουργίας των μορίων – κατ' επέκταση στη βαθύτερη κατανόηση των βιολογικών διεργασιών. Η αξία της αποκωδικοποίησης αυτών των ιδεών και μηχανισμών καθιστά τη Δομική Βιοχημεία θεμελιώδη λίθο στους ερευνητικούς τομείς της ιατρικής, της βιοτεχνολογίας και της φαρμακευτικής, με τον τελευταίο να χαρακτηρίζεται από την ευρέως γνωστή εφαρμογή της στο σχεδιασμό φαρμάκων με βάση τη δομή (*Structure-based drug design*, SBDD).



Εικόνα I.1.1. Η διεπιστημονικότητα του κλάδου της Δομικής Βιοχημείας.

Η σύγχρονη Δομική Βιοχημεία δεν περιορίζεται στον προσδιορισμό της τρισδιάστατης αρχιτεκτονικής των μακρομορίων – διερευνά επίσης τη δυναμική φύση των βιολογικών μορίων και τη σταθερότητα τους με τη χρήση ευρείας εδραιωμένων και συνεχώς εξελισσόμενων μεθόδων. Μεταξύ των μεθόδων που αξιοποιούνται για τη διερεύνηση της δομής και της δυναμικής της, περιλαμβάνονται ως κύριες η **κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ** (*X-Ray Crystallography*), ο **πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός** (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) και η **κρυογονική ηλεκτρονική μικροσκοπία** (*Cryogenic – Electron Microscopy*, Cryo-EM). Κάθε μέθοδος χρησιμοποιείται βάσει των πλεονεκτημάτων της και τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος, ενώ αξιοσημείωτη είναι η συμπληρωματικότητα που δύναται να εμφανίζουν. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ αποτελεί την κυριότερη και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στην ιστορία της Δομικής Βιοχημείας δεδομένου ότι καθιστά δυνατή την επίλυση δομής μεγάλων μορίων, πολύπλοκων συμπλόκων, ακόμη και ιοσωματίων

σε επίπεδο υψηλής έως ατομικής ευκρίνειας ($\sim 1\text{\AA}$). Σε αντίθεση με την κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ που θέτει αναγκαία την περίθλαση ακτίνων Χ (*X-ray Diffraction*, XRD) από την κρυσταλλική δομή του υπό μελέτη μακρομορίου, ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός επιτρέπει τη δομική μελέτη μικρού και μεσαίου μοριακού βάρους πρωτεϊνών σε διάλυμα ή στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον, ενώ παράλληλα προσφέρει τη δυνατότητα διερεύνησης της δυναμικής τόσο της διαμόρφωσης όσο και της αλληλεπίδρασης που συμβαίνει σε χρονικές κλίμακες κυμαινόμενες από πικοδευτερόλεπτα έως δευτερόλεπτα ή ακόμη και μέρες (Hu et al., 2021). Ωστόσο, η αξιοποίηση της συγκεκριμένης μεθόδου έχει περιοριστεί λόγω της επίπονης διαδικασίας της ανάλυσης των δεδομένων. Εν αντιθέσει, η κρυογονική ηλεκτρονική μικροσκοπία συνιστά μια ανερχόμενη μέθοδο τα τελευταία χρόνια αποδίδοντας κοντά στην ατομική ευκρίνεια δομές βιομορίων μεγάλου μοριακού βάρους στην εγγενή τους κατάσταση (Yip et al., 2020).

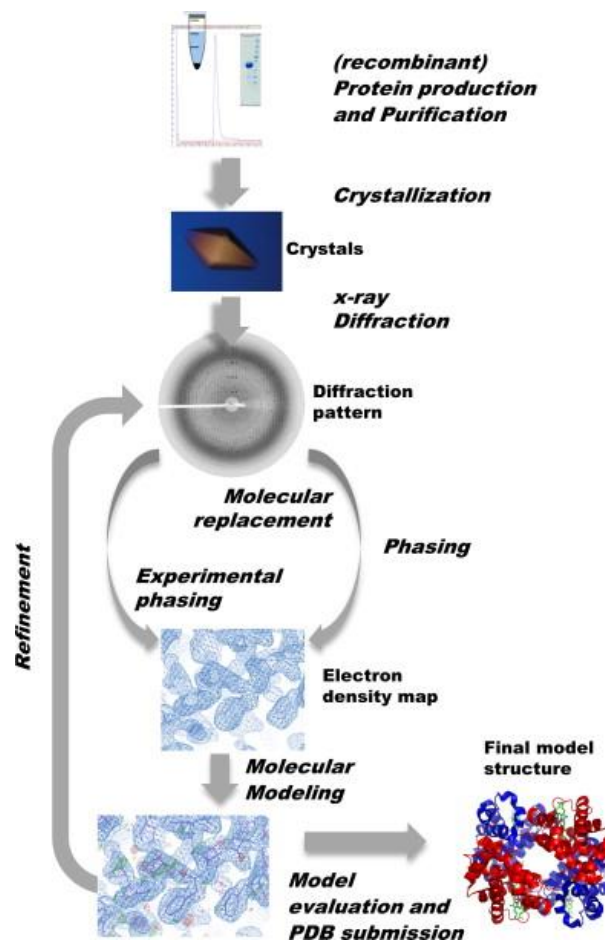


Εικόνα I.1.2. Μέθοδοι στη Δομική Βιολογία. Οι τεχνικές απεικονίζονται γραφικά συναρτήσει των ορίων της διακριτικής τους ικανότητας (Müller, 2013).

I.1.1 Το Κρυσταλλογραφικό Πείραμα

Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί μια σταθερή ως προς τη χρήση μέθοδο που επικεντρώνεται στον προσδιορισμό της μοριακής δομής των βιολογικών μακρομορίων καθώς και στην κατανόηση της συσχέτισης αυτής με τη λειτουργία τους. Το πιο δημοφιλές αντικείμενο μελέτης ενός κρυσταλλογραφικού πειράματος συνιστούν οι πρωτεΐνες λόγω του γεγονότος ότι ο ρόλος τους – λειτουργικός και δομικός – θεμελιώνει τις βιολογικές διεργασίες του κυττάρου. Ωστόσο, οι κρυσταλλογραφικές μελέτες εστιάζουν επίσης στα νουκλεϊκά οξέα και τα σύμπλοκά τους με πρωτεΐνες, ενώ το ενδιαφέρον επεκτείνεται και σε συστήματα όπως οι ιοί και τα ανοσοσύμπλοκα.

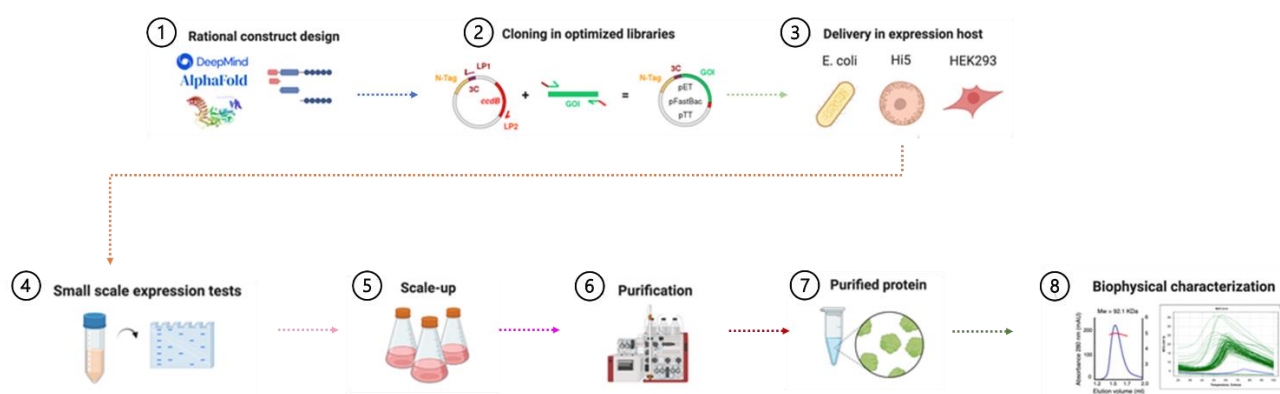
Ένα κρυσταλλογραφικό πείραμα είναι μια πολυπαραμετρική και σύνθετη διαδικασία που απαιτεί χρόνο καθώς και διεπιστημονική κατάρτιση στους επιμέρους τομείς που συγκροτούν τον κλάδο της Δομικής Βιοχημείας. Το εναρκτήριο βήμα ενός κρυσταλλογραφικού πειράματος συνιστά η βιοπληροφορική ανάλυση, η οποία στοχεύει στην εύρεση της πρωτεΐνης-στόχου. Σε δεύτερο επίπεδο, η αλληλουχία των νουκλεϊκών οξέων που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη κλωνοποιείται σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς, οι οποίοι στη συνέχεια αξιοποιούνται για την παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλες ποσότητες μέσω κατάλληλων συστημάτων ετερόλογης έκφρασης. Κατόπιν απομόνωσης της πρωτεΐνης μέσω χρωματογραφικών μεθόδων και συμπύκνωσης της σε υψηλές συγκεντρώσεις – με πρωτόκολλο που να αποδίδει καλή ποιότητα, ομοιογένεια και καλή διαλυτότητα του πρωτεϊνικού δείγματος – ακολουθούν οι δοκιμές κρυστάλλωσης, οι οποίες βασίζονται στην σταδιακή μεταβολή των ιδιοτήτων του διαλύματος της πρωτεΐνης με τέτοιο τρόπο ώστε να εξέλθει η πρωτεΐνη από το διάλυμα σε μορφή κρυστάλλου. Στην περίπτωση επιτυχούς κρυστάλλωσης πραγματοποιείται συλλογή του κρυστάλλου και έκθεση του σε ακτίνες Χ με σκοπό τη συλλογή δεδομένων περίθλασης. Η ανάλυση των δεδομένων περίθλασης καθιστά δυνατό το πειραματικό προσδιορισμό της δομής της πρωτεΐνης. Τελικό βήμα αποτελεί μια σειρά ελέγχων της στερεογεωμετρίας του πειραματικού μοντέλου για την εξακρίβωση της ορθότητας του πριν την κατάθεση του σε μια παγκόσμια και ανοιχτή βάση δεδομένων, στην οποία θα είναι προσβάσιμο στο ευρύ ερευνητικό κοινό, συνεισφέροντας κατ' αυτό τον τρόπο στην πρόοδο της επιστήμης.



Εικόνα I.1.3. Η πειραματική πορεία που ακολουθείται σε ένα κρυσταλλογραφικό πείραμα από την παραγωγή της πρωτεΐνης έως την επίλυση της δομής (Büttner, 2016).

1.2 Έκφραση και Απομόνωση Πρωτεϊνών

Ένα από τα πιο σημαντικά και χρονοβόρα στάδια ενός κρυσταλλογραφικού πειράματος είναι η έκφραση της πρωτεΐνης-στόχου, μια διαδικασία που μέσω ετερόλογων συστημάτων έκφρασης, καθώς ο προκείμενος ερευνητικός σκοπός καθιστά αναγκαία τη διαθεσιμότητα της πρωτεΐνης σε υψηλές συγκεντρώσεις. Το πιο σύνηθες σύστημα έκφρασης που χρησιμοποιείται είναι οι βακτηριακές καλλιέργειες. Μάλιστα, το πιο κοινό βακτηριακό σύστημα συνιστούν στελέχη της *Escherichia coli* (*E. coli*), καθώς επιτρέπουν τη γρήγορη ανάπτυξη και έκφραση με χαμηλό κόστος. Άλλα συστήματα έκφρασης αποτελούν ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, όπως ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*, κυτταρικές σειρές θηλασικών καθώς και κύτταρα εντόμων, ενώ λιγότερο συχνά συναντώνται και φυτικά συστήματα. Η επιλογή του συστήματος έκφρασης της εκάστοτε υπο μελέτη πρωτεΐνης είναι μια πολυπαραμετρική διαδικασία εξαρτώμενη από την προέλευση (ευκαρυωτική ή προκαρυωτική) της πρωτεΐνης, τη διαλυτότητα της, καθώς και την ανάγκη για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και μοριακών συνοδών (*chaperons*) (Marintcheva, 2018). Οι ανωτέρω παράμετροι δύναται να αποτελούν τροχοπέδη στην πειραματική πορεία, με την χαμηλή διαλυτότητα, την τοξικότητα και τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης – όταν το σύστημα επωάζεται υπο συνθήκες υπερέκφρασης- να θέτουν σημαντικούς περιορισμούς στην απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε ικανοποιητική ποσότητα και καθαρότητα. Για την πιο ομαλή και αποτελεσματική έκφραση της πρωτεΐνης, η πειραματική πορεία μπορεί να διακριθεί σε τρία στάδια: α) το σχεδιασμό του γονιδιακού φορέα έκφρασης που θα κωδικοποιεί την πρωτεΐνη-στόχο, β) τη διαλογή έκφρασης για την επιλογή του κατάλληλου φορέα και ξενιστή έκφρασης και γ) την προετοιμασία του δείγματος που περιλαμβάνει τη μετάβαση του πιο αποτελεσματικού συστήματος έκφρασης σε μεγαλύτερη κλίμακα, ακολουθούμενη από τον καθαρισμό της πρωτεΐνης και τον έλεγχο της ποιότητας της μέσω βιοφυσικών μεθόδων (Nettlehip et al., 2019; Owens & Gileadi, 2019).



Εικόνα 1.2.1. Επισκόπηση της διαδικασίας παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών υψηλών συγκεντρώσεων και καλής ποιότητας (Τροποποιημένη από <https://www.research.ieu.it/research-and-technology/technological-units/biochemistry-and-structural-biology-unit/biochemistry-and-structural-biology-unit-services/>).

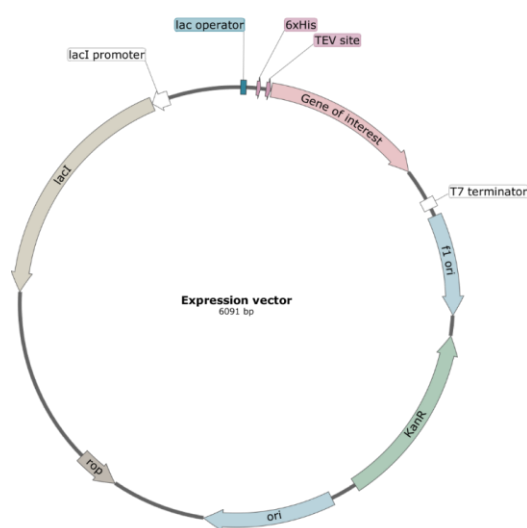
Στα βακτηριακά συστήματα, η βασική πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει την εισαγωγή του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης στα βακτηρίων, την παραγωγή της πρωτεΐνης-στόχου, καθώς επίσης την απομόνωση και τη συμπύκνωση της σε υψηλές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, ένα βήμα κατ' επιλογήν είναι η επώαση της πρωτεΐνης με πρωτεολυτικό ένζυμο για την απομάκρυνση πιθανών ετικετών που έχουν προστεθεί στη δομή της πρωτεΐνης και έχουν καθοριστικό ρόλο στην απομόνωσή της, ενώ κάποιες δύναται να έχουν προστατευτική δράση έναντι της τοξικότητας.

1.2.1 Εργαλεία Ανασυνδυασμένου DNA: Ο Πλασμιδιακός Φορέας Έκφρασης

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA αποτέλεσε καίριο σημείο στη διαμόρφωση σύγχρονων πτυχών της βιοτεχνολογίας, συμπεριλαμβανομένου της ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών. Με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών και DNA λιγάσης είναι δυνατή η απομόνωση ενός τμήματος DNA και η ενσωμάτωση του σε έναν φορέα, ο οποίος κατόπιν του ανασυνδυασμού του θα εισαχθεί σε ένα βακτήριο ξενιστή. Ο γονιδιακός αυτός φορέας ετερόλογης έκφρασης συνιστά συνήθως ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA με την ικανότητα αυτόνομου πολλαπλασιασμού εντός του κυττάρου ξενιστή. Τα πλασμίδια, φέροντας τα ανωτέρω χαρακτηριστικά, εμφανίζουν διαδεδομένη χρήση ως φορείς κλωνοποίησης τμημάτων εξωγενούς DNA.

Η επιλογή του πλασμιδιακού φορέα αποτελεί ένα στάδιο καθοριστικής σημασίας για την πειραματική πορεία της πρωτεϊνικής έκφρασης. Ο αποτελεσματικός σχεδιασμός ενός πλασμιδιακού φορέα στηρίζεται στον κατάλληλο συνδυασμό των επιμέρους χαρακτηριστικών του, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται το **ρεπλικόνιο** που είναι υπεύθυνο για τον αριθμό των αντιγράφων του πλασμιδίου εντός του κυττάρου, ο **υποκινητής** έχοντας ρόλο αφετηρίας για τη μεταγραφή, ένας **δείκτης επιλογής** που συνήθως ταυτίζεται με ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό, **ετικέτες συγγενείας** που συμβάλλουν στην απομόνωση της πρωτεΐνης ή στην ενίσχυση της διαλυτότητας της καθώς και **αλληλουχίες αναγνώρισης από πρωτεολυτικά ένζυμα** για την απομάκρυνση της ετικέτας (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αξιοποιήθηκαν πλασμιδιακοί φορείς που κατατάσσονται στην ευρύτερη κατηγορία του συστήματος pET, ένα από τα πιο διαδεδομένα σε χρήση συστήματα για κλωνοποίηση και *in vivo* έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στην *E. coli*. Τα πλασμίδια τύπου pET χαρακτηρίζονται από την παρουσία του T7 υποκινητή, στον οποίο προσδένεται η RNA πολυμεράση του T7 φάγου, καθώς και η ακολουθούμενη αλληλουχία του χειριστή του οπερονίου της λακτόζης (*lac operator*), η οποία επιτρέπει την μεταγραφή του γονιδίου-στόχου από την T7 RNA πολυμεράση μόνο κατόπιν της επαγωγής (Rosano & Ceccarelli, 2014). Πρωτύτερα του σταδίου της επαγωγής, ο καταστολέας *lacI*, του οποίου το γονίδιο συνήθως εντοπίζεται επίσης στον πλασμιδιακό φορέα pET, προσδένεται στην αλληλουχία του χειριστή και εμποδίζει τη μεταγραφή του γονιδίου.



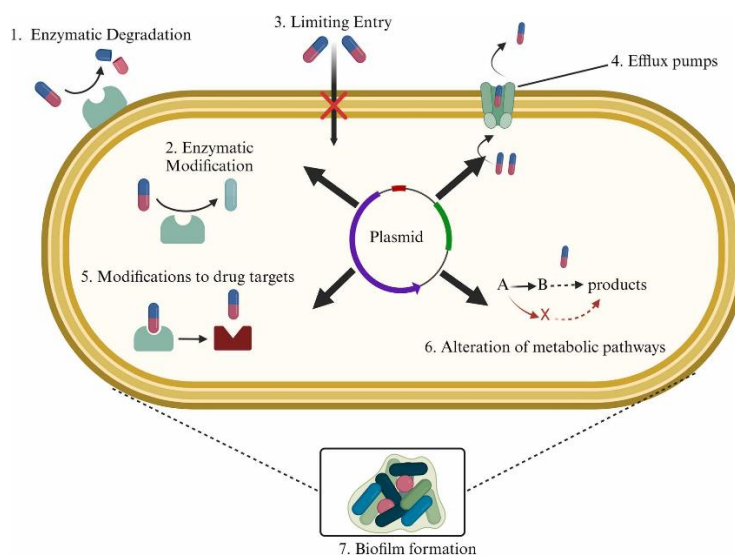
Εικόνα 1.2.2. Σχηματική αναπαράσταση ενός τυπικού πλασμιδιακού φορέα έκφρασης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (<https://pps.gu.se/en/our-areas-of-expertise/expression-vector-design>).

Τα πλασμίδια που αξιοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία φέρουν ως δείκτη επιλογής γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (*ampicillin*) ή στην καναμυκίνη (*kanamycin*), ενώ στην πειραματική πορεία χρησιμοποιήθηκε επίσης το αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη (*chloramphenicol*).

Η αμπικιλίνη αποτελεί ένα β-λακταμικό αντιβιοτικό, το οποίο συνδεδεμένο με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες δέσμευσης πενικιλίνης (*penicillin-binding proteins*, PBPs) παρεμβαίνει στο βιοχημικό μονοπάτι βιοσύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης, ενός δομικού συστατικού ζωτικής σημασίας για την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου. Έναντι αυτής της δράσης έχει αναπτυχθεί ένας μηχανισμός ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, βασιζόμενος στην ενζυμική διάσπαση του αντιβιοτικού μέσω της β-λακταμάσης, η οποία διασπά το δακτύλιο της β-λακτάμης (Peechakara et al., 2023).

Η καναμυκίνη κατατάσσεται στην κατηγορία των αμινογλυκοζιδίων και δρα ενάντια των βακτηρίων αναστέλλοντας την διαδικασία της σύνθεσης πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, δεσμεύεται στο 16S rRNA της 30S υπομονάδας του βακτηριακού ριβοσώματος, επιτρέποντας έτσι την εσφαλμένη ανάγνωση του mRNA και κατ' επέκταση τη δημιουργία μη λειτουργικών πεπτιδικών αλυσίδων (Kotra et al., 2000). Ένας από τους πιο συνήθεις μηχανισμούς ανθεκτικότητας στη δράση αμινογλυκοζιδίων είναι η ενζυμική τροποποίηση του αντιβιοτικού. Ειδικότερα, ένζυμα που ανήκουν στις κατηγορίες των Ν-ακετυλοτρανσφερασών (ACC), Ο-νουκλεοτιδυλοτρανσφερασών (ANT) και Ο-φωσφοτρανσφερασών (APC) μπορούν να απενεργοποιήσουν τα αμινογλυκοσιδικά αντιβιοτικά μέσω ακετυλίωσης, αδενυλίωσης και φωσφορυλίωσης αντίστοιχα (Ojdana et al., 2018).

Η χλωραμφενικόλη αποτελεί ένα αντιβιοτικό με βακτηριοστατική δράση – ωστόσο, σε υψηλές συγκεντρώσεις δύναται να αποκτήσει βακτηριοκτόνο ιδιότητα. Η δράση της χλωραμφενικόλης στηρίζεται στην αναστολή της διαδικασίας της μετάφρασης. Σε αντίθεση με την καναμυκίνη, η χλωραμφενικόλη δεσμεύεται στην 50S υπομονάδα του βακτηριακού ριβοσώματος και συγκεκριμένα στο κέντρο της πεπτιδυλοτρανσφεράσης, παρεμποδίζοντας κατ' αυτό τον τρόπο το σχηματισμό νέου πεπτιδικού δεσμού και συνεπώς την επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας (Oong & Tadi, 2023). Η ανθεκτικότητα του βακτηρίου στο παρόν αντιβιοτικό απορρέει κυρίως από την ενζυμική απενεργοποίηση του, κατά την οποία το ένζυμο ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφενικόλης (CAT) τροποποιεί το αντιβιοτικό μέσω ακετυλίωσης. Ωστόσο, επιπλέον μηχανισμοί περιλαμβάνουν απενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης, αντλίες εκροής, μεταλλάξεις στο σημείο-στόχο και μειωμένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης (Graf et al., 2024).



Εικόνα 1.2.3. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας έναντι των αντιβιοτικών στα βακτήρια (Ahmed et al., 2024).

1.2.2 Παρασκευή Δεκτικών Κυττάρων και Μετασχηματισμός

Το πρώτο βήμα στην βασική πειραματική πορεία της πρωτεϊνικής έκφρασης είναι η εισαγωγή του φορέα έκφρασης στον ξενιστή, στην προκειμένη περίπτωση στα βακτήρια. Πρόκειται για οριζόντια μεταφορά γονιδίων η οποία δύναται να εφαρμοστεί με την αξιοποίηση τριών κύριων προσεγγίσεων. Συγκεκριμένα, τα βακτήρια μπορούν να λάβουν ξένο γενετικό υλικό μέσω: α) του **μετασχηματισμού** (*transformation*), κατά τον οποίο το κύτταρο-ξενιστής προσλαμβάνει «γυμνό» DNA που ακολούθως είτε ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου είτε πολλαπλασιάζεται αυτόνομα ως εξωχρωμοσωμικό DNA, β) της **μεταγωγής** (*transduction*), μια διαδικασία εισαγωγής του εξωγενούς γενετικού υλικού στο κύτταρο-δέκτη με τη μεσολάβηση ενός ιού ή ιικού φορέα και γ) της **σύζευξης** (*conjugation*), η οποία εξαρτάται από την άμεση επαφή των κυττάρων (D. Liu et al., 2022).

Ο μετασχηματισμός είναι μια διαδικασία που μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με φυσικά είτε με τεχνητά μέσα. Ο φυσικός μετασχηματισμός είναι ένας μηχανισμός που εκτελείται αυθόρμητα στη φύση, αλλά αποτελεί ένα σπάνιο χαρακτηριστικό που συναντάται σε ορισμένα είδη βακτηρίων. Τα συγκεκριμένα βακτήρια φέρουν στην επιφάνεια τους πρωτεΐνες υπεύθυνες για την πρόσδεση του εξωκυττάρου DNA και τη μεταφορά του εντός του κυττάρου. Στην περίπτωση απουσίας του ανωτέρω μηχανισμού, όπως στα βακτήρια *E. coli*, τα κύτταρα υφίστανται μετασχηματισμό κατόπιν κατεργασίας που καθιστά την πλασματική μεμβράνη προσωρινά διαπερατή από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Ο τεχνητός αυτός μετασχηματισμός πραγματοποιείται είτε με χημική επεξεργασία με κατιονικές ενώσεις συνδυαστικά με θερμικό σοκ των κυττάρων είτε με ηλεκτροπόρωση με τη χρήση σύντομου ηλεκτρικού παλμού υψηλής τάσης που δημιουργεί προσωρινούς πόρους στην κυτταρική μεμβράνη.

Η πιο δημοφιλής και αποτελεσματική τεχνική εισαγωγής πλασμιδίου σε βακτήρια *E. coli* είναι η επεξεργασία των κυττάρων με CaCl_2 και η υποβολή τους σε θερμικό σοκ. Κατά τη βιοχημική αυτή μέθοδο τα δισθενή ιόντα Ca^{2+} προσδίδουν θετικό φορτίο στη μεμβράνη των βακτηριακών κυττάρων, συνεπάγοντας έτσι την έλξη των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του πλασμιδιακού DNA. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα εκτίθενται σε υποτονικό διάλυμα CaCl_2 κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης τους, προκαλώντας έτσι τη διόγκωσή τους, η οποία συμβάλλει στη διαπερατότητα της μεμβράνης. Η προαναφερθείσα διαδικασία οδηγεί στη δημιουργία **δεκτικών κυττάρων** (*competent cells*) και ακολούθως παρατίθεται αναλυτικά το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία.

Διαδικασία παρασκευής δεκτικών κυττάρων:

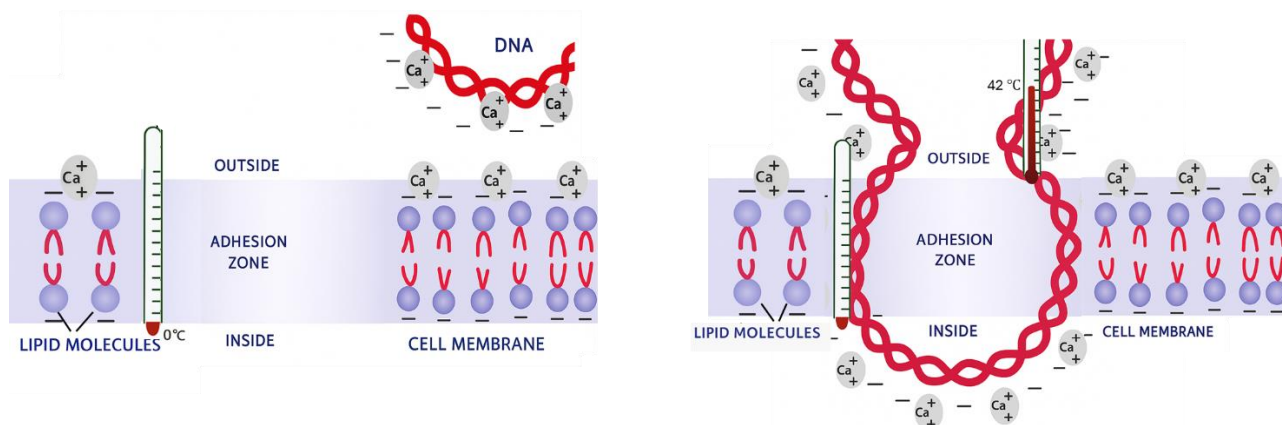
Η διαδικασία που περιγράφεται στα παρακάτω βήματα εκτελείται ασηπτικά, με τη χρήση φλόγιστρου, αποστειρωμένων υλικών και εργαλείων, για την αποτροπή πιθανής επιμόλυνσης,

1. Με τη χρήση πιπέτας λαμβάνεται ξύσμα παγωμένου κυτταρικού διαλύματος, το οποίο φυλάσσεται στους -80°C .
2. Ακολούθως, το ρύγχος της πιπέτας τοποθετείται μέσα σε σωλήνα φυγοκέντρησης *Falcon* που περιέχει 5 mL θρεπτικού υλικού *Lysogeny Borth liquid* (LB-liquid), απουσία αντιβιοτικών, και το σύστημα επωάζεται ολονύκτια (*overnight*, O/N) στους 37°C και με ανάδευση σε 200 rpm.
3. Με το πέρας ~ 18 h, μεταφέρονται 2 mL από την αρχική καλλιέργεια, που παρασκευάστηκε στο βήμα 2, σε νέο *Falcon* που περιέχει 20 mL θρεπτικού υλικού LB-liquid, απουσία αντιβιοτικών, και φυλάσσεται στον επωαστικό αναδευτήρα με ίδιες συνθήκες επώασης για ~ 2 h.
4. Διενεργείται έλεγχος της οπτικής απορρόφησης τη καλλιέργειας που αναπτύσσεται στο δεύτερο *Falcon*, στα 600 nm, με τη χρήση ddH_2O ως «τυφλό» διάλυμα για φωτόμετρο, ενώ το δείγμα της καλλιέργειας που φωτομετρείται έχει προηγουμένως αραιωθεί κατά δέκα φορές σε ddH_2O . Με την τιμή της οπτικής απορρόφησης να ανέρχεται σε ~ 0.6 , που υποδηλώνει ότι τα κύτταρα

βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης, εκκινείται η διαδικασία μετατροπής των κυττάρων σε δεκτικά.

5. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση των κυττάρων στη ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4 °C και σε 9000 rpm για 10 min.
6. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης, απορρίπτεται το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται με τη χρήση πιπέτας σε 20 mL 0.1 M CaCl_2 , ενώ η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε δοχείο με πάγο.
7. Ακολουθεί φυγοκέντρωση με τις συνθήκες που αναλύονται στο βήμα 5.
8. Μετά την ολοκλήρωση της δεύτερης φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται με τη χρήση πιπέτας σε 800 μL 0.1 M CaCl_2 . Η διαδικασία εκτελείται κοντά σε πάγο.
9. Προστίθενται 200 μL γλυκερόλης και ακολουθεί ανάδευση με συνεχείς επαναιωρήσεις.
10. Το τελικό περιεχόμενο διαμοιράζεται ισόποσα σε *Eppendorfs* (100 μL /*Eppendorf*) τα οποία φυλάσσονται στους -80 °C.

Με την περάτωση της παραπάνω διαδικασίας τα κύτταρα είναι έτοιμα να υποβληθούν στη διαδικασία του μετασχηματισμού. Όπως προαναφέρθηκε, η κατεργασία των κυττάρων με CaCl_2 φέρει διττό ρόλο, προκαλώντας ωσμωτικές συνθήκες που οδηγούν σε ήπια διόγκωση των κυττάρων και εξουδετερώνοντας τις ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ των υδρόφιλων και αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων κυτταρικής μεμβράνης και του DNA που έχει επίσης αρνητικό φορτίο. Κατ' αυτό τον τρόπο είναι επιτρεπτή η στενότερη επαφή του πλασμιδιακού DNA με τη πλασματική μεμβράνη και συνδυαστικά με το θερμικό σοκ, που επιτυγχάνεται με τη γρήγορη μεταφορά των κυττάρων από τους 0 °C στους 42 °C, καθίσταται δυνατή η μεταφορά πλασμιδίων στο εσωτερικό των κυττάρων. Συγκεκριμένα, το θερμικό σοκ έχει καθοριστικό ρόλο στη δημιουργία των προσωρινών πόρων της πλασματικής μεμβράνης καθώς αυξάνει τη ρευστότητα της, ενώ παράλληλα προκαλεί θερμοκρασιακή κλίση μεταξύ του κρύου ενδοκυττάριου και του θερμού εξωκυττάριου περιβάλλοντος, με την αυξημένη κίνηση κατά Brown των εξωκυττάριων μορίων να ωθούν το πλασμίδιο εντός του κυττάρου (Asif et al., 2017). Στο πέρας της παραπάνω διαδικασίας τα δεκτικά κύτταρα έχουν μετατραπεί σε μετασχηματισμένα, τα οποία στη συνέχεια απομονώνονται σε στερεό θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Εν συνεχεία, ακολουθεί περιγραφή του πρωτοκόλλου που αξιοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία.



Εικόνα 1.2.4. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων. Ο ρόλος των κατιόντων Ca^{2+} και του θερμικού σοκ στη διαδικασία του μετασχηματισμού (Τροποποιημένη από: https://fac.ksu.edu.sa/sites/default/files/transformation_with_plasmid_0.pdf; <https://pharmaxchange.info/category/animations/page/2/>).

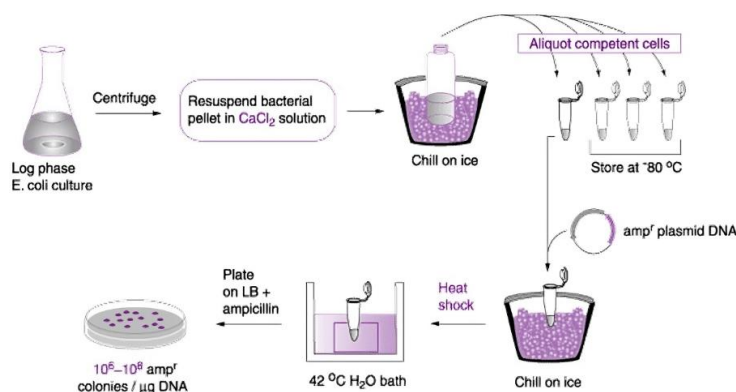
Διαδικασία μετασχηματισμού δεκτικών κυττάρων:

Η διαδικασία του μετασχηματισμού απαιτεί ομοίως ασηπτικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένου τη χρήση φλόγιστρου, αποστειρωμένων υλικών και εργαλείων, προς αποφυγή επιμολύνσεων.

1. Τα δεκτικά κύτταρα και το πλασμίδιο που αντιστοιχεί στην εκάστοτε πρωτεΐνη-στόχο απομακρύνονται από τους -80°C και ξεπαγώνουν ομαλά μέσα σε δοχείο με πάγο.
2. Όταν τα κύτταρα και το πλασμίδιο ξεπαγώσουν πλήρως, προστίθενται ασηπτικά 3 μL πλασμιδίου σε 100 μL δεκτικών κυττάρων και πραγματοποιούνται συνεχείς επαναιωρήσεις με τη χρήση πιπέτας. Να σημειωθεί ότι ο προστιθέμενος όγκος του πλασμιδίου εξαρτάται από την επιθυμητή τελική συγκέντρωση στο διάλυμα, η οποία συνήθως κυμαίνεται στο εύρος 5-10 $\text{ng}/\mu\text{L}$.
3. Με το πέρας της ανάδευσης, το *Eppendorf* που περιέχει τα δεκτικά κύτταρα και το πλασμίδιο τοποθετείται στον πάγο για 30 min.
4. Ακολουθεί θερμικό σοκ σε ξηρό θερμαντήρα (*dry bath incubator*), στους 42°C για 1 min και έπειτα στον πάγο για 5 min.
5. Μετά την ολοκλήρωση του θερμικού σοκ, προστίθενται ασηπτικά 1 mL *LB-liquid*, απουσία αντιβιοτικών, με επαναιώρηση.
6. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται επώαση των κυττάρων στους 37°C και σε 200 rpm για 50 min.
7. Με την περάτωση της επώασης, εκτελείται επίστρωση των μετασχηματισμένων βακτηρίων σε τρυβλία που περιέχουν στερεό θρεπτικό υλικό *LB-agar* εμπλουτισμένο με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Η επίστρωση πραγματοποιείται με την προσθήκη 80 μL μετασχηματισμένων κυττάρων στην άκρη του τρυβλίου και τα κύτταρα απλώνονται σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου με τη χρήση γυάλινης πιπέτας *Pasteur*. Η εναπομένουσα ποσότητα μετασχηματισμένων κυττάρων αποθηκεύεται στους -80°C για μελλοντική χρήση.

Σημείο προς επισήμανση: Πριν από τη χρήση της πιπέτας Pasteur, έχει προηγηθεί αποστείρωση της στη φλόγα, ενώ στη συνέχεια η πιπέτα «παγώνει» στο άκρο του τρυβλίου που περιλαμβάνει στερεό θρεπτικό υλικό απουσία κυττάρων για την αποτροπή της καταστροφής των τελευταίων λόγω υψηλής θερμοκρασίας.

8. Τέλος, οι στερεές καλλιέργειες υποβάλλονται σε ολονύκτια επώαση στους 37°C χωρίς ανάδευση, με τα τρυβλία να είναι τοποθετημένα ανάποδα ώστε να αποφευχθεί η αφυδάτωση της επιφάνειας του άγαρ. Με την πάροδο ~ 18 h και εφόσον έχουν σχηματιστεί ευδιάκριτες αποικίες, κάτι που υποδηλώνει την επιτυχία του μετασχηματισμού, τα τρυβλία σφραγίζονται με *Parafilm* και φυλάσσονται στους 4°C όπου τοποθετούνται επίσης ανάποδα προς αποφυγή της συμπύκνωσης νερού στην επιφάνεια του άγαρ, για ~ 21 ημέρες.



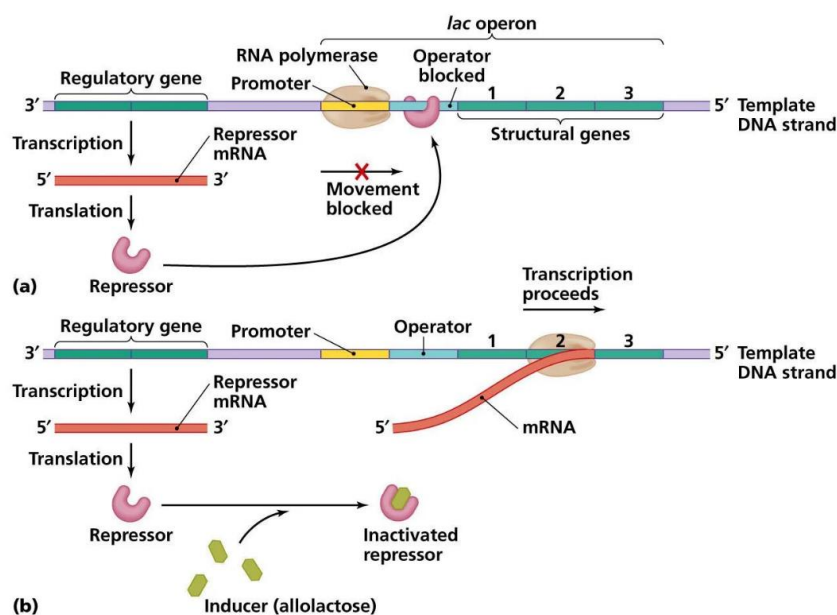
Εικόνα 1.2.5. Σύνοψη της βασικής πειραματικής πορείας της παρασκευής δεκτικών κυττάρων και του μετασχηματισμού τους (<https://microbiologyclass.net/steps-involved-in-transforming-bacterial-cells/>).

1.2.3 Παραγωγή της Πρωτεΐνης-Στόχου

Η παραγωγή της πρωτεΐνης-στόχου αποτελεί μια από τις πιο χρονοβόρες και απαιτητικές διαδικασίες στην πορεία ενός κρυσταλλογραφικού πειράματος. Βασικά στοιχεία από τα οποία απορρέει ένα επιτυχές πείραμα έκφρασης πρωτεϊνών είναι η λειτουργικότητα και καταλληλότητα του συστήματος έκφρασης, το οποίο πρέπει να συνάδει στα χαρακτηριστικά της υπο μελέτη πρωτεΐνης. Πέραν αυτού, βασικό σκέλος – εξίσου κρίσιμο για την αποδοτικότητα της διαδικασίας της παραγωγής – αποτελεί η ανάπτυξη των βακτηριακών καλλιεργειών που θα αποδώσουν ποσότητα της εκάστοτε πρωτεΐνης.

1.2.3.1 Το T7 Σύστημα Έκφρασης

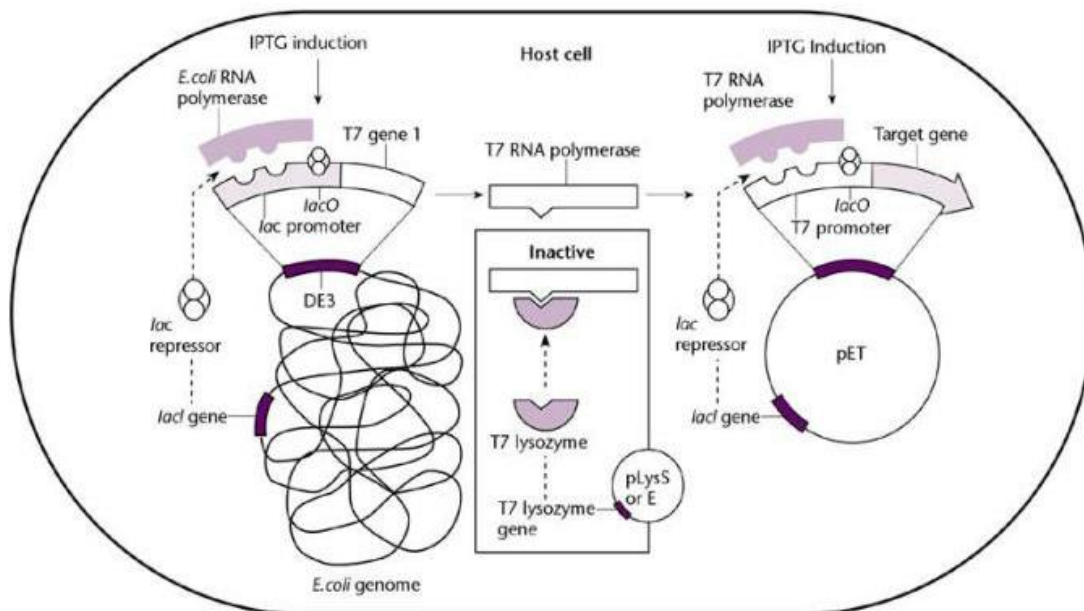
Το σύστημα έκφρασης T7 είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βακτήρια *E. coli*, καθώς χαρακτηρίζεται από απλή γενετική λειτουργία, υψηλά επίπεδα έκφρασης και αυστηρά ρυθμιζόμενη έκφραση των γονιδίων ενδιαφέροντος. Το σύστημα έκφρασης T7 συνιστάται από δύο μέρη, το πλασμίδιο έκφρασης που φέρει το γονίδιο ενδιαφέροντος υπό τον έλεγχο του υποκινητή T7 (βλέπε κεφάλαιο 1.2.1) και τον φορέα έκφρασης που φέρει το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης – εκφραζόμενο από τον υποκινητή αγρίου τύπου *lac* του οπερονίου της λακτόζης στο κύριο κυκλικό μόριο DNA (Ye et al., 2022).



Εικόνα 1.2.6. Το οπερόνιο της λακτόζης στα βακτηριακά κύτταρα *E. coli*. a) Απουσία λακτόζης, b) Παρουσία λακτόζης ή ανάλογων της λακτόζης (<https://microbenotes.com/lac-operon/>).

Η T7 RNA πολυμεράση κωδικοποιείται από το γενετικό υλικό του T7 βακτηριοφάγου, με τη μεταγραφική της δράση να χαρακτηρίζεται από ανθεκτικότητα και ακρίβεια, δεδομένου ότι δεν απαιτεί τη συνεργατική παρουσία μεταγραφικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, η T7 RNA πολυμεράση αναγνωρίζει και προσδένεται ειδικά στον T7 υποκινητή – ένα χαρακτηριστικό το οποίο συνδυαστικά με την ταχεία δράση της κατευθύνει αποτελεσματικά την επαγόμενη έκφραση της πρωτεΐνης στόχου (Sargar & Miller, 2018). Ωστόσο, στο T7 σύστημα παρατηρείται έκφραση της ανωτέρω πολυμεράσης σε

βασικά επίπεδα πριν το σημείο της επαγωγής, κάτι το οποίο δύναται να αποτελεί επιζήμιο χαρακτηριστικό καθώς κάποιες πρωτεΐνες εμφανίζουν τοξικότητα στο κύτταρο ξενιστή και τυχόν πρόωρη έκφραση τους ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα μπορεί να περιορίζει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Studier, 2018). Η συνέκφραση της T7 λυσοζύμης, η οποία συνιστά φυσικό αναστολέα της T7 RNA πολυμεράσης μέχρι το σημείο της επαγωγής, συμβάλλει στην έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης παρεμβάλλοντας στη βασική έκφραση της πολυμεράσης. Επιπλέον, το γονίδιο *lacI^q*, φέροντας μετάλλαξη στον υποκινητή του, επιτρέπει την έκφραση του καταστολέα *lacI* σε μεγαλύτερα επίπεδα παρεμποδίζοντας σε πιο αυστηρό πλαίσιο τη λειτουργία της RNA πολυμεράσης, καθώς ο καταστολέας δεσμεύει τον χειριστή *lacO* που εντοπίζεται ακόλουθα του T7 υποκινητή. Παράγωγα στελέχη T7 *express* έχουν σχεδιαστεί να φέρουν είτε ένα αντίγραφο γονιδίου T7 λυσοζύμης (*LysS*), είτε ένα αντίγραφο γονιδίου *lacI^q*, ή και των δύο (*LysS/lacI^q*) σε ένα πλασμίδιο *miniF*, που φέρει ως δείκτη επιλογής γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό, ώστε να αποτρέπεται πιθανή τοξική δράση της υπο μελέτη πρωτεΐνης στη λειτουργία του κυττάρου ξενιστή πριν την επαγωγή. Στο πειραματικό σκέλος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος T7 *express lq pLysS*, με το πλασμίδιο *miniF* στην προκειμένη περίπτωση να φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην χλωραμφενικόλη.



Εικόνα 1.2.7. Ο τρόπος λειτουργίας του T7 συστήματος έκφρασης στα κύτταρα *E. coli* T7 *express pLysS* (<https://www.slideserve.com/evelia/expression-vector-expression-of-cloned-genes-produces-large-quantities-of-protein>).

1.2.3.2 Βακτηριακές Καλλιέργειες για την Έκφραση της Πρωτεΐνης-Στόχου

Η παραγωγή της πρωτεΐνης στόχου σε μεγάλες ποσότητες απαιτεί την ανάπτυξη των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων *E. coli* σε υγρή καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας, μια πειραματική διαδικασία εξαρτώμενη σημαντικά από το ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων που διακρίνεται σε τρία βασικά στάδια: την παρασκευή αρχικής καλλιέργειας, τον εμβολιασμό σε μεγαλύτερης κλίμακας καλλιέργεια και την επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης καθώς και την αποθήκευση της καλλιέργειας.

Η διαδικασία παρασκευής της αρχικής καλλιέργειας ξεκινά με την επιλογή και τη μεταφορά μοναδιαίας αποικίας από τη στερεή καλλιέργεια των μετασχηματισμένων βακτηρίων με τον πλασμδιακό φορέα που κωδικοποιεί την υπο μελέτη πρωτεΐνη. Η επιλογή της αποικίας πραγματοποιείται με το ρύγχος πιπέτας και μεταφέρεται υπο ασηπτικές συνθήκες σε αποστειρωμένο *Falcon* που περιέχει θρεπτικό υλικό ποσότητας 5-10 mL με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Το *Falcon* που περιέχει πλέον τη μοναδιαία αποικία επωάζεται ολονύκτια στους 37 °C με ανάδευση σε 200 rpm, ώστε να επιτευχθεί η ανάπτυξη της αρχικής καλλιέργειας.

Με το πέρας του επιθυμητού χρονικού διαστήματος, συνήθως ~18 h, ελέγχεται η οπτική απορρόφηση της αρχικής καλλιέργειας στα 600 nm, με την τιμή που ανέρχεται περίπου 0.6 να υποδηλώνει ότι τα κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Στο στάδιο αυτό, το περιεχόμενο του *Falcon* μεταγγίζεται σε κωνική φιάλη με θρεπτικό υλικό για τη συνέχιση της καλλιέργειας σε μεγάλη κλίμακα. Η καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας επωάζεται στις ίδιες συνθήκες με την αρχική αλλά για συντομότερο χρονικό διάστημα καθώς τα κύτταρα βρίσκονται πλέον στην εκθετική φάση πολλαπλασιασμού, κατά την οποία αυξάνονται με ταχύτερο ρυθμό. Με την καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας πλέον να χαρακτηρίζεται από οπτική απορρόφηση με τιμή που ανέρχεται σε εύρος 0.4 – 0.6, είναι δυνατή η έναρξη της επαγωγής της πρωτεϊνικής έκφρασης.

Η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης-στόχου επιτυγχάνεται με τη χρήση του *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG), ενός χημικού ανάλογου της λακτόζης που δεν καταβολίζεται από το ένζυμο της β-γαλακτοζιδάσης. Το γεγονός ότι το IPTG δεν αποτελεί μέρος κάποιας μεταβολικής οδού του κυττάρου το καθιστά ιδανικό επαγωγέα για την έκφραση της υπο μελέτη πρωτεΐνης σε μεγάλες ποσότητες, δεδομένου ότι η συγκέντρωση του και η δράση του παραμένουν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας. Η επαγωγική δράση του IPTG βασίζεται στην δέσμευση του καταστολέα του οπερονίου της λακτόζης, με αποτέλεσμα να αλλάζει η διαμόρφωση του δεύτερου και να περιορίζεται η πρόσδεση του στην αλληλουχία του χειριστή, επιτρέποντας έτσι την έντονη έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης και την ελεύθερη δράση της στο γονίδιο-στόχο (Εικόνα 1.2.7). Με την προσθήκη του IPTG στην τελική καλλιέργεια, σε τελική συγκέντρωση 0.1-1.0 mM, ακολουθεί επώαση (συνήθως O/N) σε δεδομένες συνθήκες θερμοκρασίας που μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των πρωτοκόλλων έκφρασης της κάθε πρωτεΐνης. Μεταξύ αυτών των συνθηκών, το IPTG παρουσιάζει τη βέλτιστη λειτουργικότητα του σε θερμοκρασία 17-21 °C, ενώ η καλλιέργεια πρέπει να αναδεύεται (150-200 rpm) για την ομοιογενή πρόσβαση των κυττάρων στον επαγωγέα.

Η διαδικασία της επώασης διακόπτεται στο στάδιο που η οπτική απορρόφηση της καλλιέργειας κυμαίνεται μεταξύ 2.0 και 4.0, γεγονός που υποδηλώνει πως η καλλιέργεια βρίσκεται στο τέλος της στατικής φάσης ανάπτυξης της. Κατά τη διακοπή της επώασης, η καλλιέργεια διαμοιράζεται ισοποσα σε *Falcon* των 50 mL και ακολούθως διενεργείται φυγοκέντρηση σε 5000 rpm για 15 min σε RT προκειμένου να διαχωριστούν τα κύτταρα από το θρεπτικό υλικό και τα μεταβολικά προϊόντα. Κατόπιν της απομάκρυνσης του υπερκείμενου, τα κύτταρα αποθηκεύονται στους -20 °C έως ότου ακολουθήσει η διαδικασία της απομόνωσης της πρωτεΐνης.

1.2.4 Απομόνωση της Πρωτεΐνης-Στόχου

Επόμενο στάδιο στην πειραματική πορεία αποτελεί η απομόνωση της πρωτεΐνης στόχου από το εσωτερικό των βακτηριακών κυττάρων, μια διαδικασία που απαιτεί σε πρώτο επίπεδο τη λύση των βακτηριακών κυττάρων. Στη συνέχεια, το κυτταρικό εκχύλισμα υποβάλλεται σε ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (*Fast Protein Liquid Chromatography*, FPLC) για την απομόνωση της επιθυμητής πρωτεΐνης από το σύνολο των πρωτεϊνών που περιλαμβάνονται στο σύστημα, ενώ

ελέγχεται η καθαρότητα του δείγματος αξιοποιώντας την τεχνική της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Σε τελευταίο στάδιο, πραγματοποιείται αλλαγή του διαλύματος φύλαξης και συμπύκνωση της πρωτεΐνης για την κατάλληλη αποθήκευση του δείγματος. Σε περίπτωση που απαιτείται απομάκρυνση ετικέτας που έχει συντηχθεί με τη πρωτεΐνη για την ενίσχυση της διαλυτότητας της, πραγματοποιείται ενζυμική πέψη για την απομόνωση της αμιγούς πρωτεΐνης.

1.2.4.1 Λύση Βακτηριακών Κυττάρων

Η λύση των βακτηριακών κυττάρων αποτελεί μια πειραματική διαδικασία τριών σταδίων: i) τη θερμική, ii) τη χημική και iii) τη μηχανική καταπόνηση των κυττάρων. Κατ' αυτό τον τρόπο είναι εφικτή η ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών για την απελευθέρωση της πρωτεΐνης-στόχου.

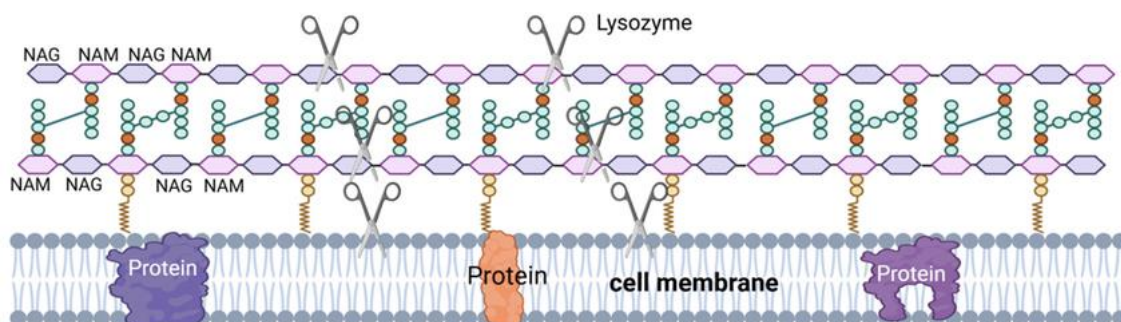
Η θερμική καταπόνηση των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιείται με την αποθήκευσή τους στους -20 °C, κατά την οποία ο σχηματισμός κρυστάλλων πάγου καταπονεί την κυτταρική μεμβράνη και με την απόψυξη των κυττάρων παρατηρείται μερική λύση. Παρότι το θερμικό σοκ είναι ανεπαρκές για την πλήρη λύση των κυττάρων, αποτελεί ένα χρήσιμο συμπληρωματικό βήμα για την πλήρη λύση των βακτηριακών κυττάρων, η οποία είναι απαραίτητη για τη λήψη της μέγιστης ποσότητας της επιθυμητής πρωτεΐνης.

Κατόπιν της απόψυξης των κυττάρων σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4°C, εκτελείται η χημική καταπόνηση με την επαναιώρηση των κυττάρων σε διάλυμα λύσης (*Lysis Buffer*), του οποίου η ποσότητα καθορίζεται από τον αριθμό των κυττάρων. Συγκεκριμένα, ο απαιτούμενος όγκος του διαλύματος λύσης υπολογίζεται βάσει της οπτικής απορρόφησης των κυττάρων με τον εξής τύπο:

$$V_{\text{lysis buffer}} = \frac{OD_{600} \times V_{\text{culture}}}{100}$$

Σχετικά με τη χημική σύσταση του διαλύματος, διαφοροποιείται ανάλογα με την υπο μελέτη πρωτεΐνη. Ένα τυπικό διάλυμα λύσης περιέχει ένα ρυθμιστικό παράγοντα (συνήθως Tris-HCl pH 7.5-8.0) για τη σταθερότητα της πρωτεΐνης, άλας για την ενίσχυση της διαλυτότητας της, απορρυπαντικό για τη διατάραξη των κυτταρικών μεμβρανών, ενώ ωφέλιμη είναι και η παρουσία της γλυκερόλης που αυξάνοντας το ιξώδες του διαλύματος προστατεύει την πρωτεΐνη από μηχανικές καταπονήσεις.

Κατόπιν της επαναιώρησης των κυττάρων στο διάλυμα λύσης, ενώ το εναιώρημα των κυττάρων βρίσκεται στον πάγο, προστίθενται λυσοζύμη και DNAάση σε τελικές συγκεντρώσεις 0.2-1.0 mg/mL και 1-10 µg/mL αντίστοιχα, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις χρησιμοποιείται και ο αναστολέας πρωτεασών PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*) σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Συγκεκριμένα, η λυσοζύμη χρησιμοποιείται για τη ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος, καθώς αποικοδομεί το σκελετό του μορίου της πεπτιδογλυκάνης διασπώντας τους β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ των μορίων N-ακετυλογλυκοζαμίνης (NAG) και N-ακετυλομουραμικού οξέος (NAM), ενώ παράλληλα έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει πόρους στην αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη αξιοποιώντας την κατιονική της φύση. Η DNAάση κατακρημνίζει το βακτηριακό DNA αποτρέποντας έτσι το σχηματισμό συμπλόκων με τις πρωτεΐνες του εκχυλίσματος, κάτι το οποίο θα οδηγούσε στην απώλεια ποσότητας της πρωτεΐνης-στόχου. Για την πραγματοποίηση των ανωτέρω ενζυμικών αντιδράσεων, το τελικό εναιώρημα επωάζεται στους 4 °C για 20 min.



Εικόνα 1.2.8. Η δράση της λυσοζύμης στο κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων κατά τη διαδικασία της λύσης (Miao et al., 2024).

Με το πέρας της επώασης, πραγματοποιείται μηχανική καταπόνηση των κυττάρων με τη χρήση υπερήχων (*Sonicator*, “*Soniprep*”). Η διαδικασία διαρκεί περίπου 3 min, με εναλλαγές 10 sec ηχοβολισμού και 10 sec παύσης, ενώ το Falcon με το εναιώρημα των κυττάρων είναι τοποθετημένο σε πάγο καθ’ όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, ώστε να αποφευχθεί η υπερθέρμανση λόγω των υπερήχων και κατ’ επέκταση η μετουσίωση της επιθυμητής πρωτεΐνης.

Τέλος, διενεργείται φυγοκέντρηση στους 4 °C και σε 14.500 rpm για 25 min για το διαχωρισμό του κυτταρικού εκχυλίσματος από υπολείμματα μεμβρανών, το DNA καθώς και άλλα συστατικά. Μετά τη συλλογή του υπερκείμενου που περιέχει τις πρωτεΐνες των βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου της πρωτεΐνης-στόχου, ακολουθεί αποθήκευση στους 4 °C για μικρό χρονικό διάστημα, έως ότου το πρωτεϊνικό εκχύλισμα υποβληθεί σε διαδικασία καθαρισμού.

1.2.4.2 Ταχεία Υγρή Χρωματογραφία Πρωτεϊνών (*Fast Protein Liquid Chromatography*, FPLC)

Η χρήση χρωματογραφικών τεχνικών είναι αναγκαίο βήμα σε ένα κρυσταλλογραφικό πείραμα, καθώς η υψηλή καθαρότητα του πρωτεϊνικού δείγματος είναι ζωτικής σημασίας για την επιτυχή διεξαγωγή δοκιμών κρυστάλλωσης. Συγκεκριμένα, η απομόνωση της πρωτεΐνης-στόχου σε υψηλή καθαρότητα επιτυγχάνεται με τη διεξαγωγή ταχείας υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών, ένα είδος χρωματογραφίας μέσης πίεσης το οποίο εξ αρχής σχεδιάστηκε για τον καθαρισμό πρωτεϊνών με υψηλή ανάλυση και αναπαραγωγιμότητα (Pontis, 2017).

Γενικότερα, η μέθοδος της χρωματογραφίας βασίζεται στη διέλευση του δείγματος είτε σε υγρή είτε σε αέρια μορφή (κινητή φάση) σε ένα υλικό προσρόφησης (στατική φάση), με τα μόρια του δείγματος που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια με τη στατική φάση να προσροφώνται σε αυτή, ενώ τα μόρια με χαμηλή ή μηδενική συγγένεια εκλούνται με τη διέλευση της κινητής φάσης. Στην περίπτωση της FPLC, η κινητή φάση αποτελείται από ένα υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα, του οποίου ο ρυθμός διέλευσης από τη στατική φάση ρυθμίζεται από μια βαλβίδα (Pontis, 2017), ενώ η συνολική διέλευση του δείγματος από τη διάταξη της χρωματογραφίας ελέγχεται από ένα σύστημα βαλβίδων, αντλιών, ανιχνευτών και ενός λογισμικού.

Η επιλογή των κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων και της στατικής φάσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα χαρακτηριστικά της υπο μελέτη πρωτεΐνης (μοριακό βάρος, υδροφοβικότητα, ισοηλεκτρικό σημείο). Η στατική φάση περιλαμβάνει μια ρητίνη που σχηματίζει πορώδη σφαιρίδια, των οποίων το μέγεθος και η επιφάνεια μπορεί να διαφέρουν με βάσει το είδος της χρωματογραφικής τεχνικής που πρόκειται να αξιοποιηθεί. Η δυνατότητα χρήσης διαφορετικών στατικών φάσεων σε

συνδυασμό με την εφαρμογή ευρείας υδατικών διαλυμάτων ως κινητή φάση επιτρέπουν την εκτέλεση των κύριων χρωματογραφικών τεχνικών, στις οποίες συγκαταλέγονται η χρωματογραφία μοριακής διήθησης (*Size exclusion/Gel filtration Chromatography*), η χρωματογραφία συγγενείας (*Affinity Chromatography*) καθώς επίσης οι χρωματογραφικές τεχνικές χρωματοεστίασης (*chromatofocusing*), ιοντοανταλλαγής (*ion exchange*), υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων (*hydrophobic interaction*) και αντίστροφης φάσης (*reversed phase*) (Madadlou et al., 2011; Pontis, 2017).

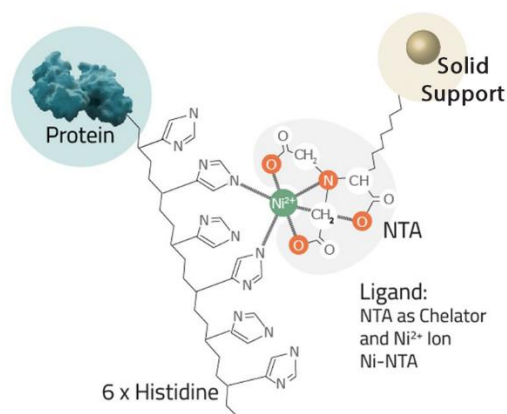


Εικόνα 1.2.9. Αριστερά: Το σύστημα χρωματογραφίας ÄKTA Start. Δεξιά: Διαγραμματική απεικόνιση του υπολογιστικού συστήματος Unicorn (<https://www.cytivalifesciences.com/en/us>).

Στον παρόν στάδιο του πειραματικού σκέλους της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο τεχνικές χρωματογραφίας, για τη επίτευξη της καλύτερης δυνατής καθαρότητας του πρωτεϊνικού δείγματος: η χρωματογραφία συγγενείας με ακινητοποιημένο μέταλλο (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC) και η χρωματογραφία μοριακής διήθησης (*Size Exclusion Chromatography*, SEC).

1.2.4.2.1 Χρωματογραφία Συγγενείας με Ακίνητοποιημένο Μέταλλο (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC)

Η χρωματογραφία IMAC αποτελεί μια κοινή τεχνική καθαρισμού ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών βασιζόμενη στη συγγένεια πολυϊστιδινικών αλληλουχιών με δισθενή μεταλλικά ιόντα (Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , και Zn^{2+}) που ακινητοποιούνται ως σύμπλοκα χηλικών μετάλλων μετάπτωσης στη μήτρα της στατικής φάσης (Kielkopf et al., 2020). Σε ένα γενικότερο πλαίσιο, οι πρωτεΐνες μπορούν να συνδεθούν ειδικά με τις θέσεις ένταξης μεταλλικών ιόντων μέσω συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων, όπως η κυστεΐνη, η ιστιδίνη και η τρυπτοφάνη που εντοπίζονται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης. Ωστόσο, η διαθεσιμότητα σε κατάλοιπα ιστιδίνης καθορίζει την πραγματική σύνδεση της πρωτεΐνης στη στατική φάση της IMAC (Cheung et al., 2012), καθιστώντας τις ετικέτες πολυϊστιδίνης εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο για της απομόνωση της πρωτεΐνης-στόχου. Η έκλυση της ειδικά συνδεδεμένης πρωτεΐνης στη στήλη χρωματογραφίας μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος χαμηλού pH, ενός ανταγωνιστικού παράγοντα εκτόπισης ή ενός χηλικού παράγοντα. Ειδικότερα, το ρυθμιστικό διάλυμα με χαμηλό pH αποτρέπει τη σύνδεση της ιστιδίνης στο μεταλλικό ιόν μέσω της πρωτονίωσης του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πλευρικής ομάδας του καταλοίπου, η χρήση διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης ιμιδαζόλης έχει ανταγωνιστικό ρόλο εκτοπίζοντας τα κατάλοιπα της ιστιδίνης, ενώ ο χηλικός παράγοντας διευκολύνει την έκλυση του στόχου εξαγοντας τα μεταλλικά ιόντα από τη μήτρα της στήλης (Cheung et al., 2012).



Εικόνα 1.2.10. Απεικόνιση της σύνδεσης πρωτεϊνών με εξαϊστιδινική ουρά στη μήτρα νικελίου Ni^{2+} -NTA (<https://blog.interchim.com/troubleshooting-his-protein-ni-nta-columns/>).

Στην παρούσα εργασία αξιοποιήθηκε το μηχάνημα *ÄKTA Start* της εταιρείας *Cytiva* και στήλη χρωματογραφίας φορτισμένη με ιόντα Ni^{2+} (*HisTrap™ HP*), τα οποία είναι ακινητοποιημένα στη μήτρα μέσω νιτριλοτριοξικού οξέος (NTA) (Εικόνα 1.2.10). Για την έκλουση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα με αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζόλης και ορίζονται ως εξής:

- Διάλυμα Πρόσδεσης (*Binding Buffer*): ρυθμίζει το περιβάλλον (pH, ιοντικής ισχύς, χημικοί παράγοντες) του συστήματος για την πρόσδεση της πρωτεΐνης-στόχου στη στήλη Ni^{2+} -NTA.
- Διάλυμα Έκπλυσης (*Washing Buffer*): περιέχει τα συστατικά του διαλύματος πρόσδεσης με ενδιάμεση συγκέντρωση ιμιδαζόλης (20-50 mM) για την έκλουση των πρωτεϊνών που συνδέονται μη ειδικά στη στήλη.
- Διάλυμα Έκλουσης (*Elution Buffer*): περιέχει τα συστατικά του διαλύματος πρόσδεσης με υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζόλης (250-500 mM) για την έκλουση της πρωτεΐνης-στόχου.

Να σημειωθεί ότι όλα τα διαλύματα υφίστανται φιλτράρισμα και απαέρωση πριν την εισαγωγή τους στο σύστημα της χρωματογραφίας, ώστε να μην επηρεαστεί η αποδοτικότητα της διαδικασίας από τυχόν μικροσωματίδια και φυσαλίδες.

Διαδικασία IMAC:

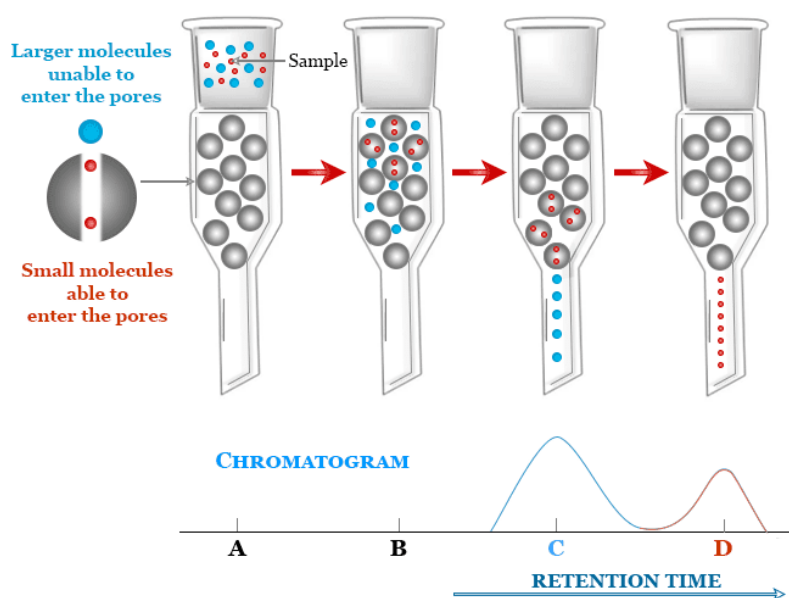
1. Το σύστημα υποβάλλεται σε καθαρισμό με ddH_2O και απομακρύνονται τυχόν φυσαλίδες.
2. Η χρωματογραφική στήλη προσαρμόζεται στο σύστημα και ακολουθεί συνέχεια του καθαρισμού με ddH_2O .
3. Το σύνολο του συστήματος πληρώνεται με **διάλυμα πρόσδεσης** για την δημιουργία κατάλληλου περιβάλλοντος που θα επιτρέψει την πρόσδεση των πρωτεϊνών που εμφανίζουν συγγένεια ως προς τη στήλη.
4. Το δείγμα εισάγεται από την κατάλληλη βαλβίδα και προωθείται στη στήλη, με τις πρωτεΐνες που δεν εμφανίζουν συγγένεια με τη στήλη να καταλήγουν στα απόβλητα.
5. Ακολουθεί η εισαγωγή του **διαλύματος έκπλυσης** για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που παρουσιάζουν χαμηλή συγγένεια με τη μήτρα της χρωματογραφικής στήλης.
6. Η πρωτεΐνη-στόχος συλλέγεται κατόπιν χρήσης του **διαλύματος έκλουσης** και φυλάσσεται στους 4 °C.
7. Το σύνολο του συστήματος καθαρίζεται με ddH_2O .
8. Το σύστημα και η στήλη της χρωματογραφίας καθαρίζονται με 20% (v/v) αιθανόλη και η στήλη αποθηκεύεται στους 4 °C μέχρι την επόμενη χρήση.

Ι.2.4.2.2 Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης (Size Exclusion Chromatography, SEC)

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης αποτελεί θεμελιώδες εργαλείο στην βιοχημεία πρωτεϊνών με ευρεία εφαρμογών, από το διαχωρισμό των μακρομορίων με βάσει το μέγεθος τους έως την εκτίμηση του μοριακού βάρους του εξεταζόμενου μορίου ή συμπλόκου αλλά και την αλλαγή του διαλύματος του δείγματος. Μεταξύ αυτών, ο διαχωρισμός της πρωτεΐνης-στόχου από άλλα μόρια βάσει του αποτελεί την πρώτη και πιο κοινή εφαρμογή της SEC (Burgess, 2018).

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με αυτή την τεχνική ουσιαστικά επιτυγχάνεται μέσω των πορωδών σφαιριδίων που συνιστούν τη στατική φάση. Δεδομένου ότι οι πόροι φέρουν μικρότερο διάμετρο από τα κανάλια που σχηματίζονται μεταξύ των πόρων της ρητίνης, τα μεγάλα μόρια δεν μπορούν να εισέλθουν σε αυτούς και επομένως εκκλύονται πιο γρήγορα. Αντιθέτως, τα μικρά μόρια εισέρχονται στους πόρους με αποτέλεσμα να παραμένουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στη στήλη και συνεπώς να εκκλύονται μεταγενέστερα των μεγάλων πρωτεϊνικών μορίων (Held & Kitz, 2021).

Σε τελικό αποτέλεσμα, η SEC επιτρέπει την απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με υψηλότερη καθαρότητα, ενώ παράλληλα προσφέρει τη δυνατότητα απομάκρυνσης των συσσωματωμάτων, προσδίδοντας έτσι καθαρισμό και σε επίπεδο ομοιογένειας μεγέθους (Oliveira & Domingues, 2018). Αμφότερα τα ανωτέρω χαρακτηριστικά αποτελούν απαραίτητο κριτήριο για την καταλληλότητα του δείγματος ως προς τη διεξαγωγή επιτυχών δοκιμών κρυστάλλωσης.



Εικόνα Ι.2.11. Σχηματική απεικόνιση της χρωματογραφίας SEC (<https://www.priyamstudycentre.com/2022/02/size-exclusion-chromatography.html>).

Στην παρούσα εργασία, για τον παρόν πειραματικό στάδιο, αξιοποιήθηκε το μηχάνημα *ÄKTA Start*, με τη χρήση της στήλης *HiPrep 16/60 Sephacryl™ S-200 HR*, η οποία επιτρέπει το διαχωρισμό πρωτεϊνικών μορίων σε εύρος μοριακών βαρών 5-250 kDa. Για την εκτέλεση της SEC και την έκλυση της πρωτεΐνης στόχου χρησιμοποιήθηκε **διάλυμα εξισορρόπησης** (*equilibration buffer*) το οποίο ρυθμίζει το χημικό περιβάλλον (pH, ιοντικής ισχύς, χημικοί παράγοντες) του συστήματος βάσει τις ανάγκες της εκάστοτε πρωτεΐνης.

Διαδικασία SEC:

Για την αποδοτικότητα της διαδικασίας, όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται υφίστανται φιλτράρισμα και απαέρωση, όπως και στη διαδικασία της IMAC.

1. Το σύστημα υποβάλλεται σε καθαρισμό με ddH₂O και απομακρύνονται τυχόν φυσαλίδες.
2. Η χρωματογραφική στήλη προσαρμόζεται στο σύστημα και ακολουθεί συνέχεια του καθαρισμού με ddH₂O για έναν όγκο στήλης (1 CV=120 mL).
3. Με το πέρας του καθαρισμού αντλείται **διάλυμα εξισορρόπησης** για έναν όγκο στήλης.
4. Το πρωτεϊνικό δείγμα εγχέεται στο σύστημα με τη χρήση σύριγγας.
5. Κατόπιν της εισαγωγής του δείγματος αντλείται **διάλυμα εξισορρόπησης** για έναν όγκο στήλης. Κατά τη διάρκεια αυτού το χρονικού διαστήματος αναμένεται η συλλογή των κλασμάτων που προκύπτουν από το διαχωρισμό των μορίων. Κάθε κλάσμα αντιστοιχεί σε διαφορετική κορυφή στο διάγραμμα οπτικής απορρόφησης, ανάλογα με το μοριακό βάρος. Η ύπαρξη μιας μοναδικής κορυφής υποδηλώνει την υψηλή καθαρότητα του δείγματος.
6. Το σύνολο του συστήματος καθαρίζεται με ddH₂O και 20% (v/v) αιθανόλη και η στήλη αποθηκεύεται σε ψυχρό θάλαμο για την καλύτερη διατήρηση της.

1.2.5 Ηλεκτροφόρηση Πηκτώματος Πολυακρυλαμιδίου με Θεικό Δωδεκυλονάτριο (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια μέθοδο διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων (συνήθως πρωτεϊνών ή νουκλεϊκών οξέων) εντός ενός ηλεκτρικού πεδίου. Διαφορετικά συστήματα ηλεκτροφόρησης αξιοποιούνται με βάση το δείγμα και το αντικείμενο μελέτης. Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για το διαχωρισμό των μορίων ενός μείγματος με βάση το μέγεθος και το φορτίο τους και ειδικότερα η τεχνική SDS-PAGE χρησιμοποιείται ευρέως για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάσει του μεγέθους τους. Η χρήση δωδεκυλικού θεικού νατρίου (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) επιτρέπει την αποδιάταξη δευτεροταγών και τριτοταγών πρωτεϊνικών δομών που δεν συμπεριλαμβάνουν δισουλφιδικούς δεσμούς, ενώ παράλληλα προσδίδει στα μόρια συνολικό αρνητικό φορτίο ανάλογο του μήκους τους. Κατ' αυτό τον τρόπο ο διαχωρισμός των μορίων πραγματοποιείται συναρτήσει του μοριακού βάρους, με τα πρωτεϊνικά μόρια μικρού μοριακού βάρους να μεταναστεύουν με πιο γρήγορο ρυθμό μέσα στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης, σε αντίθεση με τα σωματίδια μεγαλύτερου μοριακού βάρους που εμφανίζουν μικρότερο ρυθμό μετανάστευσης (Brunelle & Green, 2014; Manns, 2011).

Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, που χρησιμοποιείται ως μέσο της ηλεκτροφόρησης στην παρούσα εργασία, αποτελείται από μονομερή ακρυλαμιδίου και γέφυρες διασταύρωσης (bis-acrylamide) που σχηματίζουν το τρισδιάστατο πλέγμα. Συγκεκριμένα, το ακρυλαμίδιο πολυμερίζεται μέσω της τετραμεθυλ-αιθυλο-διαμίνης (*tetramethyl ethylenediamine*, TEMED), της οποίας η δράση βασίζεται στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών από υπερθειικό αμμώνιο (*Ammonium Persulfate*, AP) (Haynes et al., 2006). Το μέγεθος των πόρων του πλέγματος, από τους οποίους διέρχονται τα πρωτεϊνικά μόρια διαφορετικού μεγέθους, καθορίζεται από τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου, με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις να συνεπάγονται το σχηματισμό πηκτώματος με πόρους μικρού μεγέθους (Manns, 2011). Ειδικότερα, στην SDS-PAGE χρησιμοποιείται ασυνεχές πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, αποτελούμενο από το πήκτωμα πακεταρίσματος (*stacking gel*) και το πήκτωμα διαχωρισμού (*separation gel*), τα οποία διαφέρουν ως προς τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου, καθώς επίσης τη συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος και το pH. Το πήκτωμα πακεταρίσματος, φέροντας χαμηλή

συγκέντρωση ακρυλαμιδίου και κατ' επέκταση πόρους μεγάλου μεγέθους, επιτρέπει την ελεύθερη διέλευση των πρωτεϊνικών μορίων ώστε τα δείγματα να στοιβάζονται σε λεπτές ζώνες και ο διαχωρισμός των μορίων να εκκινείται συγχρονισμένα. Στο πάκτωμα των ζωνών του δείγματος συμβάλλει σημαντικά το χαμηλό pH (~6.8) που χαρακτηρίζει το πήκτωμα πακεταρίσματος. Συγκεκριμένα, στο pH του πηκτώματος πακεταρίσματος, τα ιόντα γλυκίνης που περιλαμβάνονται στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (*Running Buffer*) παρουσιάζουν μικρότερη κινητικότητα από της πρωτεΐνες, ενώ τα ανιόντα χλωρίου του πηκτώματος παρουσιάζουν μεγαλύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να πακτώνονται σε ζώνες μεταξύ των ιόντων γλυκίνης και χλωρίου. Αντιθέτως, το πήκτωμα διαχωρισμού χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου που επιτρέπει το σχηματισμό μικρών πόρων, και υψηλότερο pH (~ 8.8) στο οποίο τα ανιόντα γλυκίνης πλέον εμφανίζουν μεγαλύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα από τις πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα τα πρωτεϊνικά μόρια να διαχωρίζονται βάσει του μεγέθους τους (Gallagher, 2012a, 2012b).

Πίνακας Ι.2.1. Συστατικά των πηκτωμάτων ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

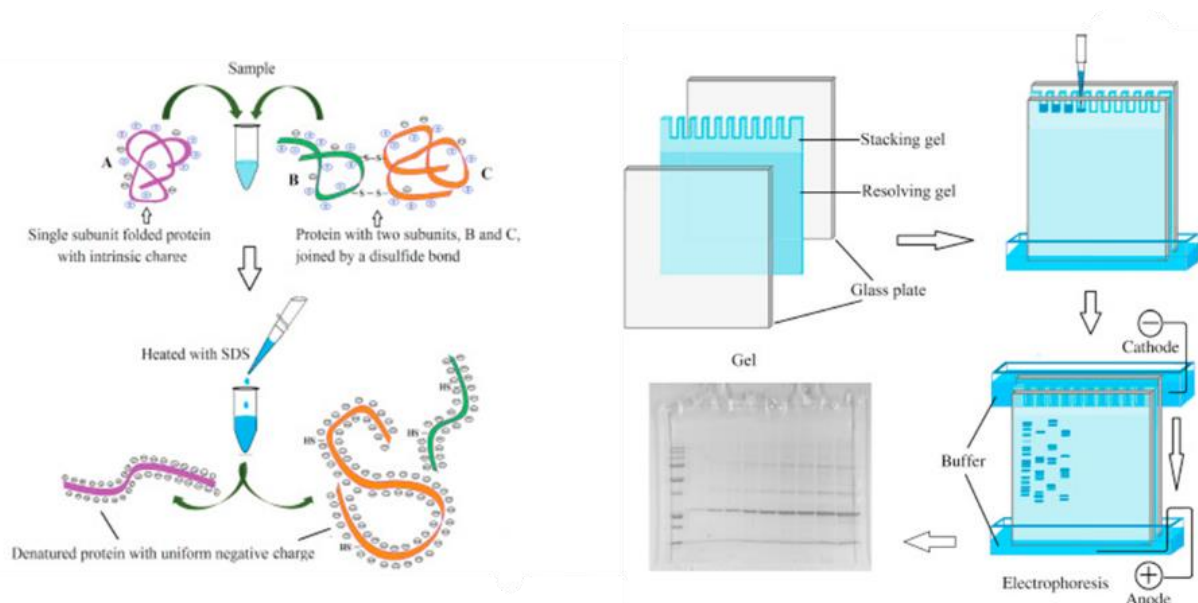
Συστατικά	Separation gel (10.5 %)	Stacking gel (6%)
ddH ₂ O	2 mL	1.4 mL
30% (w/v) acrylamide/bis	1.75 mL	0.5 mL
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1.25 mL	-
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	0.6 mL
10% (w/v) SDS	50 µL	25 µL
20% (w/v) AP	30 µL	20 µL
TEMED	5 µL	7.5 µL

Το SDS, όπως προαναφέρθηκε, χρησιμοποιείται ως παράγοντας αποδιάταξης, ενώ για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών που αναπτύσσονται τόσο σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα, όσο και μεταξύ διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων του ίδιου πρωτεϊνικού μορίου, χρησιμοποιείται β-μερκαπταιθανόλη. Ωστόσο, η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνικών μορίων επιτυγχάνεται με τη θέρμανση των δειγμάτων στους 100 °C για 3 min, επιτρέποντας κατ' αυτό τον τρόπο τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των πρωτεϊνικών μορίων με βάση το μοριακό τους βάρος.

Στην παρούσα εργασία, η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκε σε συσκευή κάθετης διάταξης, όπως φαίνεται στην Εικόνα Ι.2.12, ενώ για την εκτέλεση της χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (*Sample Buffer*):** περιλαμβάνει Tris-HCl (pH 6.8), SDS, γλυκερόλη και μπλε της βρωμοφαινόλης για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και την ορθή φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφορητικής κίνησης (*Running Buffer*) 1x:** περιέχει Tris-HCl (pH 8.8), SDS και γλυκίνη, επιτρέποντας τη μετάδοση του ηλεκτρικού πεδίου, ενώ παράλληλα ρυθμίζει το πάκτωμα και το διαχωρισμό των πρωτεϊνών.
- **Διάλυμα χρωστικής:** περιλαμβάνει μεθανόλη, οξικό οξύ και τη χρωστική *Coomassie Brilliant Blue*, για την χρώση των πρωτεϊνών

- **Διάλυμα απόχρωσης:** εμπεριέχει μεθανόλη και οξικό οξύ για την απομάκρυνση της περίσσειας της χρωστικής



Εικόνα 1.2.12. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας και της διάταξης της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης (Τροποποιημένη από: <https://www.creative-proteomics.com/resource/how-does-sds-page-work.htm>).

Διαδικασία SDS-PAGE:

Η διαδικασία παρασκευής των πηκτωμάτων αλλά και της προετοιμασίας των δειγμάτων (πριν το στάδιο της θέρμανσης) διενεργείται στον απαγωγό αερίων.

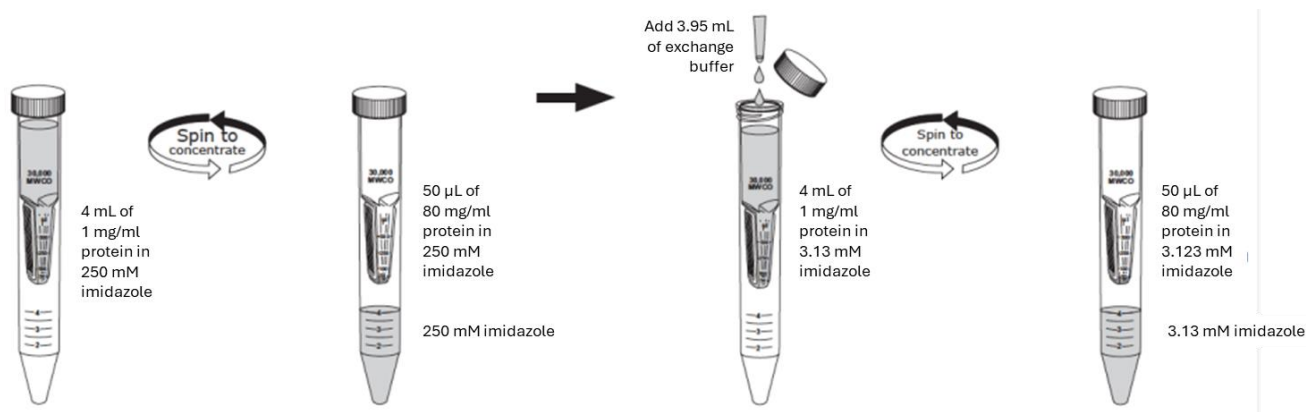
1. Συναρμολογείται η συσκευή της ηλεκτροφόρησης και πραγματοποιείται έλεγχος για διαρροές με τη χρήση ddH₂O.
2. Ακολούθως, παρασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού με βάση τα συστατικά που αναγράφονται στον Πίνακα 1.2.1. Το TEMED, εμφανίζοντας ισχυρή πηκτική δράση, προστίθεται τελευταίο και το διάλυμα του πηκτώματος διαχωρισμού μεταφέρεται άμεσα στην εσοχή μεταξύ των γυάλινων επιφανειών της συσκευής της ηλεκτροφόρησης.
3. Προστίθεται αιθανόλη πάνω από την επιφάνεια του διαλύματος, η οποία συμβάλλει στην ομοιόμορφη πήξη και αφήνεται να πήξει για ~10 min.
4. Στη συνέχεια παρασκευάζεται το πήκτωμα πακεταρίσματος, βάσει του Πίνακα 1.2.1.
5. Το διάλυμα του πηκτώματος πακεταρίσματος μεταφέρεται πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού, αφού έχει προηγηθεί η απομάκρυνση της αιθανόλης και τοποθετείται άμεσα το «χτενάκι» που θα σχηματίσει τις θέσεις εναπόθεσης των δειγμάτων. Η διαδικασία πήξης διαρκεί ομοίως ~10 min.
6. Έπειτα, προετοιμάζονται τα πρωτεϊνικά δείγματα για τη φόρτωση τους στο πήκτωμα πακεταρίσματος. Αφού τα δείγματα ξεπαγώσουν, αναμειγνύονται με το ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (*Sample Buffer*) σε αναλογία 3:1 (*Sample buffer* : δείγμα). Να σημειωθεί πως το 5% (v/v) του συνολικού όγκου που αντιστοιχεί στα 3 μέρη της αναλογίας αναλογεί σε β-μερκαπταιθανόλη.
7. Τα δείγματα υποβάλλονται σε θέρμανση στους 100 °C για 3 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 14.000 rpm για ~30 sec.
8. Κατόπιν της πήξης και του δεύτερου πηκτώματος, η συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετείται στο δοχείο της, το οποίο πληρώνεται *Running Buffer*.

9. Το χτενάκι απομακρύνεται προσεκτικά από το πήκτωμα και φορτώνονται 10 μL κάθε δείγματος στις θέσεις που έχουν σχηματιστεί, ενώ σε παρακείμενη θέση φορτώνονται 3 μL από το μάρτυρα που περιέχει πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους για τη βαθμονόμηση του πηκτώματος συναρτήσει των μοριακών βαρών.
10. Στη συνέχεια, η συσκευή συνδέεται στο τροφοδοτικό, με την τάση και την ένταση του ρεύματος να ρυθμίζονται στα 120 V και 40 mA αντίστοιχα. Η ροή του ρεύματος διαρκεί ~ 2 h, έως ότου το μέτωπο της χρωστικής (μπλε της βρωμοφαινόλης) που περιέχεται στο *Sample Buffer* να φτάσει 0.5 cm πριν το τέλος του πηκτώματος διαχωρισμού.
11. Με το πέρας της διαδικασίας που αναφέρεται στο Βήμα 10, το συνολικό πήκτωμα απομακρύνεται από τις γυάλινες επιφάνειες και αφού αφαιρεθεί το μέρος του πηκτώματος πακεταρίσματος ακολουθεί επώαση του πηκτώματος διαχωρισμού με *Coomassie Brilliant Blue* υπό ήπια ανάδευση για ~ 30 min.
12. Μετά την ολοκλήρωση της χρώσης, η χρωστική απομακρύνεται και εκκινείται η διαδικασία της απόχρωσης με την προσθήκη του διαλύματος απόχρωσης. Πραγματοποιείται επώαση υπό ήπια ανάδευση για ~ 30 min, ενώ η διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί με ανανέωση του διαλύματος απόχρωσης μέχρι το πήκτωμα να αποχρωματιστεί πλήρως και οι πρωτεϊνικές ζώνες γίνουν ορατές.

I.2.6 Συμπύκνωση της Πρωτεΐνης και Αλλαγή Διαλύματος Φύλαξης

Η επιτυχής κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης απαιτεί πέρα από το υψηλό ποσοστό καθαρότητας και την υψηλή συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Ως εκ τούτου καθίσταται αναγκαία η συμπύκνωση του πρωτεϊνικού δείγματος που λαμβάνεται μέσω των χρωματογραφικών τεχνικών. Η διαδικασία της συμπύκνωσης πραγματοποιείται με τη χρήση φίλτρων που φέρουν πόρους συγκεκριμένου μεγέθους (*Amicon Ultra-4 centrifugal filter unit*), ανάλογα με το μοριακό βάρος της υπό συμπύκνωση πρωτεΐνης. Ειδικότερα, η διαδικασία της συμπύκνωσης περιλαμβάνει διαδοχικές φυγοκεντρήσεις των 15 min, σε 5.500 rpm στους 4 °C. Κατά τη διάρκεια των επαναλαμβανόμενων φυγοκεντρήσεων ο διαλύτης διαπερνά τους πόρους του φίλτρου, ενώ τα μόρια της πρωτεΐνης συγκρατούνται, με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να συμπυκνώνεται.

Η διαδικασία αυτή αξιοποιείται επίσης για την ανταλλαγή διαλυμάτων, σε περίπτωση που είναι αναγκαίο για τη μετάβαση στο επόμενο πειραματικό βήμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η υπεραραίωση της ιμιδαζόλης, της οποίας η υψηλή συγκέντρωση που εντοπίζεται στο δείγμα κατόπιν της IMAC δύναται να αποτελέσει περιοριστικό παράγοντα σε μετέπειτα στάδια καθαρισμού μέσω IMAC αλλά και στη διαδικασία της κρυστάλλωσης. Για το λόγο αυτό, το μεγαλύτερο ποσοστό της ιμιδαζόλης απομακρύνεται μέσω διαδοχικών αραιώσεων του πρωτεϊνικού δείγματος με το διάλυμα ανταλλαγής, το οποίο συνήθως έχει τη σύσταση του διαλύματος πρόσδεσης που χρησιμοποιείται στην IMAC, δίχως όμως να περιέχει ιμιδαζόλη. Στην πραγματικότητα, η διαδικασία της ανταλλαγής ξεκινά μόλις μειωθεί ο αρχικός όγκος του δείγματος, ενώ στη συνέχεια ακολουθούν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις με ενδιάμεσα στάδια αραιώσεων, επιτρέποντας έτσι την ταυτόχρονη αλλαγή του διαλύματος και τη συμπύκνωση της πρωτεΐνης. Με το πέρας της διαδικασίας η πρωτεΐνη μπορεί να αποθηκευτεί στους 4 °C στην περίπτωση που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί άμεσα ή στους -20 °C για μακροχρόνια φύλαξη, ενώ κρίνεται ιδανική η αποθήκευση στους -80 °C για την καλύτερη σταθερότητα του πρωτεϊνικού δείγματος.



Εικόνα I.2.13. Σχηματική απεικόνιση των διαδικασιών της συμπύκνωσης και της αλλαγής διαλύματος φύλαξης (Τροποποιημένη από: https://microbes.sites.haverford.edu/MEE_wiki/index.php?title=Protein_Sample_Concentration).

I.2.7 Πέψη με την Πρωτεάση του *Tobacco Etch Virus* (TEVpro)

Σε πειράματα έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, όπως αναφέρεται στο Κεφάλαιο I.2.1, περιλαμβάνεται συνήθως η σύντηξη ετικετών συγγένειας (*affinity tags*) που συμβάλλουν στην απομόνωση της πρωτεΐνης, ενώ η συνδυαστική χρήση ετικετών σύντηξης (*fusion tags*) συμβάλλει στην ενίσχυση της διαλυτότητας της (Körppl et al., 2022). Η εξαϊστιδινική ουρά (*His₆ tag*) αποτελεί μια γνωστή ετικέτα σύντηξης που επιτρέπει την πιο γρήγορη και αποτελεσματική απομόνωση πρωτεϊνών μέσω IMAC, ενώ συνήθως συνδέεται με μια θειορεδοξινική ομάδα, η οποία ενισχύει τη διαλυτότητα του μορίου. Η χρήση ετικετών σύντηξης, όπως η θειορεδοξίνη, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η πρωτεΐνη δέσμευσης της μαλτόζης δύναται να βελτιώσει την έκφραση της πρωτεΐνης-στόχου, καθώς επίσης τη διαλυτότητα και την αναδίπλωση της, ενώ μπορεί να φέρει προστατευτικό ρόλο έναντι της πρωτεόλυσης. Ωστόσο, η κρυσταλλογραφική μελέτη της πρωτεΐνης-ενδιαφέροντος συνήθως απαιτεί την απομάκρυνση των ανωτέρω ετικετών, λόγω της ετερογένειας ως προς τη διαμόρφωση που δύναται να επάγουν – γεγονός που αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη των κρυστάλλων (Smyth et al., 2003). Η αφαίρεση των ετικετών σύντηξης πραγματοποιείται μέσω της δράσης πρωτεολυτικών ενζύμων, η λειτουργία των οποίων στοχεύει ειδικά σε μια αλληλουχία αναγνώρισης που έχει ενσωματωθεί στην πρωτεΐνη. Στα πρωτεολυτικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό συγκαταλέγονται ο παράγοντας Xa, η θρομβίνη, η εντεροκινάση και η TEV πρωτεάση (TEV protease, TEVpro) (Fang et al., 2007).

Η TEVpro αποτελεί το καταλυτικό κέντρο της πρωτεΐνης πυρηνικού εγκλεισμού α (*nuclear inclusion a protein*, NIa pro) του ιού *Tobacco etch virus* (TEV) και αναγνωρίζει τον γραμμικό επίτοπο της μορφής Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-(Gly/Ser), με την πέψη να πραγματοποιείται στο σημείο Gln-Gly ή Gln-Ser. Η βέλτιστη λειτουργία της TEVpro παρατηρείται στους 34 °C - ωστόσο, το ένζυμο μπορεί να δράσει και σε χαμηλές θερμοκρασίας, όπως στους 4 °C, ενώ παρουσιάζει ενεργότητα σε εύρος συνθηκών και παρουσία ποικίλων αναστολέων πρωτεασών. Δεδομένου των ανωτέρω ιδιοτήτων, η TEVpro αποτελεί ιδανική επιλογή για την απομάκρυνση ετικετών σύντηξης από την πρωτεΐνη-στόχο (Fang et al., 2007; Nam et al., 2020).

1.2.8 Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Πρωτεΐνης – Φασματοφωτομετρική Μέτρηση με NanoDrop

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών στην προκείμενη εργασία βασίζεται στη φασματοσκοπία υπεριώδους ακτινοβολίας – συγκεκριμένα στη φασματοσκοπία απορρόφησης στα 280 nm – η οποία δεν απαιτεί τη χρήση πρόσθετων χημικών αντιδραστηρίων, σε αντίθεση με άλλες μεθόδους που βασίζονται σε χρωστικές ουσίες (όπως *Branford* και *Lowry*). Η φασματοσκοπία UV με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm βασίζεται στην ιδιότητα ορισμένων αμινοξέων, όπως η τυροσίνη, η τρυπτοφάνη, η φαινυλαλανίνη και τα κατάλοιπα κυστεΐνης, που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς, να απορροφούν μέγιστα στο συγκεκριμένο μήκος κύματος. Με τον προσδιορισμό της οπτικής απορρόφησης στα 280 nm και τη διαθεσιμότητα του συντελεστή μοριακής απορρόφησης ϵ , είναι δυνατός ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης-στόχου από την εξίσωση Lambert-Beer: $A = \epsilon \times I \times c$, όπου A είναι η οπτική απορρόφηση της πρωτεΐνης, ϵ είναι ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης ($M^{-1} \times cm^{-1}$), I είναι η διαδρομή που διανύει η δέσμη φωτός μέσα στο δείγμα (cm) και c είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης (M).

Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης είναι ειδικός για την εκάστοτε πρωτεΐνη και ο υπολογισμός του, που βασίζεται στην αλληλουχία της πρωτεΐνης, διεξάγεται με τον ακόλουθο τύπο: $\epsilon_{280} = 5500 \times n_{trp} + 1490 \times n_{tyr} + 125 \times n_{s-s}$, όπου n_{trp} είναι ο αριθμός καταλοίπων τρυπτοφάνης, n_{tyr} είναι ο αριθμός καταλοίπων τυροσίνης και n_{s-s} είναι ο αριθμός των δισουλφιδικών δεσμών που αναπτύσσονται στην πρωτεΐνη-στόχο.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη χρήση του φασματοφωτομέτρου *Multiskan SkyHigh Microplate* διεξάγεται αυτόματα με την εισαγωγή της τιμής του συντελεστή μοριακής απορρόφησης. Ο εξοπλισμός του προαναφερθέντος φασματοφωτομέτρου βασίζεται στην τεχνολογία *NanoDrop*, η οποία επιτρέπει τη χρήση δειγμάτων μικρού όγκου (0.5-2.0 μL), με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιείται η απώλεια ποσότητας του πρωτεϊνικού δείγματος.

1.3 Κρυστάλλωση Πρωτεϊνών

Ένα από τα πιο κομβικά στάδια ενός κρυσταλλογραφικού πειράματος, όπως προαναφέρθηκε, είναι η ανάπτυξη κρυστάλλων, ένα απαραίτητο βήμα που επιτυγχάνεται μέσω της διαδικασίας της κρυστάλλωσης. Για την επίτευξη της κρυστάλλωσης μιας πρωτεΐνης απαιτείται η εφαρμογή συγκεκριμένων συνθηκών στο υδατικό διάλυμα που εμπεριέχεται, οι οποίες επιτρέπουν την καθίζηση της πρωτεΐνης σε κρυσταλλική μορφή. Ωστόσο, η κρυστάλλωση πρωτεϊνών είναι μια εξαιρετικά δύσκολη διαδικασία λόγω του μεγάλου μεγέθους και της χειρομορφίας που παρουσιάζουν, ενώ σημαντικός περιοριστικός παράγοντας καθίσταται επίσης η δυναμική τους φύση σε υδατικά διαλύματα (Rupp, 2010).

1.3.1 Θεμελιώδεις Αρχές Κρυστάλλωσης

Ο σχηματισμός των κρυστάλλων βασίζεται στο διαχωρισμό των πρωτεϊνικών μορίων από τα μόρια του διαλύτη και στην οργάνωσή τους σε ένα περιοδικό πλέγμα, ένα φαινόμενο που επιτυγχάνεται με τον υπερκορεσμό του πρωτεϊνικού διαλύματος, δηλαδή την υπέρβαση του ορίου διαλυτότητας, S^0 , της πρωτεΐνης. Το όριο διαλυτότητας ορίζεται ως το σημείο στο οποίο επικρατεί ισορροπία μεταξύ της στερεάς και της διαλυτής φάσης μιας ουσίας. Ο υπερκορεσμός αποτελεί μια κατάσταση ανισορροπίας του συστήματος, η εξισορρόπηση του οποίου επέρχεται με το σχηματισμό στερεάς φάσης, είτε με τη

μορφή ιζήματος, είτε με κρυσταλλική μορφή. Ο σχηματισμός της στερεάς φάσης υφίσταται παράλληλα με την μείωση της συγκέντρωσης της ουσίας – στην προκειμένη περίπτωση της πρωτεΐνης – στο διάλυμα έως ότου αποκατασταθεί ο κορεσμός (McPherson & Gavira, 2014).

Η μετάβαση του συστήματος σε υπέρκορη κατάσταση πραγματοποιείται με τη μεταβολή των ιδιοτήτων του διαλύματος ή των μακρομορίων, ώστε να μειωθεί η διαλυτότητα των τελευταίων και να είναι δυνατή η ανάπτυξη κρυστάλλων. Ειδικότερα, κατά τη διαδικασία της κρυστάλλωσης τροποποιούνται οι σχέσεις μεταξύ των μορίων της πρωτεΐνης και των μορίων του διαλύτη, με τις ελκτικές δυνάμεις (υδροφόβες αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, δυνάμεις *van der Waals* και γέφυρες αλάτων) που αναπτύσσονται μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων να υπερτερούν έναντι των αλληλεπιδράσεων με το διαλύτη, διευκολύνοντας τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών μορίων, γεγονός που οδηγεί στη μείωση της ελεύθερης ενέργειας *Gibbs* ($\Delta G < 0$) και καθιστά τη διαδικασία της κρυστάλλωσης ευνοϊκή (McPherson & Gavira, 2014).

Ι.3.1.1 Πυρήνωση και Ανάπτυξη κρυστάλλων

Απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη κρυστάλλων αποτελεί ο σχηματισμός πυρήνων κρυστάλλωσης. Οι πυρήνες (nuclei) αποτελούν μικρές σταθερές συστάδες των μορίων μιας ουσίας σε ένα διάλυμα, οι οποίες λειτουργούν ως γνώμονας για την εναπόθεση μορίων σε περιοδική διευσθέτηση, επιτρέποντας κατ' αυτό τον τρόπο την ανάπτυξη κρυστάλλων.

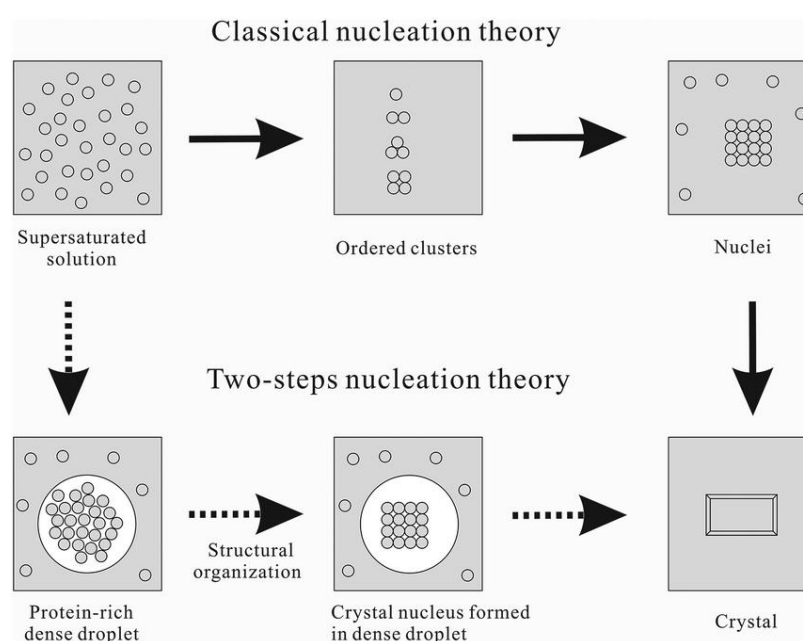
Δεδομένου του καίριου ρόλου που φέρει στην έναρξη της διαδικασίας της κρυστάλλωσης, η διαδικασία της πυρήνωσης των πρωτεϊνικών κρυστάλλων καθορίζει πολλές ιδιότητες της αναδυόμενης κρυσταλλικής φάσης. Στην περίπτωση της ταχείας πυρήνωσης, πολλοί κρύσταλλοι αναπτύσσονται ταυτόχρονα, κατά την ανάπτυξη των οποίων εξαντλούνται τα πρωτεϊνικά μόρια από το διάλυμα με αποτέλεσμα τη διακοπή του σχηματισμού πυρήνων κρυστάλλωσης σε μεταγενέστερα στάδια και το δημιουργία κρυστάλλων με παραπλήσια μεγέθη. Αντιθέτως, στην περίπτωση που η πυρήνωση πραγματοποιείται με αργό ρυθμό, μόνο λίγοι κρύσταλλοι αναπτύσσονται στα αρχικά στάδια, με αποτέλεσμα η υπερκορεσμένη κατάσταση του διαλύματος να διατηρείται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Ως εκ τούτου, ο σχηματισμός νέων πυρήνων εξακολουθεί να υφίσταται και οι κρύσταλλοι αναπτύσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς, προσδίδοντας έτσι στον πληθυσμό των κρυστάλλων ανομοιόμορφη κατανομή μεγεθών. Δεδομένου των ανωτέρω, ο έλεγχος της διαδικασίας της πυρήνωσης αποτελεί βασικό μέσο ρύθμισης του μεγέθους και της κατανομής μεγέθους των κρυστάλλων, ενώ παράλληλα καθορίζει τον κρυσταλλικό πολυμορφισμό, με την κρυσταλλική φάση που χαρακτηρίζεται με τον ταχύτερο ρυθμό πυρήνωσης να επικρατεί (Vekilov, 2015).

Η διαδικασία της πυρήνωσης διακρίνεται σε δύο βασικές κατηγορίες, την ομοιογενή και την ετερογενή, οι οποίες διαφοροποιούνται ως προς τους μηχανισμούς που διέπουν το σχηματισμό κρυστάλλων, με την ομοιογενή πυρήνωση να περιλαμβάνει το σχηματισμό πυρήνων απουσία εξωτερικών επιδράσεων και την ετερογενή να διαμεσολαβείται από την επίδραση εξωγενών παραγόντων.

Η ομοιογενής πυρήνωση εκφράζεται από δύο μοντέλα πυρήνωσης. Το πρώτο περιγράφεται από την κλασική θεωρία πυρήνωσης, σύμφωνα με την οποία ο σχηματισμός θερμοδυναμικά σταθερών πυρήνων διαμεσολαβείται από τη δημιουργία σταγονοειδών μοριακών συστάδων. Η ανάπτυξη των μοριακών συστάδων απαιτεί τη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας (ΔG) του συστήματος, η οποία αποτελεί το άθροισμα της ελεύθερης ενέργειας (ΔG_v) που είναι αναγκαία για τη μετάβαση φάσης και της ελεύθερης ενέργειας σχηματισμού επιφάνειας (ΔG_s). Καθώς η στερεή φάση είναι θερμοδυναμικά σταθερότερη από τη διαλυτή, η ΔG_v είναι αρνητική με αποτέλεσμα τη μείωση της

ΔG του συστήματος. Αντίθετα, η ΔG_s – κατ’ επέκταση και η ΔG του συστήματος – αυξάνεται με τη δημιουργία διεπαφής μεταξύ της στερεάς και της υγρής φάσης, ευνοώντας τη διάλυση των μοριακών συστάδων. Η ισορροπία αυτού του ανταγωνισμού εξαρτάται από το μέγεθος των συστάδων, με τις συστάδες μικρού μεγέθους να επαναδιαλύονται και τις συστάδες που αποκτούν ένα κρίσιμο μέγεθος να οδηγούνται στο σχηματισμό πυρήνων (Erdemir et al., 2009).

Το δεύτερο μοντέλο, γνωστό ως θεωρία πυρήνωσης δύο βημάτων, περιγράφει αρχικά το σχηματισμό μιας πυκνής σταγόνας που περιέχει την πρωτεΐνη σε άτακτη διάταξη. Σε δεύτερο βήμα ακολουθεί ο σχηματισμός του κρυσταλλικού πυρήνα εντός της σταγόνας, κατόπιν της αναδιάταξης των πρωτεϊνικών μορίων. Στην περίπτωση που η σταγόνα είναι σταθερή, η πυρήνωση πραγματοποιείται άμεσα στο εσωτερικό της – αντίθετα, στην περίπτωση ασταθούς σταγόνας προηγείται ο σχηματισμός μετασταθών μοριακών συστάδων και ακολούθως ολοκληρώνεται η πυρήνωση (Zhou et al., 2017).

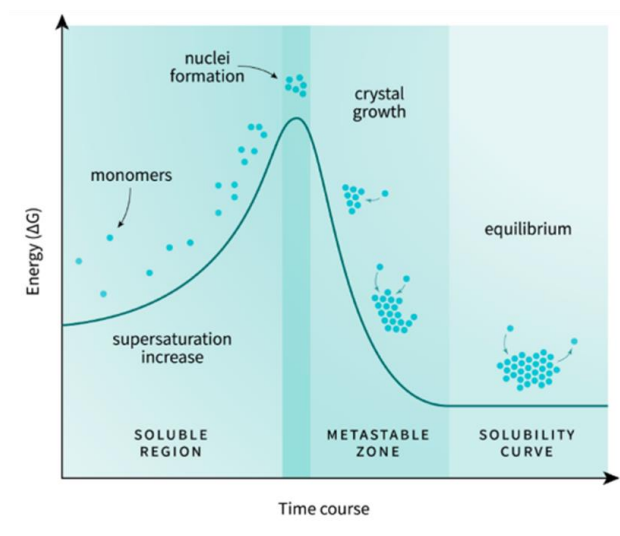


Εικόνα 1.3.1. Οι δύο μηχανισμοί της ομοιογενούς πυρήνωσης. Τα συμπαγή βέλη υποδεικνύουν την πορεία της κλασσικής θεωρίας πυρήνωσης, ενώ τα στικτά βέλη αντιστοιχούν στη θεωρία πυρήνωσης δύο βημάτων (Zhou et al., 2017).

Η ετερογενής πυρήνωση είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται σε περίπτωση που ο υπερκορεσμός δεν είναι επαρκής για την επίτευξη ομοιογενούς πυρήνωσης και υποστηρίζεται από εξωγενείς παράγοντες πυρήνωσης οι οποίοι μέσω της αλληλεπίδρασης τους με τα μόρια της πρωτεΐνης αυξάνουν την τοπική συγκέντρωση της και οδηγούν στο σχηματισμό συστάδων προπυρήνωσης. Η σταθεροποίηση των τελευταίων επιτρέπει το σχηματισμό πυρήνων κρυστάλλωσης (H. Liu et al., 2023). Συγκριτικά με την ομοιογενή πυρήνωση, η ετερογενής ευνοείται ενεργειακά μέσω της μείωσης της ΔG_s , καθώς οι παράγοντες πυρήνωσης συνεπάγονται τη μείωση της διεπιφάνειας – γεγονός που επιτρέπει το δημιουργία πυρήνων μικρότερου κρίσιμου μεγέθους (Zhou et al., 2017). Ως παράγοντες πυρήνωσης δύναται να λειτουργήσουν σωματίδια ή επιφάνειες, με τυχόν επιμολύνσεις ή τα τοιχώματα δοχείων να αποτελούν τους συνηθέστερους παράγοντες πυρήνωσης σε πραγματικές συνθήκες. Σε ευρύτερη κλίμακα, στους παράγοντες πυρήνωσης συμπεριλαμβάνονται πληθώρα υλικών, φορτισμένες επιφάνειες, πορώδη υλικά, το DNA και η μέθοδος σποράς (*seeding method*) που χρησιμοποιείται

ευρέως στη βελτίωση ποιότητας των κρυστάλλων όπως θα αναφερθεί σε επόμενο κεφάλαιο (H. Liu et al., 2023).

Με την ολοκλήρωση της πυρήνωσης, καθίσταται θερμοδυναμικά ευνοϊκή η ανάπτυξη κρυστάλλων, καθώς οι πυρήνες λειτουργούν ως πρότυπα για την περιοδική διευθέτηση των μορίων. Συνολικά, η διαδικασία της κρυστάλλωσης είναι μια εξώεργη αντίδραση που καταλήγει στη δημιουργία περιοδικά οργανωμένων δομών μέσω της ανάπτυξης διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, μειώνοντας έτσι την εντροπία της πρωτεΐνης, σε αντίθεση με την εντροπία του διαλύματος που αυξάνεται κατά την απομάκρυνση των μορίων του διαλύτη από τα μόρια της πρωτεΐνης (Rupp, 2010).



Εικόνα I.3.2. Θερμοδυναμική περιγραφή της πορείας ενός πειράματος κρυστάλλωσης (Spiliopoulou, Triandafilidis et al., 2020).

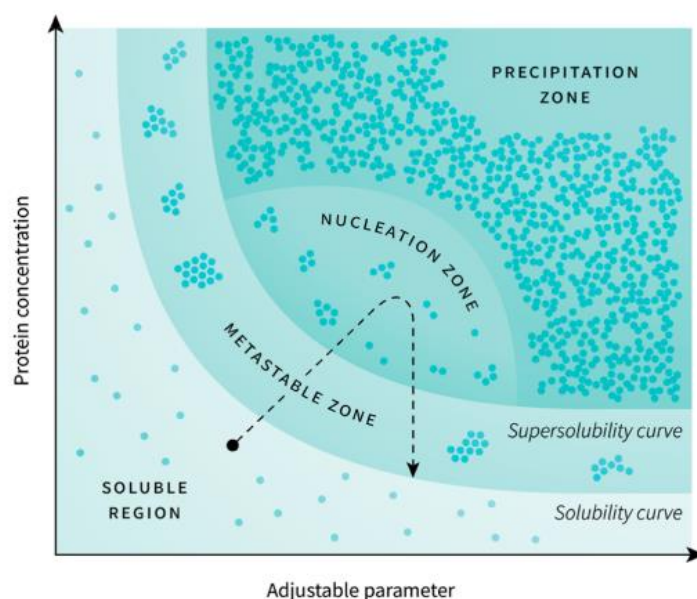
I.3.1.2 Διαγράμματα Φάσης

Το διάγραμμα φάσης (Εικόνα I.3.3) αποτελεί ένα κοινό τρόπο αναπαράστασης της μεταβολής της διαλυτότητας της πρωτεΐνης και της πορείας της κρυστάλλωσης συναρτήσει της μεταβολής κάποιων συνθηκών, με τον κατακόρυφο άξονα να προσδιορίζει τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης και τον οριζόντιο άξονα να περιγράφει κάποιο παράγοντα κρυστάλλωσης, είτε αυτός αποτελεί κάποιο παράγοντα καθίζησης, είτε τη θερμοκρασία, ή το pH.

Ένα τυπικό διάγραμμα φάσης φέρει δύο διακριτές καμπύλες, την καμπύλη διαλυτότητας (*solubility curve*) και την καμπύλη υπερδιαλυτότητας (*supersolubility curve*). Η πρώτη προσδιορίζει τις συνθήκες κορεσμού του πρωτεϊνικού μορίου, με την περιοχή που εντοπίζεται κάτωθεν της καμπύλης να αντιστοιχεί στην υπόκορη ζώνη, ενώ η περιοχή που εκτείνεται άνωθεν της καμπύλης υποδεικνύει τις συνθήκες υπερκορεσμού του μορίου. Η δεύτερη καμπύλη διαχωρίζει την υπέρκορη περιοχή στη **ζώνη πυρήνωσης** (*nucleation zone*) ή **ασταθής ζώνη** (*labile zone*) και στη **μετασταθή ζώνη** (*metastable zone*), ενώ στην περιοχή εκτείνεται και μια τρίτη ζώνη, γνωστή ως **ζώνη κατακρήμνισης** (*precipitation zone*).

Η ζώνη πυρήνωσης αντιστοιχεί σε μια ενδιάμεση κατάσταση υπερκορεσμού στην οποία λαμβάνει χώρα η διαδικασία της πυρήνωσης, ενώ η μετασταθή ζώνη αντιπροσωπεύει το σημείο παύσης της πυρηνοποίησης και της ανάπτυξης των ήδη υπαρχόντων πυρήνων σε κρυστάλλους. Σε

περίπτωση επίτευξης υψηλού υπερκορεσμού, η πρωτεΐνη καθιζάνει στη ζώνη κατακρήμνισης με τη μορφή ιζήματος (Chayen & Saridakis, 2008).



Εικόνα Ι.3.3. Τυπικό διάγραμμα φάσης της κρυστάλλωσης πρωτεϊνών (Spiliopoulou, Triandafillidis et al., 2020).

Το διάγραμμα φάσης δεν αποτελεί μόνο μέσο περιγραφής των μεταβάσεων φάσης που διέπουν την κρυστάλλωση, αλλά συνιστά επίσης πολύτιμο εργαλείο για το σχεδιασμό πειραμάτων. Η μετάβαση στη ζώνη πυρήνωσης καθορίζεται από το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα της κρυστάλλωσης. Στην περίπτωση σχηματισμού μονοκρυσταλλικού δείγματος, δηλαδή λίγων και ευμεγεθών κρυστάλλων καλής ποιότητας, στοχεύεται το κάτω όριο της ζώνης πυρήνωσης. Εν τούτοις, για την ανάπτυξη πολυκρυσταλλικού δείγματος στοχεύεται το άνω όριο της ζώνης πυρήνωσης, στο οποίο ο σχηματισμός πολυάριθμων πυρήνων επάγει την ανταγωνιστική προσρόφηση των διαθέσιμων πρωτεϊνικών μορίων και τελικά την καθίζηση πολυάριθμων μικρών κρυστάλλων.

Ι.3.2 Παράγοντες Κρυστάλλωσης

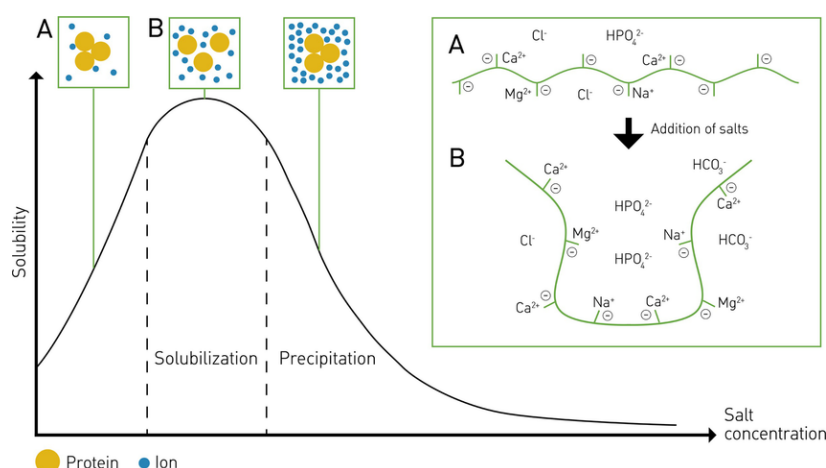
Η κρυστάλλωση αποτελεί μια πολυπαραμετρική διαδικασία, στην οποία ποικίλοι παράγοντες καθορίζουν τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης και την αλληλεπίδραση της με το υδατικό περιβάλλον. Οι σημαντικότερες παράμετροι που σχετίζονται με τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης είναι οι εξής:

1. Η **συγκέντρωση της πρωτεΐνης**, της οποίας οι υψηλές τιμές οδηγούν στον υπερκορεσμό του διαλύματος και κατ' επέκταση στη μείωση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης. Οι χαμηλές τιμές συγκέντρωσης της πρωτεΐνης δεν δύναται να επάγουν τον υπερκορεσμό του διαλύματος, ενώ οι εξαιρετικά υψηλές τιμές συνεπάγονται το σχηματισμό ιζήματος (Bijelic & Rompel, 2018).
2. Το **pH**, το οποίο επηρεάζοντας το φορτίο των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων, δύναται να μεταβάλλει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων, αλλά και μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων και των μορίων του διαλύτη. Στην περίπτωση που η τιμή του pH προσεγγίζει το ισοηλεκτρικό σημείο pI της πρωτεΐνης, δηλαδή το σημείο όπου η πρωτεΐνη φέρει ουδέτερο φορτίο, η διαλυτότητα του μορίου ελαχιστοποιείται. Ωστόσο, παρά το δεδομένο αυτό, οι

περισσότερες πρωτεΐνες μπορούν να κρυσταλλώσουν σε ένα μεγαλύτερο εύρος τιμών εκατέρωθεν της τιμής του pI (Rupp, 2010).

3. Οι **προσδέτες** (μικρά οργανικά μόρια ή ιόντα), η πρόσδεση των οποίων δύναται να μεταβάλλει ή και να σταθεροποιήσει τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, ενώ μπορεί επίσης να τροποποιήσει τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-διαλύτη (Russo Krauss et al., 2013).
4. Οι **παράγοντες καθίζησης**, οι οποίοι διακρίνονται κυρίως σε ανόργανα άλατα, πολυμερικές ενώσεις και οργανικούς διαλύτες

- i. **Ανόργανα άλατα:** Η ιονική ισχύς φέρει διττό ρόλο στη διαλυτότητα της πρωτεΐνης, με την αύξηση της ιονικής να επάγει είτε τη μείωση της διαλυτότητας (φαινόμενο *salting out*), είτε την αύξηση της διαλυτότητας (φαινόμενο *salting in*) (Giacovazzo, 1992). Στη δεύτερη περίπτωση, οι υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων καταστέλλουν τη διαδικασία της κρυστάλλωσης, ενώ οι χαμηλές συγκεντρώσεις καθιστούν την πρωτεΐνη λιγότερο υδρόφιλη, με αποτέλεσμα να μειώνεται η διαλυτότητα της και να ευνοείται η διαδικασία της κρυστάλλωσης.



Εικόνα 1.3.4. Σχηματική περιγραφή της διαλυτότητας της πρωτεΐνης. Η κατάσταση A που αναδεικνύεται στο διάγραμμα αντιστοιχεί σε χαμηλή διαλυτότητα της πρωτεΐνης υπό συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης άλατος (*salting in*), ενώ αντιδιαμετρικά παρουσιάζεται η κατάσταση χαμηλής διαλυτότητας της πρωτεΐνης υπό συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης άλατος (*salting out*). Το πλαίσιο δεξιά απεικονίζει την επίδραση των ιόντων σε ένα πρωτεϊνικό θραύσμα (Sven by et al., 2024).

- ii. **Πολυμερικές ενώσεις:** Τα πολυμερή προάγουν την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών με την απομάκρυνση των μορίων του διαλύτη από την επιφάνειά τους. Αυτή η δράση των πολυμερών αποδίδεται στην ασταθή διαμόρφωσή τους, η οποία τους επιτρέπει να καταλαμβάνουν μεγαλύτερο όγκο σε σχέση με τα μόρια του διαλύτη. Τα πολυμερή της οικογένειας των PEG (*polyethylene glycols*) εμφανίζουν διαδεδομένη χρήση στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών λόγω των ιδιοτήτων που τους προσφέρει το μεγάλο μοριακό τους βάρος (McPherson & Gavira, 2014).
- iii. **Οργανικοί διαλύτες:** Η χρήση οργανικών διαλυτών στη κρυστάλλωση πρωτεϊνών στηρίζεται στην ιδιότητά τους να απομακρύνουν τα μόρια νερού από το διάλυμα και να μειώνουν τη διηλεκτρική σταθερά του μέσου. Ωστόσο, αξιοποιούνται με επιφύλαξη ως παράγοντες καθίζησης δεδομένου ότι δύναται να επηρεάσουν τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης (Giacovazzo, 1992).
5. Η **θερμοκρασία**, η αύξηση της οποίας μπορεί να οδηγήσει είτε στην αύξηση είτε στη μείωση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης. Η σχέση μεταξύ της θερμοκρασίας και της διαλυτότητας της πρωτεΐνης καθορίζεται από την παρουσία των διαφόρων παραγόντων καθίζησης, ενώ οι τιμές

θερμοκρασίες που έχουν αναδειχθεί ως οι πιο κατάλληλες για την επίτευξη κρυστάλλωσης πρωτεϊνών αντιστοιχούν στους 4 °C και στους ~ 20 °C (Rupp, 2010).

6. Η **καθαρότητα** του πρωτεϊνικού δείγματος, η οποία αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την επιτυχία ενός πειράματος κρυστάλλωσης, καθώς η παρουσία εξωγενών παραγόντων – όπως σωματίδια σκόνης, μετουσιωμένη ή συσσωματωμένη πρωτεΐνη, υπολείμματα ρητίνης από τη χρωματογραφία – μπορεί να προκαλέσει ανεξέλεγκτη πυρήνωση (Rupp, 2010).

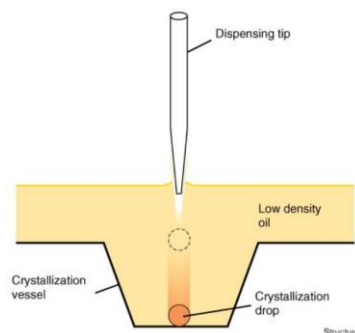
I.3.3 Μέθοδοι Κρυστάλλωσης

Η πειραματική διαδικασία της κρυστάλλωσης βασίζεται στην ανάμιξη του πρωτεϊνικού διαλύματος με ένα διάλυμα κρυστάλλωσης, το οποίο περιλαμβάνοντας παράγοντες καθίζησης, πρόσθετα ή/και ρυθμιστικό διάλυμα συγκεκριμένου pH, μειώνει τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης και οδηγεί κατ' επέκταση στην επίτευξη υπερκορεσμού. Για την επίτευξη υπερκορεσμού του πρωτεϊνικού διαλύματος έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η διάχυση ατμών (*vapor diffusion*), η μέθοδος *batch*, η διαπίδυση και η ελεύθερη διάχυση μεταξύ επιφανειών, με τις δύο πρώτες να χρησιμοποιούνται ευρέως. Το σύνολο των ανωτέρων μεθόδων στηρίζεται σε κοινά θεμέλια – ωστόσο, κάθε τεχνική επιδρά με διαφορετικό τρόπο στην πορεία του υπερκορεσμού (Bergfors, 2022).

I.3.3.1 Μέθοδος Απευθείας Ανάμιξης (*Batch*)

Η μέθοδος *batch* αποτελεί την παλαιότερη και πιο αξιόπιστη τεχνική κρυστάλλωσης, με τη διεξαγωγή της να χαρακτηρίζεται από απλότητα. Ειδικότερα, βασίζεται στην ανάμιξη του πρωτεϊνικού διαλύματος με το διάλυμα κρυστάλλωσης στις τελικές τους συγκεντρώσεις, γεγονός που συνεπάγεται τον άμεσο υπερκορεσμό της πρωτεΐνης. Η χρήση αμφοτέρων των διαλυμάτων σε υψηλές συγκεντρώσεις στοχεύει απευθείας στη ζώνη πυρήνωσης, με σύνθηες αποτέλεσμα το σχηματισμό πολυάριθμων πυρήνων και συνεπώς τη δημιουργία ποσότητας μικροκρυστάλλων χαμηλής ποιότητας (Chayen & Saridakis, 2008; Spiliopoulou et al., 2020). Η κρυστάλλωση δια της μεθόδου *batch* μπορεί να διεξαχθεί σε οποιοδήποτε δοχείο μικρού όγκου, όπως οι σωλήνες μικροφυγοκέντρου και τα τριχοειδή σωληνάκια (Bergfors, 2022).

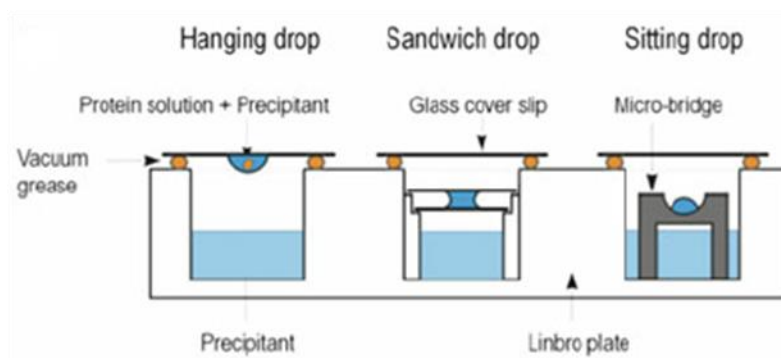
Μια εναλλακτική προσέγγιση της μεθόδου είναι τεχνική *microbatch*, η οποία περιλαμβάνει τη χρήση ελαίου χαμηλής πυκνότητας, επιτρέποντας κατ' αυτό τον τρόπο την εφαρμογή της μεθόδου σε μικρές ποσότητες – της τάξης των νανολίτρων – πρωτεΐνης. Ειδικότερα, το έλαιο χαμηλής πυκνότητας (συνήθως έλαιο παραφίνης ή/και σιλικόνης) επικαλύπτει τη σταγόνα κρυστάλλωσης με στόχο την αποτροπή της εξάτμισης, τυχόν ατμοσφαιρικής επιμόλυνσης και γενικότερα εξωγενών διαταραχών (Chayen & Saridakis, 2008, Bergfors, 2022).



Εικόνα I.3.5. Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής *microbatch* με τη χρήση ελαίου χαμηλής πυκνότητας (Chayen, 1997).

1.3.3.2 Μέθοδος Διάχυσης Ατμών (*Vapor Diffusion*)

Η κρυστάλλωση μέσω διάχυσης ατμών, σε αντίθεση με τη μέθοδο *batch*, δεν βασίζεται στον αιφνίδιο υπερκορεσμό του πρωτεϊνικού διαλύματος, αλλά εκκινείται με τη διαμόρφωση μιας υπόκορης κατάστασης κατά την ανάμιξη του πρωτεϊνικού διαλύματος με το διάλυμα κρυστάλλωσης, ενώ ο υπερκορεσμός επιτυγχάνεται μέσω εξάτμισης και διάχυσης του νερού μεταξύ των διαλυμάτων διαφορετικής συγκέντρωσης. Ειδικότερα, η διάχυση ατμών είναι αποτέλεσμα της ανάμιξης των δύο διαλυμάτων – συνήθως σε αναλογία 1:1 – και τοποθέτησης της συνολικής σταγόνας κρυστάλλωσης πάνω σε μια δεξαμενή που περιέχει το διάλυμα κρυστάλλωσης σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Με το σφράγισμα του συνόλου της διάταξης, πραγματοποιείται διάχυση του νερού λόγω της διαφοράς συγκέντρωσης του διαλύματος κρυστάλλωσης μεταξύ της σταγόνας (*droplet*) και της δεξαμενής (*reservoir*), έως ότου επιτευχθεί εξίσωση των τάσεων των ατμών του νερού πάνω από τις δύο προαναφερθείσες θέσεις. Αποτέλεσμα της διάχυσης του διαλύτη από τη σταγόνα κρυστάλλωσης στη δεξαμενή είναι η μείωση του όγκου της σταγόνας και επομένως η αύξηση των μη πτητικών συστατικών της. Έτσι, το σύστημα μεταβαίνει από τον υποκορεσμό σε κατάσταση υπερκορεσμού (Bergfors, 2022). Βάσει της πειραματικής διάταξης, η μέθοδος της διάχυσης ατμών διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες: α) στη διάταξη καθημένης σταγόνας (*sitting drop*), όπου η σταγόνα κρυστάλλωσης τοποθετείται δίπλα από τη δεξαμενή, β) στη διάταξη κρεμάμενης σταγόνας (*hanging drop*), με τη σταγόνα κρυστάλλωσης να κρέμεται από μια καλυπτρίδα πάνω από τη δεξαμενή και γ) στη διάταξη σταγόνας-σάντουιτς (*sandwich drop*), όπου η σταγόνα κρυστάλλωσης τοποθετείται εφαπτομενικά μεταξύ δυο υάλινων επιφανειών (Sauter et al., 2012).



Εικόνα 1.3.6. Σχηματική αναπαράσταση των τριών πειραματικών διατάξεων της μεθόδου διάχυσης ατμών (Wu et al., 2012).

1.3.3.3 Μέθοδος Ελεγχόμενης Σποράς Κρυστάλλων (*Seeding*)

Η μέθοδος *seeding* αποτελεί πλέον μια επιτυχή μέθοδο για βελτίωση του αριθμού, του μεγέθους και της ποιότητας των υπαρχόντων κρυστάλλων ή του κρυσταλλικού υλικού. Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στην αξιοποίηση μιας συνθήκης που επιτρέπει τη διαδικασία της πυρηνοποίησης αλλά ίσως δεν είναι βέλτιστη για την υποκείμενη ανάπτυξη των κρυστάλλων. Αντιστρόφως, μια συνθήκη δύναται να ευνοεί την ανάπτυξη των κρυστάλλων αλλά να μην είναι ιδανική για το σχηματισμό των πυρήνων κρυστάλλωσης. Συγκεκριμένα, η σπορά, εκμεταλλευόμενη τις δύο ανωτέρω περιπτώσεις, στηρίζεται στη μεταφορά πυρήνων κρυστάλλωσης από μια συνθήκη σε μια άλλη, αυξάνοντας έτσι το ποσοστό επιτυχίας ενός πειράματος διαλογής (*screening*) (Till et al., 2013). Σε αντίθεση με τον αυθόρμητο σχηματισμό πυρήνων, ή τη δημιουργία κρυστάλλων δίχως τη χρήση σπόρων (*seeds*), η ανάπτυξη των κρυστάλλων απαιτεί μικρότερο βαθμό υπερκορεσμού της πρωτεΐνης, μια αναγκαία

προϋπόθεση για την ελεγχόμενη ανάπτυξη των σπόρων και την αποδοτικότητα της μεθόδου της σποράς (Bergfors, 2022).

Η μέθοδος της σποράς, βάσει της προέλευσης των κρυστάλλων-σπόρων, διακρίνεται στην ομοιογενή και στην ετερογενή. Η ομοιογενής σπορά περιλαμβάνει τη χρήση κρυστάλλων που συνίστανται από την υπό κρυστάλλωση πρωτεΐνη-στόχο. Αντιθέτως, η ετερογενής σπορά χαρακτηρίζεται από την αξιοποίηση κρυστάλλων αποτελούμενων από μη σχετιζόμενες ουσίες, όπως το πορώδες πυρίτιο. Μικρότεροι βαθμοί ετερογένειας, που συμμετέχουν στην εδραίωση της κρυστάλλωσης σχετιζόμενων πρωτεϊνών, περιλαμβάνουν επίσης τη χρήση κρυστάλλων της εγγενούς πρωτεΐνης ως σπόρους, μια τεχνική γνωστή και ως διασταυρούμενη σπορά. Χαρακτηριστικές περιπτώσεις πρωτεϊνών που έχουν κρυσταλλώσει μέσω διασταυρούμενης σποράς αποτελούν πρωτεΐνες υποκατεστημένες με σεληνομεθειονίνη, μεταλλάγματα, σύμπλοκα πρωτεϊνών-αναστολέων καθώς και ομόλογων πρωτεϊνών (Bergfors, 2003).

Μια επιπλέον κατηγοριοποίηση χαρακτηρίζει την τεχνική της σποράς βάσει του μεγέθους των σπόρων σε δύο κατηγορίες, τη *microseeding* και τη *macroseeding*, με την πρώτη να βασίζεται στη μεταφορά εξαιρετικά μικρών σπόρων, ενώ η δεύτερη χαρακτηρίζεται από τη μεταφορά ενός κρυστάλλου με μέγεθος της τάξης 5-50 μm (Bergfors, 2003).

Σε εκτενέστερη ανάλυση, η τεχνική *microseeding* αφορά την προσθήκη μικροσκοπικών θραυσμάτων κρυσταλλικού υλικού σε ένα ελαφρώς υπερκορεσμένο διάλυμα πρωτεΐνης, ενώ είναι επίσης δυνατή η χρήση σφαιρουλιτών και μικροκρυσταλλικού ιζήματος (Bergfors, 2022). Για την αποφυγή της εισαγωγής μεγάλου αριθμού πυρήνων, το αρχικό διάλυμα των σπόρων αραιώνεται σε ένα ευρύ φάσμα και το επιθυμητό δείγμα σπόρων προστίθεται στη σταγόνα κρυστάλλωσης είτε με τη μορφή διαλύματος είτε με τη χρήση ενός λεπτού μέσου (πχ μουστάκι γάτας ή τρίχα αλόγου), το οποίο εμβαπτίζεται στο εναιώρημα των σπόρων και μεταφέρει τους πυρήνες συρόμενο στη σταγόνα κρυστάλλωσης, μια τεχνική γνωστή και ως *streak seeding* (Bergfors, 2003; McPherson & Gavira, 2014). Μια παραλλαγή της τεχνικής του *microseeding* είναι το *matrix microseeding* (MMS), όπου το εναιώρημα των σπόρων κατανέμεται σε ένα πλέγμα (*screen*) διαφορετικών και συχνά μη σχετιζόμενων συνθηκών, επιτρέποντας έτσι τη διερεύνηση ενός ευρύτερου χημικού περιβάλλοντος που μπορεί να αποδώσει κρυστάλλους καλύτερης ποιότητας. Στο σύνολο της, η τεχνική MMS αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο δεδομένου της εύρεσης νέων συνθηκών που αποδίδουν κρυστάλλους καθώς και της αυξημένης πιθανότητας απόκτησης κρυστάλλων υψηλής ποιότητας και, ενώ παράλληλα μπορεί να συνδυαστεί με αυτοματοποιημένα πρωτόκολλα κρυστάλλωσης (D'Arcy et al., 2014).

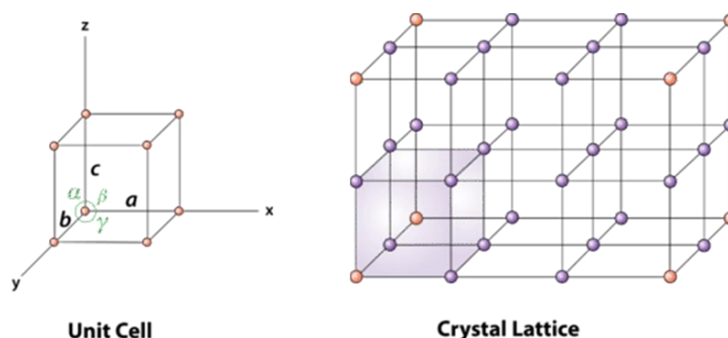
Στην περίπτωση του *macroseeding*, όπως προαναφέρθηκε, περιλαμβάνεται η μεταφορά ενός ήδη σχηματισμένου κρυστάλλου στη σταγόνα κρυστάλλωσης, με τη διαδικασία να πραγματοποιείται κάτω από μικροσκόπιο. Ομοίως με την προαναφερθείσα τεχνική, ενέχει ο κίνδυνος της μεταφοράς πολυαριθμικών σπόρων, καθώς στην επιφάνεια του κρυστάλλου δύναται να προσκολλώνται μικροκρυστάλλοι. Για την αποφυγή της παράπλευρης μεταφοράς μικροκρυστάλλων μαζί με τη σπορά του κρυστάλλου, ο σπόρος υποβάλλεται σε διαδικασία πλύσης μέσα από μια σειρά ενδιάμεσων διαλυμάτων μεταφοράς (McPherson & Gavira, 2014). Επιπλέον, η διαδικασία της πλύσης με τη χρήση διαλυμάτων κρυστάλλωσης χαμηλότερης συγκέντρωσης επιτρέπει το ελαφρύ ράγισμα της επιφάνειας του κρυστάλλου, δημιουργώντας κατ' αυτό τον τρόπο νέες ενεργές θέσεις για την περαιτέρω ανάπτυξη του κρυστάλλου στη νέα σταγόνα (Bergfors, 2022). Η τεχνική του *macroseeding*, αν και αποτελεί πολύτιμο εργαλείο στην ανάπτυξη κρυστάλλων υψηλής ποιότητας, παραμένει μια τεχνικά δύσκολη διαδικασία που απαιτεί δεξιότητες στο χειρισμό κρυστάλλων, ενώ δεν είναι δυνατή η εφαρμογή αυτοματοποιημένων χειρισμών (Rupp, 2010).

I.4 Η Δομή των Κρυστάλλων

Ο κρύσταλλος χαρακτηρίζεται από την περιοδική διάταξη των δομικών του στοιχείων στο χώρο. Η κατανόηση της τρισδιάστατης διάταξης των στοιχείων αυτών είναι εξαιρετικά σημαντική για τη μελέτη της σταθερότητας, των ιδιοτήτων αλλά και των αλληλεπιδράσεων που διέπουν τον κρύσταλλο. Στο πλαίσιο αυτό, η έννοια του κρυσταλλικού πλέγματος και της μοναδιαίας κυψελίδας αποτελούν θεμέλια για τη βασική περιγραφή και την ανάλυση της κρυσταλλικής δομής.

I.4.1 Το Κρυσταλλικό Πλέγμα και η Μοναδιαία Κυψελίδα

Ο κρύσταλλος ορίζεται ως η στερεά φάση της ύλης που φέρει το χαρακτηριστικό της αυστηρής περιοδικής διευθέτησης των δομικών της στοιχείων στις τρεις διαστάσεις του χώρου. Το δομικό στοιχείο ενός κρυστάλλου, γνωστό ως **μοναδιαία κυψελίδα** (*unit cell*) δύναται να αποτελεί ένα μόριο, ιόν ή το συνδυασμό αυτών και ταυτίζεται με την ελάχιστη μονάδα του χώρου που εμφανίζει τη μεγαλύτερη συμμετρία. Η μοναδιαία κυψελίδα, μέσω απλής μετατόπισης προς τις τρεις διαστάσεις του χώρου, χωρίς περιστροφή, δομεί τον κρυσταλλικό πλέγμα.



Εικόνα I.4.1. Απεικόνιση της μοναδιαίας κυψελίδας και των πλεγματικών παραμέτρων (**αριστερά**) και του κρυσταλλικού πλέγματος (**δεξιά**) (<https://flexbooks.ck12.org/cbook/ck-12-chemistry-flexbook-2.0/section/13.14/primary/lesson/unit-cells-chem/>).

Η μοναδιαία κυψελίδα ορίζεται από τρία μη ομοεπίπεδα διανύσματα $\vec{a}$, $\vec{b}$ και $\vec{c}$ τα οποία εκτείνονται στους άξονες x, y και z αντίστοιχα, ενώ σχηματίζουν τις γωνίες α , β και γ , με τη γωνία α να εντοπίζεται μεταξύ των διανυσμάτων $\vec{b}$ και $\vec{c}$, τη γωνία β μεταξύ των $\vec{a}$ και $\vec{c}$ και τη γωνία μεταξύ των διανυσμάτων $\vec{a}$ και $\vec{b}$. Τα μέτρα των τριών διανυσμάτων και οι σχηματιζόμενες γωνίες αποτελούν τις πλεγματικές παραμέτρους (*unit-cell parameters*) που περιγράφουν τη γεωμετρία της μοναδιαίας κυψελίδας. Το σημείο τομής των τριών αξόνων που ορίζουν τα διανύσματα καλείται πλεγματικό σημείο, ενώ το σύνολο των πλεγματικών σημείων αποτελεί το κρυσταλλικό πλέγμα.

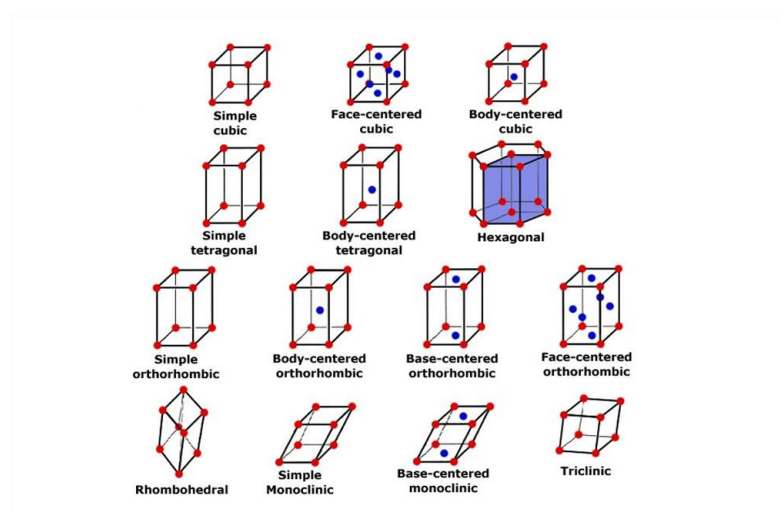
Βάσει των θέσεων που εντοπίζονται τα πλεγματικά σημεία, η μοναδιαία κυψελίδα διακρίνεται σε **πρωτογενή** (*primitive*) και **κεντρωμένη** (*centred*). Στην πρωτογενή μοναδιαία κυψελίδα, τα πλεγματικά σημεία εμφανίζονται μόνο στις κορυφές της, ενώ στην περίπτωση της κεντρωμένης εντοπίζονται επίσης στο εσωτερικό της. Ειδικότερα, η κεντρωμένη μοναδιαία κυψελίδα, βάσει της εσωτερικής της συμμετρίας, διακρίνεται σε ενδοκεντρωμένη (*body-centred/I*), μονοεδρικά κεντρωμένη (*based-centred/II, B ή C*) και ολοεδρικά κεντρωμένη (*face-centred/F*), ενώ ένα επιπλέον τύπο κέντρωσης αποτελεί η ρομβοεδρική (*rhombohedral-centred/R*) (Rupp.2010).

I.4.2 Κρυσταλλικά Συστήματα και Πλέγματα *Bravais*

Το σχήμα της μοναδιαίας κυψελίδας αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό της γεωμετρίας της, το οποίο περιγράφεται βάσει των αναλογιών των πλεγματικών σταθερών από **επτά κρυσταλλικά συστήματα** (*crystal systems*) (Πίνακας I.4.1). Ο συνδυασμός των κρυσταλλικών συστημάτων με τους διαφορετικούς τύπους κέντρωσης αποδίδει δεκατέσσερα πρωτότυπα κρυσταλλικά πλέγματα, γνωστά ως **πλέγματα *Bravais*** (*Bravais lattice*) (Εικόνα I.4.2) (Giacovazzo, 1992).

Πίνακας I.4.1. Τα κρυσταλλικά συστήματα και τα πλέγματα *Bravais* (Cullity & Stock, 2014).

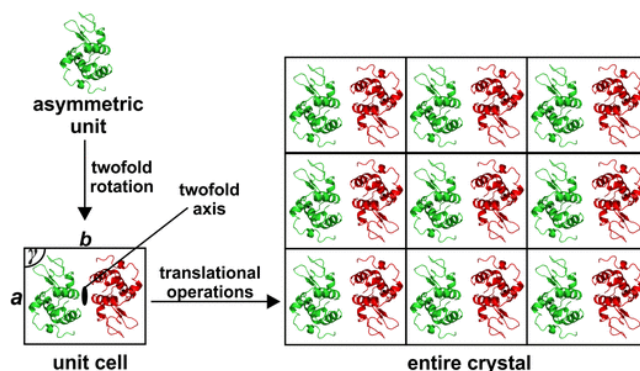
Κρυσταλλικό σύστημα	Σχέση μεταξύ πλευρών και γωνιών	Πλέγματα <i>Bravais</i>	Σύμβολο πλέγματος
Κυβικό	$a=b=c$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	Απλό	P
		Ενδοκεντρωμένο	I
		Ολοεδρικά κεντρωμένο	F
Τετραγωνικό	$a=b \neq c$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	Απλό	P
		Ενδοκεντρωμένο	I
		Απλό	P
Ορθορομβικό	$a \neq b \neq c$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	Ενδοκεντρωμένο	I
		Μονοεδρικά κεντρωμένο	C
		Ολοεδρικά κεντρωμένο	F
Ρομβοεδρικό/Τριγωνικό	$a=b=c$, $\alpha=\beta=\gamma \neq 90^\circ$	Απλό	R
Εξαγωνικό	$a=b \neq c$, $\alpha=\beta=90^\circ \neq \gamma=120^\circ$	Απλό	P
		Απλό	P
Μονοκλινές	$a \neq b \neq c$, $\alpha=\gamma=90^\circ \neq \beta$	Μονοεδρικά κεντρωμένο	C
Τρικλινές	$a \neq b \neq c$, $\alpha=\beta=\gamma \neq 90^\circ$	Απλό	P



Εικόνα I.4.2. Τα δεκατέσσερα πλέγματα Bravais (<https://slideplayer.gr/slide/11582531/>).

I.4.3 Διεργασίες Συμμετρίας

Το μικρότερο αδιαίρετο στοιχείο μιας κρυσταλλικής δομής ορίζεται ως **ασύμμετρη μονάδα** (*asymmetry unit*), η οποία μέσω διεργασιών συμμετρίας σχηματίζει τη μοναδιαία κυψελίδα. Οι διεργασίες συμμετρίας διεξάγονται με σημείο αναφοράς ένα σημείο, άξονα ή επίπεδο και απολήγουν στη δημιουργία ισοδύναμων αντικειμένων, δηλαδή αντικειμένων πανομοιότυπων με την αρχική τους κατάσταση. Η ισοδυναμία των δύο αντικειμένων χαρακτηρίζεται ευθεία, στην περίπτωση που τα αντικείμενα φέρουν τις αντίστοιχες γωνίες τους με θετικό πρόσημο και αντίθετη, στην περίπτωση που οι αντίστοιχες γωνίες εμφανίζονται με αρνητικό πρόσημο (Giacovazzo, 1992).



Εικόνα I.4.3. Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας μιας κρυσταλλικής δομής μέσω της εφαρμογής διεργασιών συμμετρίας στην ασύμμετρη μονάδα (Bijelic & Rompel, 2018).

Οι διεργασίες συμμετρίας που οδηγούν σε ευθεία ισοδυναμία περιλαμβάνουν τη μετατόπιση (*translation*), την περιστροφή (*rotation*) και τη στροφομετατόπιση ή κοχλίωση (*rototranslation or screw movement*). Η **μετατόπιση** περιλαμβάνει τη μετακίνηση όλων των σημείων ενός αντικειμένου κατά ίση απόσταση και προς την ίδια κατεύθυνση. Η διεργασία της **περιστροφής** επιβάλλει την περιστροφή των σημείων ενός αντικειμένου ως προς έναν άξονα συμμετρίας κατά ίση γωνία. Στη **στροφομετατόπιση** πραγματοποιείται συνδυασμός των δύο προηγούμενων διεργασιών συμμετρίας, με την περιστροφή να διεξάγεται γύρω από έναν άξονα και τη μετατόπιση κατά μήκος αυτού (Giacovazzo, 1992).

Οι διεργασίες συμμετρίας που αποδίδουν την αντίθετη ισοδυναμία περιλαμβάνουν την αναστροφή (*inversion*), τον κατοπτρισμό (*reflection*), τη στροφοαναστροφή (*rotoinversion*), την ολίσθηση (*glide*) και το στροφοκατοπτρισμό (*rotoreflexion*). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ανωτέρω διεργασίες συμμετρίας δεν βρίσκουν εφαρμογή σε χειρόμορφα και συνεπώς δεν παρατηρούνται σε πρωτεϊνικούς κρυστάλλους (Giacovazzo, 1992).

I.4.4 Ομάδες Συμμετρίας

Οι διεργασίες συμμετρίας δύνανται να δρουν μεμονωμένα ή συνδυαστικά σχηματίζοντας ομάδες συμμετρίας. Ο συνδυασμός των διεργασιών, στον οποίο δεν περιλαμβάνεται η διεργασία της μετατόπισης, δημιουργεί 32 **ομάδες συμμετρίας σημείου** (*point groups*), εκ των οποίων μόνο οι 11 είναι επιτρεπτές για χειρόμορφα μόρια όπως οι πρωτεΐνες (Rupp, 2010).

Ο συνδυασμός των διεργασιών συμμετρίας με τα 14 πλέγματα *Bravais* δημιουργεί τις **ομάδες συμμετρίας χώρου** (*space groups*). Συνολικά, προκύπτουν 230 *space groups* που χαρακτηρίζουν την εσωτερική συμμετρία της μοναδιαίας κυψελίδας. Ωστόσο, μόνο 65 εξ αυτών περιγράφουν τη

διευθέτηση των πρωτεϊνικών μορίων εντός της μοναδιαίας κυψελίδας, λόγω της χειρόμορφης φύσης των μορίων που επιτρέπουν την εφαρμογή μόνο των διεργασιών της μετατόπισης, της περιστροφής και της στροφομετατόπισης. Η περιγραφή των *space groups* βασίζεται στο συμβολισμό *Hermann-Mauguin*, σύμφωνα με τον οποίο ο πρώτος χαρακτήρας (*P, I, A, B, C, F, R*) αντιστοιχεί στον τύπο του πλέγματος *Bravais*, ενώ οι υπόλοιποι χαρακτήρες δηλώνουν τα στοιχεία συμμετρίας που περιλαμβάνονται στην ομάδα (Rupp, 2010).

Εν κατακλείδι, τα *point groups* περιγράφουν τις διεργασίες συμμετρίας που αφήνουν ένα μόριο αμετάβλητο, αποκλείοντας τις διεργασίες συμμετρίας που περιλαμβάνουν μετατόπιση. Εν τούτοις, τα *space group* χαρακτηρίζουν τη συμμετρία της μοναδιαίας κυψελίδας συμπεριλαμβάνοντας τη μετατόπιση στις διεργασίες συμμετρίας που εφαρμόζονται στην ασύμμετρη μονάδα για τη δόμηση της μοναδιαίας κυψελίδας (Amei, 2019).

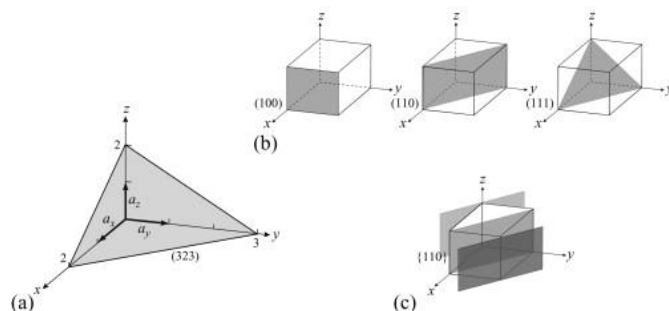
I.4.5 Κρυσταλλογραφικά Επίπεδα

Η κρυσταλλογραφική μελέτη θέτει ως απαραίτητο βήμα τη γνώση της διεύθυνσης και του προσανατολισμού των κρυσταλλογραφικών επιπέδων – νοητών επιπέδων επιφανειών – που διέρχονται μέσα από τα δομικά στοιχεία ενός κρυστάλλου, καθώς και της μεταξύ τους απόστασης. Μια κρυσταλλική δομή τέμνεται από διαφορετικές οικογένειες κρυσταλλογραφικών επιπέδων, ενώ κάθε οικογένεια συγκροτείται από παράλληλα και ισαπέχοντα κρυσταλλογραφικά επίπεδα.

Κάθε κρυσταλλογραφικό επίπεδο περιγράφεται από τους **δείκτες Miller** (*h, k, l*), οι οποίοι αποτελούν στην ουσία ένα σύνολο συντεταγμένων που περιγράφει τη διεύθυνση και τον προσανατολισμό ενός κρυσταλλογραφικού επιπέδου, όπως επίσης μιας οικογένειας κρυσταλλογραφικών επιπέδων. Οι δείκτες *h, k* και *l* αντιστοιχούν σε ακέραιους αριθμούς που ταυτίζονται με το αντίστροφο των σημείων τομής ενός επιπέδου με τους τρεις άξονες. Σε περίπτωση που το αποτέλεσμα δεν είναι ακέραιο, πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός των δεικτών με κοινό παράγοντα που να αποδίδει το χαμηλότερο ακέραιο λόγο τους. Επιπροσθέτως, στην περίπτωση που ένα κρυσταλλογραφικό επίπεδο δεν τέμνει έναν άξονα, τότε το σημείο τομής θεωρείται στο άπειρο και ο αντίστοιχος δείκτης *Miller* φέρει μηδενική τιμή (Atkins et al., 2020). Ακολουθώντας, παρατίθεται η σχέση που εκφράζει τους δείκτες *Miller*:

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

όπου *x, y, z* οι συντεταγμένες των σημείων τομής ενός επιπέδου με τους κρυσταλλογραφικούς άξονες *a, b* και *c* αντίστοιχα.

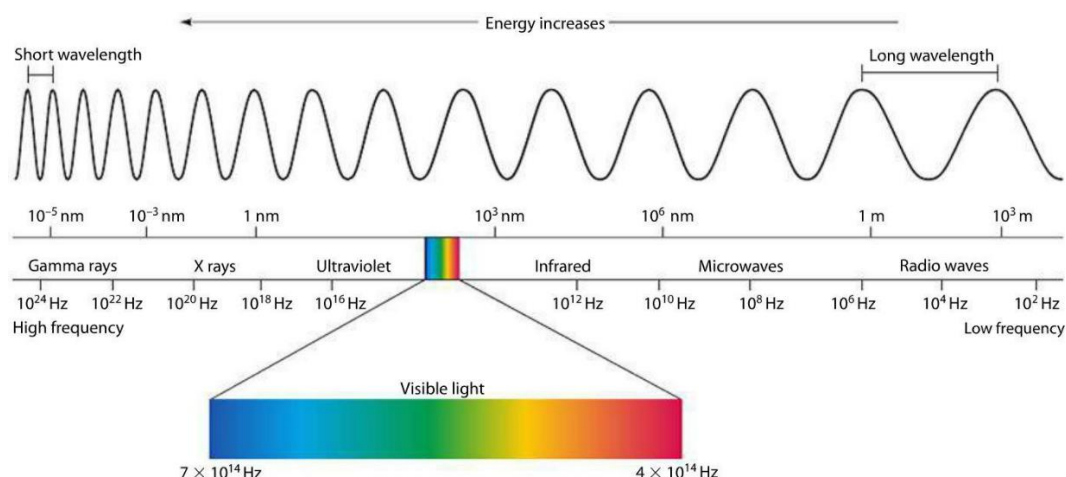


Εικόνα I.4.4. Τα κρυσταλλογραφικά επίπεδα στον τρισδιάστατο χώρο. (a) Απεικόνιση κρυσταλλογραφικού επιπέδου που τέμνει τους άξονες στα σημεία 2, 3 και 2 αντίστοιχα. (b) Απεικόνιση κρυσταλλογραφικών επιπέδων που είναι παράλληλα ως προς δύο άξονες (αριστερά), ως προς έναν άξονα (κέντρο) ή τέμνουν και τους τρεις άξονες (δεξιά). (c) Απεικόνιση μιας οικογένειας κρυσταλλογραφικών επιπέδων (Yamanaka et., 2013).

Όπως προαναφέρθηκε, ένα κρυσταλλογραφικό επίπεδο χαρακτηρίζεται από τους δείκτες *Miller*, με την παράθεση των δεικτών σε παρένθεση (*hkl*) να δηλώνει την ονομασία του επιπέδου, ενώ ο συμβολισμός τους σε [*hkl*] χαρακτηρίζει την κατεύθυνση του εκάστοτε επιπέδου. Για τον χαρακτηρισμό μιας οικογένειας επιπέδων οι δείκτες αποτυπώνονται με τη μορφή {*hkl*}, όπως φαίνεται στην Εικόνα I.4.4.c. Πέραν όμως της διεύθυνσης των κρυσταλλογραφικών επιπέδων, σημαντική πληροφορία παρέχει και η χαρακτηριστική απόσταση d_{hkl} μεταξύ των διαδοχικών επιπέδων μιας οικογένειας, η οποία σχετίζεται άμεσα με τις διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας και διαφέρει μεταξύ των κρυσταλλικών συστημάτων (Atkins et al., 2020).

I.5 Ακτίνες Χ

Οι ακτίνες Χ είναι ένα είδος ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με υψηλές ενέργειες και σημαντική διεισδυτική ικανότητα. Στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα, οι ακτίνες Χ καταλαμβάνουν την περιοχή μεταξύ της υπεριώδους ακτινοβολίας και των ακτίνων γάμμα, φέροντας μήκη κύματος που κυμαίνονται από 0.01 έως 10 nm (0.1-100 Å). Οι ακτίνες Χ παρουσιάζουν διττή φύση, καθώς πέραν των κυματικών ιδιοτήτων μπορούν να περιγραφούν επίσης ως φωτόνια, υποστηρίζοντας τη σωματιδιακή φύση τους. Η ενέργεια των φωτονίων τους εκτείνεται σε εύρος από 100 eV έως 100 keV, βάσει της σχέσης $E = hc/\lambda$, όπου h η σταθερά *Planck*, c η ταχύτητα του φωτός στο κενό και λ το μήκος κύματος. Η υψηλή ενέργεια κατατάσσει τις ακτίνες Χ στην κατηγορία των ιονίζουσων ακτινοβολιών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από τη δυνατότητα τους να προκαλέσουν απομάκρυνση ηλεκτρονίων από άτομα ή μόρια.



Εικόνα I.5.1. Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα (<https://physics.at-ung.com/phys-2212-module-12-5/>).

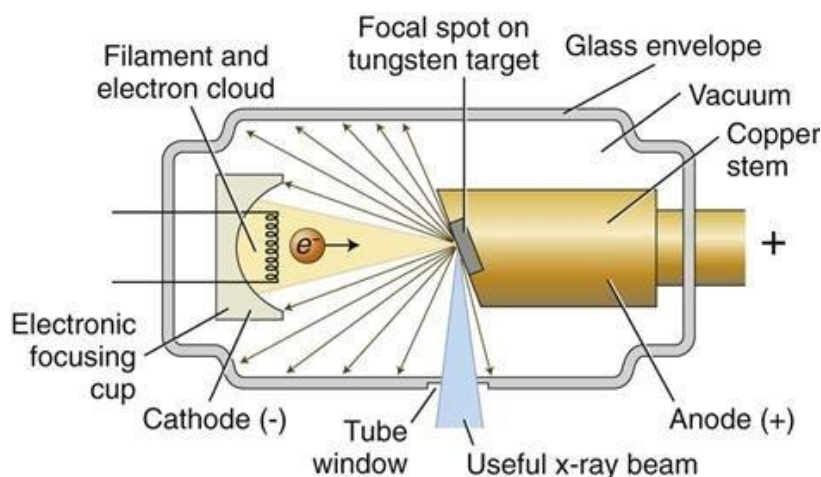
Οι ακτίνες Χ κατηγοριοποιούνται, βάσει του μήκος κύματος και κατ' επέκταση της ενέργειας, στις μαλακές και στις σκληρές, με τις τελευταίες να εμφανίζουν μικρότερο μήκος κύματος και ενέργεια φωτονίων από 5 έως 10 keV. Στην κρυσταλλογραφική μελέτη αξιοποιούνται οι σκληρές ακτίνες Χ, οι οποίες είναι ιδιαίτερα διεισδυτικές λόγω του μικρού μήκους κύματος (συνήθως μικρότερο από 1-2 Å). Το μήκος κύματος των σκληρών ακτίνων Χ είναι συγκρίσιμο με τις αποστάσεις μεταξύ των ατόμων στον κρύσταλλο, γεγονός που επιτρέπει την υψηλή διακριτική ικανότητα και καθιστά δυνατό το δομικό χαρακτηρισμό σε επίπεδο ατομικής ευκρίνειας.

1.5.1 Παραγωγή Ακτίνων Χ

Η παραγωγή των ακτίνων Χ βασίζεται στη μεταβολή της κινητικής κατάστασης των ηλεκτρονίων μέσω της επιβράδυνσης τους ή της αλληλεπίδρασης τους με τα άτομα ενός μεταλλικού στόχου. Στην πρώτη περίπτωση, ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας επιταχύνονται προς το μεταλλικό στόχο και με τη πρόσκρουση τους σε αυτό επιβραδύνονται, επάγοντας κατ' αυτό τον τρόπο την εκπομπή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας υπό τη μορφή ενός συνεχούς φάσματος φωτονίων ακτίνων Χ, γνωστή και ως ακτινοβολία πέδησης ή συνεχείς ακτίνες Χ. Στη δεύτερη περίπτωση, όταν ένα ηλεκτρόνιο φέρει υψηλή ενέργεια έχει τη δυνατότητα να εκτοπίσει ένα ηλεκτρόνιο από μια εσωτερική στιβάδα του ατόμου του μεταλλικού στόχου. Το κενό που προκύπτει αντισταθμίζεται από τη μετάπτωση ενός ηλεκτρονίου εξωτερικής στιβάδας και η διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο τροχιακών εκπέμπεται με υπο τη μορφή φωτονίων ακτίνων Χ με συγκεκριμένα μήκη κύματος, γνωστές ως χαρακτηριστικές ακτίνες Χ (Cullity & Stock, 2014).

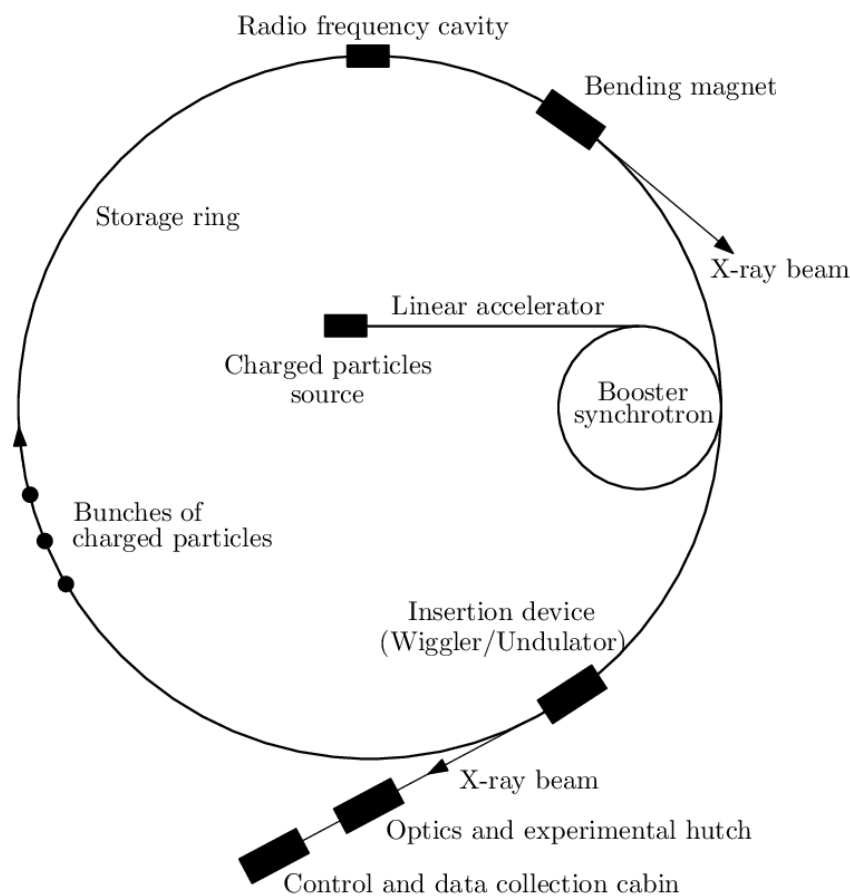
1.5.2 Πηγές Ακτίνων Χ

Οι πηγές που αξιοποιούνται για την παραγωγή των ακτίνων Χ διακρίνονται στις συμβατικές εργαστηριακές πηγές και στο σύγχροτρον (*synchrotron*). Στην περίπτωση των συμβατικών πηγών, όπως οι σωλήνες ακτίνων Χ, η παραγωγή των ηλεκτρονίων βασίζεται στη θέρμανση ενός νήματος θερμαινόμενης καθόδου (π.χ. βολφραμίου) – ένα φαινόμενο γνωστό ως θερμιονική εκπομπή. Τα εκπεμπόμενα ηλεκτρόνια επιταχύνονται προς την άνοδο με την εφαρμογή σημαντικής διαφοράς δυναμικού στην άνοδο και την κάθοδο. Αυτή η διαδικασία, όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 1.5.1, οδηγεί στη δημιουργία ενός συνεχούς φάσματος ακτίνων Χ καθώς και των χαρακτηριστικών ακτίνων Χ, με τις τελευταίες να απομονώνονται σε συγκεκριμένα μήκη κύματος μέσω φίλτρων και μονochρωμάτων για τη διεξαγωγή κρυσταλλογραφικών πειραμάτων. Λόγω της χαμηλής λαμπρότητας, οι ακτίνες Χ που παράγονται με αυτό τον τρόπο αξιοποιούνται σε πειράματα περίθλασης που λαμβάνουν χώρα σε ένα κοινό εργαστηριακό περιβάλλον, με τη σωλήνες ακτίνων Χ να κατέχουν πρωτεύοντα ρόλο στη διάταξη ενός εργαστηριακού περιθλασιμέτρου (Als-Nielsen & McMorrow, 2011).



Εικόνα 1.5.2. Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης του σωλήνα ακτίνων Χ (Roque, 2018).

Στην περίπτωση της ακτινοβολίας σύγχροτρον, παράγονται ακτίνες X υψηλών ενεργειών και λαμπρότητας, μια διαδικασία βασιζόμενη στην εκτροπή ηλεκτρονίων που φέρουν υψηλή ενέργεια και ταχύτητα προσεγγιστική σε αυτή του φωτός. Συγκεκριμένα, ένα κανόνι ηλεκτρονίων (*electron gun*) παράγει ηλεκτρόνια με παρόμοιο τρόπο με αυτόν των σωλήνων ακτίνων X, τα οποία επιταχύνονται με τη χρήση γραμμικού επιταχυντή (*linear accelerator*, linac) και αποκτούν την τελική τους ταχύτητα – κοντά στην ταχύτητα του φωτός – στο δακτύλιο ενίσχυσης (*booster ring*). Στη συνέχεια, τα ηλεκτρόνια διοχετεύονται με περιοδικό ρυθμό σε ένα δακτύλιο αποθήκευσης (*storage ring*), στον οποίο διατηρούν την ενέργεια τους κινούμενα σε κυκλική τροχιά με τη χρήση μαγνητικών πεδίων. Ο δακτύλιος αποθήκευσης περιλαμβάνει τετράπολους και εξάπολους μαγνήτες που εστιάζουν τη δέσμη και διορθώνουν την χρωματική εκτροπή που προκύπτει από τη πιθανή διαφορά ενέργειας των ηλεκτρονίων αντίστοιχα. Επιπλέον, αξιοποιούνται δίπολοι μαγνήτες ή μαγνήτες καμπυλότητας (*dipole or bending magnets*) που διατηρούν τη τροχιά των ηλεκτρονίων και συσκευές εισαγωγής που βρίσκονται σε ευθύγραμμα τμήματα του δακτυλίου και περιλαμβάνουν ταλαντωτές (*undulators*) ή ταλαντωτές μεγάλης απόκλισης (*wigglers*). Ουσιαστικά, οι μαγνήτες καμπυλότητας εκτρέπουν την τροχιά των ηλεκτρονίων, με την αλλαγή της κατεύθυνσης της ταχύτητας του – κατ' επέκταση της κινητικής τους κατάστασης – να οδηγεί στην εκπομπή των ακτίνων X. Οι συσκευές εισαγωγής επάγουν την εκπομπή των ακτίνων X ομοίως με την αλλαγή του διανύσματος της ταχύτητας των ηλεκτρονίων, αλλά μέσω της ταλάντωσης τους, η οποία στηρίζεται στην εφαρμογή εναλλασσόμενου μαγνητικού πεδίου (Als-Nielsen & McMorro, 2011; Bharti & Goyal, 2019).



Εικόνα Ι.5.3. Σχηματική αναπαράσταση των κύριων τμημάτων ενός σύγχροτρον (Sochi, 2010).

I.6 Περίθλαση Ακτίνων Χ

Η περίθλαση (*diffraction*) συνιστά ένα φαινόμενο που προκύπτει από την αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την περιοδικά διευθετημένη ύλη στο χώρο (Rupp, 2010). Συγκεκριμένα, κατά την περίθλαση, ένα κύμα ανακατευθύνεται προς όλες τις κατευθύνσεις καθώς προσπίπτει σε ένα στόχο. Σε μικροσκοπικό επίπεδο, η προσπίπτουσα προς την περιοδικά οργανωμένη ύλη ακτινοβολία επάγει την ταλάντωση των ηλεκτρονίων των ατόμων που την αποτελούν, με αποτέλεσμα αυτά να εκπέμπουν ακτινοβολία προς όλες τις κατευθύνσεις. Στα κρυσταλλογραφικά πειράματα αξιοποιείται η τεχνική της περίθλασης των ακτίνων Χ λόγω της κυματικής φύσης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και του μήκους κύματος που χαρακτηρίζει τις ακτίνες Χ και είναι ανάλογο των διατομικών αποστάσεων εντός του κρυστάλλου.

I.6.1 Περίθλαση από Κρυστάλλους

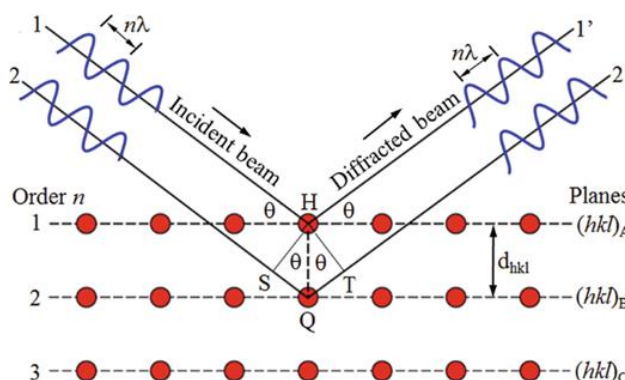
Η εφαρμογή της τεχνικής της περίθλασης ακτίνων Χ στην κρυσταλλογραφική έρευνα βασίζεται στα χαρακτηριστικά της κρυσταλλικής δομής, η οποία επιτρέπει την ισχυρή σκέδαση των ακτίνων Χ λόγω της περιοδικής διευθέτησης ενός πλήθους μορίων στο χώρο. Οι ακτίνες Χ που εκπέμπονται δευτερογενώς συμβάλλουν μεταξύ τους είτε ενισχυτικά είτε αποσβεστικά, ανάλογα με τη γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας και τις αποστάσεις των κρυσταλλικών επιπέδων του πλέγματος. Το φαινόμενο της περίθλασης παρατηρείται στην περίπτωση της ενισχυτικής συμβολής των κυμάτων, η οποία προϋποθέτει την τήρηση του νόμου του *Bragg*.

I.6.1.1 Νόμος του *Bragg*

Η περίθλαση, όπως προαναφέρθηκε, προκύπτει μόνο όταν τα κύματα των ακτίνων Χ που σκεδάζονται συμβάλλουν ενισχυτικά. Η συνθήκη αυτή προαπαιτεί τη συμφωνία φάσεων των εκπεμπόμενων κυμάτων, δηλαδή η διαφορά φάσης των κυμάτων πρέπει να ισούται με μηδέν ($\Delta\phi=0$) ή να είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του 2π ($\Delta\phi=n2\pi$, n =ακέραιος αριθμός). Για να πληρείται η ανωτέρω συνθήκη πρέπει να τηρείται ο **νόμος του *Bragg***, ο οποίος περιγράφεται από την ακόλουθη σχέση:

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

όπου n ένας ακέραιος αριθμός, λ το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, d η απόσταση μεταξύ των εκάστοτε κρυσταλλογραφικών επιπέδων που σκεδάζουν την ακτινοβολία και θ η γωνία εκτροπής των ακτίνων Χ που ταυτίζεται με τη γωνία πρόσπτωσης.



Εικόνα I.6.1. Μοντέλο περίθλασης ακτίνων Χ από επίπεδα ατόμων (Perez, 2020).

Βάσει του νόμου του *Bragg*, ενισχυτική συμβολή συμβαίνει μόνο όταν η διαφορά της διαδρομής που διανύει ένα κύμα σε σχέση με ένα άλλο είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος. Αυτό αποδεικνύεται γεωμετρικά με δεδομένο ότι η απόσταση που διανύει μια προσπίπτουσα ακτίνα ισούται με αυτήν που διανύει η περιθλούσα – ωστόσο η προσπίπτουσα και η περιθλούσα ακτίνα από ένα ενδότερο επίπεδο διανύει μεγαλύτερη απόσταση συγκριτικά με ένα εξωτερικό επίπεδο. Στην Εικόνα I.6.1 η ανωτέρω διαφορά διαδρομής ισούται με $SQ + QT$ και δεδομένου της ενισχυτικής συμβολής ισχύει η σχέση

$$SQ + QT = n\lambda \quad (1).$$

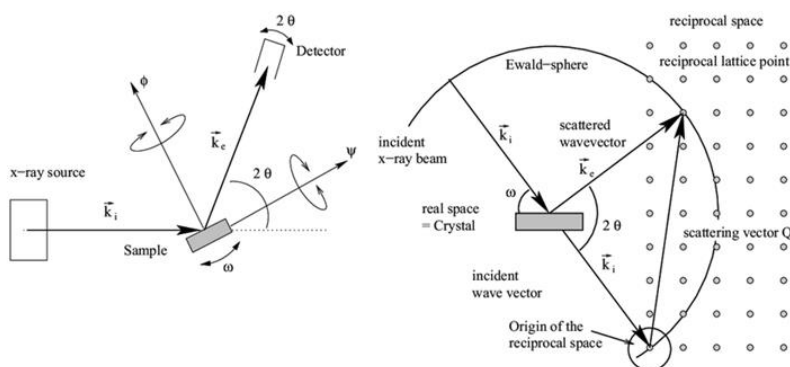
Από τα τρίγωνα SQH και TQH, προκύπτει βάσει τριγωνομετρίας ότι:

$$SQ = HQ \cdot \sin\theta \quad (2) \text{ και } TQ = HQ \cdot \sin\theta \quad (3)$$

Δεδομένου ότι $HQ = d_{hkl}$, ο συνδυασμός των σχέσεων (1), (2) και (3) αποδίδει την εξίσωση του νόμου του *Bragg*.

I.6.1.2 Σφαίρα του *Ewald*

Η μαθηματική περιγραφή του φαινομένου της περίθλασης περιλαμβάνει την έννοια του **αντίστροφου πλέγματος**, το οποίο – σε αντίθεση με το κρυσταλλικό πλέγμα που ταυτίζεται με το ευθύ πλέγμα – συνιστά τμήμα του αντίστροφου χώρου. Κάθε σημείο του αντίστροφου πλέγματος αντιστοιχεί σε μια οικογένεια επιπέδων του κρυσταλλικού πλέγματος, ενώ η απόσταση του από την αρχή των αξόνων συσχετίζεται με την απόσταση μεταξύ των κρυσταλλογραφικών επιπέδων που παρατηρείται στον ευθύ χώρο. Το σήμα περίθλασης αποτυπώνεται στον ανιχνευτή με τη μορφή κηλίδων, με τις κηλίδες περίθλασης να προσδιορίζονται ως τα σημεία τομής των περιθλούντων κυμάτων με τη **σφαίρα του *Ewald***. Η σφαίρα του *Ewald* αποτελεί μια νοητή γεωμετρική δομή με ακτίνα $1/\lambda$, στο κέντρο της οποίας εντοπίζεται ο κρύσταλλος. Κάθε σημείο του αντίστροφου χώρου που βρίσκεται στην περιφέρεια της σφαίρας επαληθεύει το νόμο του *Bragg*, αντιστοιχώντας σε μια οικογένεια κρυσταλλογραφικών επιπέδων του ευθέος πλέγματος, ενώ η απόσταση του εκάστοτε σημείου από την αρχή του αντίστροφου χώρου προσδιορίζεται ως διάνυσμα d_{hkl}^* και ισούται με το αντίστροφο του αντίστοιχου d_{hkl} ($d_{hkl}^* = 1/d_{hkl}$) (Ameht, 2019). Η γεωμετρική αυτή δομή επιτρέπει τη σύνδεση της τρισδιάστατης οργάνωσης του κρυστάλλου με τα δισδιάστατα δεδομένα περίθλασης στον ανιχνευτή. Με την περιστροφή του κρυστάλλου διαφορετικά σημεία του αντίστροφου πλέγματος έρχονται σε επαφή με την περιφέρεια της σφαίρας, αποδίδοντας ένα πλήρες μοτίβο περίθλασης που να καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής.



Εικόνα I.6.2. Σχηματική αναπαράσταση της σφαίρας του *Ewald* (Chierchia, 2007).

1.6.2 Μέθοδοι Περίθλασης

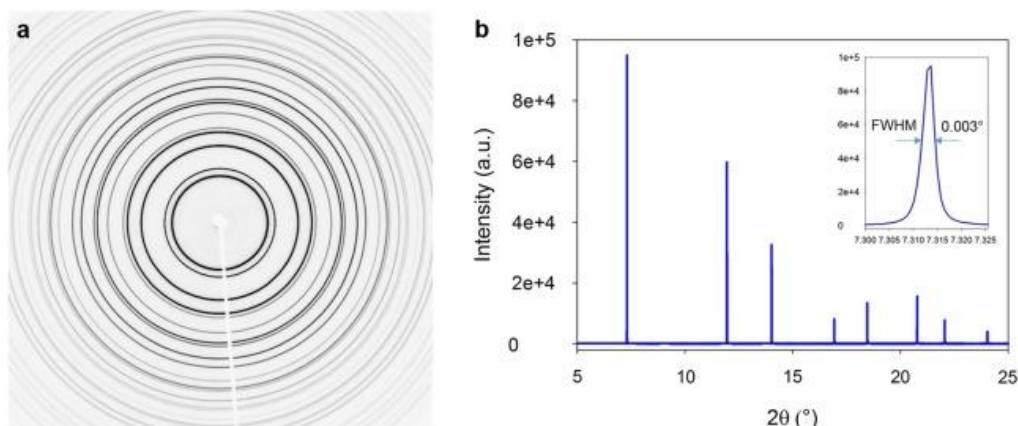
Ο χαρακτηρισμός της κρυσταλλικής δομής μέσω περίθλασης ακτίνων Χ μπορεί να πραγματοποιηθεί με διαφορετικές πειραματικές τεχνικές εξαρτώμενες από τον τύπο του κρυσταλλικού δείγματος που λειτουργεί ως σκεδαστής της ακτινοβολίας. Ειδικότερα, βάσει του αριθμού και του μεγέθους των κρυστάλλων που συνιστούν το δείγμα, διακρίνονται δύο τεχνικές: η περίθλαση από μονοκρύσταλλο και η περίθλαση από πολυκρυσταλλικό δείγμα.

Στην **περίθλαση ακτίνων Χ από μονοκρύσταλλο** (*Single Crystal X-ray Diffraction, SCXRD*), ένας ευμεγέθους και καλοσηματισμένος κρύσταλλος τοποθετείται μπροστά σε μία μονοχρωματική δέσμη και περιστρεφόμενος αποδίδει το σήμα περίθλασης με τη μορφή κηλίδων. Η θέση των κηλίδων που αποτυπώνονται στον ανιχνευτή καθορίζει τη συμμετρία και τις διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας, ενώ η ένταση τους προσδιορίζει τη θέση των ατόμων εντός της μοναδιαίας κυψελίδας (Amei, 2019).



Εικόνα 1.6.3. Μοτίβο περίθλασης: **(Αριστερά)** Μοτίβο περίθλασης από έναν κρύσταλλο, **(Κέντρο)** Μοτίβο περίθλασης από τέσσερις κρυστάλλους που βρίσκονται σε τυχαίες κατευθύνσεις, **(Δεξιά)** Μοτίβο περίθλασης από πολυκρυσταλλικό δείγμα (https://cmacd.myweb.cs.uwindsor.ca/Teaching/553-class/59-553_Notes12.pdf).

Αντιθέτως, στην **περίθλαση ακτίνων Χ από πολυκρυσταλλικό δείγμα** (*X-ray Powder Diffraction, XRPD*) ένα σύνολο πολυάριθμων και τυχαία προσανατολισμένων κρυστάλλων αποδίδει το σήμα περίθλασης με τη μορφή ομόκεντρων κύκλων. Η μορφή με την οποία αποτυπώνεται το σήμα περίθλασης αποτελεί ορόσημο που απορρέει από την τεχνική *Debye-Scherrer* – μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική κατά την οποία μονοχρωματική ακτινοβολία προσπίπτει σε περιστρεφόμενο πολυκρυσταλλικό δείγμα, με αποτέλεσμα η περίθλαση της ακτινοβολίας από τις οικογένειες των κρυσταλλογραφικών επιπέδων των διαφόρων κρυστάλλων. Ουσιαστικά, ο σχηματισμός των ομόκεντρων κύκλων οφείλεται στην αποτύπωση πολυάριθμων κηλίδων περίθλασης που προκύπτουν λόγω του υψηλού αριθμού των κρυστάλλων αλλά και της τυχαίου προσανατολισμού τους. Κάθε δακτύλιος αντιστοιχεί σε μια οικογένεια κρυσταλλογραφικών επιπέδων που περιθλά την ακτινοβολία σε ίδια γωνία 2θ , ενώ το πάχος των δακτυλίων σχετίζεται με την ένταση των περιθλούσων ακτίνων Χ. Σε τελική μορφή το σήμα περίθλασης εκφράζεται σε διάγραμμα που σχετίζει την ένταση των ανακλάσεων *Bragg* συναρτήσει της γωνίας 2θ με τη μορφή κορυφών, όπου κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε ένα δακτύλιο (Margiolaki et al., 2007).



Εικόνα 1.6.4. (a) Σήμα περίθλασης από πολυκρυσταλλικό δείγμα, (b) Το διάγραμμα της έντασης συναρτήσει της γωνίας 2θ (Dejoie et., 2019).

II. Κρυσταλλογραφική Μελέτη Φαρμακευτικών Μορίων

Η κρυσταλλογραφία ακτίνων X, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για τη δομική μελέτη φαρμακευτικών μορίων. Η αποσαφήνιση της δομής τους κατέχει καίριο ρόλο για την κατανόηση της λειτουργίας του, ενώ η συνδυαστική διερεύνηση της κρυσταλλικής τους δομής συμβάλλει στο σχεδιασμό και την ανάπτυξη σταθερών και αποτελεσματικών φαρμακευτικών σκευασμάτων. Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία περιλαμβάνεται η κρυσταλλογραφική μελέτη της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του οργανικού προσδέτη 4-βρωμορεσορσινόλη υπο μεταβαλλόμενες συνθήκες φυσικοχημικού περιβάλλοντος με στόχο τον προσδιορισμό των συνθηκών που συμβάλλουν στη σταθερότητα των ινσουλινικών σκευασμάτων.

II.1 Ινσουλίνη και Διαβήτης

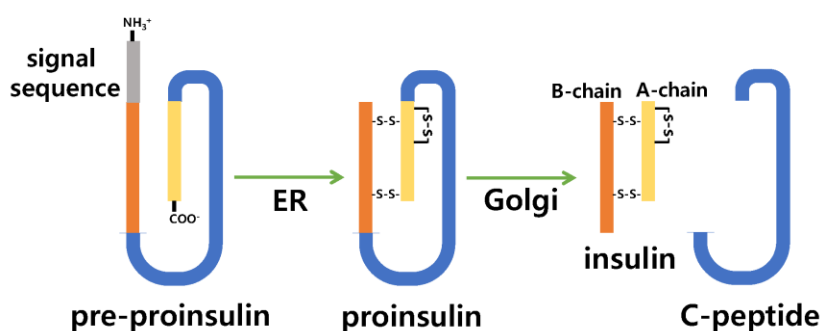
Η ινσουλίνη αποτελεί μια πεπτιδική ορμόνη 51 αμινοξέων, η οποία φέρει μοριακό βάρος των 5.8 kDa, ενώ η παραγωγή της εκτελείται στα β κύτταρα των νησίδων *Langerhans* του παγκρέατος ως απόκριση στην αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης και άλλων θρεπτικών συστατικών (αμινοξέων και ελεύθερων λιπαρών οξέων) στο αίμα, στη διέγερση του παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος κατόπιν της λήψης τροφής και στην παρουσία ινκρετινών (Park et al., 2021; Sherwood, 2016). Ο καίριος ενδοκρινής ρόλος της στο μεταβολισμό οργανικών ενώσεων (υδατανθράκων, λιπιδίων και πρωτεϊνών) καθιστά υπαίτια την ανεπαρκή της δράση για την πρόκληση του **σακχαρώδη διαβήτη**. Η διαταραχή αυτή διακρίνεται, βάσει της ικανότητας του παγκρέατος να εκκρίνει ινσουλίνη, σε σακχαρώδη διαβήτη τύπου I, ο οποίος χαρακτηρίζεται από πλήρη απουσία της ορμόνης και σε σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, στον οποίο παρατηρούνται φυσιολογικά ως ελαφρώς αυξημένα επίπεδα εκκρινόμενης ινσουλίνης αλλά με μειωμένη ανταπόκριση των κυττάρων στο ερέθισμα της.

II.1.1 Βιοσύνθεση και Έκκριση της Ινσουλίνης

Η έκκριση της ινσουλίνης αποτελεί την πρώτη απόκριση στα υψηλά επίπεδα γλυκόζης – ωστόσο, πρωταρχικό βήμα συνιστά η παραγωγή ενός πρόδρομου μορίου, το οποίο είναι γνωστό ως προ-προϊνσουλίνη (*pre-proinsulin*) και περιλαμβάνει μια αλληλουχία 24 υδρόφοβων αμινοξέων για την

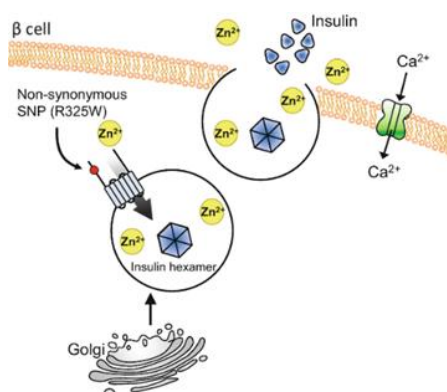
καθοδήγηση του στον αυλό του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου. Με την είσοδο του πρόδρομου μορίου στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου, η κατευθυντήρια αλληλουχία αποκόπτεται και σχηματίζει το μόριο της προϊνσουλίνης (*proinsulin*) (Weiss, Steiner, Philipson, 2014).

Εν συνεχεία, η προϊνσουλίνη αναδιπλώνεται με το σχηματισμό τριών δισουλφιδικών δεσμών και κατά την παραμονή της στα εκκριτικά κυστίδια του συμπλέγματος *Golgi* τέμνεται από μια ενδοπρωτεάση παρόμοια της τρυψίνης και μια εξωπεπτιδάση παρόμοια της καρβοξυπεπτιδάσης B. Ειδικότερα, η ενδοπρωτεάση πέπτει το μόριο σε δύο δέσεις που εντοπίζονται μετά από δύο ζεύγη βασικών αμινοξέων, ενώ η εξωπεπτιδάση απομακρύνει τα βασικά κατάλοιπα (Weiss, Steiner, Philipson, 2014). Το τμήμα που αποκόπτεται ονομάζεται πεπτίδιο C και η απομάκρυνση του στηρίζεται στο σχηματισμό εξαμερών προϊνσουλίνης. Ο σχηματισμός των εξαμερών απαιτεί την παρουσία ιόντων ψευδαργύρου ή ασβεστίου και καθιστά το πεπτίδιο C προσβάσιμο στα πρωτεολυτικά ένζυμα (Dunn, 2005).



Εικόνα II.1.1. Τα στάδια βιοσύνθεσης της ινσουλίνης (Yoon et al., 2023).

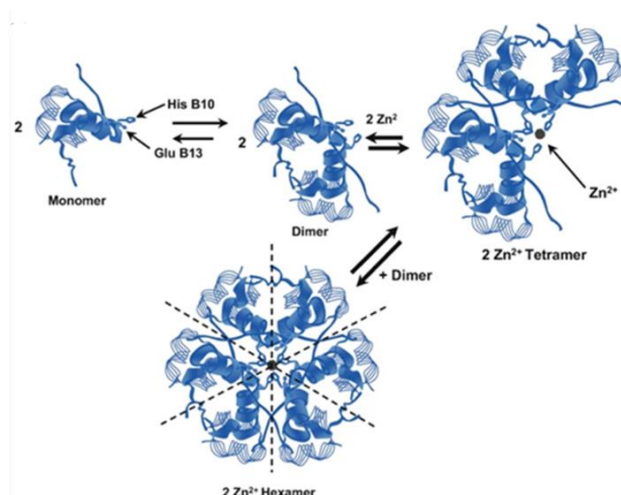
Τα εξαμερή ινσουλίνης, που σχηματίζονται στα εκκριτικά κυστίδια, συγκεντρώνονται σε μικροκρυστάλλους λόγω της μειωμένης διαλυτότητας τους, γεγονός που θεωρείται ότι προσδίδει επιπλέον προστασία έναντι της δράσης πρωτεολυτικών ενζύμων. Με την έκκριση της ινσουλίνης σε ένα περιβάλλον με χαμηλή συγκέντρωση ιόντων Zn^{2+} ή Ca^{2+} και υψηλότερο pH, οι μικροκρυσταλλοί διασπώνται και τα εξαμερή μετατρέπονται σε μονομερή, τα οποία αποτελούν την ενεργή μορφή της ινσουλίνης (Fukunaka & Fujitani, 2019).



Εικόνα II.1.2. Έκκριση της ινσουλίνης (Fukunaka & Fujitani, 2019).

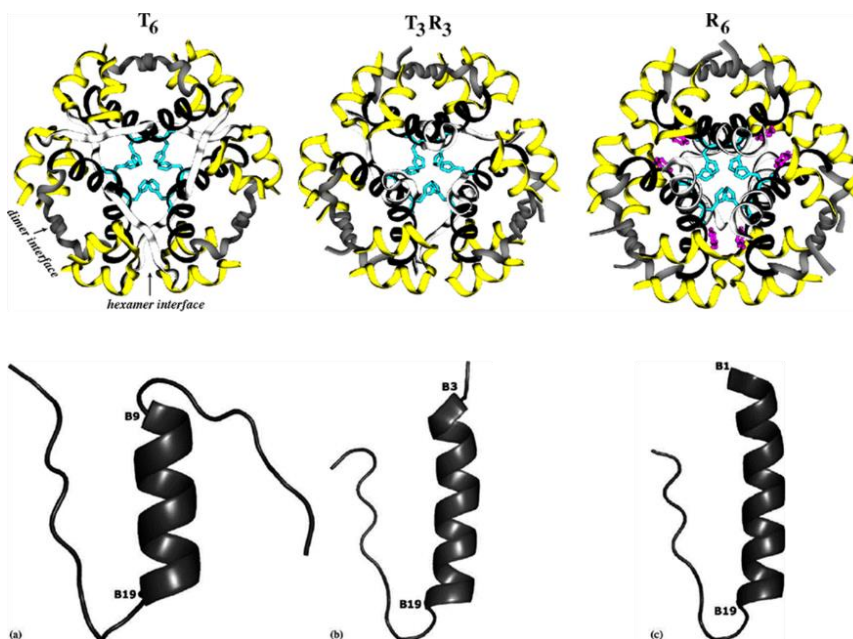
II.1.2 Ινσουλίνη: Δομή και Μοριακές Διαμορφώσεις

Το τελικό μόριο της ινσουλίνης, το οποίο συνιστά και την ενεργή μορφή της, αποτελείται από δυο πεπτιδικές αλυσίδες Α και Β των 21 και 30 αμινοξέων αντίστοιχα, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους μέσω δυο δισουλφιδικών δεσμών που σχηματίζονται μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης Α7-Β7 και Α20-Β19 – στη τριτοταγή δομή του μορίου συμβάλει επίσης ο σχηματισμός μιας δισουλφδικής γέφυρας που σχηματίζεται εσωτερικά της αλυσίδας Α μεταξύ των κυστεϊνικών καταλοίπων Α6-Α11. Ωστόσο, παρουσία ιόντων ψευδαργύρου, όπως προαναφέρθηκε, σχηματίζει σύμπλοκα εξαμερών. Τα ιόντα Zn^{2+} εντοπίζονται στο κέντρο των εξαμερών, με κάθε κατιόν να αλληλεπιδρά είτε με τρία κατάλοιπα HisB10 και ένα ανιόν (τετραεδρική οργάνωση) είτε με τρία κατάλοιπα HisB10 και τρία μόρια νερού (οκταεδρική οργάνωση). Κάθε εξαμερές αποτελεί ένα τριμερές διμερών ινσουλίνης το οποίο σταθεροποιείται με την παρουσία δύο ιόντων ψευδαργύρου. Ένα διμερές ινσουλίνης προκύπτει από την αλληλεπίδραση των καρβοξυτελικών άκρων των β αλυσίδων δύο μονομερών μέσω δεσμών υδρογόνου. Ειδικότερα, σε πρώτο στάδιο, δύο διμερή συνδυάζονται με δύο ιόντα Zn^{2+} , σχηματίζοντας κατ' αυτό τον τρόπο ένα τετραμερές. Σε τελευταίο στάδιο, ένα επιπλέον διμερές προσδένεται στο ανωτέρω σύμπλοκο, ολοκληρώνοντας το σχηματισμό του εξαμερούς (Dunn, 2005; Zoete et al., 2005).



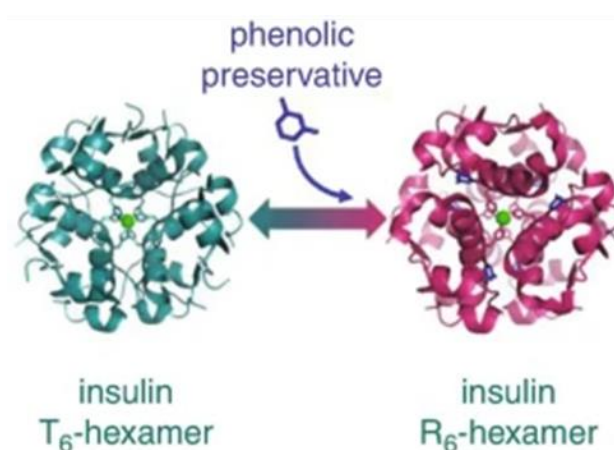
Εικόνα II.1.3. Σχηματισμός εξαμερών ινσουλίνης. Οι αλυσίδες Α απεικονίζονται με ανοιχτό κυανό ενώ οι αλυσίδες Β με σκούρο κυανό χρώμα (Fukunaka & Fujitani, 2019).

Τα εξαμερή που προκύπτουν από την προαναφερθείσα διαδικασία δύναται να παρουσιάσουν τρεις διαφορετικές μοριακές διαμορφώσεις, οι οποίες διακρίνονται βάσει της διαμόρφωσης του αμινοτελικού άκρου της β αλυσίδας σε T_6 , $T_3R'_3$ και R_6 . Ο συμβολισμός αυτός αντιστοιχεί στην διάταξη του αμινοτελικού άκρου της β αλυσίδας κάθε μονομερούς, ενώ ο δείκτης προσδιορίζει τον αριθμό των μονομερών που φέρουν την αντίστοιχη διαμόρφωση. Συγκεκριμένα, στην T_6 διαμόρφωση όλα τα μονομερή παρουσιάζουν T διαμόρφωση, η οποία χαρακτηρίζεται από την εκτεταμένη διάταξη των καταλοίπων Β1-Β6. Στη διαμόρφωση $T_3R'_3$ τρία μονομερή φέρουν εκτεταμένη T διαμόρφωση ενώ τρία χαρακτηρίζονται από τη διαμόρφωση R' (*frayed*), όπου στην τελευταία τα κατάλοιπα Β1-Β2 διατάσσονται σε T διαμόρφωση ενώ τα κατάλοιπα Β3-Β19 σχηματίζουν δομή α-έλικας. Στην R_6 διαμόρφωση όλα τα μονομερή χαρακτηρίζονται από τη διαμόρφωση R , στην οποία τα κατάλοιπα Β1-Β19 φέρουν δομή α-έλικας (Weiss, 2009).



Εικόνα II.1.4. Επάνω: Οι τρεις διαμορφώσεις της εξαμερούς ινσουλίνης. Κάτω: Οι τρεις διαμορφώσεις του αμινοτελικού άκρου της β αλυσίδας. Κάθε διάταξη του αμινοτελικού άκρου αντιστοιχεί στην ανωτέρω εξαμερική διαμόρφωση (Vashisth, 2015; Bhatnagar et al., 2006).

Η μετάβαση από τη μια διαμόρφωση στην άλλη οφείλεται στην πρόσδεση μικρών μορίων (*ligands*) στις αλλοστερικές θέσεις του εξαμερικού συμπλόκου, στις οποίες περιλαμβάνονται μια ανιονική θέση ικανή να δεσμεύει μονοσθενή ανιόντα (πχ Cl^- , SCN^- , OCN^- , CN^- , N_3^- και NO_2^-) που αλληλεπιδρούν με ιόντα Zn^{2+} , καθώς και μια φαινολική θέση που προσδένει μόρια φαινόλης και φαινολικών παραγώγων. Η παρουσία φαινολικών παραγώγων (*meta-cresol*, *resorcinol*, *methylparaben*) προκαλεί τη μετάβαση από τη T στην R διαμόρφωση, ενώ παρουσιάζει επίσης αντιμικροβιακή δράση, βρίσκοντας εφαρμογή στα φαρμακευτικά σκευάσματα ινσουλίνης (Fili et al., 2015; Karavassili et al., 2012; Norrman & Schluckebier, 2007; Spiliopoulou et al., 2021).



Εικόνα II.1.5. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης των φαινολικών συντηρητικών στη διαμόρφωση της εξαμερούς ινσουλίνης (Beals et al., 2019).

Βάσει κρυσταλλογραφικών αναλύσεων, η εμφάνιση των διαφορετικών διαμορφώσεων βασίζεται στο χημικό περιβάλλον και την ύπαρξη μικρών μορίων και ιόντων. Η T_6 διαμόρφωση παρατηρείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις ανιόντων. Η T_3R_3' διαμόρφωση δύναται να προκύπτει απουσία ή παρουσία φαινολικών παραγώγων, αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις ανιόντων, φέροντας τρεις φαινολικές θέσεις και μια ανιονική. Η R_6 διαμόρφωση επάγεται σε υψηλές συγκεντρώσεις ανιόντων και παρουσία φαινολικών παραγώγων, φέροντας έξι φαινολικές και δύο ανιονικές θέσεις (Derewenda et al., 1989; Dunn, 2005; Karavassili et al., 2017; Norrman & Schluckebier, 2007). Όσον αφορά τη φυσική και χημική σταθερότητα του συμπλόκου, διαφέρει μεταξύ των τριών διαμορφώσεων – ένα χαρακτηριστικό που επηρεάζει σημαντικά τη διάρκεια δράσης των ινσουλινικών σκευασμάτων. Η διαφορά ως προς τη σταθερότητα μεταξύ των τριών αλλοστερικών καταστάσεων εκφράζεται ως εξής: $R_6 > T_3R_3' > T_6$ και βασίζεται στη συγγένεια πρόσδεσης των ιόντων ψευδαργύρου, η οποία επηρεάζεται από τη διάταξη του αμινοτελικού άκρου της β αλυσίδας (Rahuel-Clermont et al., 1997).

II.1.3 Η Σημασία της Ινσουλίνης στην Αντιμετώπιση του Διαβήτη

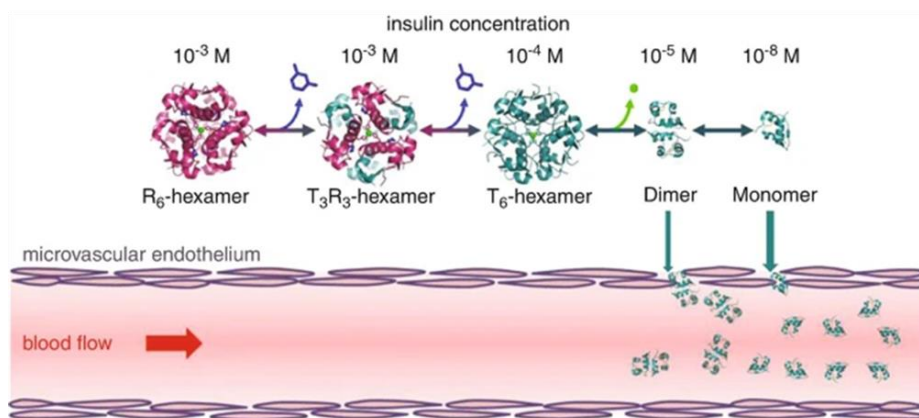
Η θεραπεία έναντι του σακχαρώδους διαβήτη στηρίζεται στην εξωγενή χορήγηση της ινσουλίνης μέσω υποδόριας ένεσης. Ειδικότερα, η χορήγηση ινσουλίνης εφαρμόζεται στην αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου Ι, ο οποίος συνιστά την ινσουλινοεξαρτώμενη μορφή της διαταραχής.

Τα φαρμακευτικά σκευάσματα που αξιοποιούνται στην αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου Ι περιέχουν την ινсуλίνη σε άμορφη ή/και κρυσταλλική μορφή και κατηγοριοποιούνται βάσει του χρόνου απορρόφησης και της διάρκειας δράσης σε μακράς (*long acting*), ενδιάμεσης (*intermediate acting*) και ταχείας δράσης (*short acting*), με τα δύο πρώτα να δρουν κατά την απουσία τροφής, ενώ τα τελευταία αντικαθιστούν την έκκριση της ινσουλίνης κατά την πρόσληψη τροφής. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται και τα ανάλογα ινσουλίνης, τα οποία περιέχουν την ινσουλίνη σε τροποποιημένη μορφή. Η ανάπτυξη των διαφορετικών ινσουλινικών σκευασμάτων έγκειται στις διαφορετικές ανάγκες των διαβητικών ασθενών και αποσκοπεί στην ικανοποίηση των φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών απαιτήσεων της εκάστοτε περίπτωσης (Bhatnagar et al., 2006; Galdo et al., 2014).

II.1.3.1. Μικροκρυσταλλικά Φαρμακευτικά Σκευάσματα

Η δράση των ινσουλινικών σκευασμάτων κρυσταλλικού εναιωρήματος βασίζεται στο σχηματισμό σταθερών εξαμερών ινσουλίνης και συνοδεύεται από την αντιμικροβιακή δράση των φαινολικών παραγώγων, όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο II.1.2. Τα φαρμακευτικά σκευάσματα που φέρουν τα ανωτέρω χαρακτηριστικά συμβάλλουν στην επιβράδυνση της απορρόφησης της ινσουλίνης, διότι πρωταρχικό στάδιο αποτελεί η αποσυναρμολόγηση των κρυστάλλων των εξαμερών ινσουλίνης με την ακόλουθη διάσπαση των εξαμερών σε διμερή (μέσω της διάχυσης των ιόντων Zn^{2+}), τα οποία σε τελικό στάδιο αποδίδουν την ενεργή μορφή της μονομερούς ινσουλίνης.

Κρυσταλλογραφικές έρευνες επικεντρώνονται στον προσδιορισμό συνθηκών και μικρών οργανικών μορίων που να συμβάλλουν στη βελτίωση των χαρακτηριστικών των κρυστάλλων (μέγεθος, σχήμα και πακετάρισμα των μορίων), με απώτερο στόχο την αύξηση της διάρκειας δράσης του σκευάσματος και κατ' επέκταση τη μείωση των απαιτούμενων δόσεων εντός της ημέρας.



Εικόνα II.1.6. Σχηματική αναπαράσταση της πορείας απορρόφησης της ινσουλίνης έπειτα από υποδόρια ένεση (Beals et al., 2019).

II.1.3.2 Ανασυνδυασμένα/Συνθετικά Ανάλογα Ινσουλίνης

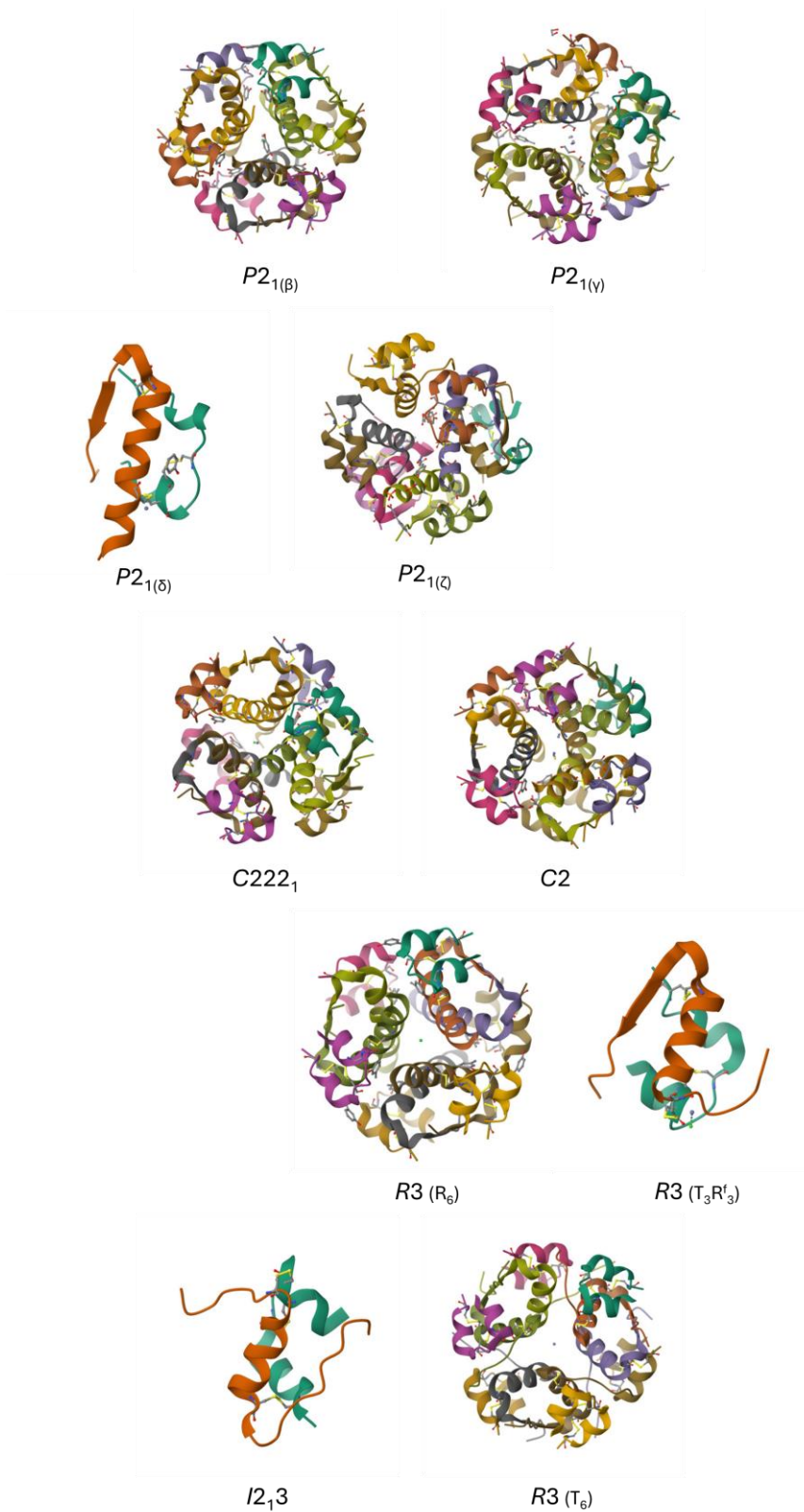
Η ανάπτυξη των αναλόγων ινσουλίνης βασίζεται στην τροποποίηση των μορίων της ινσουλίνης αξιοποιώντας τεχνικές της μοριακής γενετικής. Μεταξύ των τροποποιήσεων περιλαμβάνονται αντικαταστάσεις ή προσθήκες αμινοξέων, καθώς και ακυλίωση του με λιπαρό οξύ, οι οποίες προσαρμόζονται με σκοπό τη βελτίωση των χαρακτηριστικών της φαρμακοκινητικής.

Ορισμένες τροποποιήσεις αντιστοιχούν σε αντικαταστάσεις αμινοξέων που αποτρέπουν το σχηματισμό διμερών, διατηρώντας την ινσουλίνη στην ενεργή μονομερική μορφή της. Κατ' αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η γρηγορότερη απορρόφηση της ινσουλίνης και συνεπώς η ταχύτερη απόκριση της στα αυξανόμενα επίπεδα γλυκόζης κατά την πρόσληψη τροφής (Brange et al., 1988). Οι μετατροπές που σχετίζονται με την προσθήκη ενός λιπαρού οξέος στο μόριο της ινσουλίνης αποσκοπούν στην αύξηση του χρόνου δράσης της ινσουλίνης μέσω πρόσδεσης το τροποποιημένου μορίου στην αλβουμίνη του ορού, η οποία εμφανίζει μειωμένο ρυθμό κάθαρσης από το αίμα (Bhatnagar et al., 2006).

II.2 Μελέτη Πολυμορφισμού της Ανθρώπινης Ινσουλίνης

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε διερεύνηση του κρυσταλλικού πολυμορφισμού της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του οργανικού προσδέτη 4-βρωμορεσορσινόλη (4-bromoresorcinol, brm) και σε συνθήκες μεταβαλλόμενου χημικού περιβάλλοντος. Ειδικότερα, εκπονήθηκε μελέτη της επίδρασης του pH στον πολυμορφισμό της ινσουλίνης, με την εφαρμογή όξινου έως και βασικού περιβάλλοντος.

Σε εγγενή κατάσταση, η ινσουλίνη χαρακτηρίζεται από ρομβοεδρική συμμετρία ($R3$), φέροντας διαμόρφωση T_6 και $T_3R'_3$ σε ελαφρώς όξινο και ουδέτερο pH αντίστοιχα, ενώ σε βασικό pH χαρακτηρίζεται από κυβική συμμετρία ($I2_13$) σχηματίζοντας διμερή με διαμόρφωση T_2 . Δεδομένου των ανωτέρω, επισημαίνεται η συμβολή του pH τόσο στον κρυσταλλικό όσο και στο μοριακό πολυμορφισμό της ινσουλίνης. Επιπλέον, κρυσταλλογραφικές μελέτες αναδεικνύουν ένα ευρύτερο φάσμα κρυσταλλικού πολυμορφισμού παρουσία οργανικών προσδετών (φαινολικών και μη). Υπό την επίδραση οργανικών μορίων παρατηρείται η εμφάνιση πολυμόρφων μονοκλινούς ($P2_{1(a)}$, $P2_{1(\beta)}$, $P2_{1(\gamma)}$, $P2_{1(\delta)}$, $P2_{1(\zeta)}$ και $C2$) και ορθορομβικής συμμετρίας ($C222_1$), καθώς επίσης πολύμορφα ρομβοεδρικής συμμετρίας με διαμόρφωση R_6 και $T_3R'_3$ (Karavassili et al., 2017; D. P. Triandafillidis et al., 2023; D.-P. Triandafillidis et al., 2020).



Εικόνα II.2.1. Δομικά μοντέλα διαφορετικών κρυσταλλικών πολυμόρφων της ινσουλίνης. Τα PDB ID των δομικών μοντέλων για κάθε κρυσταλλικό πολύμορφο παρατίθενται ως εξής: $P2_{1(\beta)}$ (1evr), $P2_{1(\gamma)}$ (6gnq), $P2_{1(\delta)}$ (1wav), $P2_{1(\zeta)}$ (6tc2), $C2$ (2olz), $C222_1$ (2om1), $R3$ με διαμόρφωση T_6 , $T_3R'_3$ και R_6 (1mso, 1trz και 1ev3 αντίστοιχα) και $I2_{13}$ (7qac).

II.2.1 Υλικά & Μέθοδοι

Για την διεκπεραίωση της μελέτης του κρυσταλλικού πολυμορφισμού της ανθρώπινης ινσουλίνης πραγματοποιήθηκαν πειράματα συγκρυστάλλωσης της ινσουλίνης με το φαινολικό παράγωγο της 4-βρωμορεσορσινόλης. Ακολούθησε συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ από πολυκρυσταλλικό δείγμα στον πειραματικό σταθμό ID22 της Ευρωπαϊκής Εγκατάστασης Σύγχροτρον, με τελικό βήμα την ανάλυση των δεδομένων για ταυτοποίηση του κρυσταλλικού πολυμορφισμού και βελτιστοποίηση των πλεγματικών παραμέτρων.

II.2.1.1 Ανάπτυξη Κρυστάλλων με την Τεχνική *Batch*

Για τη μελέτη του πολυμορφισμού του συμπλόκου ανθρώπινης ινσουλίνης – 4-βρωμορεσορσινόλης πραγματοποιήθηκε μια σειρά κρυστάλλωσης σε εύρος pH 4.20 – 8.00 αξιοποιώντας τη μέθοδο *batch*. Στο σύνολο της διαδικασίας παρασκευάστηκαν 20 δείγματα των 0.625 mL – εξετάζοντας διαφορετική τιμή pH σε κάθε δείγμα – τα οποία συγκροτούν την 5^η σειρά κρυστάλλωσης παρουσία του συγκεκριμένου προσδέτη, σε συνέχεια προγενέστερων δοκιμών που διεξήχθησαν στα πλαίσια της ερευνητικής ομάδας.

Για την προετοιμασία του διαλύματος της ινσουλίνης υπολογίστηκε ποσότητα για 21 δείγματα ώστε να υπάρχει επαρκής ποσότητα έναντι των σφαλμάτων που δύναται να συνοδεύουν τους χειρισμούς της πιπέτας. Ειδικότερα, σε πρώτο βήμα προετοιμάστηκε υδατικό διάλυμα ινσουλίνης σε ποσότητα των 10.5 mL και συγκέντρωση 19 mg/mL, μέσω διάλυσης λυοφιλοποιημένης ινσουλίνης σε δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O). Για το σχηματισμό των εξαμερών συμπλόκων προστέθηκαν 1.2075 mL οξικού ψευδαργύρου (Zn(CH₃CO₂) συγκέντρωσης 10 mM και πραγματοποιήθηκαν αναδεύσεις μέχρι το διάλυμα να διαυγάσει. Στη συνέχεια έγινε ανάμιξη με 0.626 mL διαλύματος προσδέτη συγκέντρωσης 1 M, με τον προσδέτη να είναι διαλυμένο σε διμεθυλικό σουλφοξείδιο (*dimethyl sulfoxide*, DMSO). Το σύστημα παρέμεινε στον πάγο για 5 min ώστε να επέλθει πρόσδεση της 4-βρωμορεσορσινόλης και στη συνέχεια έγινε προσθήκη 0.1575 mL διαλύματος NaSCN συγκέντρωσης 1 M για τη σταθεροποίηση του συμπλόκου των εξαμερών με τον προσδέτη. Το αναφερόμενο πρωτόκολλο βασίστηκε σε πρότερες δοκιμές (Σπηλιοπούλου, 2023) και παρατίθεται στον Πίνακα II.2.1.

Πίνακας II.2.1. Η σύσταση του διαλύματος πρωτεΐνης για τη συγκρυστάλλωση με τον οργανικό προσδέτη της 4-βρωμορεσορσινόλης.

Διάλυμα Πρωτεΐνης					
Αριθμός δειγμάτων	HI (19 mg/mL)	ZnAc ₂ (10mM)	4-bromoresorcinol (1M)	Επώαση 5 min	NaSCN (1M)
21	10.5 mL	1.2075 mL	0.626 mL		0.1575 mL
Τελική συγκέντρωση	15.97 mg/mL	0.9667 mM	50.1 mM		12.6 mM
Τελικός όγκος = 12.491 ml					

Κάθε συνθήκη pH παρασκευάστηκε με την ανάμιξη διαλυμάτων μονοβασικού φωσφορικού νατρίου (NaH_2PO_4) και διβασικού φωσφορικού καλίου (K_2HPO_4), όπου αμφότερα έφεραν συγκέντρωση 2 M. Μετά την προετοιμασία των ρυθμιστικών διαλυμάτων με τις επιθυμητές τιμές pH εντός του εύρους που διερευνήθηκε, ακολούθησε ανάμιξη του διαλύματος της πρωτεΐνης με το κάθε ρυθμιστικό διάλυμα σε αναλογία 4:1 (διάλυμα πρωτεΐνης : διάλυμα φωσφορικών ιόντων). Η ανάμιξη των διαλυμάτων διενεργήθηκε σε *Eppendorfs* των 1.5 mL με την σύσταση του τελικού διαλύματος να παρατίθεται στον Πίνακα II.2.2. Τα *Eppendorfs* σφραγίστηκαν με *parafilm* και παρέμειναν σε θερμοκρασία των 20 °C.

Πίνακας II.2.2. Η σύσταση του διαλύματος κρυστάλλωσης για κάθε συνθήκη.

	Διάλυμα Κρυστάλλωσης				
	HI	ZnAc ₂	4-bromoresorcinol	NaSCN	PO4 buffer
Αρχική συγκέντρωση	15.97 mg/mL	0.97 mM	50.1 mM	12.6 mM	2M
Αρχικός όγκος	0.5 mL				0.125 mL
Τελική συγκέντρωση	12.78 mg/mL	0.77 mM	40.06 mM	10.09 mM	0.4 M
Τελικός όγκος = 0.625 mL					

II.2.1.2 Πείραμα Περίθλασης Ακτίνων Χ από Πολυκρυσταλλικά Δείγματα (*X-ray Powder Diffraction*, XRPD)

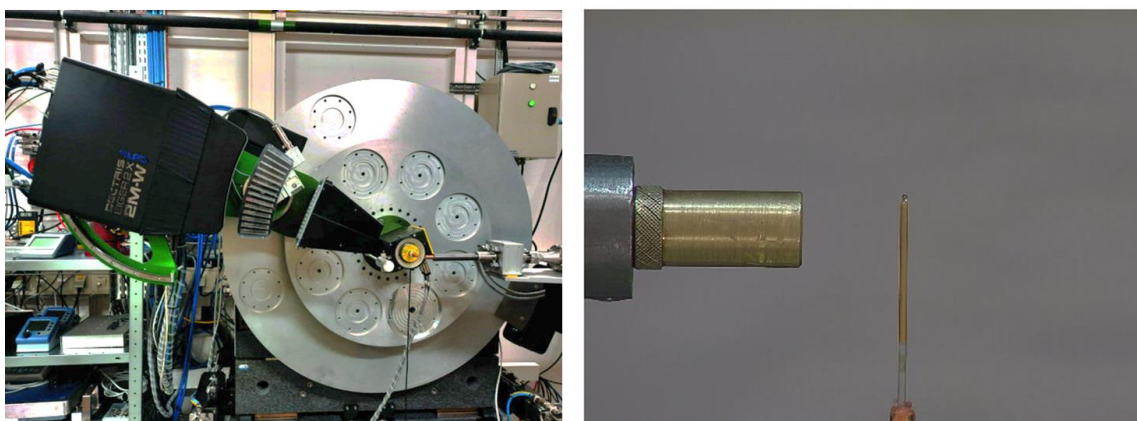
A. Προετοιμασία Δειγμάτων

Ένα πείραμα περίθλασης αποτελείται από δύο στάδια: την προετοιμασία των δειγμάτων και την συλλογή των δεδομένων περίθλασης. Σε πρώτο βήμα πραγματοποιείται μέτρηση του pH κάθε δείγματος, καθώς με την ολοκλήρωση της διαδικασίας της κρυστάλλωσης παρατηρείται μεταβολή της αρχικής τιμής του pH. Ακολούθως, κατά την προετοιμασία των δειγμάτων πραγματοποιείται μεταφορά του πολυκρυσταλλικού δείγματος σε ένα τριχοειδή σωλήνα (*capillary*), ο οποίος συντίθεται από βοριοπιριτικό γυαλί με διάμετρο 1 mm και πάχος 0.1 mm. Για τη διαδικασία αυτή, ο τριχοειδής σωλήνας πληρώνεται με μητρικό υγρό, το οποίο αποτελεί το υπερκείμενο που έχει προκύψει με το πέρας της διαδικασίας της κρυστάλλωσης. Στη συνέχεια, με τη χρήση πιπέτας, προστίθενται ~ 30 μL κρυσταλλικού ιζήματος, το οποίο καθιζάνει στον πυθμένα του τριχοειδή σωλήνα με χαρακτηριστικές κινήσεις τιναγμάτων, ενώ υποβάλλεται συμπληρωματικά σε φυγοκέντρηση (700 g, 7 min) για την επίτευξη του καλύτερου δυνατού πακτώματος του κρυσταλλικού υλικού. Ακολουθεί τομή του δειγματοφορέα σε σημείο κατά το ήμισυ του μήκους του και αφαιρείται ποσότητα μητρικού υγρού με τη χρήση σύριγγας – ωστόσο, ελάχιστη ποσότητα μητρικού υγρού πρέπει να παραμένει στο σύστημα για τη διατήρηση της κρυσταλλικότητας του δείγματος, διότι δύναται να καταρρεύσει σε περίπτωση αφυδάτωσης. Το ανοικτό άκρο του τριχοειδούς σωλήνα σφραγίζεται με γράσο σιλικόνης ή κερί ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση της εναπομείνουσας ποσότητας μητρικού υγρού. Σε τελευταίο στάδιο ο δειγματοφορέας τοποθετείται στο γωνιόμετρο του περιθλασιμέτρου και εκτελείται ευθυγράμμιση του ώστε να μην αποκλίνει κατά την περιστροφή του από το εύρος της δέσμης.

Β. Συλλογή Δεδομένων XRPD στην Ευρωπαϊκή Εγκατάσταση Ακτινοβολίας Σύγχροτον

Η συλλογή δεδομένων περίθλασης από τα πολυκρυσταλλικά δείγματα ινσουλίνης – 4-βρωμορεσορσινόλης πραγματοποιήθηκε στο πειραματικό σταθμό ID22 της Ευρωπαϊκής Εγκατάστασης Ακτινοβολίας Σύγχροτον (*European Synchrotron Radiation Facility*, ESRF), ο οποίος παρέχει υψηλής ευκρίνειας δεδομένα περίθλασης από πολυκρυσταλλικά δείγματα (*high-resolution powder diffraction beamline*). Το ID22 χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά ευθυγραμμισμένη και μονοχρωματική δέσμη, η οποία σε συνδυασμό με τον πολύ-αναλυτή 13 καναλιών Si 111, που βρίσκεται μεταξύ του δείγματος και του ανιχνευτή *Dectris Eiger2 X 2M-W CDTe*, προσδίδει υψηλή γωνιακή ευκρίνεια στα δεδομένα περίθλασης. Ουσιαστικά, ο πολύ-αναλυτής αποτελείται από 13 μονοεπίπεδους κρυστάλλους Si, οι οποίοι περιθλούν δευτερογενώς την ακτινοβολία που εκπορεύεται από το δείγμα σε γωνία 2θ που καθορίζονται από τους ίδιους τους κρυστάλλους.

Τα φωτόνια που προσπίπτουν στον ανιχνευτή πληρούν αυστηρά το νόμο του *Bragg* όπως επιβάλλεται από τους κρυστάλλους του αναλυτή, ελαχιστοποιώντας έτσι την καταγραφή σκέδασης από το περιβάλλον του δείγματος και την ατμόσφαιρα. Ο ανιχνευτής *Dectris Eiger2 X 2M-W CDTe* αποτελεί έναν ανιχνευτή εικονοστοιχείων, του οποίου η αξονική ευκρίνεια παρέχει στενότερες και πιο συμμετρικές κορυφές περίθλασης, περιορίζοντας την αλληλοεπικάλυψη των γειτονικών κορυφών (Fitch et al., 2023).



Εικόνα II.2.2. Αριστερά: Η διάταξη του περιθλασιμέτρου στον πειραματικό σταθμό ID22. Δεξιά: Απεικόνιση πολυκρυσταλλικού δείγματος ινσουλίνης – 4-βρωμορεσορσινόλης κατά τη διάρκεια συλλογής δεδομένων στον πειραματικό σταθμό ID22 (Fitch et al., 2023).

Για τη συλλογή των δεδομένων, τα πολυκρυσταλλικά δείγματα εκτέθηκαν σε ακτινοβολία μήκους κύματος $\lambda=1.07817(3)$ Å. Το πείραμα διεξήχθη σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ το δείγμα περιστρεφόταν 1031 rpm/min. Η φόρτωση των δειγμάτων στο γωνιόμετρο του περιθλασιμέτρου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ρομπότ κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Κάθε δείγμα ακτινοβολήθηκε σε διαδοχικές θέσεις που εκτείνονται στο μήκος του δειγματοφορέα και απέχουν μεταξύ τους 1 mm. Αυτή ενέργεια πραγματοποιείται λόγω της υψηλής λαμπρότητας και έντασης της ακτινοβολίας ή οποία είναι επιζήμια για το δείγμα. Έτσι, συλλέχτηκαν από κάθε δείγμα έως και 10 μοτίβα περίθλασης, τα οποία κατόπιν επεξεργασίας παρέχουν το τελικό μοτίβο περίθλασης προς ανάλυση.

Γ. Ανάλυση Δεδομένων Περίθλασης από Πολυκρυσταλλικό Δείγμα

Η ανάλυση των δεδομένων περίθλασης που συλλέχθηκαν κατά το πείραμα περίθλασης στο ID22 πραγματοποιήθηκε το κρυσταλλογραφικό πακέτο *HighScore Plus* της εταιρείας *Malvern Panalytical*. Εναρκτήριο βήμα αποτελεί η **δεικτοδότηση** (*indexing*), μια διαδικασία που επιτρέπει τον προσδιορισμό των δεικτών *Miller* που αντιστοιχούν σε κάθε κορυφή και των πλεγματικών σταθερών που χαρακτηρίζουν τη μοναδιαία κυψελίδα. Για την διεξαγωγή της δεικτοδότησης εισάγεται το μήκος κύματος της δέσμης που χρησιμοποιήθηκε κατά την ακτινοβολήση του δείγματος και ορίζεται ένα **υπόβαθρο** (*background*) που λειτουργεί ως άξονας αναφοράς για την εύρεση των εντάσεων. Η παρούσα διαδικασία αξιοποιεί ένα χαμηλό εύρος 2θ , με την επιλογή των πρώτων 20-30 κορυφών που εμφανίζουν υψηλή ένταση. Το τελικό αποτέλεσμα περιλαμβάνει ένα σύνολο πιθανών μοναδιαίων κυψελίδων που αντιστοιχούν στο μοτίβο περίθλασης, εκ των οποίων επιλέγεται η μοναδιαία κυψελίδα που εμφανίζει την υψηλότερη συμμετρία. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως η δεικτοδότηση αποτελεί μια απαιτητική έως και αδύνατη διαδικασία στην περίπτωση των μακρομορίων, λόγω της μειωμένης αναλογίας έντασης : θορύβου καθώς και της συνύπαρξης φάσεων που δύναται να χαρακτηρίζει ένα κρυσταλλικό δείγμα ως προς τον πολυμορφισμό του μακρομορίου ή ως προς την παρουσία συγκρυσταλλωμένων παραγόντων κρυστάλλωσης (Spiliouroulou et al., 2020).

Ο πλήρης χαρακτηρισμός της κρυσταλλικής δομής σε επίπεδο μοναδιαίας κυψελίδας απαιτεί, πέραν της διαδικασίας της δεικτοδότησης, τη βελτιστοποίηση και την εξαγωγή εντάσεων. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται μέσω της **ανάλυσης Pawley** (*Pawley fit*) (Pawley, 1981), κατά την οποία οι παράμετροι της μοναδιαίας κυψελίδας, του υποβάθρου, του σχήματος των κορυφών και των εντάσεων βελτιστοποιούνται για την επίτευξη ταύτισης του θεωρητικού με το πειραματικό μοντέλο (Spiliouroulou et al., 2020). Στόχος της βελτιστοποίησης είναι η μείωση της απόκλισης του θεωρητικού μοντέλου από το πειραματικό, η οποία ποσοτικοποιείται μέσω στατιστικών δεικτών αξιοπιστίας (*R-values*), στους οποίους περιλαμβάνεται και ο δείκτης R_{wp} , ο ορίζεται από την ακόλουθη σχέση:

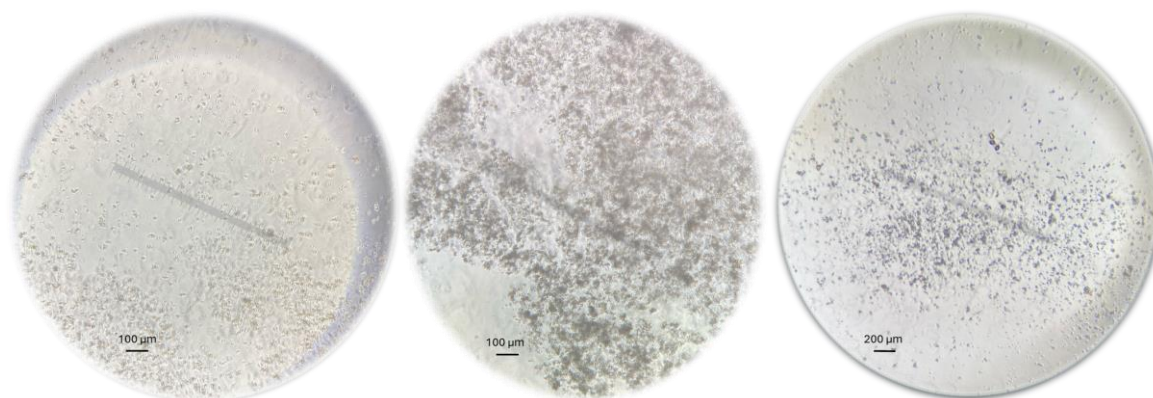
$$R_{wp} = \frac{\sqrt{\sum w(2\theta) [y_o(2\theta) - y_c(2\theta)]^2}}{\sum w(2\theta) [y_o(2\theta)]^2}$$

όπου y_o και y_c συνιστούν τις παρατηρούμενες και τις υπολογισμένες εντάσεις, ενώ το w αποτελεί το συντελεστή στάθμισης (*weighting factor*) που συμπεριλαμβάνει στη στατιστική ανάλυση το πειραματικό σφάλμα σ_{y_o} .

$$w = \frac{1}{\sigma_{y_o}^2(2\theta)}$$

II.2.2 Αποτελέσματα

Η διαδικασία της κρυστάλλωσης που διεξήχθη σε εύρος pH 4.2-8.0 απέδωσε πολυκρυσταλλικά ιζήματα ινσουλίνης – 4-βρωμορεσορσινόλης σε όλες τις εξεταζόμενες συνθήκες. Με την ολοκλήρωση εβδομαδιαίας περιόδου επώασης, πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων, η αποκάλυψε την παρουσία μικροκρυστάλλων. Στην Εικόνα II.2.3 παρατίθενται ενδεικτικές φωτογραφίες από ορισμένα πολυκρυσταλλικά δείγματα.



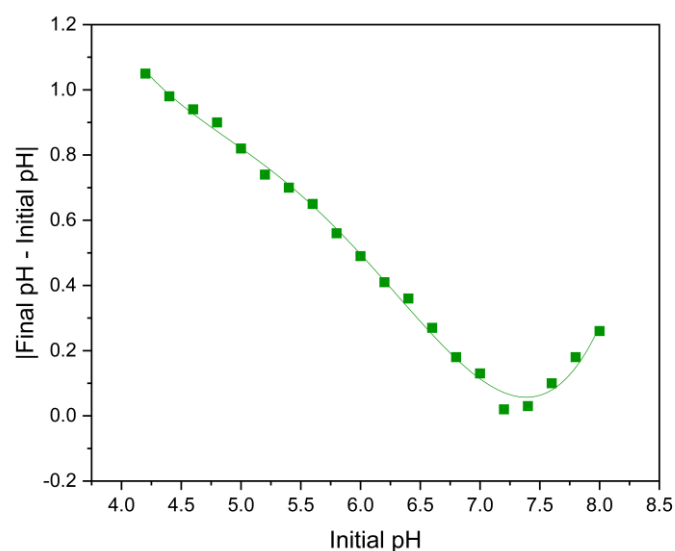
Εικόνα II.2.3. Εικόνες πολυκρυσταλλικών ιζημάτων των δειγμάτων brm55 (αριστερά), brm58 (κέντρο) και brm516 (δεξιά), όπως λήφθηκαν μέσω οπτικής μικροσκοπίας.

Όπως προαναφέρθηκε, πριν την προετοιμασία των δειγμάτων για το πείραμα περίθλασης πραγματοποιήθηκε εκ νέου μέτρηση του pH για κάθε δείγμα, καθώς με τη διαδικασία της κρυστάλλωσης μεταβάλλεται η ιοντική ισχύς του συστήματος και μειώνεται η ρυθμιστική ικανότητα των φωσφορικών διαλυμάτων. Έτσι, στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων συμπεριλαμβάνεται η τελική τιμή του pH για λόγους επιστημονικής ακριβείας και εγκυρότητας ως προς την εμφάνιση του εκάστοτε κρυσταλλικού πολυμόρφου. Στον Πίνακα II.2.3 παρατίθενται οι τιμές του pH των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία της κρυστάλλωσης και οι τελικές τιμές pH που μετρήθηκαν πριν τη διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων για τη συλλογή των δεδομένων περίθλασης, ενώ στην Εικόνα II.2.4 αναπαρίστανται οι μεταβολές του pH, κατά απόλυτη τιμή, συναρτήσει του αρχικού pH κάθε δείγματος.

Πίνακας II.2.3. Τιμές pH που προσδιορίστηκαν πριν τη διεξαγωγή κρυστάλλωσης και πριν τη διεξαγωγή του πειράματος περίθλασης.

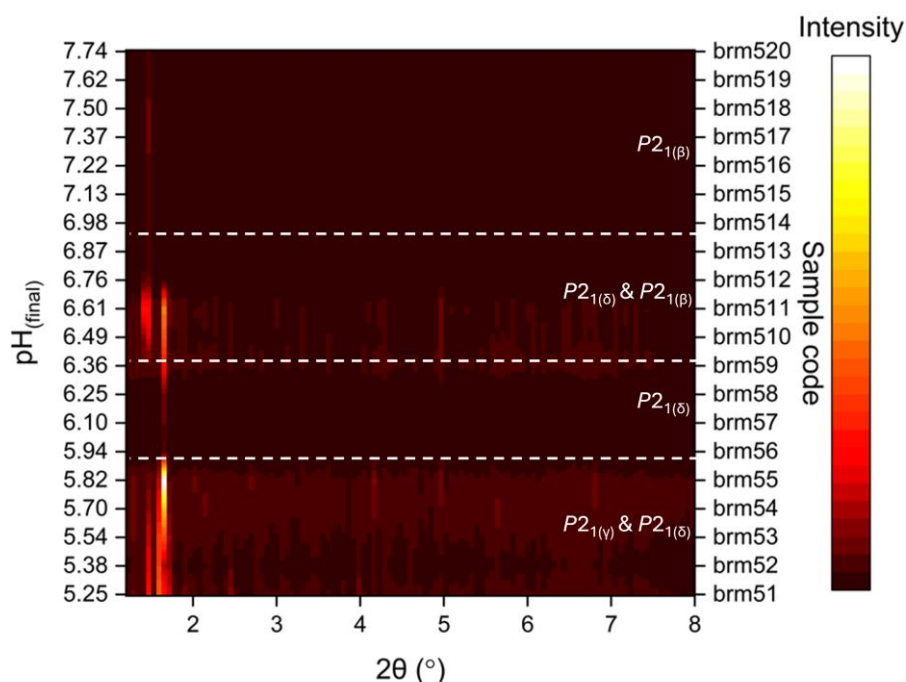
Κωδικός δείγματος	Αρχικό pH	Τελικό pH
brm51	4.20	5.25
brm52	4.40	5.38
brm53	4.60	5.54
brm54	4.80	5.70
brm55	5.00	5.82
brm56	5.20	5.94
brm57	5.40	6.10

brm58	5.60	6.25
brm59	5.80	6.36
brm510	6.00	6.49
brm511	6.20	6.61
brm512	6.40	6.76
brm513	6.60	6.87
brm514	6.80	6.98
brm515	7.00	7.13
brm516	7.20	7.22
brm517	7.40	7.37
brm518	7.60	7.50
brm519	7.80	7.62
brm520	8.00	7.74



Εικόνα II.2.4. Διάγραμμα μεταβολής του pH από την αρχική τιμή σε όλα τα πολυκρυσταλλικά δείγματα του συμπλόκου ανθρώπινης ινσουλίνης – 4-βρωμορεσορσινόλης.

Από την πρωταρχική ανάλυση των δεδομένων περίθλασης που συλλέχθηκαν από τα προαναφερθέντα δείγματα, στο εξεταζόμενο εύρος pH ταυτοποιήθηκαν πολύμορφα μονοκλινούς συμμετρίας και συγκεκριμένα τα $P2_{1(y)}$, $P2_{1(\delta)}$ και $P2_{1(\beta)}$ τα οποία έχουν προσδιοριστεί κατ' εξακολούθηση και σε πρότερα πειράματα κρυστάλλωσης της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία φαινολικών παραγώγων, συμπεριλαμβανομένου και της 4-βρωμορεσορσινόλης (Spiliopoulou et al., 2021). Ο πολυμορφισμός που αναδεικνύεται από τα δεδομένα περίθλασης αποτυπώνεται στο ακόλουθο διάγραμμα επιφανείας, το οποίο παρουσιάζει την κάτοψη του συνόλου των δεδομένων περίθλασης.

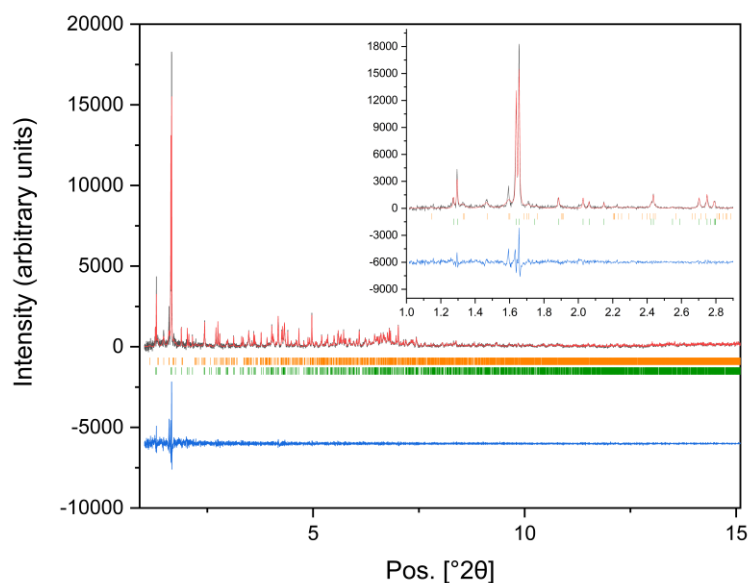


Εικόνα II.2.5. Διάγραμμα επιφανείας δεδομένων XRPD για τα πολυκρυσταλλικά δείγματα ανθρώπινης ινσουλίνης – 4-βρωμορεσορσινόλης.

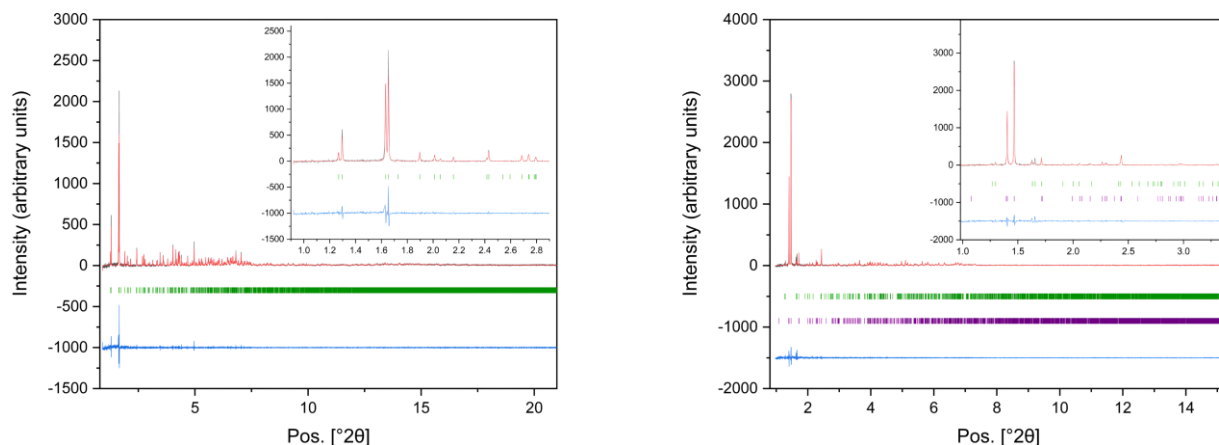
Το πολύμορφο $P2_{1(\gamma)}$ προσδιορίστηκε μόνο σε συνύπαρξη με το πολύμορφο $P2_{1(\delta)}$ σε εύρος pH 5.25 – 5.82. Χαρακτηριστικό δείγμα στο οποίο εμφανίζεται η φάση $P2_{1(\gamma)}$ αποτελεί το brm55 το οποίο εμφανίζει τις εξής πλεγματικές σταθερές: $a = 87.917(8) \text{ \AA}$, $b = 70.213(6) \text{ \AA}$, $c = 48.111(4) \text{ \AA}$ και $\beta = 106.785(2)^\circ$ και όγκο μοναδιαίας κυψελίδας $V = 2.8434(4) (\times 10^5) \text{ \AA}^3$, με την ανάλυση Pawley να χαρακτηρίζεται από $R_{wp} = 4.8860\%$ και $\chi^2 = 1.9345$.

Η φάση $P2_{1(\delta)}$ εμφανίζεται σε συνύπαρξη τόσο με την $P2_{1(\gamma)}$ όσο και με την $P2_{1(\beta)}$, ενώ εμφανίζεται και μεμονωμένα σε εύρος pH 5.94 – 6.36. Το brm58 αποτελεί ένα ενδεικτικό δείγμα για το πολύμορφο $P2_{1(\delta)}$, φέροντας τις ακόλουθες πλεγματικές σταθερές $a = 48.858(1) \text{ \AA}$, $b = 60.089(1) \text{ \AA}$, $c = 47.805(1) \text{ \AA}$ και $\beta = 95.2783(6)^\circ$ και όγκο μοναδιαίας κυψελίδας $V = 1.39751(6) (\times 10^5) \text{ \AA}^3$, ενώ η ανάλυση Pawley χαρακτηρίζεται από $R_{wp} = 3.9330\%$ και $\chi^2 = 1.4214$.

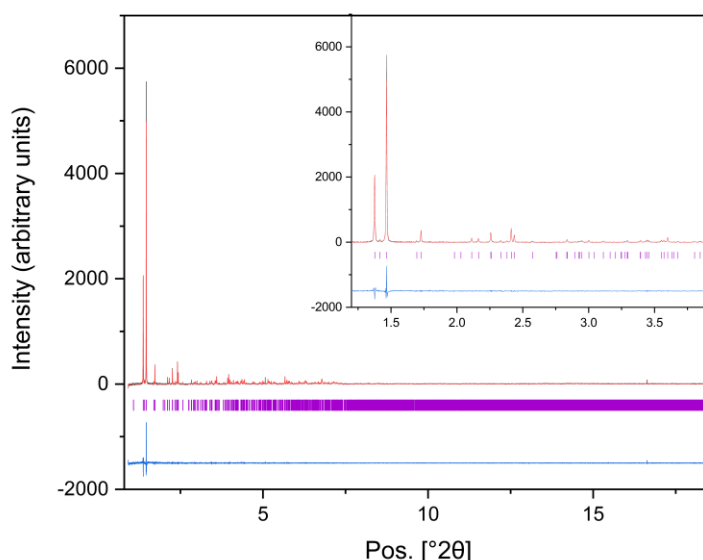
Το πολύμορφο $P2_{1(\beta)}$, όπως προαναφέρθηκε, εμφανίζεται σε συνύπαρξη με το $P2_{1(\delta)}$, ενώ σε εύρος pH 6.98 – 7.74 προσδιορίζεται ως μεμονωμένη φάση. Ως αντιπροσωπευτικό χαρακτηρίζεται το δείγμα το brm516, το οποίο φέρει τη φάση $P2_{1(\beta)}$ με τις εξής πλεγματικές σταθερές: $a = 62.862(2) \text{ \AA}$, $b = 62.359(1) \text{ \AA}$, $c = 48.006(1) \text{ \AA}$ και $\beta = 114.7493(5)^\circ$ και όγκο μοναδιαίας κυψελίδας $V = 1.70900(8) (\times 10^5) \text{ \AA}^3$, ενώ η ανάλυση Pawley χαρακτηρίζεται από $R_{wp} = 3.9936\%$ και $\chi^2 = 1.6209$.



Εικόνα II.2.6. Ανάλυση *Pawley* των δεδομένων XRPD από το δείγμα brm55, η συλλογή των οποίων διεξήχθη στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF ($\lambda=1.07817(3)$ Å). Η κόκκινη, γκρι και μπλε γραμμή αντιστοιχούν στο θεωρητικό μοντέλο, στα πειραματικά δεδομένα και στη διαφορά των δύο προαναφερθέντων. Οι πράσινες κάθετες γραμμές αντιστοιχούν στις θεωρητικές ανακλάσεις *Bragg* για το πολύμορφο $P2_1(\delta)$, ενώ οι πορτοκαλί κάθετες γραμμές προσδιορίζουν τις θέσεις των θεωρητικών ανακλάσεων *Bragg* για το πολύμορφο $P2_1(\gamma)$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση *Pawley* είναι: $a=87.917(8)$ Å, $b=70.213(6)$ Å, $c=48.111(4)$ Å και $\beta=106.785(2)^\circ$ (για τη φάση $P2_1(\gamma)$) και $a=48.621(2)$ Å, $b=59.886(3)$ Å, $c=47.812(2)$ Å και $\beta=94.395(1)^\circ$ (για τη φάση $P2_1(\delta)$), με δείκτες αξιοπιστίας: $R_{wp}=4.8860\%$ και $\chi^2=1.9345$.



Εικόνα II.2.7. Ανάλυση *Pawley* των δεδομένων XRPD από το δείγμα brm58 (αριστερά) και brm513 (δεξιά), η συλλογή των οποίων διεξήχθη στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF ($\lambda=1.07817(3)$ Å). Η κόκκινη, γκρι και μπλε γραμμή αντιστοιχούν στο θεωρητικό μοντέλο, στα πειραματικά δεδομένα και στη διαφορά των δύο προαναφερθέντων. Οι πράσινες κάθετες γραμμές των αμφοτέρων διαγραμμάτων αντιστοιχούν στις θεωρητικές ανακλάσεις *Bragg* για το πολύμορφο $P2_1(\delta)$, ενώ οι μωβ κάθετες γραμμές προσδιορίζουν τις θέσεις των θεωρητικών ανακλάσεων *Bragg* για το πολύμορφο $P2_1(\beta)$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση *Pawley* για το δείγμα brm58 είναι: $a=48.858(1)$ Å, $b=60.089(1)$ Å, $c=47.805(1)$ Å και $\beta=95.2783(6)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=3.9330\%$ και $\chi^2=1.4214$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση *Pawley* για το δείγμα brm513 είναι: $a=49.009(5)$ Å, $b=60.130(7)$ Å, $c=47.819(5)$ Å και $\beta=96.079(2)^\circ$ (για το πολύμορφο $P2_1(\delta)$) και $a=62.332(4)$ Å, $b=61.999(3)$ Å, $c=47.811(3)$ Å και $\beta=113.093(1)^\circ$ (για το πολύμορφο $P2_1(\beta)$), με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=4.5579\%$ και $\chi^2=1.8318$.



Εικόνα II.2.8. Ανάλυση *Pawley* των δεδομένων XRPD από το δείγμα brm516, η συλλογή των οποίων διεξήχθη στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF ($\lambda=1.07817(3)$ Å). Η κόκκινη, γκρι και μπλε γραμμή αντιστοιχούν στο θεωρητικό μοντέλο, στα πειραματικά δεδομένα και στη διαφορά των δύο προαναφερθέντων. Οι μωβ κάθετες γραμμές προσδιορίζουν τις θέσεις των θεωρητικών ανακλάσεων *Bragg* για το πολύμορφο $P2_{1(\beta)}$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση *Pawley* είναι: $a=62.862(2)$ Å, $b=62.359(1)$ Å, $c=48.006(1)$ Å και $\beta=114.7493(5)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας: $R_{wp}=3.9936\%$ και $\chi^2=1.6209$.

II.2.3 Συμπεράσματα – Συζήτηση

Το παρόν αντικείμενο μελέτης αφορά τη κρυσταλλογραφική μελέτη της ανθρώπινης ινσουλίνης, συγκρυσταλλωμένης με το φαινολικό παράγωγο 4-βρωμορεσορσινόλη, υπό διαφορετικές συνθήκες pH. Ειδικότερα, εξετάστηκε το σύμπλοκο σε επίπεδο μοναδιαίας κυψελίδας, με στόχο τη μελέτη του κρυσταλλικού πολυμορφισμού σε όξινα, βασικά και ουδέτερα περιβάλλοντα, ώστε να αποτυπωθεί η σταθερότητα και η συνύπαρξη διαφορετικών πολυμόρφων της ινσουλίνης παρουσία του συγκεκριμένου φαινολικού υποκατάστατου.

Η πρωταρχική ανάλυση των δεδομένων περίθλασης XRPD επέτρεψε τον προσδιορισμό τριών πολυμόρφων μονοκλινούς συμμετρίας σε όλο το εύρος pH, τα οποία αντιστοιχούν στα *space groups* $P2_{1(\gamma)}$, $P2_{1(\delta)}$ και $P2_{1(\beta)}$. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με τα αποτελέσματα παλαιότερων δημοσιευμένων μελετών (Spiliourou et al., 2021), οι οποίες κατέδειξαν τα ίδια πολύμορφα σε ανάλογες πειραματικές συνθήκες. Ωστόσο, η παρούσα εργασία αποκάλυψε διαφορετικά πρότυπα σταθερότητας και συνύπαρξης των προαναφερόμενων πολυμόρφων, γεγονός που προσδίδει πρόσθετες πληροφορίες για τη δυναμική ισορροπία τους.

Συγκεκριμένα, το πολύμορφο $P2_{1(\gamma)}$ ταυτοποιήθηκε αποκλειστικά σε συνύπαρξη με το πολύμορφο $P2_{1(\delta)}$ σε εύρος pH 5.25-5.82, σε αντίθεση με προηγούμενες αναφορές (Καραβασίλη, 2012; Σπηλιοπούλου, 2023) όπου το $P2_{1(\gamma)}$ καταγράφηκε ως ανεξάρτητη φάση σε όξινο pH. Η παρατηρούμενη συνύπαρξη υποδεικνύει πως η παρουσία της 4-βρωμορεσορσινόλης ενδεχομένως επάγει την ενεργειακή εξάρτηση και τη δομική αλληλεξάρτηση των δύο πολυμόρφων.

Το πολύμορφο $P2_{1(\delta)}$ παρουσίασε τη μεγαλύτερη ευρύτητα εμφάνισης, εντοπιζόμενο σε συνύπαρξη τόσο με το $P2_{1(\gamma)}$ όσο και με το $P2_{1(\beta)}$, ενώ καταγράφηκε ως μεμονωμένη φάση σε εύρος pH

5.94-6.36. Το αναφερόμενο εύρος pH υποδηλώνει ότι το $P2_{1(\beta)}$ αποτελεί ενδιάμεση πολυμορφική φάση μεταξύ των άλλων δύο πολυμόρφων, γεγονός που συμφωνεί με την αλληλοεπικάλυψη των συνθηκών σταθερότητας των πολυμόρφων και με παλαιότερες παρατηρήσεις μεταβάσεων της πολυμορφικής φάσης (Καραβασίλη, 2012).

Το πολύμορφο $P2_{1(\beta)}$ επικράτησε ως η θερμοδυναμικά σταθερότερη φάση, καθώς εντοπίστηκε μεμονωμένα σε μεγαλύτερο εύρος pH (6.98-7.74), ενώ εμφανίστηκε και σε συνύπαρξη με το πολύμορφο $P2_{1(\delta)}$. Το εύρημα αυτό υποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο πολύμορφο είναι πιθανόν το επικρατέστερο υπό συνθήκες που απαντώνται στον υποδόριο ιστό, ένα χαρακτηριστικό απαραίτητο για τη σταθερότητα και αποτελεσματικότητα των ινσουλινικών σκευασμάτων.

Όσον αφορά την παρατηρούμενη μεταβολή του pH μετά την κρυστάλλωση, σε σχέση με τις αρχικές τιμές, επιβεβαιώνει την απορρόφηση ή απελευθέρωση πρωτονίων κατά τη διαδικασία σχηματισμού των κρυστάλλων, πιθανόν λόγω αλληλεπιδράσεων των φωσφορικών ιόντων με τις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων της πρωτεΐνης. Το φαινόμενο αυτό αναδεικνύει τη σημασία της ακριβούς καταγραφής του τελικού pH για την ορθή αντιστοίχιση των συνθηκών σταθερότητας των πολυμόρφων.

Συνολικά, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ισορροπία μεταξύ των πολυμόρφων επηρεάζεται σημαντικά από το pH, τη συγκέντρωση των ρυθμιστικών ιόντων και την παρουσία της 4-βρωμορεσορσινόλης. Το φαινόμενο αυτό καθιστά το σύστημα ενδιαφέρον για περεταίρω μελέτη. Μελλοντικά πειράματα θα μπορούσαν να επικεντρωθούν στην επίδραση της συγκέντρωσης της 4-βρωμορεσορσινόλης ή του NaSCN στη σταθερότητα και τη σχετική ενεργειακή ισορροπία των πολυμόρφων.

Πέραν της διερεύνησης των συνθηκών κρυστάλλωσης, στους μελλοντικούς στόχους περιλαμβάνεται επίσης η πλήρης δομική επίλυση του πολυμόρφου $P2_{1(\beta)}$ από πολυκρυσταλλικό δείγμα μέσω XRPD. Η επίτευξη αυτού του στόχου, ο οποίος βρίσκεται ήδη σε εξέλιξη, αναμένεται να αναδείξει τη μέθοδο XRPD ως συμπληρωματικό εργαλείο της SCXRD στη μελέτη μακρομοριακών συστημάτων υψηλής συμμετρίας και πολυμορφισμού.

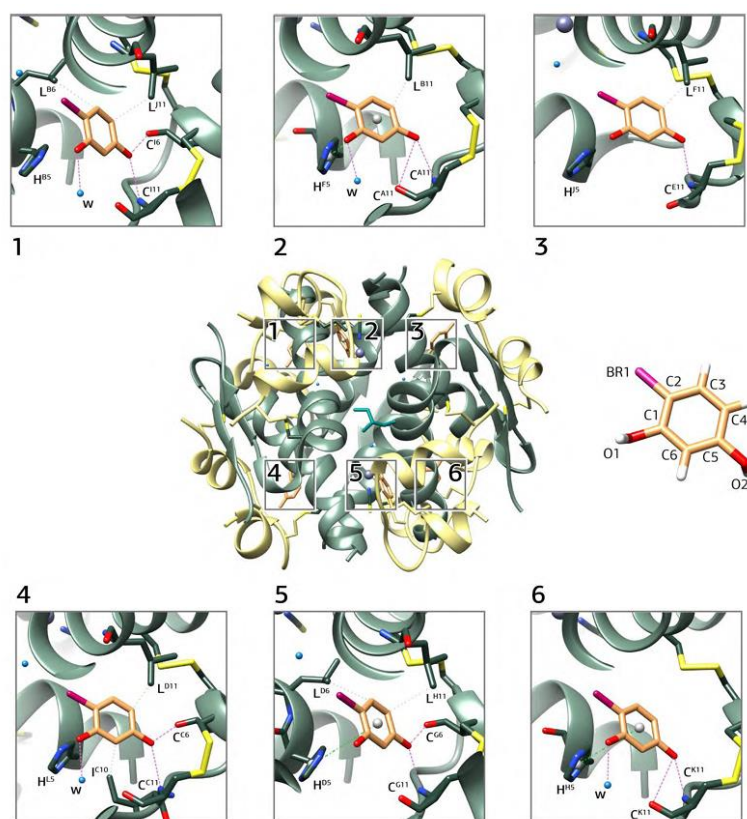
II.3 Μελέτη της Επίδρασης της Σχετικής Υγρασίας στην Κρυσταλλική Δομή της Ανθρώπινης Ινσουλίνης

Η πλειονότητα των πρωτεϊνών υιοθετούν την εγγενή διαμόρφωσή τους και επιτελούν τη φυσιολογική τους λειτουργία σε υδατικά διαλύματα. Η μελέτη της επίδρασης των φυσικών παραμέτρων, όπως η σχετική υγρασία και η θερμοκρασία, στη δομή των πρωτεϊνών αποτελεί έρευνα αιχμής στον κλάδο της Δομικής Βιολογίας και ειδικότερα στο ερευνητικό πεδίο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, δεδομένης της ένυδρης φύσης των πρωτεϊνικών κρυστάλλων. Συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση των μορίων και κατ' επέκταση η διευθέτησή τους εντός του κρυστάλλου βασίζεται σε σημαντικό βαθμό στο σχηματισμό υδατικών γεφυρών, γεγονός που καθιστά τη μεταβολή της υγρασίας καθοριστικό παράγοντα στην εσωτερική οργάνωση του κρυστάλλου (Logotheti et al., 2019; Trampari et al., 2018).

Παλαιότερες *in situ* κρυσταλλογραφικές μελέτες υπό μεταβαλλόμενη σχετική υγρασία έχουν αναδείξει την επίδραση της αφυδάτωσης και της επανενυδάτωσης του πολυκρυσταλλικού δείγματος στην κρυσταλλικότητα και στα χαρακτηριστικά της μοναδιαίας κυψελίδας. Ειδικότερα, μελέτες XRPD στην λυσοζύμη από ασπράδι αυγού όρνιθας (*Henn Egg-Whit Lysozyme*, HEWL) έδειξαν ότι η κρυσταλλικότητα διατηρείται σε επίπεδα σχετικής υγρασίας έως ~75%, έπειτα από βαθμιαία

αφυδάτωση του δείγματος, ενώ η επανενυδάτωση επισημαίνει την αναστρεψιμότητα του φαινομένου που επιφέρει η αφυδάτωση (Logotheti et al., 2019; Trampari et al., 2018). Επιπλέον, παρόμοια μελέτη στο φαρμακευτικό πεπτίδιο της οκτρεοτίδης κατέδειξε τη διατήρηση της συμμετρίας της κρυσταλλικής δομής, καθώς και της κρυσταλλικότητας του δείγματος σε εύρος θερμοκρασιών 294-318 K και σχετικής υγρασίας 95-30%, με τις μεταβολές των διαστάσεων της μοναδιαίας κυψελίδας να είναι αναστρέψιμες (Athanasiadou et al., 2024). Στην περίπτωση της ινσουλίνης, αξιοσημείωτη είναι η διαφορετική επίδραση υγρασίας σε πολυκρυσταλλικά δείγματα ινσουλίνης παρουσία διαφορετικών φαινολικών παραγώγων, με πρόσφατη έρευνα να επισημαίνει τον διαφορετικό τρόπο μεταβολής των πλεγματικών παραμέτρων των δύο διακριτών δειγμάτων, παρά το γεγονός ότι τα δύο δείγματα υποβάλλονται σε ίδιες μεταβολές σχετικής υγρασίας (Kontarinis, Papefthymiou et al., 2025) .

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε συστηματική μελέτη της επίδρασης της ελεγχόμενης μεταβολής της σχετικής υγρασίας σε πολυκρυσταλλικό δείγμα ινσουλίνης, το οποίο είναι συγκρυσταλλωμένο με το φαινολικό παράγωγο 4-βρωμορεσορσινόλη. Συγκεκριμένα, η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στο κρυσταλλικό πολύμορφο $P2_{1(\beta)}$, το οποίο εμφανίζεται ως μεμονωμένη φάση σε μεγαλύτερο εύρος pH, ενώ έχει προσδιοριστεί επίσης η δομή του μέσω πειράματος SCXRD, αναδεικνύοντας την R_6 διαμόρφωση που υιοθετεί το εξαμερικό σύμπλοκο της ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδότη 4-βρωμορεσορσινόλη (Σπηλιοπούλου, 2023).



Εικόνα II.3.1. Δομικό μοντέλο του πολυμόρφου $P2_{1(\beta)}$ της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδότη 4-βρωμορεσορσινόλη (Σπηλιοπούλου, 2023).

II.3.1 Υλικά και Μέθοδοι

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκαν πειράματα συγκρυστάλλωσης της ανθρώπινης ινσουλίνης με το φαινολικό παράγωγο 4-βρωμορεσορσινόλη. Κατόπιν της συλλογής δεδομένων XRPD σε συνθήκες περιβάλλοντος, ακολούθησε *in situ* συλλογή δεδομένων XRPD υπό μεταβαλλόμενη σχετική υγρασία στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο *X'pert Pro* της *Malvern Panalytical*, το οποίο έχει εξοπλιστεί με το θάλαμο υγρασίας *MHC-trans-Anton Paar humidity chamber* και περιλαμβάνεται στις υποδομές της παρούσας ερευνητικής ομάδας. Σε τελευταίο στάδιο με την περάτωση της συλλογής δεδομένων, διενεργήθηκε ανάλυση *Pawley* για την εξαγωγή των πλεγματικών σταθερών, όπως περιεγράφηκε στο υποκεφάλαιο II.2.1.2. Σημειώνεται ότι η παρούσα μελέτη βασίστηκε σε δύο διακριτούς κύκλους πειραμάτων για την επιβεβαίωση της αναπαραξιμότητας των ευρημάτων.

II.3.1.1 Πειράματα Κρυστάλλωσης με τη Μέθοδο *Batch*

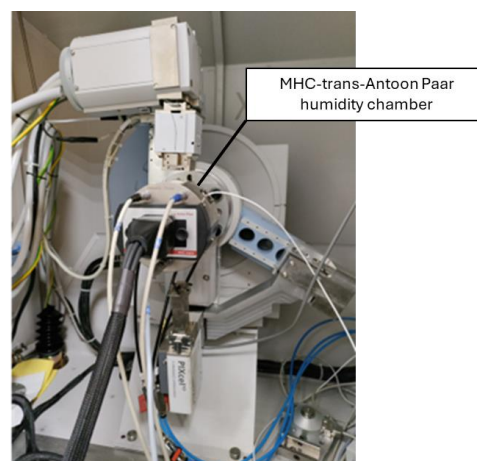
Για την μελέτη της επίδρασης των μεταβολών της σχετικής υγρασίας στο υπό μελέτη κρυσταλλικό πολύμορφο του συγκεκριμένου συμπλόκου πραγματοποιήθηκε αρχικά κρυστάλλωση της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη 4-βρωμορεσορσινόλη με τη μέθοδο *batch*. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στο παρόν πείραμα ακολουθήθηκε και στους δύο κύκλους πειραμάτων, ενώ βασίστηκε στο πρωτόκολλο κρυστάλλωσης που αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο II.2.1.1, με τη διαφορά ότι το ρυθμιστικό διάλυμα των φωσφορικών έφερε pH 7.1, ενώ η κρυστάλλωση πραγματοποιήθηκε για το σχηματισμό 6 κρυσταλλικών δειγμάτων.

II.3.1.2 Πείραμα Περίθλασης XRPD υπο Μεταβαλλόμενες Συνθήκες Σχετικής Υγρασίας

A. Προετοιμασία Δειγμάτων

Η προετοιμασία του δείγματος για την μέτρηση XRPD σε συνθήκες περιβάλλοντος, με σκοπό την ταυτοποίηση του πολυμόρφου $P2_{1(\beta)}$, πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία που αναλύθηκε στο υποκεφάλαιο II.1.2.2.

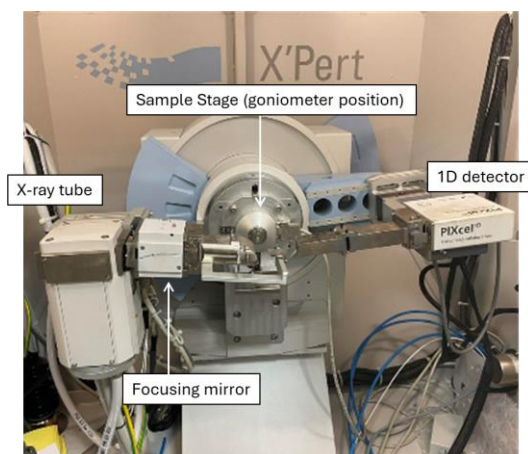
Όσον αφορά την προετοιμασία των δειγμάτων για το πείραμα XRPD υπό ελεγχόμενες συνθήκες σχετικής υγρασίας, ακολουθήθηκε διαφοροποιημένη διαδικασία λόγω της χρήσης διαφορετικού δειγματοφορέα. Ωστόσο, το βήμα της μέτρησης του pH πριν τη φόρτωση του ιζήματος στο δειγματοφορέα παρέμεινε αμετάβλητο. Στο πλαίσιο της παρούσας διαδικασίας, τα *Eppendorfs* που περιείχαν τα πολυκρυσταλλικά δείγματα υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρωση για την πάκτωση των κρυστάλλων και τον αποτελεσματικό διαχωρισμό από το μητρικό υγρό. Εν συνεχεία, απομακρύνθηκε η περίσσεια του μητρικού υγρού και το κρυσταλλικό ίζημα συλλέχθηκε με τη χρήση πιπέτας, της οποίας το ρύγχος είχε υποστεί τομή στο άκρο του, προκειμένου να αποφευχθεί η μηχανική καταπόνηση των κρυστάλλων. Το ίζημα μεταφέρθηκε σε ένα δειγματοφορέα που έφερε ως υπόστρωμα ένα φύλλο του πολυμερούς *Kapton*. Κατόπιν πλήρωσης του δειγματοφορέα με το κρυσταλλικό υλικό, μεταφέρθηκε το σύνολο τους στο ρότορα υποδοχής δειγμάτων πολλαπλών θέσεων εντός του θαλάμου.



Εικόνα II.3.2. Αριστερά: Πολυκρυσταλλικό δείγμα του συμπλόκου ανθρώπινης ινσουλίνης – 4-βρωμορεσορσινόλης εναποτεθειμένο στο δειγματοφόρέα. Δεξιά: Ο θάλαμος υγρασίας *MHC-trans-Anton Paar humidity chamber* εγκατεστημένος στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο *X' pert Pro* της εταιρείας *Malvern Panalytical*. Κέντρο: Ο ρότορας υποδοχής (https://www.researchgate.net/publication/305986686_The_Power_of_Powder_Humidity_induced_phase_transitions_of_HEWL_ysozyme).

B. Συλλογή Δεδομένων Περίθλασης XRPD

Η συλλογή των δεδομένων XRPD τόσο σε συνθήκες περιβάλλοντος όσο και σε συνθήκες μεταβαλλόμενης υγρασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο *X' pert Pro*, αξιοποιώντας τη γεωμετρία *Debye-Scherrer*, με την ακτινοβολία να φέρει μήκος κύματος $\lambda=1.540585(3)$ Å. Η δέσμη των ακτίνων X εστιάστηκε στο δείγμα με τη χρήση ενός κατόπτρου εστίασης, ενώ το σήμα περίθλασης συλλέχθηκε από τον ανιχνευτή *PIXcel*^{1D}. Η πρωταρχική συλλογή δεδομένων, η οποία διεξήχθη σε συνθήκες περιβάλλοντος για την ακριβή ταυτοποίηση του πολυμόρφου, πραγματοποιήθηκε σε εύρος 2θ από 0° έως 30° , με το δείγμα να ακτινοβολείται σε μια μόνο θέση για 25 συνεχόμενες σαρώσεις, όπου κάθε σάρωση διήρκεσε 30 min. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέτρηση του δείγματος σε μια μόνο θέση είναι επαρκής δεδομένου ότι δεν παρατηρείται καταπόνηση λόγω ακτινοβόλησης (*radiation damage*) του δείγματος, καθώς η ακτινοβολία που παράγεται από την πηγή των ακτίνων X είναι χαμηλής έντασης. Με το πέρας της συλλογής των δεδομένων περίθλασης, ακολούθησε άθροιση των επιμέρους σαρώσεων για τη βελτίωση του λόγου σήματος προς θόρυβο.



Εικόνα II.3.3. Απεικόνιση της διάταξης του περιθλασιμέτρου *X' pert Pro (capillary mode)* που βρίσκεται στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών.

Στην *in situ* συλλογή δεδομένων υπο συνθήκες μεταβαλλόμενης σχετικής υγρασίας, όπως προαναφέρθηκε, πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές πειραμάτων για την εξασφάλιση της επαναληψιμότητας. Συνολικά διενεργήθηκαν έξι κύκλοι, με τους τέσσερις πρώτους να ανήκουν στο πρώτο πείραμα περιθλάσης, ενώ το δεύτερο πείραμα περιλάμβανε δύο κύκλους συλλογής δεδομένων.

Συγκεκριμένα, εξετάστηκε εύρος σχετικής υγρασίας από 95 % έως 50 %, με το χρόνο αναμονής 60 min στο κάθε επίπεδο υγρασίας πριν τη συλλογή δεδομένων. Το αναλυτικό πρωτόκολλο συλλογής δεδομένων παρατίθεται στους Πίνακες III.3.1 και III.3.2 για την πρώτη και τη δεύτερη σειρά πειραμάτων αντίστοιχα.

Πίνακας II.3.1. Πρωτόκολλο συλλογής δεδομένων XRPD κατά την 1^η σειρά κύκλων αφυδάτωσης και ενυδάτωσης.

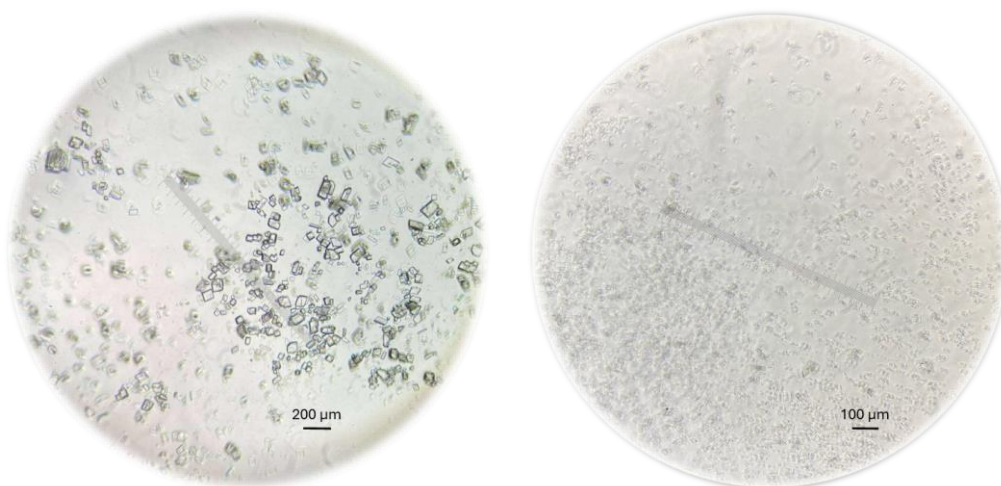
1 ^η Σειρά					
Κύκλος	Αφυδάτωση	Ενυδάτωση	Χρόνος Αναμονής	Scans/RH level	Θερμοκρασία (°C)
1	95%→90%→85%→80%→75%	75%→80%→85%→90%→95%	60 min	8	21
2	95%→90%→85%→80%→75%	75%→80%→85%→90%→95%	60 min	8	21
3	95%→90%→85%→80%→75%	75%→80%→85%→90%→95%	60 min	8	21
4	95%→90%→85%→80%→75%→70%→60%→50%	50%→60%→70%→75%→80%→85%→90%→95%	60 min	6	21

Πίνακας II.3.2. Πρωτόκολλο συλλογής δεδομένων XRPD κατά την 2^η σειρά κύκλων αφυδάτωσης και ενυδάτωσης.

2 ^η Σειρά					
Κύκλος	Αφυδάτωση	Ενυδάτωση	Χρόνος Αναμονής	Scans/RH level	Θερμοκρασία (°C)
1	95%→90%→85%→80%→75%	75%→80%→85%→90%→95%	60 min	6	21
2	95%→85%→75%→60%→50%	50%→60%→75%→85%→95%	60 min	6	21

II.3.2 Αποτελέσματα

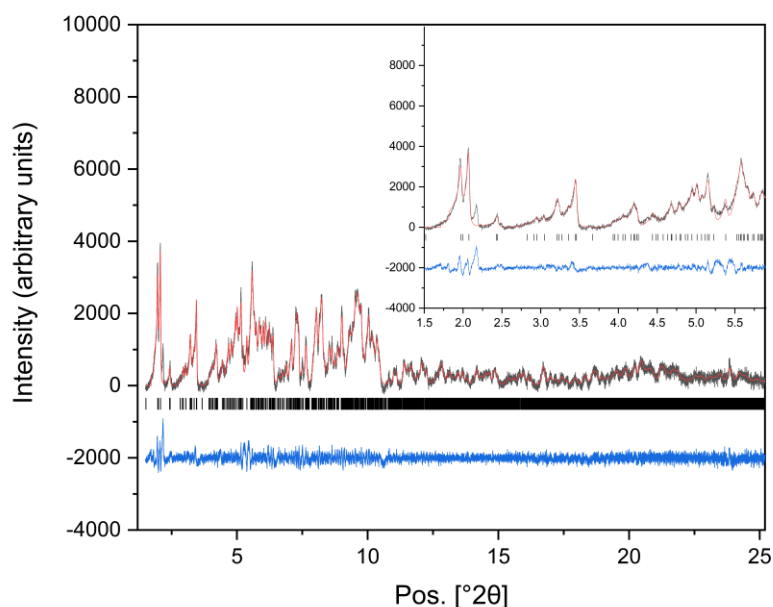
Αμφότερα τα πειράματα κρυστάλλωσης οδήγησαν στο σχηματισμό πολυκρυσταλλικών ιζημάτων του συμπλόκου της ανθρώπινης ινσουλίνης με 4-βρωμορεσορσινόλη. Μετά την πάροδο 7 ημερών επώασης, παρατηρήθηκε σε κάθε περίπτωση το αποτέλεσμα που απεικονίζεται στην Εικόνα II.3.3.



Εικόνα II.3.3. Εικόνες πολυκρυσταλλικού ιζήματος από δείγμα που προέκυψε από την 1^η σειρά πειραμάτων (**αριστερά**) και από τα 2^η σειρά πειραμάτων (**δεξιά**), όπως λήφθηκαν μέσω οπτικής μικροσκοπίας.

Η μέτρηση του pH που πραγματοποιήθηκε πριν το πείραμα περίθλασης υπέδειξε μικρή αύξηση του pH. Στην πρώτη περίπτωση το pH είχε αυξηθεί σε 7.13, ενώ στη δεύτερη περίπτωση παρατηρήθηκε αύξηση σε 7.17.

Η πρωταρχική ανάλυση των δεδομένων XRPD, που συλλέχθηκαν σε συνθήκες περιβάλλοντος, υπέδειξε την παρουσία του πολυμόρφου $P2_{1(\beta)}$, με πλεγματικές σταθερές: $a=62.880(8)$ Å, $b=62.32(1)$ Å, $c=48.007(8)$ Å και $\beta=113.274(2)$ ° και με δείκτες αξιοπιστίας: $R_{wp}=1.4869\%$ και $\chi^2=1.60434$ (Εικόνα II.3.4).



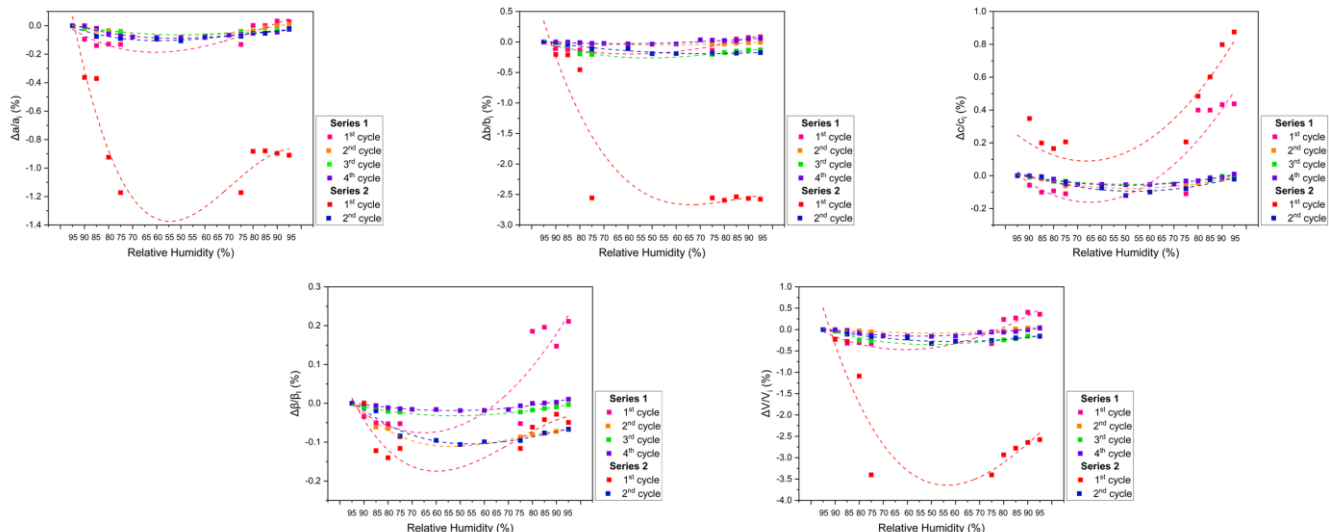
Εικόνα II.3.4. Ανάλυση Pawley των δεδομένων XRPD, η συλλογή των οποίων διεξήχθη σε συνθήκες περιβάλλοντος στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο ($\lambda=1.540585(3)$ Å). Η κόκκινη, γκρι και μπλε γραμμή αντιστοιχούν στο θεωρητικό μοντέλο, στα πειραματικά δεδομένα και στη διαφορά των δύο προαναφερθέντων. Οι μωβ κάθετες γραμμές προσδιορίζουν τις θέσεις των θεωρητικών ανακλάσεων Bragg για το πολύμορφο $P2_{1(\beta)}$.

Η ανάλυση των δεδομένων XRPD που συλλέχθηκαν υπό ελεγχόμενες συνθήκες μεταβαλλόμενης υγρασία κατέδειξε την διατήρηση της συμμετρίας του κρυστάλλου καθ' όλη τη μεταβολή της υγρασίας. Παράλληλα, παρατηρήθηκαν μεταβολές στις διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας, με τις πλεγματικές σταθερές να μειώνονται εμφανώς κατά την αφυδάτωση.

Ειδικότερα, στην πρώτη σειρά πειραμάτων, οι πλεγματικές σταθερές a και c εμφάνισαν τη μεγαλύτερη μείωση στον 1^ο κύκλο μεταβολής υγρασίας, ενώ οι σταθερές b και β παρουσίασαν τη μεγαλύτερη μεταβολή στον 3^ο και στον 2^ο κύκλο αντίστοιχα. Όπως παρατίθεται στον Πίνακα II.3.3, η πλεγματική σταθερά a μειώνεται κατά 0.13% και η c κατά 0.11%, ενώ οι πλεγματικές σταθερές b και β εμφάνισαν μείωση κατά 0.2% και 0.09% αντίστοιχα. Στη 2^η σειρά, οι πλεγματικές σταθερές a και b εμφάνισαν μείωση κατά 1.2% και 2.6% στον 1^ο κύκλο ενώ οι c και β μειώθηκαν στον 2^ο κύκλο κατά 0.12% και 0.11% αντίστοιχα. Το σύνολο των ποσοστιαίων μεταβολών που υπέστησαν οι πλεγματικές σταθερές και ο όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας κατά την αφυδάτωση στους έξι κύκλους διακύμανσης της υγρασίας παρατίθενται στον Πίνακα II.3.3, ενώ στην Εικόνα II.3.5 αποτυπώνεται η επί % μεταβολή των παραπάνω παραμέτρων καθ' όλη τη διάρκεια των σταδίων αφυδάτωσης και ενυδάτωσης.

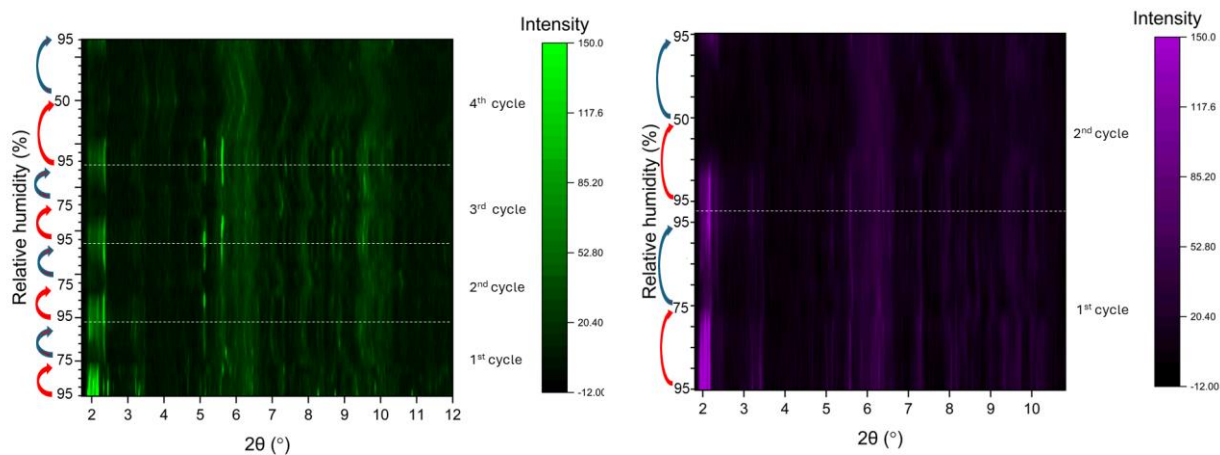
Πίνακας II.3.3. Ποσοστιαίες (%) μεταβολές των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας κατά τα στάδια της αφυδάτωσης των δύο σειρών πειραμάτων. Οι διακυμάνσεις υπολογίστηκαν βάσει της σχέσης: $\Delta(x_i - x_i)/x_i \times 100\%$, όπου x_i αντιστοιχεί στην τιμή της εκάστοτε σταθεράς σε 95% RH κατά την αφυδάτωση και x_i αντιστοιχεί στην τιμή της εκάστοτε σταθεράς στο χαμηλότερο επίπεδο RH κατά την αφυδάτωση.

Σειρά	Κύκλος	$\Delta a/a_i(\%)$	$\Delta b/b_i(\%)$	$\Delta c/c_i(\%)$	$\Delta \beta/\beta_i(\%)$	$\Delta V/V_i(\%)$
1	1 (95% → 75%)	-0.131965	-0.136	-0.1097	-0.052	-0.331
	2 (95% → 75%)	-0.039	-0.033	-0.063	-0.086	-0.055
	3 (95% → 75%)	-0.044	-0.204	-0.034	-0.022	-0.262
	4 (95% → 50%)	-0.084	-0.036	-0.055	-0.019	-0.158
2	1 (95% → 75%)	-1.172	-2.555	0.2058	-0.116	-3.401
	2 (95% → 50%)	-0.106	-0.192	-0.12	-0.106	-0.326

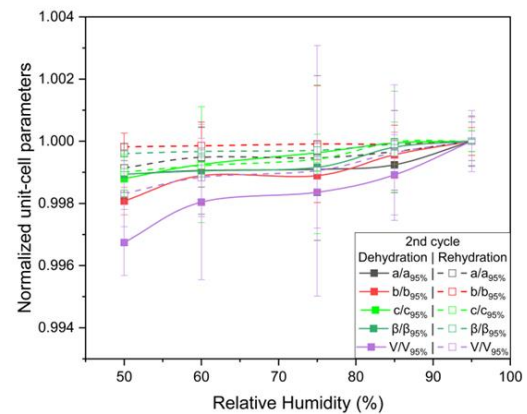
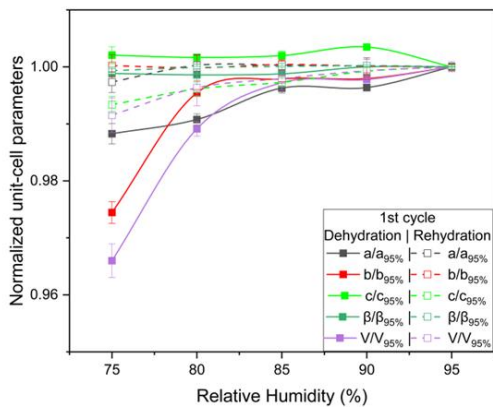
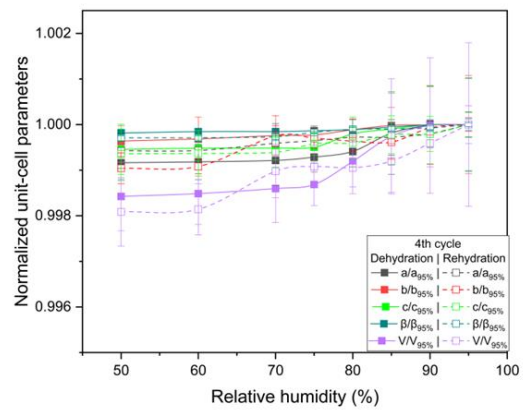
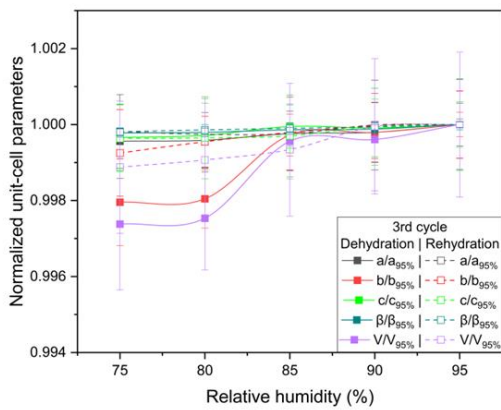
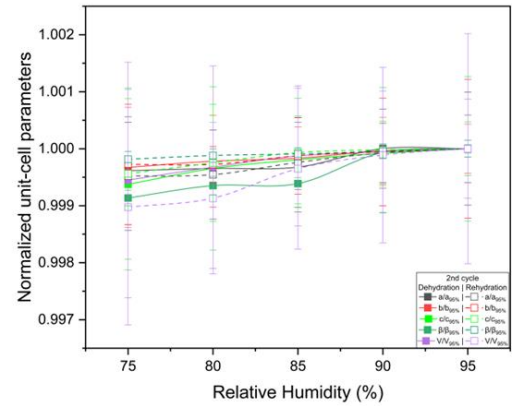
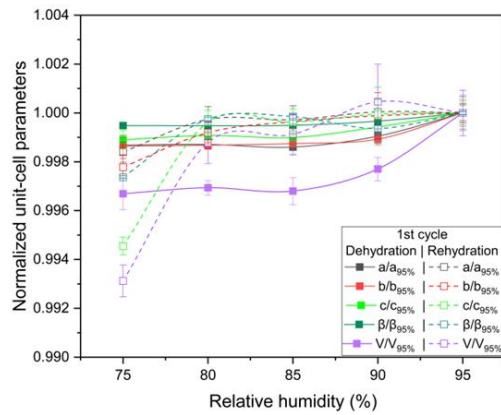


Εικόνα II.3.5. Διαγράμματα των ποσοστιαίων (%) μεταβολών των πλεγματικών σταθερών $\Delta a/a_i$ (επάνω αριστερά), $\Delta b/b_i$ (επάνω κέντρο), $\Delta c/c_i$ (επάνω δεξιά), $\Delta b/b_i$ (κάτω αριστερά) και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας $\Delta V/V_i$ (κάτω δεξιά). Κάθε κύκλος αναπαρίστανται με διαφορετικό χρωματικό κώδικα. Για την 1^η σειρά μετρήσεων: 1^{ος} κύκλος (ροζ), 2^{ος} κύκλος (πορτοκαλί), 3^{ος} κύκλος (πράσινο) και 4^{ος} κύκλος (μωβ). Για τη δεύτερη σειρά μετρήσεων : 1^{ος} κύκλος (κόκκινο) και 2^{ος} κύκλος (μπλε).

Στην Εικόνα II.3.6, που παρουσιάζει την κάτοψη του συνόλου των δεδομένων που λήφθηκαν σε κάθε σειρά μετρήσεων XRPD, παρατηρείται μετατόπιση των κορυφών, υποδηλώνοντας την αναφερόμενη μεταβολή των εξαγόμενων πλεγματικών σταθερών. Επιπλέον, αξιοσημείωτη είναι η μείωση των εντάσεων στους τελευταίους κύκλους μεταβολής της σχετικής υγρασίας, η οποία υποδεικνύει την υποβάθμιση της κρυσταλλικότητας του δείγματος.

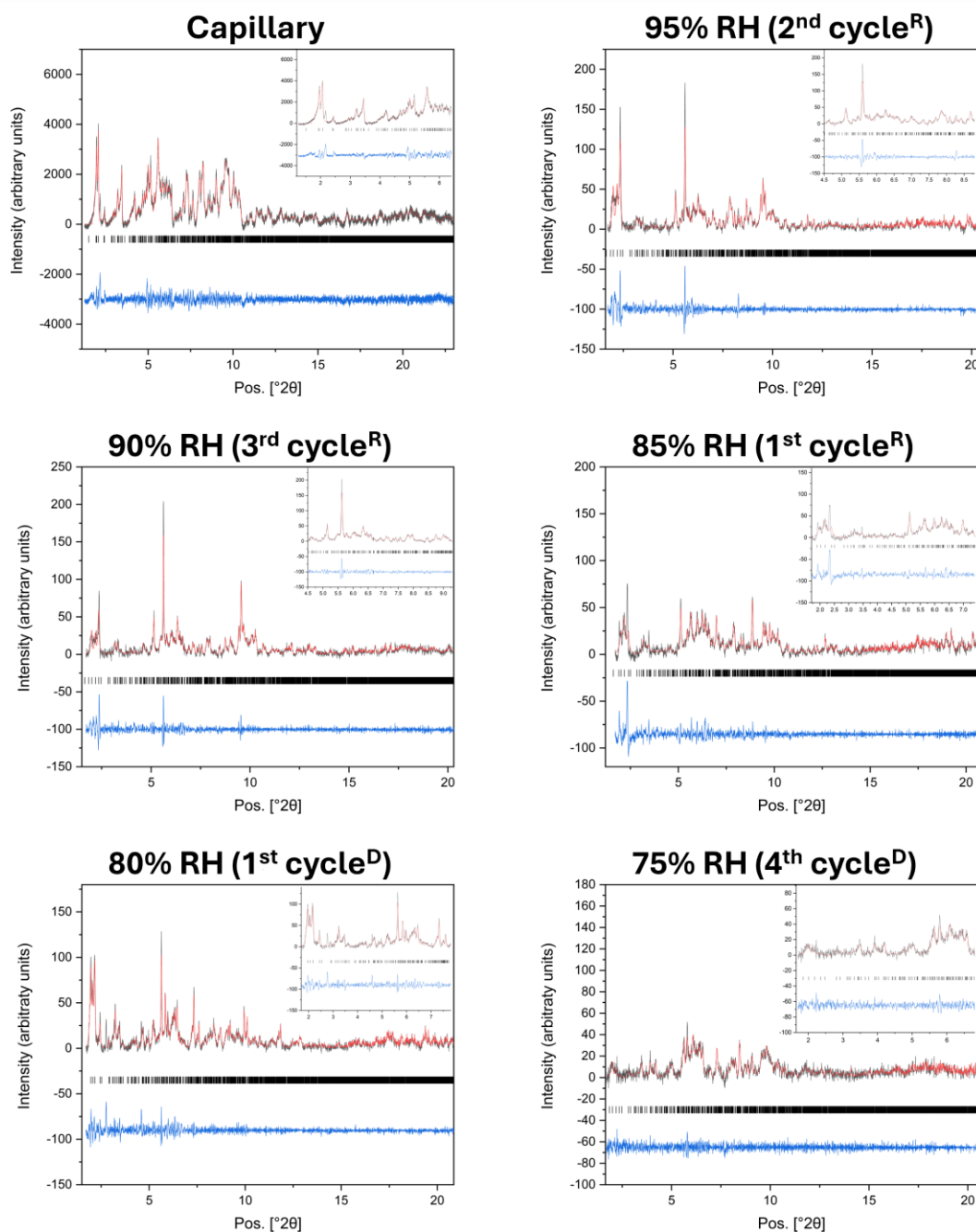


Εικόνα II.3.6. Διαγράμματα επιφανείας των δεδομένων XRPD που συλλέχθηκαν κατά το σύνολο όλων των κύκλων μεταβαλλόμενης σχετικής υγρασίας κάθε σειράς. Αριστερά: Το διάγραμμα επιφανείας που αντιστοιχεί στη 1^η σειρά μετρήσεων XRPD. Δεξιά: Το διάγραμμα επιφανείας που αντιστοιχεί στη 2^η σειρά μετρήσεων XRPD.

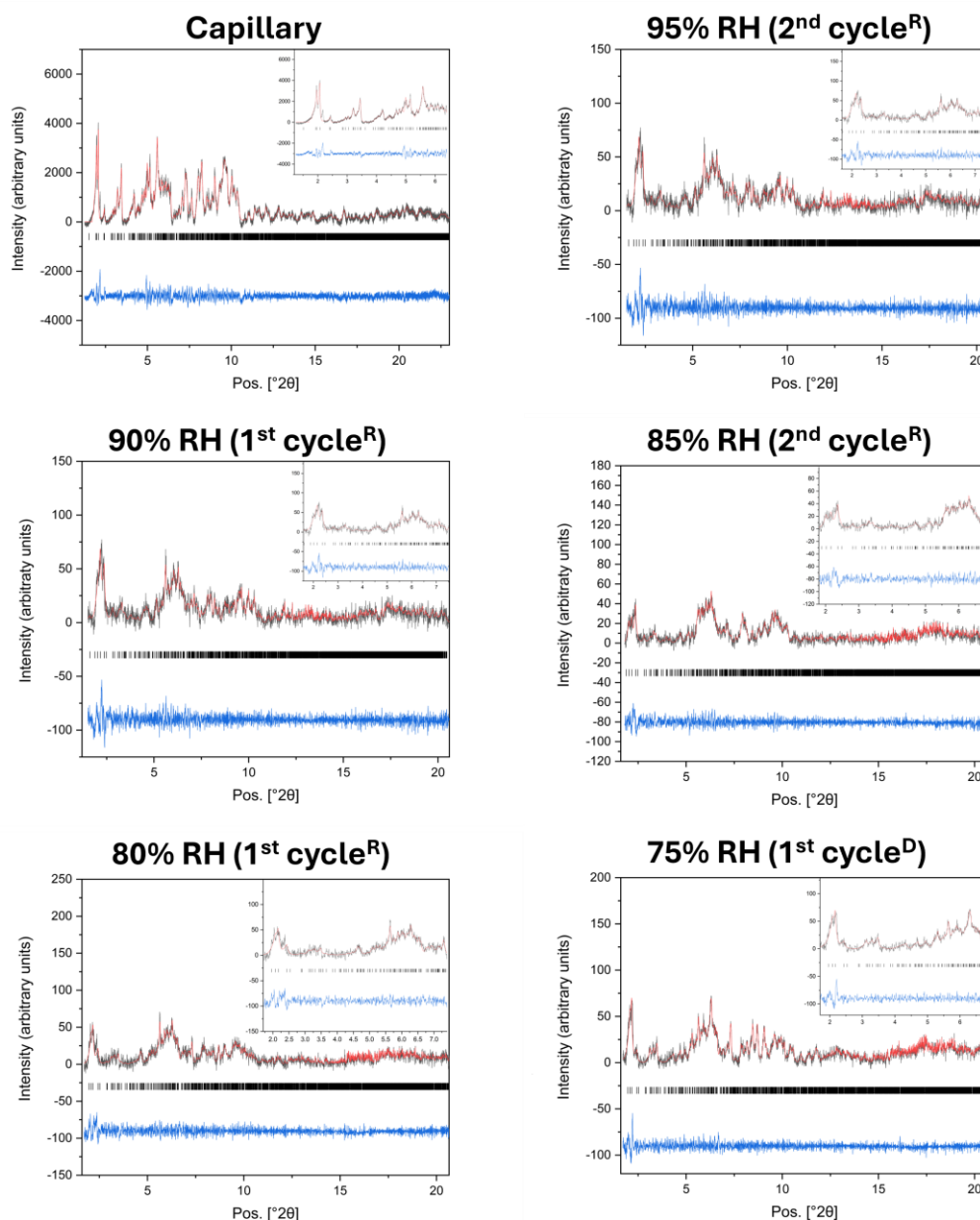


Εικόνα II.3.7. Διαγράμματα μεταβολής των κανονικοποιημένων πλεγματικών σταθερών a/a_i , b/b_i , c/c_i , β/β_i και του όγκου V/V_i ανά κύκλο αφυδάτωσης-ενυδάτωσης στις δύο σειρές πειραμάτων. Με συνεχείς γραμμές και κλειστά σύμβολα παρουσιάζονται οι μεταβολές των παραμέτρων κατά την αφυδάτωση, ενώ με σκεπτικές γραμμές και ανοιχτά σύμβολα περιγράφονται οι μεταβολές των παραμέτρων κατά την ενυδάτωση. Με γκρι χρώμα αναπαρίστανται οι μεταβολές που αφορούν την πλεγματική σταθερά a , με κόκκινο οι μεταβολές που αφορούν τη b , με πράσινο οι μεταβολές της c , με κυανό-πράσινο οι μεταβολές της β και με μωβ οι μεταβολές του όγκου. Επάνω: **Αριστερά** παρατίθεται το διάγραμμα που αντιστοιχεί στον 1^ο κύκλο μεταβολής της σχετικής υγρασίας της 1^η σειράς και **δεξιά** το διάγραμμα που αντιστοιχεί στον 2^ο κύκλο της 1^{ης} σειράς συλλογής δεδομένων. Κέντρο: **Αριστερά** παρατίθεται το διάγραμμα που αντιστοιχεί στον 3^ο κύκλο μεταβολής της σχετικής υγρασίας της 1^η σειράς και **δεξιά** το διάγραμμα που αντιστοιχεί στον 4^ο κύκλο της 1^{ης} σειράς συλλογής δεδομένων. Κάτω: **Αριστερά** παρατίθεται το διάγραμμα που αντιστοιχεί στον 1^ο κύκλο μεταβολής της σχετικής υγρασίας της 2^{ης} σειράς και **δεξιά** το διάγραμμα που αντιστοιχεί στον 2^ο κύκλο της 2^{ης} σειράς συλλογής δεδομένων.

Κατά την ενυδάτωση του δείγματος στο αρχικό επίπεδο σχετικής υγρασίας παρατηρήθηκε μερική επαναφορά των τιμών των πλεγματικών σταθερών. Ωστόσο, στον πρώτο κύκλο ενυδάτωσης της 2^{ης} σειράς συλλογής δεδομένων, παρατηρήθηκε μείωση των πλεγματικών σταθερών a και b κατά 0.9% και 2.6% αντίστοιχα (Εικόνα II.3.5).



Εικόνα II.3.8. Διαγράμματα *Pawley* για ενδεικτικά επίπεδα υγρασίας από τους τέσσερις κύκλους της 1^{ης} σειράς μετρήσεων XRPD. Ο εκθέτης D προσδιορίζει την αφυδάτωση, ενώ ο δείκτης R εκφράζει την ενυδάτωση. Η κόκκινη, γκρι και μπλε γραμμή αντιστοιχούν στο θεωρητικό μοντέλο, στα πειραματικά δεδομένα και στη διαφορά των δύο προαναφερθέντων. Οι μαύρες κάθετες γραμμές αντιστοιχούν στις θεωρητικές ανακλάσεις *Bragg* που αντιστοιχούν στο πολύμορφο $P2_{1(\beta)}$.



Εικόνα II.3.9. Διαγράμματα *Pawley* για ενδεικτικά επίπεδα υγρασίας από τους δύο κύκλους της 2^{ης} σειράς μετρήσεων XRPD. Ο εκθέτης D προσδιορίζει την αφυδάτωση, ενώ ο δείκτης R εκφράζει την ενυδάτωση. Η κόκκινη, γκρι και μπλε γραμμή αντιστοιχούν στο θεωρητικό μοντέλο, στα πειραματικά δεδομένα και στη διαφορά των δύο προαναφερθέντων. Οι μαύρες κάθετες γραμμές αντιστοιχούν στις θεωρητικές ανακλάσεις *Bragg* που αντιστοιχούν στο πολύμορφο $P2_{1(\beta)}$.

II.3.3 Συμπεράσματα-Συζήτηση

Η *in situ* συλλογή δεδομένων υπό συνθήκες μεταβαλλόμενης σχετικής υγρασίας ανέδειξε την ευαισθησία του πολυκρυσταλλικού δείγματος στις μεταβολές του περιβάλλοντος, όπως καταδεικνύεται από τις συστηματικές μετατοπίσεις των κορυφών περίθλασης. Οι προαναφερόμενες μετατοπίσεις αντικατοπτρίζουν τη δομική προσαρμογή του πλέγματος, με τις διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας να μειώνονται κατά την αφυδάτωση και να επανέρχονται μερικώς κατά την ενυδάτωση.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει, επίσης, το γεγονός ότι η κρυσταλλικότητα του δείγματος διατηρείται έως και επίπεδα σχετικής υγρασίας ~50%, παρά την εμφανή υποβάθμιση της σε $RH \leq 75\%$, η

οποία ωστόσο ανακάμπτει μερικώς κατά την επανενυδάτωση. Το παρόν φαινόμενο συνάδει με την περίπτωση του πολυμόρφου $P2_{1(\beta)}$ του συμπλόκου της ανθρώπινης ινσουλίνης – 4-χλωρορεσορσινόλης, η αφυδάτωση του οποίου οδηγεί σε εξασθένηση των εντάσεων σε χαμηλά επίπεδα ($RH < 70\%$), χωρίς πλήρη απώλεια της κρυσταλλικής δομής (Κωνσταντόπουλος, 2025). Παρόμοιο φαινόμενο υποβάθμισης της κρυσταλλικότητας καταγράφεται, επίσης, στην περίπτωση της ινσουλίνης απουσία προσδέτη, όπου το κρυσταλλικό πολύμορφο ρομβοεδρικής συμμετρίας $R3$ με διαμόρφωση $T_3R^f_3$ χαρακτηρίζεται από την έντονη υποβάθμιση της κρυσταλλικότητας από RH 80%, ενώ το αναφερόμενο πολύμορφο με διαμόρφωση T_6 υφίσταται πλήρη αποδιοργάνωση σε αντίστοιχα επίπεδα υγρασίας χωρίς επανακάμπτει κατά το στάδιο της επανενυδάτωσης (Καφετζή, 2025). Βάσει των αναγραφόμενων παρατηρήσεων, είναι διακριτή η επίδραση των προσδετών στη σταθεροποίηση της δομής έναντι των συνθηκών αφυδάτωσης, με την παρουσία τους να επάγει την αυξημένη ανθεκτικότητα της κρυσταλλικής ακεραιότητας.

Αξιοσημείωτο είναι, επιπροσθέτως, το φαινόμενο της ισοτροπικής μεταβολής των πλεγματικών σταθερών που παρατηρείται κατά τα στάδια αφυδάτωσης και ενυδάτωσης του δείγματος. Ειδικότερα, το αναφερόμενο φαινόμενο επισημαίνει τη ταυτόχρονη μείωση όλων των πλεγματικών σταθερών κατά το στάδιο της αφυδάτωσης και την αύξησή τους με την επανενυδάτωση του δείγματος. Η συγκεκριμένη συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί επιπλέον στην περίπτωση του συμπλόκου της ανθρώπινης ινσουλίνης – m -κρεσόλης (Παπαευσθυμίου, 2024; Kontarinis, Papaefthymiou et al., 2025), καθώς και στην περίπτωση της ινσουλίνης απουσία προσδέτη (Καφετζή, 2025). Αντιθέτως, στην περίπτωση του πολυμόρφου $P2_{1(\beta)}$ παρουσία του προσδέτη 4-χλωρορεσορσινόλη (Κωνσταντόπουλος, 2025), αλλά και του συμπλόκου της ανθρώπινης ινσουλίνης με το φαινολικό προσδέτη m -νιτροφαινόλη (Κονταρίνης, 2024; Kontarinis, Papaefthymiou et al., 2025) καταγράφεται ανισοτροπική μεταβολή, με χαρακτηριστική αύξηση του άξονα c κατά την αφυδάτωση. Τα ανωτέρω αποτελέσματα κρίνουν σημαντική την επίδραση των διαφορετικών προσδετών στην απόκριση της ανθρώπινης ινσουλίνης στις μεταβολές του φυσικοχημικού περιβάλλοντος, με τις διαφορετικές δομικές μεταβολές του κρυσταλλικού πλέγματος να οφείλονται πιθανόν σε ένα διαφορετικό πρότυπο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των εξαμερών της ινσουλίνης.

Εν κατακλείδι, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν τη σταθερότητα και τη δομική προσαρμοστικότητα που εμφανίζει το πολύμορφο $P2_{1(\beta)}$ του συμπλόκου ανθρώπινης ινσουλίνης – 4-βρωμορεσορσινόλης έναντι των συνθηκών μεταβαλλόμενης υγρασίας. Επιπλέον, επισημαίνεται η προστατευτική επίδραση του προσδέτη στη διατήρηση της κρυσταλλικότητας. Τα ανωτέρω αποτελέσματα συνεισφέρουν σημαντικά στη συγκριτική μελέτη των φαινολικών παραγώγων που δύναται να προσδένονται στην ινσουλίνη και ενισχύουν την άποψη ότι οι δομικές αποκρίσεις σε μεταβολές του φυσικοχημικού περιβάλλοντος εξαρτώνται από τη φύση του προσδέτη και τη θέση πρόσδεσης.

Μελλοντικά, κρίνεται σημαντική η συνδυαστική διερεύνηση υγρασίας και θερμοκρασίας, σε συνεφαρμογή με συμπληρωματικές μεθόδους όπως SCXRD υπό ελεγχόμενη υγρασία. Κατ' αυτό τον τρόπο, θα ήταν δυνατή η αποσαφήνιση της σχέσης μεταξύ ενυδάτωσης, διαμόρφωσης εξαμερών και σταθερότητας του συμπλόκου, συμβάλλοντας ουσιαστικά στην κατανόηση της δυναμικής του μορίου και στη βελτιστοποίηση των φαρμακευτικών σκευασμάτων.

III. Δομική Μελέτη Ιικών Πρωτεϊνών

Ο επιστημονικός κλάδος της ιολογίας επικεντρώνεται στη μελέτη των ιών, αποσαφηνίζοντας τη δομή τους και τους μηχανισμούς μόλυνσης και αλληλεπίδρασης με τον ξενιστή – χαρακτηριστικά που αποτελούν τη θεμέλια βάση τόσο για την ανάπτυξη αντιικών θεραπειών και στρατηγικών πρόληψης, όσο και για την αξιοποίηση των ιών σε βιοϊατρικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Οι ιοί αποτελούν υποχρεωτικά ενδοκυττάρια παράσιτα τα οποία αξιοποιούν τους μηχανισμούς αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης του ξενιστή για τον πολλαπλασιασμό τους. Απουσία ξενιστή, οι ιοί αποτελούν αδρανή σωμάτια, γνωστά ως ιοσωμάτια, τα οποία φέρουν το γενετικό υλικό (DNA ή RNA) περιβεβλημένο από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο. Πέραν των δομικών πρωτεϊνών που κωδικοποιεί ένας ιός για τη συγκρότηση του καψιδίου, στο ρεπερτόριο των πρωτεϊνών του δύναται να περιλαμβάνονται ρυθμιστικές και λειτουργικές πρωτεΐνες που συμβάλλουν στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού του εντός του κυττάρου και στην αποφυγή των μηχανισμών του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Ο προσδιορισμός της δομής των ανωτέρω πρωτεϊνών αποτελεί απαραίτητο βήμα για την κατανόηση των μηχανισμών εισόδου και πολλαπλασιασμού των ιών στα κύτταρα του ξενιστή. Κατ' αυτό τον τρόπο, η σύμπραξη της Δομικής Βιολογίας με τον κλάδο της Ιολογίας δύναται να συμβάλλει στον εντοπισμό φαρμακευτικών στόχων και στο σχεδιασμό αναστολέων με το ρόλο αντιικών φαρμάκων.

Στην παρούσα εργασία εκπονήθηκε κρυσταλλογραφική μελέτη της **πρωτεάσης 3C του ιού Cocksackie B3** – σε συνέχεια προγενέστερων δοκιμών (Fili et al., 2016; Σπηλιοπούλου, 2018; Κοσίνας, 2020; Κονταρίνης, 2024) – με την αξιοποίηση της μεθόδου XRPD, αποσκοπώντας στη βελτίωση της ποιότητας των δεδομένων περίθλασης. Σε δεύτερο σκέλος, πραγματοποιήθηκε κρυσταλλογραφική διερεύνηση της **3'-5' εξωνουκλεάσης του ιού της λεμφοκυτταρικής χοριομηνιγγίτιδας (Lymphocytic Choriomeningitis Virus, LCMV)** – σε συνέχεια πρότερων πειραμάτων (Σπηλιοπούλου, 2023; Κονταρίνης, 2024) – με στόχο την ταυτοποίηση επιτυχούς συνθήκης κρυστάλλωσης που να αποδίδει δεδομένα περίθλασης από μονοκρύσταλλο υψηλής ευκρίνειας.

III.1 Κρυσταλλογραφική Μελέτη της 3C Πρωτεάσης του Ιού Cocksackie B3

Ο βασικός στόχος της παρούσας μελέτης είναι η βελτίωση της ποιότητας του πολυκρυσταλλικού ιζήματος της 3C πρωτεάσης του ιού *Cocksackie B3* και κατ' επέκταση των δεδομένων XRPD για τον προσδιορισμό της δομής της ιικής πρωτεΐνης μέσω περίθλασης ακτίνων Χ από πολυκρυσταλλικό δείγμα. Δεδομένου ότι πολλές πρωτεΐνες αποδίδουν πολυκρυσταλλικό ίζημα έναντι των μονοκρυστάλλων, η αξιοποίηση τεχνικών και η ταυτοποίηση συνθηκών που αποδίδουν τον ποιοτικό σχηματισμό του πολυκρυσταλλικού υλικού αποτελεί θεμέλιο βήμα για την ενίσχυση της μεθόδου της περίθλασης ακτίνων Χ από πολυκρυσταλλικά δείγματα πρωτεϊνών.

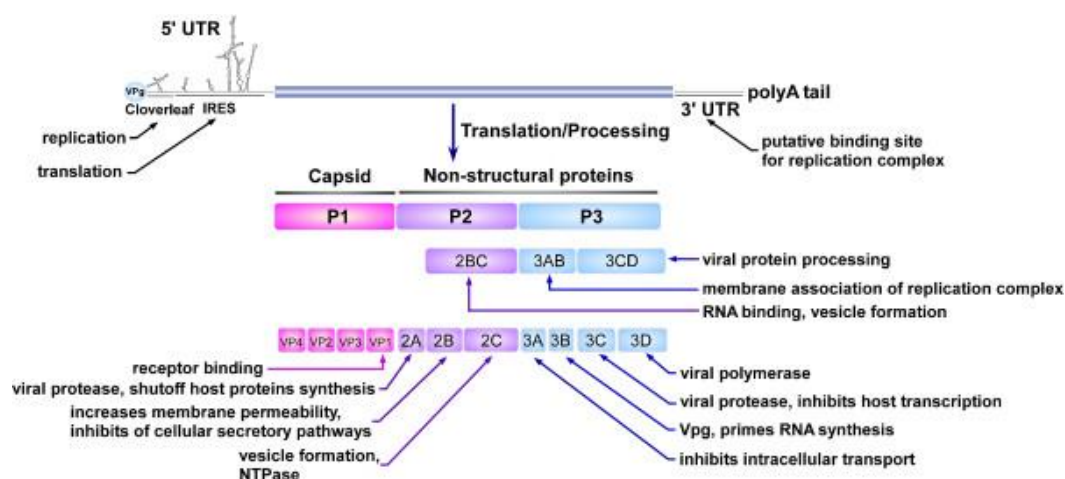
III.1.1 Ιός Cocksackie B3

Ο ιός *Cocksackie B3* είναι μέλος της οικογένειας *Picornaviridae* και συγκαταλέγεται στο γένος των εντεροϊών (*Enterovirus*) – συγκεκριμένα στην υποομάδα Β. Ως κύριο μέσο μετάδοσης χαρακτηρίζεται το επιθήλιο του εντέρου, ενώ ο ιός προσβάλλει επιπλέον όργανα, όπως τους λεμφοειδείς ιστούς, το μυοκάρδιο και ιστούς του νευρικού συστήματος. Μεταξύ των κλινικών περιπτώσεων που επάγουν οι ιοί *Cocksackie* της υποομάδας Β περιλαμβάνονται ήπιες εμπύρετες λοιμώξεις, ιική μυοκαρδίτιδα, ασηπτική

μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, παγκρεατίτιδα, ενώ πιθανή είναι και η πρόκληση σακχαρώδους διαβήτη τύπου Ι (Fili et al., 2016).

Το γενετικό υλικό των εντεροϊών, συνεπώς και του *Coxsackie B3*, συγκροτείται σε ένα γραμμικό μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας (+ssRNA) μήκους περίπου 7.500 νουκλεοτιδίων. Το αναφερόμενο RNA διακρίνεται σε τρεις περιοχές: την 5' αμετάφραστη περιοχή (5'-*untranslated region*, 5'-UTR), το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (*Open Reading Frame*, ORF) και την 3' αμετάφραστη περιοχή (3'-*untranslated region*, 3' UTR). Η 5'-UTR περιλαμβάνει συντηρημένες αλληλουχίες απαραίτητες για τη διαδικασία της αντιγραφής και της μετάφρασης – μεταξύ αυτών εμπεριέχεται η εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος (*Internal Ribosome Entry Site*, IRES), η οποία επιτρέπει την έναρξη της μετάφρασης χωρίς την ανάγκη για την παρουσία καλύπτρας στο 5' άκρο (Wang et al., 2020). Ωστόσο, το 5' άκρο φέρει προσδεμένη μια μικρή πρωτεΐνη, γνωστή ως VPg (*Viral Protein genome-linked*), η οποία είναι απαραίτητη για την έναρξη της αντιγραφής. Όσον αφορά την 3'-UTR, φέρει μια αλληλουχία πολύ-Αδενίνης η οποία διαδραματίζει καίριο ρόλο στις διαδικασίες της αντιγραφής και της μετάφρασης (Lin et al., 2009).

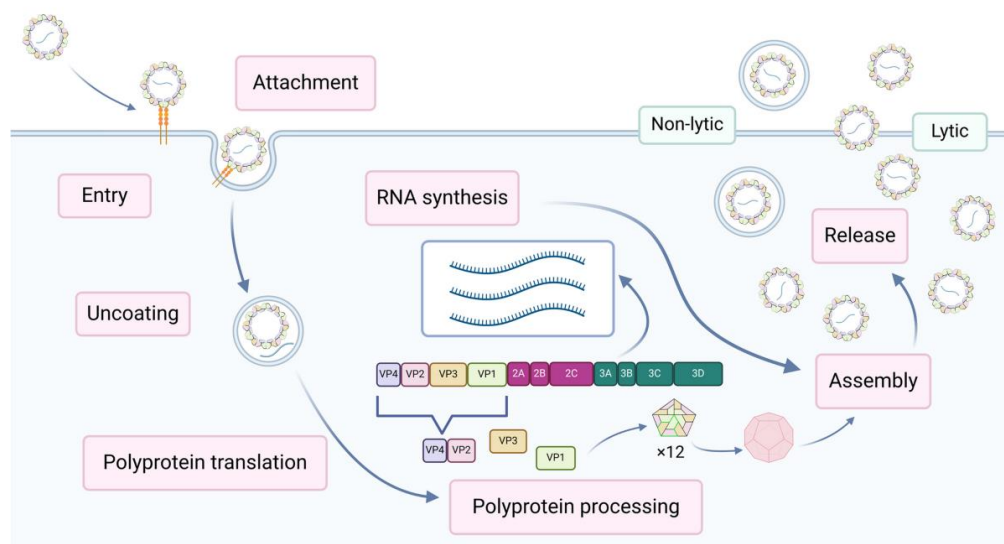
Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης κωδικοποιεί μια πρόδρομη πολυπρωτεΐνη, η οποία αντιστοιχεί σε 4 δομικές πρωτεΐνες υπεύθυνες για τη δόμηση του καψιδίου, 7 μη δομικές (λειτουργικές πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τη μόλυνση του κυττάρου-ξενιστή και του πολλαπλασιασμό του ιού, καθώς και στα ενδιάμεσα προϊόντα μεταξύ αυτών. Ειδικότερα, η πολυπρωτεΐνη χαρακτηρίζεται από τρεις γονιδιακές επικράτειες, τις P1, P2 και P3, όπου η P1 κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες (VP1-VP4), ενώ οι P2 και P3 κωδικοποιούν τις λειτουργικές πρωτεΐνες (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D) και τα ενδιάμεσα πρωτεϊνικά μόρια (2BC, 3AB και 3CD) (Joffret et al., 2018; Lin et al., 2009). Στην Εικόνα III.1.1 περιγράφεται η οργάνωση του γονιδιώματος και της πολυπρωτεΐνης, καθώς και οι λειτουργίες των τελικών προϊόντων.



Εικόνα III.1.1. Σχηματική αναπαράσταση του γονιδιώματος των εντεροϊών, των τελικών προϊόντων που προκύπτουν από τη διάσπαση της πολυπρωτεΐνης (Lin et al., 2009).

Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών, κατά κανόνα, παρουσιάζει τα ίδια χαρακτηριστικά σε όλα τα είδη, συμπεριλαμβανομένου και του *Coxsackie B3*. Συγκεκριμένα, ο κύκλος ζωής των εντεροϊών ξεκινά με την προσκόλληση των ιοσωματίων στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων του ξενιστή μέσω υποδοχέων και με την είσοδο στο εσωτερικό του κυττάρου απελευθερώνει το γενετικό υλικό στο κυτταρόπλασμα. Ακολούθως, εκκινείται η διαδικασία της μετάφρασης για την παραγωγή πολυάριθμων αντιγράφων της πολυπρωτεΐνης, η οποία στη συνέχεια διασπάται σταδιακά στα επιμέρους προϊόντα,

που θα επιτελέσουν τις λειτουργίες τους στα επόμενα στάδια της αντιγραφής, συναρμολόγησης και απελευθέρωσης των νεοσυντιθέμενων ισωματίων, μέσω των ιικών πρωτεασών. Με την παραγωγή των προαναφερθέντων μορίων σε επαρκή αριθμό εκκινείται η διαδικασία της αντιγραφής για τη δημιουργία πολλών αντιγράφων του γονιδιώματος, τα οποία σε επόμενο στάδιο εσωκλείονται σε νέα πρωτεϊνικά καψίδια για την τελική απελευθέρωση των ισωματίων μέσω λύσης των κυττάρων και την μετέπειτα μόλυνση των γειτονικών κυττάρων (Garmaroudi et al., 2015; Lin et al., 2009).



Εικόνα II.1.2. Σχηματική απεικόνιση του κύκλου ζωής των εντεροϊών (Jartti et al., 2024).

III.1.1.1 Η Πρωτεάση 3C του Ιού *Coxsackie* (3Cpro)

Το αντικείμενο μελέτης της παρούσας έρευνας, όπως προαναφέρθηκε, είναι η 3Cpro. Στη λειτουργική του μορφή, το ένζυμο της ανωτέρω πρωτεάσης καταλύει μέρος της πέψης της πολυπρωτεΐνης, καθώς και πρωτεϊνών καίριος σημασίας των κυττάρων του ξενιστή, επάγοντας έτσι την αναστολή των διαδικασιών της μετάφρασης και της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή – ένα χαρακτηριστικό που την καθιστά πιθανό φαρμακευτικό στόχο.

Ειδικότερα, πρόκειται για μια πρωτεάση κυστεΐνης, η οποία φέροντας την καταλυτική τριάδα των αμινοξέων Cys₁₄₇, His₄₀ και Glu₇₁ στο ενεργό της κέντρο, προκαλεί τη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών μεταξύ καταλοίπων γλουταμίνης και γλυκίνης, τόσο στα ιικά μόρια όσο και σε μόρια του κυττάρου ξενιστή (Bazan & Fletterick, 1988).

Μεταξύ των μορίων του κυττάρου ξενιστή που πέπτονται κατόπιν δράσης της πρωτεάσης περιλαμβάνεται ο μεταγραφικός παράγοντας TFIIIC, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη σύνθεση των tRNAs από την RNA πολυμεράση III. Κατ' αυτό τον τρόπο, η δράση της 3C πρωτεάσης αναστέλλει τη διαδικασία της μετάφρασης των κυτταρικών πρωτεϊνών, επάγοντας έτσι τον κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, η πρωτεΐνη TBP (*TATA-binding protein*) δύναται να υποστεί επίσης πρωτεόλυση, διακόπτοντας έτσι τη μετάφραση του ιικού γονιδιώματος ώστε να εκκινηθεί η διαδικασία της αντιγραφής για τη συναρμολόγηση νέων ισωματίων (Fili et al., 2016; Weidman et al., 2003).

III.1.2 Υλικά και Μέθοδοι

Για τη διεξαγωγή της κρυσταλλογραφικής μελέτης της 3Cpro διενεργήθηκαν πειράματα έκφρασης και απομόνωσης της πρωτεΐνης στόχου, με τη χρήση γενετικά τροποποιημένων βακτηριακών συστημάτων και χρωματογραφικών τεχνικών. Με την παραγωγή της πρωτεΐνης σε υψηλή συγκέντρωση και καθαρότητα ακολούθησαν δοκιμές κρυστάλλωσης με στόχο το σχηματισμό πολυκρυσταλλικού ιζήματος και συλλογή δεδομένων περίθλασης στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF. Οι πειραματικές διαδικασίες που αφορούσαν το πείραμα περίθλασης πραγματοποιήθηκαν βάσει των πρωτοκόλλων που περιεγράφηκαν στο κεφάλαιο II.2.1.2.

III.1.2.1 Έκφραση και Απομόνωση της 3Cpro

Για την έκφραση της 3Cpro χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pET-24a(+), ο οποίος φέρει κλωνοποιημένο το cDNA που αντιστοιχεί στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου που κωδικοποιεί την 3Cpro μαζί με μια αλληλουχία που εκφράζει μια εξαϊστιδινική ουρά στο 3' άκρο για τη διευκόλυνση της απομόνωσης της πρωτεΐνης μέσω χρωματογραφικών συγγενείας, όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο I.2.7. Να σημειωθεί πως ο παρόν πλασμιδιακός φορέας διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό της καναμυκίνης.

Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* του στελέχους T7 express Ιq rLysS με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET-24a(+). Για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες των μετασχηματισμένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό *Terrific Borth* (TB) που περιείχε καναμυκίνη (50 mg/ml) και χλωραμφενικόλη (35 mg/ml) σε αναλογία 1:1000 ως προς το συνολικό όγκο καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε αρχική καλλιέργεια των 5 ml, η οποία κατόπιν ολονύκτιας επώασης στους 37 °C με ανάδευση σε 200 rpm, εμβολιάστηκε σε καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας των 500 ml. Η επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης διεξήχθη, όπως περιεγράφηκε στο υποκεφάλαιο I.2.3.2, με προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM και επώαση της καλλιέργειας σε 17 °C και με ανάδευση σε 200 rpm για 18 h. Με την ολοκλήρωση της ανάπτυξης της καλλιέργειας, τα κύτταρα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C έως ότου υποβληθούν σε λύση.

Η λύση των κυττάρων βασίστηκε στο πρωτόκολλο θερμικής, χημικής και μηχανικής καταπόνησης που αναλύθηκε στο υποκεφάλαιο I.2.4.1 και το κυτταρικό εκχύλισμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία IMAC με τη χρήση της χρωματογραφικής στήλης *HisTrap™ HP*, με τη διαδικασία που περιεγράφηκε στο υποκεφάλαιο I.2.4.2.1. Με το πέρας της χρωματογραφίας IMAC έγινε ανταλλαγή του διαλύματος έκλουσης του απομονωμένου πρωτεϊνικού δείγματος με το διάλυμα πρόσδεσης με παράλληλη συμπύκνωση της πρωτεΐνης και στη συνέχεια ακολούθησε αποθήκευση στους -20 °C με την προσθήκη γλυκερόλης σε τελική συγκέντρωση 10% (v/v). Σε σύντομο χρονικό διάστημα πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία SEC για τον περαιτέρω καθαρισμό του δείγματος – κατόπιν ελέγχου της καθαρότητας με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση – με τη χρήση της στήλης *HiPrep 16/60 Sephacryl™ S-200 HR*, ακολουθώντας τη διαδικασία που αναφέρθηκε στο I.2.4.2.2. Με την ολοκλήρωση της χρωματογραφίας SEC διεξήχθη εκ νέου SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων που συλλέχθηκαν κατά τη χρωματογραφία για την επιβεβαίωση της παρουσίας της 3Cpro και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση της πρωτεΐνης με τη χρήση των φίλτρων φυγοκέντρωσης *Amicon Ultra-4 centrifugal filter unit*. Σε τελικό στάδιο, η πρωτεΐνη αποθηκεύτηκε στο διάλυμα εξισορρόπησης με την προσθήκη 10% (v/v) γλυκερόλης στους -80 °C. Στον Πίνακα III.1.1 παρατίθενται τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν από το στάδιο της έκφρασης έως και τα βήματα απομόνωσης της 3Cpro.

Πίνακας III.1.1. Τα συστατικά των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις διαδικασίες της έκφρασης και απομόνωσης της 3Cpro.

Έκφραση		Απομόνωση							
		Διάλυμα λύσης	Λυσοζύμη DNAάση MgSO ₄			IMAC		SEC	
Θρεπτικό μέσο	IPTG					Διάλυμα πρόσδεσης	Διάλυμα πλύσης	Διάλυμα έκλουσης	Διάλυμα εξισορρόπησης
<i>Terrific Borth</i> (TB)	0.5 mM	50 mM Tris-HCl (pH 7.5)	0.5 mg/mL	10 µg/mL	1 mM	50 mM Tris-HCl (pH 7.5)	50 mM Tris-HCl (pH 7.5)	50 mM Tris-HCl (pH 7.5)	50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
		300 mM NaCl					300 mM NaCl	300 mM NaCl	50 mM NaCl
		10 mM ιμιδαζόλη (pH 7.5)					30 mM ιμιδαζόλη (pH 7.5)	250 mM ιμιδαζόλη (pH 7.5)	2 mM DTT
		5% (v/v) γλυκερόλη					30 mM ιμιδαζόλη (pH 7.5)	250 mM ιμιδαζόλη (pH 7.5)	2 mM DTT
		0.1% (v/v) Triton-X							
		2 mM DTT							

III.1.2.2 Κρυστάλλωση και Πρωταρχική Κρυσταλλογραφική Μελέτη με Χρήση Δεδομένων XRPD

Με στόχο τη βελτίωση της ποιότητας του πολυκρυσταλλικού ιζήματος, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές κρυστάλλωσης με τη μέθοδο *microbatch* αξιοποιώντας την τεχνική της σποράς (Λαμπροπούλου, 2025). Κατόπιν ερμηνείας των αποτελεσμάτων που απέδωσαν πρότερες δοκιμές κρυστάλλωσης με τη τεχνική διάχυσης ατμών (για τη λήψη μονοκρυστάλλων) (Λαμπροπούλου, 2025), αξιοποιήθηκε η εξής συνθήκη για την παρασκευή του διαλύματος των πυρήνων:

Πίνακας III.1.2. Συνθήκη κρυστάλλωσης για την παραγωγή του διαλύματος των πυρήνων κρυστάλλωσης.

Διάλυμα Πρωτεΐνης	Διάλυμα Κρυστάλλωσης
6 mg/mL 3Cpro	20% (w/v) PEG-4000
50 mM Tris-HCl (pH 7.5)	0.1 M Tris-HCl pH 8.5
50 mM NaCl	0.2 M MgCl ₂
2 mM DTT	

Η παρασκευή του διαλύματος των πυρήνων κρυστάλλωσης (*seedstock*) πραγματοποιήθηκε βάσει πρωτοκόλλου της εταιρείας *Hampton Research* με θραύση των κρυστάλλων αξιοποιώντας ράβδο θρυμματισμού, υπό παρατήρηση σε στερεοσκόπιο. Η σταγόνα με τους θρυμματισμένους πλέον κρυστάλλους μεταφέρθηκε – κατόπιν επαναιώρησης για την αποκόλληση του κρυσταλλικού υλικού από το *plate* κρυστάλλωσης – σε 50 µL διαλύματος κρυστάλλωσης που έχουν προηγουμένως μεταφερθεί από την αντίστοιχη δεξαμενή σε *Eppendorf* το οποίο είναι τοποθετημένο σε πάγο. Να σημειωθεί πως το *Eppendorf* περιέχει μια μικροσκοπική μπίλια, η οποία θα συμβάλλει στη δημιουργία των πυρήνων με διαδοχικές σύντομες ανακινήσεις τύπου *vortex*. Στο τέλος της διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις του διαλύματος των πυρήνων κατά 1/4, 1/8 και 1/16.

Η διερεύνηση των συνθηκών κρυστάλλωσης με τη μέθοδο *microbatch* βασίστηκε σε συνθήκη που χαρακτηριζόταν από διάλυμα κρυστάλλωσης με σύσταση: 18% (w/v) PEG-4000, 0.1 M Tris-HCl pH

8.5 και 0.2 M $MgCl_2$. Η επιλογή της προαναφερθείσας συνθήκης βασίστηκε στη διερεύνηση των συνθηκών κρυστάλλωσης με τη μέθοδο της διάχυσης ατμών συνδυαστικά με τη χρήση της τεχνικής της σποράς που διεξήχθη σε προγενέστερες δοκιμές (Λαμπροπούλου, 2025). Κριτήριο της επιλογής αποτέλεσε η ομοιομορφία και η μορφολογία των κρυστάλλων που απέδωσε η συγκεκριμένη συνθήκη. Η κρυστάλλωση *microbatch* πραγματοποιήθηκε σε plate κρυστάλλωσης, το οποίο στο τέλος της διαδικασίας σφραγίστηκε με κρυσταλλογραφική ταινία για την αποφυγή εξάτμισης των σταγόνων. Στον Πίνακα III.1.3 παρατίθεται αναλυτικά το πρωτόκολλο της διερεύνησης που ακολουθήθηκε.

Πίνακας III.1.3. Κάτοψη της διάταξης του *plate* με τις αντίστοιχες συνθήκες κρυστάλλωσης που διερευνήθηκαν με τη μέθοδο *microbatch*. Τα διαλύματα πρωτεΐνης (Π), παραγόντων καθίζησης (ΠΚ) και πυρήνων κρυστάλλωσης (S) αναμειχθηκαν με τις αναλογίες που παρατίθενται σε τελικό όγκο 3 μL .

	4 mg/mL 3Cpro	6 mg/mL 3Cpro	8 mg/mL 3Cpro	10 mg/mL 3Cpro	12mg/mL 3Cpro
<i>Dilution 1/4</i>	A1 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1S:2ΠΚ:3Π	A2 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1S:2ΠΚ:3Π	A3 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1S:2ΠΚ:3Π	A4 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1S:2ΠΚ:3Π	A5 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1S:2ΠΚ:3Π
	B1 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1S:2ΠΚ:3Π	B2 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1S:2ΠΚ:3Π	B3 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1S:2ΠΚ:3Π	B4 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1S:2ΠΚ:3Π	B5 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1S:2ΠΚ:3Π
	C1 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1S:2ΠΚ:3Π	C2 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1S:2ΠΚ:3Π	C3 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1S:2ΠΚ:3Π	C4 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1S:2ΠΚ:3Π	C5 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1S:2ΠΚ:3Π
	D1 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1ΠΚ:1Π	D2 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1ΠΚ:1Π	D3 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1ΠΚ:1Π	D4 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1ΠΚ:1Π	D5 $MgCl_2$ (0.2 M) 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 PEG 4000 (18% v/v) 1ΠΚ:1Π
<i>Control</i>					

Κατόπιν παρατήρησης των αποτελεσμάτων της *microbatch* η συνθήκη που περιλάμβανε **12 mg/mL πρωτεΐνης – διάλυμα πυρήνων αραιωμένο κατά 1/4** και εφαρμόστηκε σε κρυστάλλωση με τη μέθοδο batch με τελικό όγκο των 300 μL , ενώ εξετάστηκε επίσης η συνθήκη **9 mg/mL πρωτεΐνης – διάλυμα πυρήνων αραιωμένο κατά 1/4**. Συνολικά, παρασκευάστηκαν 17 δείγματα, εκ των οποίων τα 10 χαρακτηρίζονταν από συγκέντρωση πρωτεΐνης 12 mg/mL και τα εναπομείναντα 7 παρουσίαζαν

συγκέντρωση πρωτεΐνης 9 mg/mL. Να σημειωθεί ότι εκ των τελευταίων ένα δείγμα περιείχε διάλυμα πυρήνων αραιωμένο κατά 1/2, ενώ ένα δείγμα δεν περιλάμβανε διάλυμα πυρήνων κρυστάλλωσης.

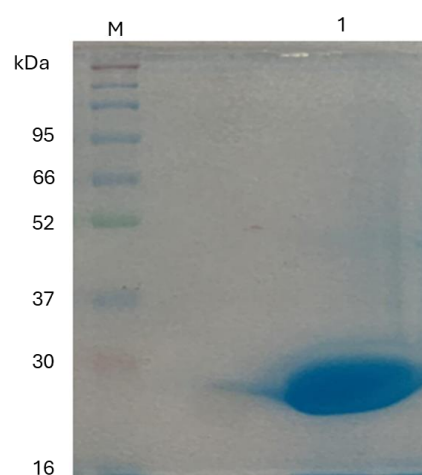
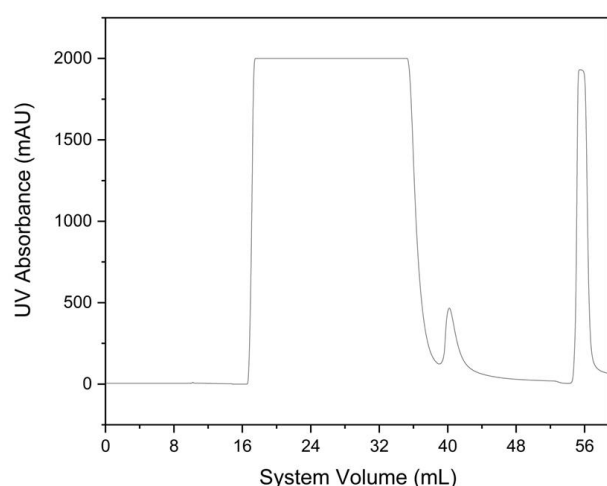
Πίνακας III.1.4. Δείγματα που προετοιμάστηκαν κατά την κρυστάλλωση *batch*.

Κωδικός δειγμάτων	Συνθήκη: 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M MgCl ₂ , 18% (w/v) PEG 4000
cox_sa - cox_s10	12 mg/ml <i>protein</i> , <i>seedstock dilution</i> 1/4
cox_s11 - cox_s13 & cox_s15	9 mg/ml <i>protein</i> , <i>seedstock dilution</i> 1/4
cox_s14	9 mg/ml <i>protein</i> , <i>seedstock dilution</i> 1/2
cox_s17	9 mg/ml <i>protein</i>

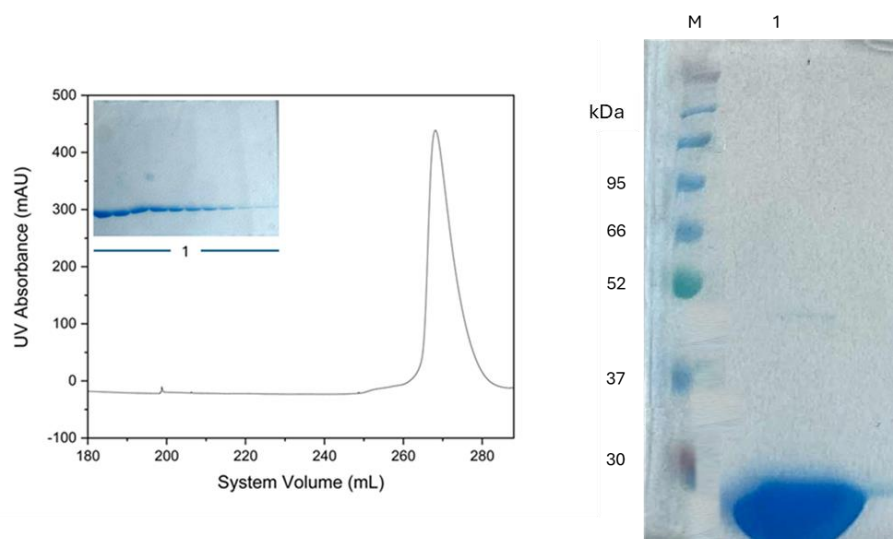
III.1.3 Αποτελέσματα

III.1.3.1 Έκφραση και Απομόνωση της 3Cpro του Ιού *Coxsackie B3*

Η διαδικασία της έκφρασης και της απομόνωσης της απομόνωσης της 3Cpro χαρακτηρίστηκε επιτυχής, με το αποτέλεσμα της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης να προσδιορίζεται στην Εικόνα III.1.3. Το χαρακτηριστικό της υψηλής κορυφής, που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη-στόχο, στο διάγραμμα της χρωματογραφίας, καθώς και της εμφάνισης έντονης ζώνης στο αντίστοιχο μοριακό βάρος στο πήκτωμα της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης μαρτυρούν την παρουσία της πρωτεΐνης σε υψηλή συγκέντρωση. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε ποσοτικά με φασματοφωτομετρία *nanodrop*.



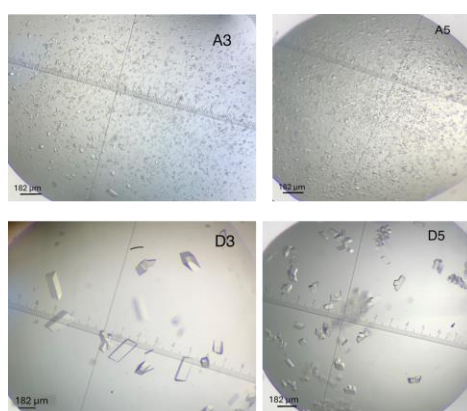
Εικόνα III.1.3. Αριστερά: Διάγραμμα οπτικής απορρόφησης στα 280 nm συναρτήσεως του όγκου που διέρχεται από το σύστημα κατά τη διαδικασία της IMAC. Η πρώτη κορυφή, που παρουσιάζει πλατό, αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες που διέρχονται από τη στήλη χωρίς να αλληλεπιδράσουν με αυτή. Η δεύτερη κορυφή αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες που προσδένονται μη ειδικά στη στήλη. Η τρίτη κορυφή αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες που δεσμεύονται ειδικά στη στήλη, συμπεριλαμβανομένου της 3Cpro. Δεξιά: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης για την 3Cpro έπειτα από τη διαδικασία της IMAC. M: μάρτυρας μοριακού βάρους, 1: Διάλυμα της 3Cpro έπειτα από τη διαδικασία της IMAC.



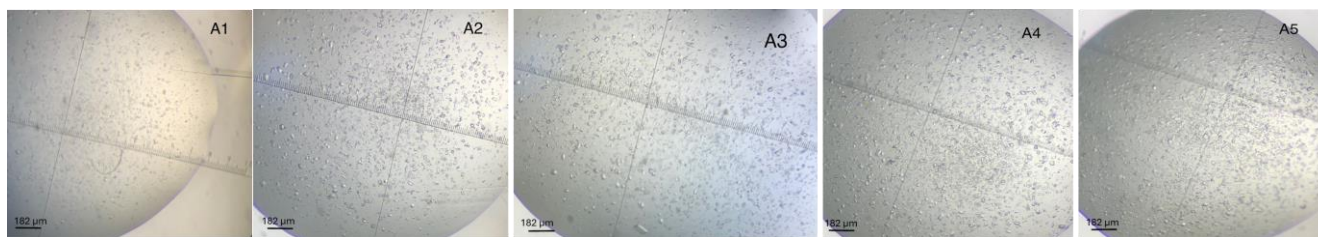
Εικόνα III.1.4. Αριστερά: Διάγραμμα οπτικής απορρόφησης στα 280 nm συναρτήσει του όγκου που διέρχεται από το σύστημα κατά τη διαδικασία της SEC. Η κορυφή αντιστοιχεί στην 3Cpro. Στο επάνω αριστερό τμήμα παρατίθεται το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης που παρουσιάζει ενδεικτικά κλάσματα της 3Cpro που συλλέχθηκαν κατά τη διαδικασία της μοριακής διήθησης. **Δεξιά:** Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης της 3Cpro έπειτα από όλα τα βήματα απομόνωσης. M: Μάρτυρας μοριακού βάρους, 1: Συμπυκνωμένο διάλυμα της 3Cpro έπειτα από τη διαδικασία της SEC.

III.1.3.2. Κρυστάλλωση και Πρωταρχική Κρυσταλλογραφική Μελέτη με Χρήση Δεδομένων XRPD

Σε πρώτο στάδιο, όπως προαναφέρθηκε, πραγματοποιήθηκε κρυστάλλωση με τη μέθοδο *microbatch* για τον έλεγχο της επίδρασης της τεχνικής της σποράς στην απόδοση του πολυκρυσταλλικού δείγματος. Για το σκοπό αυτό αξιοποιήθηκαν σχετικά πυκνά διαλύματα πυρήνων κρυστάλλωσης με αραιώσεις της τάξης των 1/4, 1/8 και 1/16. Το καλύτερο αποτέλεσμα αποδόθηκε σε συνθήκες που χαρακτηρίζονταν από τη μικρότερη αραιώση του διαλύματος των πυρήνων κρυστάλλωσης, ενώ παράλληλα η πρωτεΐνη έφερε υψηλές τιμές συγκέντρωσης. Στην Εικόνα III.1.4 παρουσιάζεται η επίδραση της τεχνικής της σποράς στο αποτέλεσμα του πολυκρυσταλλικού δείγματος, ενώ στην Εικόνα III.1.5 αποτυπώνεται η επίδραση της αραιώσης του διαλύματος των πυρήνων στο σχηματισμό πολυκρυσταλλικού ιζήματος.



Εικόνα III.1.4. Εικόνες οπτικής μικροσκοπίας που παρουσιάζουν την επίδραση της τεχνικής της σποράς στην απόδοση πολυκρυσταλλικού δείγματος. Επάνω: Συνθήκες κρυστάλλωσης που περιλαμβάνουν διάλυμα πυρήνων αραιωμένο κατά 1/4, ενώ η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ανέρχεται στα 8 mg/mL (A3) και στα 12 mg/mL (A5). Κάτω: Συνθήκες κρυστάλλωσης που δεν εφαρμόστηκε η τεχνική της σποράς, με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης να ανέρχεται στα 8 mg/mL (D3) και 12 mg/mL (D5).



Εικόνα III.1.5. Εικόνες οπτικής μικροσκοπίας που παρουσιάζουν την επίδραση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, συνδυαστικά με τη χρήση διαλύματος πυρήνων αραιωμένου κατά 1/4, στην απόδοση πολυκρυσταλλικού δείγματος. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης αυξάνεται από αριστερά προς τα δεξιά με τις συνθήκες A1, A2, A3, A4 και A5 να φέρουν συγκέντρωση πρωτεΐνης 4, 6, 8, 10 και 12 mg/mL αντίστοιχα.

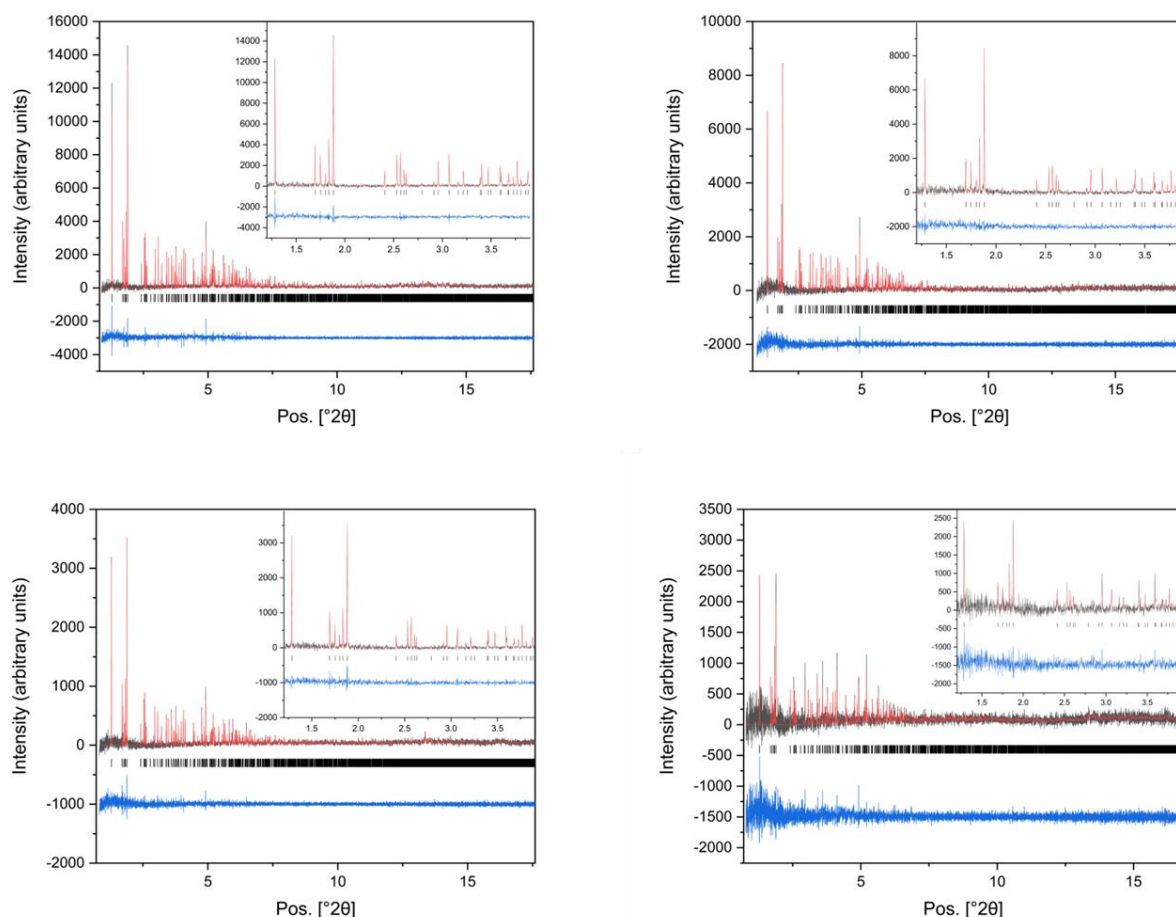
Όπως παρατηρείται στις Εικόνες III.1.4 και III.1.5, η συνθήκη A5, η οποία αντιστοιχεί σε συγκέντρωση πρωτεΐνης 12 mg/mL και αρραίωση του διαλύματος των πυρήνων κατά 1/4, απέδωσε το σχηματισμό πολυάριθμων μικροκρυστάλλων ομοιογενούς μορφολογίας. Δεδομένου του ανωτέρω γεγονότος, η συγκεκριμένη συνθήκη αξιοποιήθηκε για την κρυστάλλωση της 3Cpro με τη μέθοδο *batch*, ενώ παράλληλα εξετάστηκε και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης των 9 mg/mL, τόσο σε αρραίωση του διαλύματος των πυρήνων κατά 1/4 όσο και κατά 1/2, αλλά και χωρίς την προσθήκη πυρήνων κρυστάλλωσης.



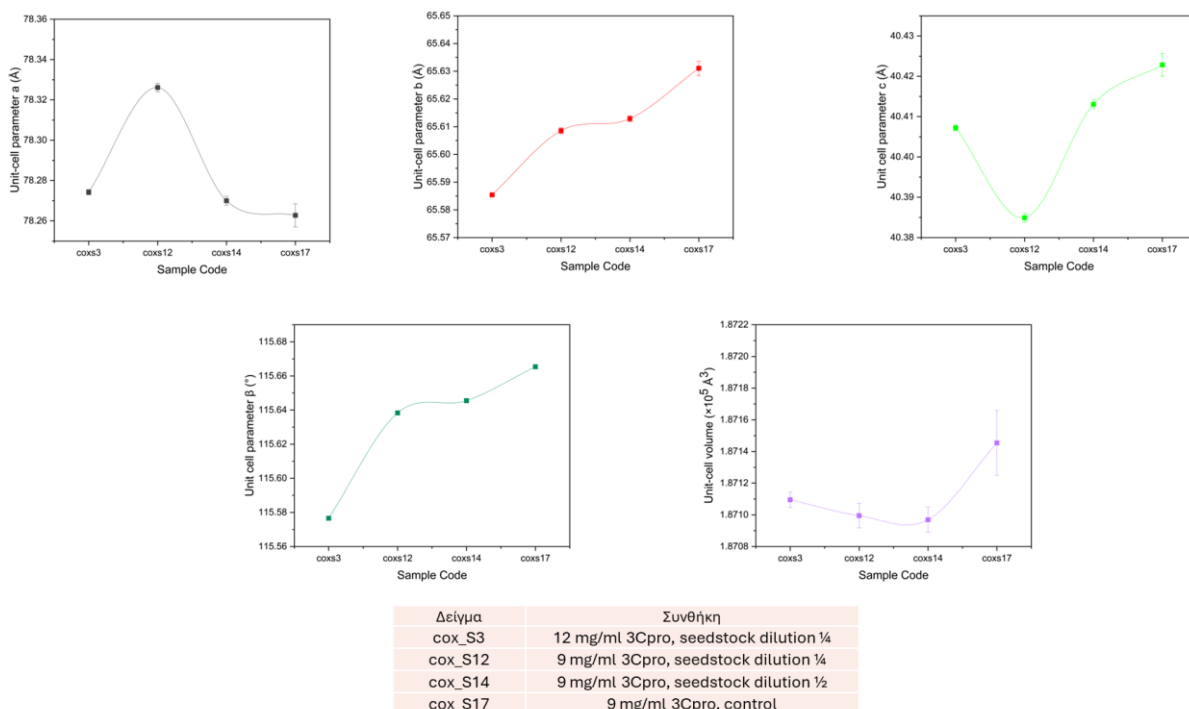
Εικόνα III.1.6. Εικόνες πολυκρυσταλλικών ιζημάτων των δειγμάτων cox_s8 (**αριστερά**), cox_s14 (**κέντρο**) και cox_s17 (**δεξιά**), όπως λήφθηκαν μέσω οπτικής μικροσκοπίας. Το δείγμα cox_s8 χαρακτηρίζεται από συγκέντρωση πρωτεΐνης 12 mg/mL και αρραίωση του διαλύματος των πυρήνων κατά 1/4. Το δείγμα cox_s14 χαρακτηρίζεται από συγκέντρωση πρωτεΐνης 9 mg/mL και αρραίωση του διαλύματος των πυρήνων κατά 1/2. Το δείγμα cox_s17 χαρακτηρίζεται από συγκέντρωση πρωτεΐνης 9 mg/mL, ενώ δεν προστέθηκε διάλυμα πυρήνων κρυστάλλωσης.

Τα πολυκρυσταλλικά δείγματα που προέκυψαν με τη μέθοδο *batch* υποβλήθηκαν σε συλλογή δεδομένων XRPD υψηλής ευκρίνειας στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, με τα πολυκρυσταλλικά δείγματα να εκτίθενται σε ακτινοβολία μήκους κύματος $\lambda = 1.07817(3)$ για ~2 min. Πλην ενός δείγματος που εμφανίζει έντονο άμορφο χαρακτήρα με ασθενή κρυσταλλική κατάσταση – πιθανόν λόγω εξωγενών παραγόντων – η συλλογή των δεδομένων ανέδειξε σχετικά πανομοιότυπο προφίλ περίθλασης μεταξύ των δειγμάτων των διαφορετικών συνθηκών, όπως παρατηρείται στην Εικόνα III.1.7, ενώ πρωταρχική ανάλυση τους επέτρεψε τον προσδιορισμό του πολυμόρφου μονοκλινούς συμμετρίας (*space group* C2). Ενδεικτικό δείγμα αποτελεί το cox_s3, το οποίο χαρακτηρίζεται από τις εξής πλεγματικές σταθερές: $a = 78.274(1)$ Å,

$b = 65.5854(7) \text{ \AA}$, $c = 40.4072(7) \text{ \AA}$, $\beta = 115.5766(3)^\circ$ και φέρει όγκο μοναδιαίας κυψελίδας $V = 1.87110(5) (\times 10^5) \text{ \AA}^3$, ενώ η ανάλυση *Pawley* χαρακτηρίζεται από στατιστικούς δείκτες: $R_{wp} = 6.0847 \%$ και $\chi^2 = 1.35132$.



Εικόνα III.1.7. Ανάλυση *Pawley* των δεδομένων XRPD από τα δείγματα cox_s3 (επάνω αριστερά), cox_s12 (επάνω δεξιά), cox_s14 (κάτω αριστερά) και cox_s17 (κάτω δεξιά) η συλλογή των οποίων διεξήχθη στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF ($\lambda = 1.07817(3) \text{ \AA}$). Η κόκκινη, γκρι και μπλε γραμμή αντιστοιχούν στο θεωρητικό μοντέλο, στα πειραματικά δεδομένα και στη διαφορά των δύο προαναφερθέντων. Οι μαύρες κάθετες γραμμές προσδιορίζουν τις θέσεις των θεωρητικών ανακλάσεων *Bragg* για το πολύμορφο C2. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση *Pawley* για το δείγμα cox_s3 είναι $a = 78.274(1) \text{ \AA}$, $b = 65.5854(7) \text{ \AA}$, $c = 40.4072(7) \text{ \AA}$ και $\beta = 115.5766(3)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας: $R_{wp} = 6.0847 \%$ και $\chi^2 = 1.35132$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση *Pawley* για το δείγμα cox_s12 είναι $a = 78.326(2) \text{ \AA}$, $b = 65.609(1) \text{ \AA}$, $c = 40.385(1) \text{ \AA}$ και $\beta = 115.6383(5)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας: $R_{wp} = 5.7204 \%$ και $\chi^2 = 1.22201$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση *Pawley* για το δείγμα cox_s14 είναι $a = 78.270(2) \text{ \AA}$, $b = 65.613(1) \text{ \AA}$, $c = 40.413(1) \text{ \AA}$ και $\beta = 115.6455(5)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας: $R_{wp} = 7.3818 \%$ και $\chi^2 = 1.22118$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση *Pawley* για το δείγμα cox_s17 είναι $a = 78.263(6) \text{ \AA}$, $b = 65.631(3) \text{ \AA}$, $c = 40.423(3) \text{ \AA}$ και $\beta = 115.665(1)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας: $R_{wp} = 7.7356 \%$ και $\chi^2 = 1.20329$.



Εικόνα III.1.8. Διαγράμματα μεταβολής των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας συναρτήσει των συνθηκών κρυστάλλωσης που αντιστοιχούν στα διαφορετικά δείγματα. Στο κάτω μέρος της εικόνας παρατίθενται οι συνθήκες κρυστάλλωσης που αντιστοιχούν σε κάθε δείγμα.

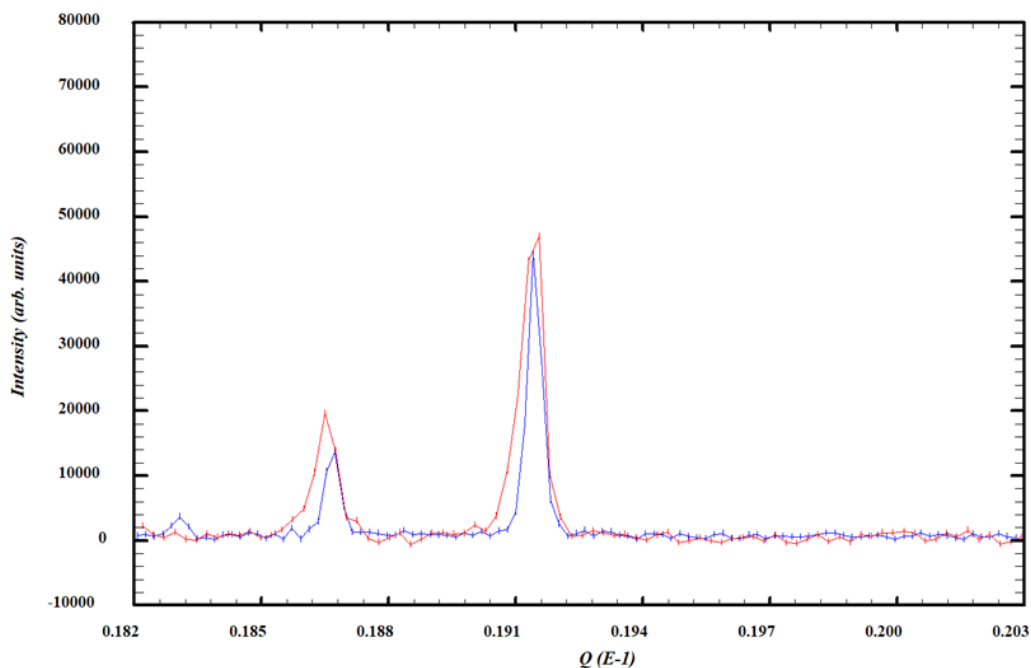
Στην Εικόνα III.1.8 παρατίθεται διαγραμματικά η μεταβολή των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας συναρτήσει των συνθηκών που αντιστοιχούν στα διαφορετικά δείγματα. Η μεταβολή των πλεγματικών σταθερών υποδεικνύεται από μετατοπίσεις των κορυφών περίθλασης που παρατηρούνται στα δεδομένα XRPD, ενώ η παράμετρος στην οποία οφείλεται χρήζει εξέτασης.

III.1.4 Συμπεράσματα – Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη κατέστη εφικτή με την επιτυχή έκφραση της 3Cpro μέσω των βακτηριακού συστήματος *E. coli*. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης με υψηλό βαθμό καθαρότητας προσέφερε τη δυνατότητα της διεξαγωγής δοκιμών κρυστάλλωσης τόσο σε μικρή όσο και σε μεγάλη κλίμακα, με τη συνδυαστική χρήση της τεχνικής της σποράς. Βάσει των αποτελεσμάτων που παρατίθενται στο υποκεφάλαιο III.1.3.2, γίνεται αντιληπτή η θετική επίδραση της τεχνικής σποράς στο σχηματισμό πολυκρυσταλλικού ιζήματος. Μάλιστα, η χρήση πυκνότερων διαλυμάτων πυρήνων κρυστάλλωσης, σε συμφωνία με το θεωρητικό υπόβαθρο, απέδωσε πιο πυκνό πολυκρυσταλλικό ίζημα, όπως παρατηρείται στα αποτελέσματα της δοκιμής με τη μέθοδο *microbatch*. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε σχετική ομοιογένεια των κρυστάλλων ως προς τη μορφολογία, ένα υποσχόμενο χαρακτηριστικό που αποτέλεσε βάση για πειράματα μεγαλύτερης κλίμακας, ώστε να είναι εφικτή η πραγματοποίηση πειράματος περίθλασης XRPD.

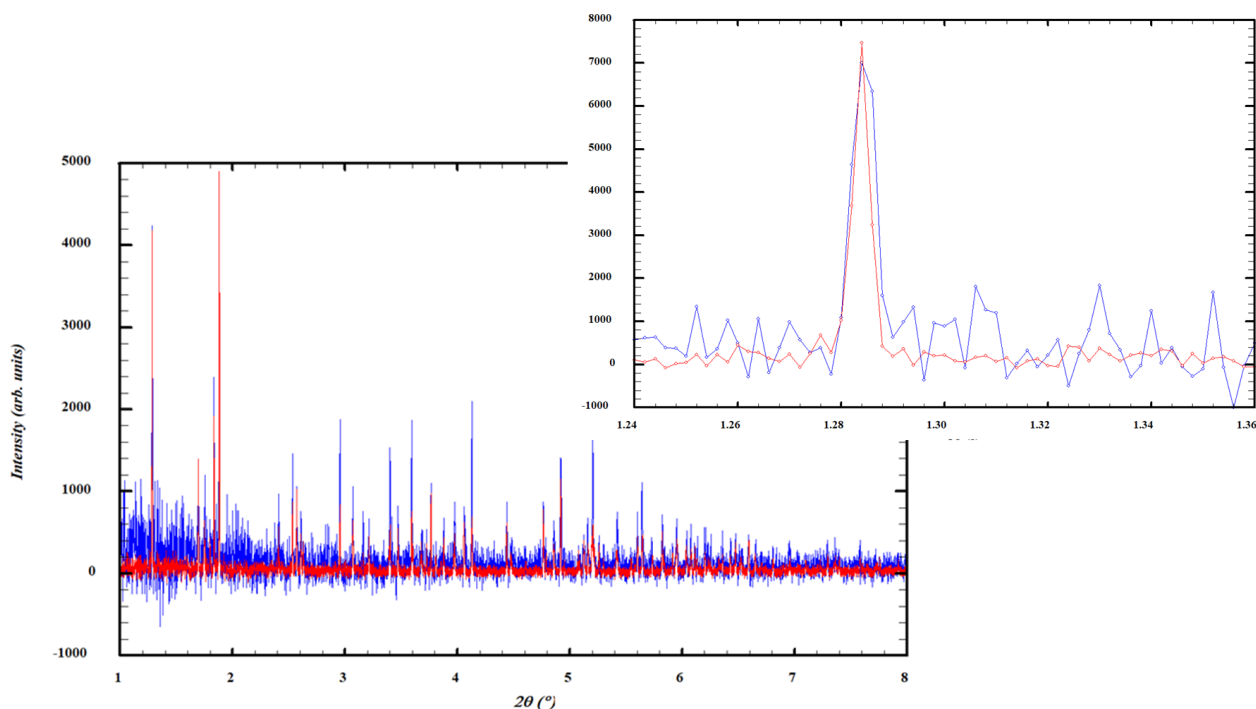
Βάσει των δεδομένων που συλλέχθηκαν στο πειραματικό σταθμό ID22, παρατηρήθηκε συμφωνία αποτελεσμάτων ως προς τον πολυμορφισμό της 3Cpro με προγενέστερες δοκιμές (Fili et al., 2016; Κονταρίνης, 2024; Κοσίνας, 2020, Σπηλιοπούλου, 2018). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε σύγκριση με

παλαιότερα αποτελέσματα που δεν συμπεριλάμβαναν την τεχνική της σποράς, τα δεδομένα περίθλασης της παρούσας μελέτης παρουσιάζουν εμφανή βελτίωση ως προς την ποιότητα (Εικόνα III.1.9). Όπως παρατηρείται στην Εικόνα III.1.9, η βελτίωση του σήματος περίθλασης είναι εμφανής, με τις κορυφές να χαρακτηρίζονται από καλύτερη γωνιακή ευκρίνεια. Ωστόσο, δεδομένου ότι η υψηλή γωνιακή ευκρίνεια αποτελεί χαρακτηριστικό που συνοδεύει την περίθλαση ακτίνων Χ στον πειραματικό σταθμό ID22 – έπειτα από την αναβάθμιση του ESRF που διεκπεραιώθηκε κατά τη διάρκεια του έτους 2019 – κρίνεται αναγκαία η σύγκριση αντίστοιχων δεδομένων περίθλασης που έχουν συλλεχθεί με μικρή διαφορά χρονικού διαστήματος.



Εικόνα III.1.9. Σύγκριση δεδομένων περίθλασης XRPD από τα πολυκρυσταλλικά δείγματα cox46 (κόκκινη γραμμή) και cox_s3 (μπλε γραμμή). Το δείγμα cox46 μετρήθηκε στον πειραματικό σταθμό ID22 (RT, $\lambda = 1.30003(3) \text{ \AA}$) το έτος 2018 και αντιστοιχεί σε πολύμορφο C2 με τις εξής πλεγματικές σταθερές: $a = 77.341(9) \text{ \AA}$, $b = 65.608(5) \text{ \AA}$, $c = 40.901(9) \text{ \AA}$ και $\beta = 115.879(9)^\circ$. Το δείγμα cox_s3 μετρήθηκε στον πειραματικό σταθμό ID22 (RT, $\lambda = 1.07817(3) \text{ \AA}$) το έτος 2025 και αντιστοιχεί σε πολύμορφο C2 με τις εξής πλεγματικές σταθερές: $a = 78.274(1) \text{ \AA}$, $b = 65.5854(7) \text{ \AA}$, $c = 40.4072(7) \text{ \AA}$ και $\beta = 115.5766(3)^\circ$.

Στον παρόν πείραμα που αναλύθηκε στη παραπάνω μελέτη πραγματοποιήθηκε επίσης συλλογή δεδομένων XRPD από δείγμα που δεν προέκυψε με τη χρήση σπόρων. Όπως παρατηρείται στην Εικόνα III.1.10, η διαφορά μεταξύ των δύο δειγμάτων είναι σημαντική, με τη βελτίωση της ποιότητας των δεδομένων XRPD – ως προς την αναλογία σήματος περίθλασης : θορύβου – να είναι αισθητή στα δείγματα που έχουν προκύψει με τη χρήση σπόρων. Επιπροσθέτως, παρατηρείται σχετικά βελτιωμένη γωνιακή ευκρίνεια των προαναφερόμενων δεδομένων – ωστόσο, η ποσότητα του δείγματος που σχηματίστηκε απουσία σπόρων δεν ήταν ικανοποιητική με αποτέλεσμα να αποδώσει ασθενές σήμα περίθλασης και η σύγκριση μεταξύ των δύο δειγμάτων να καθίσταται αναξιόπιστη.



Εικόνα III.1.10. Σύγκριση δεδομένων XRPD με κλιμακωμένες εντάσεις από τα δείγματα cox_s13 (κόκκινο χρώμα) και cox_17 (μπλε χρώμα), η συλλογή των οποίων διεξήχθη στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF (RT, $\lambda = 1.07817(3)$ Å). Το δείγμα cox_s13 αντιστοιχεί σε πολύμορφο C2 με τις εξής πλεγματικές σταθερές: $a = 78.300(2)$ Å, $b = 65.608(1)$ Å, $c = 40.409(1)$ Å και $\beta = 115.6266(5)^\circ$. Το δείγμα cox_s17 αντιστοιχεί σε πολύμορφο C2 με τις εξής πλεγματικές σταθερές: $a = 78.263(6)$ Å, $b = 65.631(3)$ Å, $c = 40.423(3)$ Å και $\beta = 115.665(1)^\circ$. Στο επάνω δεξιό τμήμα της εικόνας παρατίθεται εστίαση της συγκριτικής απεικόνισης των δεδομένων XRPD σε μικρότερο εύρος γωνιών περίθλασης 2θ .

Δεδομένου των ανωτέρω, κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση των συνθηκών κρυστάλλωσης με στόχο την αύξηση της ποσότητας του πολυκρυσταλλικού ιζήματος, ώστε να βελτιωθεί η διαδικασία της συλλογής δεδομένων και ως εκ τούτου να κατανοηθεί η επίδραση της τεχνικής της σποράς στην ποιότητα του πολυκρυσταλλικού ιζήματος. Μελλοντικές διερευνήσεις θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν την εξέταση των αναλογιών του πρωτεϊνικού διαλύματος : διαλύματος κρυστάλλωσης : διαλύματος σπόρων, ενώ περαιτέρω διερεύνηση χρήζει η παράμετρος της αραιώσης του διαλύματος των σπόρων.

Απώτερος στόχος είναι η συλλογή δεδομένων με μεγαλύτερη ευκρίνεια, που συνοδεύεται από μικρότερο *d-spacing*, για τον προσδιορισμό της δομής με μεγαλύτερη ακρίβεια. Η βελτίωση της ποιότητας των πολυκρυσταλλικών δειγμάτων με την εφαρμογή της μεθόδου της σποράς θα αποτελέσει ισχυρό θεμέλιο για τη μεθοδολογία XRPD ως προς την επίλυση δομής, καθώς πληθώρα πρωτεϊνών αδυνατεί να σχηματίσει μονοκρυστάλλους καλής ποιότητας, καλύπτοντας έτσι το χάσμα μεταξύ της δυσκολίας ανάπτυξης μονοκρυστάλλων και της χαμηλής ποιότητας των πολυκρυσταλλικών πρωτεϊνικών δειγμάτων.

Παράλληλα, η βελτίωση της ποιότητας των μονοκρυστάλλων με την αξιοποίηση της μεθόδου της σποράς θα συνεισφέρει σε μελλοντικά πειράματα διαλογής δομικών θραυσμάτων (*fragment screening*), τα οποία πρόκειται να αποτελέσουν συνέχεια πρότερων δοκιμών (Κοσίνας, 2020), με στόχο το σχεδιασμό αντικών φαρμάκων.

III.2 Δομική Μελέτη της 3'-5' Εξωνουκλεάσης του Ιού LCMV (LCMV ExoN)

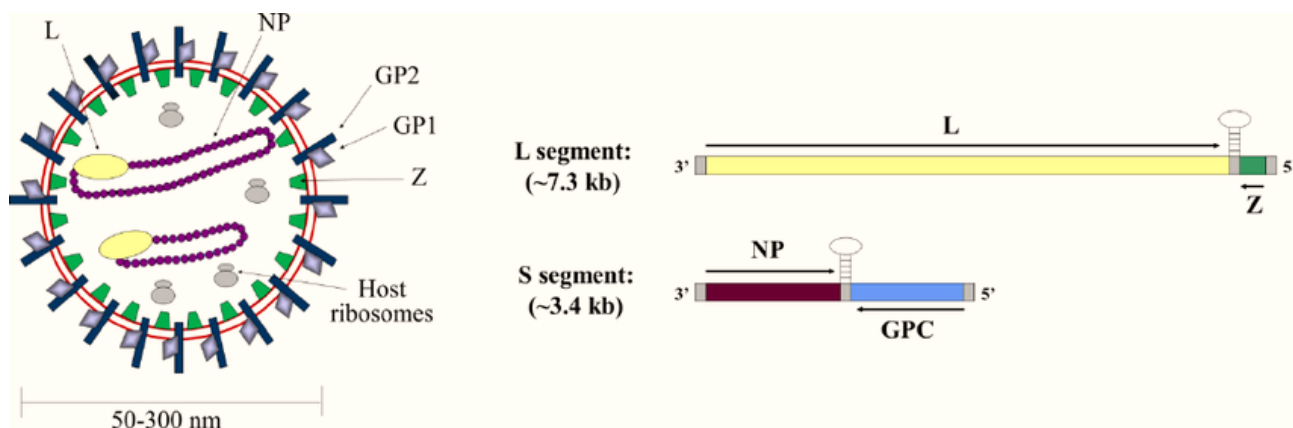
Ο βασικός στόχος της παρούσας μελέτης είναι ο προσδιορισμός μιας επιτυχούς και επαναλήψιμης συνθήκης κρυστάλλωσης της LCMV ExoN, που να αποδίδει κρυστάλλους υψηλής ποιότητας. Τρία δομικά μοντέλα περιγράφουν το αναφερόμενο πρωτεϊνικό μόριο μέχρι στιγμής, με ευκρίνεια έως και 2 Å ([4o6h](#), [4o6i](#) και [8cnl](#)), ενώ δεν υπάρχει κατατεθειμένο μοντέλο που να το περιγράφει παρουσία ιόντων μαγνητίου ή να το παρουσιάζει σε πρόσδεση με πιθανά φαρμακευτικά μικρομόρια.

III.2.1 Ιός Λεμφοκυτταρικής Χοριομηνιγγίτιδας (*Lymphocytic Choriomeningitis Virus*, LCMV)

Ο LCMV είναι μέλος της οικογένειας *Arenaviridae* και συγκεκριμένα του γένους *Mammarenavirus*, το οποίο περιλαμβάνει ιούς που προσβάλλουν θηλαστικά. Οι ιοί του γένους *Mammarenavirus* ταξινομούνται περαιτέρω σε δύο ομάδες, βάσει γενετικών και γεωγραφικών διαφοροποιήσεων. Η ταξινόμηση αυτή διακρίνει το γένος σε αρενοϊούς του Παλαιού Κόσμου (*Old world*, OW) και σε αρενοϊούς του Νέου Κόσμου (*New World*, NW). Στην πρώτη ομάδα συγκαταλέγεται ο LCMV, που εμφανίζει παγκόσμια κατανομή μεταδιδόμενος μέσω των τρωκτικών, καθώς και ο ιός LASV (*Lassa virus*), ο οποίος είναι υπαίτιος για την πρόκληση ιογενούς αιμορραγικού πυρετού (*Lassa Hemorrhagic Fever*).

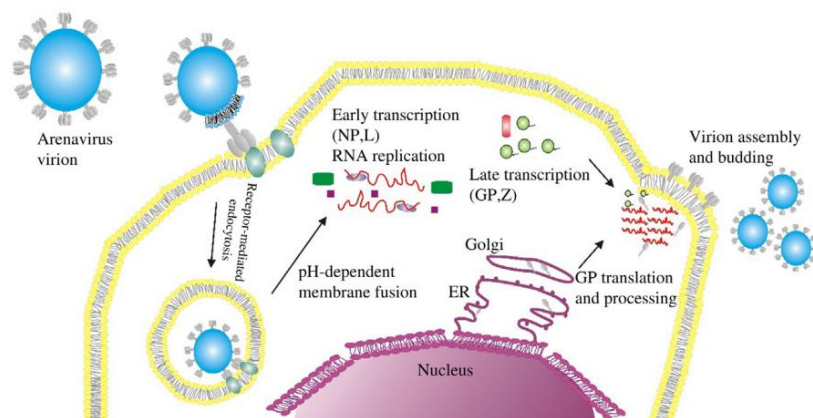
Ο ανθρώπινος οργανισμός δύναται να αποτελέσει ξενιστή για τον LCMV, κατόπιν άμεσης επαφής με μολυσμένα αντικείμενα, μέσω εισπνοής του ιού με τη μορφή αερολύματος, ή ακόμα και μέσω μεταμόσχευσης οργάνων. Στις επιπτώσεις που επιφέρει η μόλυνση με τον ιό περιλαμβάνονται νευρικές διαταραχές, όπως μηνιγγίτιδα και απώλεια ακοής, ενώ έχει παρατηρηθεί σημαντικός αριθμός αποβολών στην περίπτωση νεογνικών λοιμώξεων, καθώς και η πρόκληση επιπλοκών σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (Papageorgiou et al., 2020). Παρά ταύτα, ο LCMV παρουσιάζει χαμηλό ποσοστό θνησιμότητας, γεγονός που καθιστά δυνατή τη μελέτη του σε επίπεδο βιοασφάλειας 2 (*Biosafety Level 2*, BSL-2), σε αντίθεση με άλλα μέλη της οικογένειας των αρενοϊών που απαιτούν επίπεδο βιοασφάλειας 4. Ως εκ τούτου, καθίσταται ιδανικό μοντέλο μελέτης για την κατανόηση των μηχανισμών της αντιγραφής και ανοσοκαταστολής που χαρακτηρίζουν τους αρενοϊούς (West et al., 2014).

Το γονιδίωμα των αρενοϊών συγκροτείται από μονόκλωνο RNA αρνητικής πολικότητας (-ssRNA), το οποίο εμφανίζει διατμηματικό και αμφιπολικό χαρακτήρα. Ειδικότερα, αποτελείται από δύο τμήματα μονόκλωνου RNA, ένα μικρού μήκους (*small segment*, S) με μέγεθος ~3.4 kb και ένα τμήμα μεγάλου μήκους (*large segment*, L) με μέγεθος ~7.2 kb. Κάθε τμήμα περιέχει δύο γονίδια που εκφράζονται με αμφιπολικό μηχανισμό και συνδέονται μεταξύ τους με μια διαγονιδιακή περιοχή (*intergenic region*, IGR), της οποίας η αλληλουχία του μονόκλωνου RNA σχηματίζει δομή φουρκέτας για τον τερματισμό της μεταγραφής του ιικού mRNA. Το S τμήμα εκφράζει τη νουκλεοπρωτεΐνη (*nucleoprotein*, NP), η οποία εκτελεί πολλαπλές λειτουργίες και ένα πρόδρομο μόριο γλυκοπρωτεΐνης (*glycoprotein precursor*), το οποίο με τη δράση μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων προσδίδει τα GP-1, GP-2 και ενός διαμεμβρανικού σηματοδοτικού πεπτιδίου (*transmembrane stable signal peptide*, SSP). Το L τμήμα είναι υπεύθυνο για την έκφραση της RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης, γνωστή και ως πρωτεΐνη L και της μικρής πρωτεΐνης Z, που λειτουργεί ως πρωτεΐνη μήτρας. Αμφότερα τα αναφερόμενα τμήματα φέρουν στα 5' και 3' άκρα τους συμπληρωματικές μη κωδικοποιητικές αλληλουχίες που σχηματίζουν μια δομή στην άκρη κάθε τμήματος, η οποία αποτελεί θέση πρόσδεσης για την RNA πολυμεράση L (Papageorgiou et al., 2020).



Εικόνα III.2.1. Σχηματική απεικόνιση της δομής του ιοσωματίου (αριστερά) και η οργάνωση του γονιδιώματος των αρενοϊών (δεξιά) (Wolff et al., 2013).

Κάθε μια εκ των ανωτέρω πρωτεϊνών έχει καίριο ρόλο επιτελώντας διαφορετικές λειτουργίες στον κύκλο ζωής των αρενοϊών. Η **NP** σχηματίζει ένα πολυμερές που ενκαψιδιώνει το ιικό RNA σχηματίζοντας το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο (*ribonucleoprotein complex*, RNP), ενώ αποτελεί συμπαραγόντα για τη δράση της L πρωτεΐνης. Η **L πρωτεΐνη** προσδένεται στα RNPs, στο σημείο που υποδείχθηκε παραπάνω, συγκροτώντας τα σύμπλοκα αντιγραφής και μετάφρασης (*replication-transcription complexes*, RTC), επιτελώντας διττή λειτουργία – αυτή της αντιγραφής και της μεταγραφής. Η **πρωτεΐνη Z** έχει καθοριστικό ρόλο στη συναρμολόγηση και την εκβλάστηση των ιοσωματίων, ενώ εμφανίζει και ρυθμιστική ικανότητα ως προς τη μετάβαση από το στάδιο της αντιγραφής στη συναρμολόγηση, αναστέλλοντας τη λειτουργία της πρωτεΐνης L. Τα **μόρια της γλυκοπρωτεΐνης GP1 και GP2**, εντοπιζόμενα στο μεμβρανικό περίβλημα του ιού, συμβάλλουν στην πρόσδεση του ιοσωματίου στον αντίστοιχο υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή και στη σύντηξη του μεμβρανικού περιβλήματος με την ενδοσωμική μεμβράνη για την απελευθέρωση του ιοσωματίου στο κυτταρόπλασμα αντίστοιχα. Το **σηματοδοτικό πεπτίδιο SSP** έχει καθοριστικό ρόλο στην αναδίπλωση και στη λειτουργικότητα το GP2, καθώς ρυθμίζει τη σύντηξη των μεμβρανών μέσω της αισθητηριακής του λειτουργίας ως προς το pH. Στην Εικόνα III.2.2 περιγράφεται συνοπτικά ο κύκλος ζωής των αρενοϊών, από την είσοδο τους στο κύτταρο ξενιστή έως και την εκβλάστηση των νέων ιοσωματίων.



Εικόνα II.2.2. Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής των αρενοϊών (Moolla & Weyer, 2020).

II.2.1.1 Η Νουκλεοπρωτεΐνη (NP) και η 3'-5' Εξωνουκλεάση (ExoN)

Η νουκλεοπρωτεΐνη αποτελεί την πιο άφθονη ιική πρωτεΐνη που εντοπίζεται στα μολυσμένα κύτταρα και στα ιοσωμάτια, διαδραματίζοντας καίριο ρόλο στον κύκλο ζωής των αρενοϊών ως δομικό αλλά και λειτουργικό συστατικό. Η νουκλεοπρωτεΐνη των αρενοϊών χαρακτηρίζεται από πολλαπλές περιοχές, ενώ επιτελεί πολλαπλές λειτουργίες. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται η προστασία του ιικού γονιδιώματος και του αντιγονιδιώματος, που προκύπτει από την αντιγραφή, από αποικοδόμηση, η αποτροπή σχηματισμού δίκλωνων μορίων ιικού RNA και η συμπύκνωση του ιικού γονιδιώματος στα RNPs, ενώ κρίσιμος είναι ο ρόλος της και στις διαδικασίες της αντιγραφής και της μεταγραφής.

Οι λειτουργίες της νουκλεοπρωτεΐνης στηρίζονται σε δύο βασικές του μορίου: την αμινοτελική και την καρβοξυτελική περιοχή. Η αμινοτελική περιοχή (*N-terminal domain*) είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του ιικού RNA και τον πολυμερισμό του μορίου για την προστασία του ιικού γονιδιώματος/αντιγονιδιώματος, ενώ προσδένει την *L* πρωτεΐνη κατά το σχηματισμό των RTC.

Η καρβοξυτελική επικράτεια (*C-terminal domain*) εμφανίζει ρόλο 3'-5' εξωνουκλεάσης, κατακερματίζοντας μόρια dsRNA. Η επικράτεια της 3'-5' εξωνουκλεάσης έχει ανοσοκατασταλτική δράση κατά τη διάρκεια της ιογενούς μόλυνσης ενώ εξασφαλίζει τη σταθερότητα του γονιδιώματος κατά τις διαδικασίες της αντιγραφής και της μεταγραφής (Papageorgiou et al., 2020). Ειδικότερα, η κατάτμηση των μορίων dsRNA ιογενούς προέλευσης – που αναγνωρίζονται από τα μολυσμένα κύτταρα- ξενιστές ως επαγωγείς της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης – αποτρέπει την αντιική σηματοδότηση από κυτταροπλασματικούς αισθητήρες του RNA (Pyle & Whelan, 2021). Επιπλέον, η επικράτεια της εξωνουκλεάσης φαίνεται να εμφανίζει σταθεροποιητικό ρόλο στην αντιγραφή και τη μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος, καθώς αν και δεν απαιτείται για τη διεξαγωγή των διαδικασιών αυτών, μελέτες έχουν υποδείξει πως μεταλλάξεις που οδηγούν στην απουσία της δραστηριότητας της συνεπάγονται τη μειωμένη αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος (Huang et al., 2015).

Η περιοχή της εξωνουκλεάσης είναι τύπου DEDDh, καταλύοντας της υδρόλυση του υποστρώματος μέσω του μηχανισμού δύο μεταλλικών ιόντων. Το ενεργό κέντρο φέρει το μοτίβο DEDD περιλαμβάνοντας τέσσερα συντηρημένα όξινα αμινοξικά κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος και γλουταμινικού οξέος δύο μεταλλικά ιόντα (συνήθως Mg^{2+}) με ένα κοντινό βασικό κατάλοιπο ιστιδίνης ή τυροσίνης. Μάλιστα, η παρουσία διαφορετικών μεταλλικών ιόντων καθορίζει τη λειτουργικότητα της εξωνουκλεάσης, με τα ιόντα Mg^{2+} και Mn^{2+} να ενεργοποιούν το ένζυμο, ενώ η παρουσία των ιόντων Ca^{2+} να αναστέλλουν τη δράση του (Yekwa et al., 2017). Αξίζει να σημειωθεί επίσης η σημασία της παρουσίας ιόντων Zn^{2+} στη σωστή λειτουργία της εξωνουκλεάσης. Παρότι η περιοχή πρόσδεσης του ψευδαργύρου δεν ταυτίζεται με το ενεργό κέντρο του ενζύμου, αλλά εντοπίζεται πλησίον του, δύναται να φέρει καίριο ρόλο στη δομική σταθερότητα της επικράτειας, επάγοντας την ορθή αναδίπλωση του καταλυτικού κέντρου (West et al., 2014).

Ένα επιπρόσθετο χαρακτηριστικό που παρουσιάζει συσχέτιση με τη λειτουργικότητα του ενζύμου είναι η βασική θηλιά, μια εύκαμπτη περιοχή 12 αμινοξέων (κυρίως βασικών καταλοίπων) που εντοπίζεται άνω του ενεργού κέντρου. Αν και μεταλλάξεις των βασικών αμινοξέων στην περιοχή της θηλιάς μειώνουν την ενεργότητα της εξωνουκλεάσης, ο ακριβής ρόλος της δεν έχει αποσαφηνιστεί (Hastie et al., 2011; Papageorgiou et al., 2020).

Ο ρόλος της 3'-5' εξωνουκλεάσης τόσο στην αποφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος του όσο και στη σταθεροποίηση του γονιδιώματος κατά την αντιγραφή, την καθιστά ενδιαφέρον φαρμακευτικό στόχο, με την αναστολή της δράσης της να αποτελεί πρωταρχικό βήμα για την ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων έναντι των ιογενών λοιμώξεων που προκαλούν οι αρενοϊοί.

III.2.2 Υλικά και Μέθοδοι

Για την παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν πειράματα έκφρασης της εξωνουκλεασικής επικράτειας της νουκλεοπρωτεΐνης του LCMV. Κατόπιν απομόνωσης της πρωτεΐνης με τη χρήση χρωματογραφικών τεχνικών και απομάκρυνσης της ουράς σύντηξης, ακολούθησαν δοκιμές κρυστάλλωσης της εξωνουκλεάσης με στόχο τον προσδιορισμό συνθήκης που να αποδίδει κρυσταλλικό αποτέλεσμα και να χαρακτηρίζεται από αναπαραγωγικότητα.

III.2.2.1 Έκφραση και Απομόνωση της LCMV ExoN

Η έκφραση της LCMV ExoN βασίστηκε στη χρήση του πλασμιδιακού φορέα pMCOX20A, ο οποίος ανασυνδυάστηκε με το cDNA που αντιστοιχεί στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου που κωδικοποιεί την ExoN, ενώ φέρει κλωνοποιημένη επίσης τη γενετική πληροφορία που εκφράζει μια αλληλουχία His₆ και μια ετικέτα θειορεδοξίνης (*Thioredoxin*, TRX) στο 5' άκρο για τη διευκόλυνση της απομόνωσης της πρωτεΐνης, την ενίσχυση της διαλυτότητας και την ορθή αναδίπλωση της, όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο I.2.7. Να σημειωθεί πως ο παρόν πλασμιδιακός φορέας διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό της αμικικιλίνης.

Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli* του στελέχους T7 *express* lq pLysS με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pMCOX20A. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης επιτεύχθηκε με την ανάπτυξη καλλιέργειών των μετασχηματισμένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό *Lysogeny Borth* (LB) που περιείχε αμικικιλίνη (100 mg/ml) και χλωραμφενικόλη (35 mg/ml) σε αναλογία 1:1000 ως προς το συνολικό όγκο καλλιέργειας. Ειδικότερα, παρασκευάστηκε αρχική καλλιέργεια των 50 ml, η οποία εμβολιάστηκε σε καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας των 2 L έπειτα από ολονύκτια επώαση στους 37 °C με ανάδευση σε 200 rpm. Η επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης ακολούθησε, όπως περιεγράφηκε στο υποκεφάλαιο I.2.3.2, με προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM, ενώ προστέθηκε επιπλέον ZnCl₂ σε τελική συγκέντρωση 0.1 mM για τη σταθεροποίηση της δομής και την ενεργότητα της πρωτεΐνης. Κατόπιν της επαγωγής η καλλιέργεια επώαστηκε σε 17 °C και με ανάδευση σε 200 rpm για 18 h. Σε τελικό στάδιο όπου τα κύτταρα ολοκλήρωσαν τη φάση ανάπτυξης, πραγματοποιήθηκε διακοπή της επώασης και τα κύτταρα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C έως ότου υποβληθούν σε λύση.

Η λύση των κυττάρων επήλθε με τη θερμική, χημική και μηχανική καταπόνηση, όπως αναλύθηκε στο υποκεφάλαιο I.2.4.1 και το κυτταρικό εκχύλισμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία IMAC με τη χρήση της χρωματογραφικής στήλης *HisTrap™ HP*, με τη διαδικασία που περιεγράφηκε στο υποκεφάλαιο I.2.4.2.1. Κατόπιν ολοκλήρωσης της χρωματογραφίας IMAC έγινε ανταλλαγή του διαλύματος έκλουσης του απομονωμένου πρωτεϊνικού δείγματος με το διάλυμα φύλαξης, ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση της πρωτεΐνης με τη χρήση των φίλτρων φυγοκέντρωσης *Amicon Ultra-4 centrifugal filter unit* και ακολούθησε αποθήκευση στους -20 °C με την προσθήκη γλυκερόλης σε τελική συγκέντρωση 10% (v/v). Σε περίπτωση που η διαδικασία της πέψης της αλληλουχίας σύντηξης διεξαγόταν σε σύντομο χρονικό διάστημα, ακολουθούσε φύλαξη του πρωτεϊνικού δείγματος στους 4 °C χωρίς προσθήκη γλυκερόλης. Η διαδικασία απομάκρυνσης της αλληλουχίας His₆-TRX επιτεύχθηκε μέσω ενζυμικής πέψης με TEVpro. Πιο συγκεκριμένα, το πρωτεϊνικό δείγμα επώαστηκε με την TEVpro σε μοριακή αναλογία 5:1 (ExoN:TEVpro) υπό ανακίνηση στους 4 °C (16 h) και έπειτα σε θερμοκρασία δωματίου (2 h). Με το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκε έλεγχος του αποτελέσματος της πέψης με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και εν συνεχεία το δείγμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία IMAC για το διαχωρισμό της πρωτεολυμμένης εξωνουκλεάσης από τα μόρια της TEVpro, τα τμήματα His₆-TRX καθώς και τα μόρια της εξωνουκλεάσης που δεν υποστεί πέψη. Σε τελικό στάδιο, πραγματοποιήθηκε αλλαγή του διαλύματος της συλλεχθείσας πρωτεΐνης με το τελικό διάλυμα φύλαξης

και το δείγμα αποθηκεύτηκε στο -80 °C. Στον Πίνακα III.2.1 παρατίθενται τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στα στάδια της έκφρασης και της απομόνωσης της ExoN.

Πίνακας III.2.1. Τα συστατικά των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις διαδικασίες της έκφρασης και της απομόνωσης της ExoN.

Έκφραση		Απομόνωση							
Θρεπτικό μέσο	IPTG / ZnCl ₂	Διάλυμα λύσης	Λυσοζύμη DNAάση			IMAC			
						Διάλυμα πρόσδεσης	Διάλυμα πλύσης	Διάλυμα έκλουσης	Διάλυμα αποθήκευσης
Lysogeny Borth (LB)	0.5 mM / 0.1 mM	50 mM Tris-HCl (pH 7.5)	0.5 mg/mL	10 µg/mL	Πριν τη πέψη με TEVpro	Πριν τη πέψη με TEVpro	Πριν τη πέψη με TEVpro	Πριν τη πέψη με TEVpro	
		20 mM Hepes (pH 7.5)			20 mM Hepes (pH 7.5)	20 mM Hepes (pH 7.5)	20 mM Hepes (pH 7.5)		
		300 mM NaCl			300 mM NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl		
		10 mM ιμιδαζόλη (pH 7.5)			30 mM ιμιδαζόλη (pH 7.5)	250 mM ιμιδαζόλη (pH 7.5)	Μετά την πέψη με TEVpro		
		5% (v/v) γλυκερόλη			Μετά την πέψη με TEVpro	Μετά την πέψη με TEVpro	20 mM Hepes (pH 7.5)		
		0.1% (v/v) Triton-X			20 mM Hepes (pH 7.5)	20 mM Hepes (pH 7.5)	300 mM NaCl		
		5 mM EDTA			300 mM NaCl	300 mM NaCl	5 mM ιμιδαζόλη (pH 7.5)		
		5 mM ιμιδαζόλη (pH 7.5)			30 mM ιμιδαζόλη (pH 7.5)	250 mM ιμιδαζόλη (pH 7.5)	5% (v/v) γλυκερόλη		
		5% (v/v) γλυκερόλη			5% (v/v) γλυκερόλη	5% (v/v) γλυκερόλη	2 mM MnCl ₂		

III.2.2.2 Δοκιμές Κρυστάλλωσης της LCMV ExoN

Οι δοκιμές κρυστάλλωσης της εξωνουκλεάσης πραγματοποιήθηκαν στην εγκατάσταση *Biocrystal Facility* υπό την αιγίδα του έργου ITACA.SB και βασίστηκαν στη διερεύνηση της συνθήκης 0.05 M sodium cacodylate (C₂H₆AsNaO₂) pH 6.8, 0.01 M magnesium sulfate (MgSO₄), 2 M ammonium sulfate [(NH₄)₂SO₄], που απέδωσε κρυσταλλικούς σχηματισμούς και επέτρεψε μέσω περιθλασης ακτίνων το δομικό χαρακτηρισμό σε ευκρίνεια 2.8 Å (PDB ID: 8cni) (Σπηλιοπούλου, 2023). Η περεταίρω διερεύνηση της συνθήκης αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης καθώς η αναφερόμενη συνθήκη δεν κατέστη επιτυχώς επαναλήψιμη, ενώ παράλληλο σκοπό αποτελεί η βελτίωση των δεδομένων περιθλασης για την επίλυση δομής υψηλότερης ευκρίνειας, η οποία να περιλαμβάνει τη παρουσία ιόντων μαγγανίου.

Σε πρώτο στάδιο διεξήχθη διερεύνηση της ανωτέρω συνθήκης με την αξιοποίηση της μεθόδου της διάχυσης ατμών και συγκεκριμένα της διάταξης της κρεμάμενης σταγόνας, με τη δοκιμή κρυστάλλωσης να λαμβάνει χώρα σε *plate Linbro 24 wells*. Η πρώτη δοκιμή βασίστηκε στη μεταβολή της συγκέντρωσης των (NH₄)₂SO₄ και MgSO₄, ενώ η συγκέντρωση του C₂H₆AsNaO₂ και το pH παρέμειναν σταθερά. Οι μεταβολές που εφαρμόστηκαν κατά τη διερεύνηση παρατίθενται αναλυτικά στον Πίνακα III.2.2. Κατά την αναφερόμενη διαδικασία, το διάλυμα της πρωτεΐνης – με συγκέντρωση 8 mg/mL και σύσταση που ταυτίζεται με το τελικό διάλυμα φύλαξης – αναμειχθηκε με το διάλυμα κρυστάλλωσης σχηματίζοντας στην κάθε καλυπτρίδα 3 σταγόνες διαφορετικές ως προς την αναλογία των δύο διαλυμάτων. Ειδικότερα, κάθε δεξαμενή περιείχε 500 µL του εκάστοτε διαλύματος κρυστάλλωσης, ενώ η σύσταση των τελικών σταγόνων κρυστάλλωσης είχε ως εξής:

1. 0.5 μL ExoN + 0.5 μL διάλυμα κρυστάλλωσης (1:1)
2. 0.5 μL ExoN + 0.25 μL διάλυμα κρυστάλλωσης (2:1)
3. 0.25 μL ExoN + 0.5 μL διάλυμα κρυστάλλωσης (1:2)

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας, το *plate* παρέμεινε στους 21 °C.

Πίνακας III.2.2. Η διάταξη των θέσεων στο *plate* κρυστάλλωσης, συμπεριλαμβανομένου των συνθηκών της διερεύνησης. Οριζόντια, η συγκέντρωση του $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ αυξάνεται με βήμα 0.2 (από 1.4 - 2.4 M). Κάθετα, αυξάνεται η συγκέντρωση του MgSO_4 με βήμα 10 mM (από 10 – 80 mM).

	1.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
10 mM MgSO_4	A1 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	A2 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	A3 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	A4 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	A5 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	A6 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8
20 mM MgSO_4	B1 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	B2 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	B3 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	B4 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	B5 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	B6 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8
40 mM MgSO_4	C1 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	C2 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	C3 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	C4 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	C5 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	C6 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8
80 mM MgSO_4	D1 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	D2 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	D3 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	D4 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	D5 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8	D6 50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ pH 6.8

Σε δεύτερο στάδιο, βάσει των αποτελεσμάτων της πρώτης δοκιμής, επαναλήφθηκε η προαναφερόμενη διερεύνηση, αλλά με τη συνδυαστική χρήση της τεχνική σποράς. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε διάλυμα σπόρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας *Hampton Research*, όπως περιεγράφηκε III.1.2.2. Για την παρασκευή του συγκεκριμένου διαλύματος αξιοποιήθηκε η σταγόνα κρυστάλλωσης της συνθήκης A5 (Πίνακας III.2.2), όπως προέκυψε από την προαναφερόμενη δοκιμή, με αναλογία ExoN:διαλύματος κρυστάλλωσης 1:1, ενώ ως διάλυμα επαναιώρησης των κρυσταλλικών θραυσμάτων χρησιμοποιήθηκε η συνθήκη A6 (50 μL) για τη σταθεροποίηση των σπόρων που προσδίδεται λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσης παραγόντων καθίζησης. Το διάλυμα των σπόρων δεν υποβλήθηκε σε αραιώσεις και προσαρμόστηκε στις συνθήκες που μελετήθηκαν στην πρώτη δοκιμή, με τις 3 σταγόνες κρυστάλλωσης που αντιστοιχούσαν σε κάθε δεξαμενή να έχουν την εξής σύσταση:

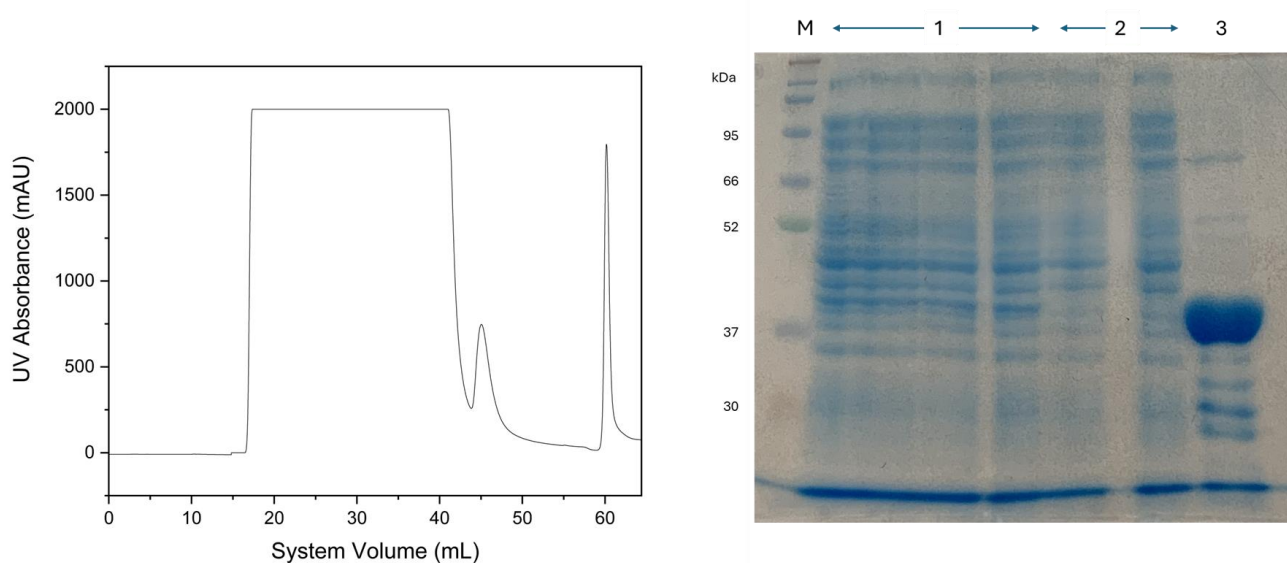
1. 0.5 μL ExoN + 0.45 μL διάλυμα κρυστάλλωσης + 0.05 μL διάλυμα σπόρων (10:9:1)
2. 0.5 μL ExoN + 0.20 μL διάλυμα κρυστάλλωσης + 0.05 μL διάλυμα σπόρων (10:4:1)
3. 0.25 μL ExoN + 0.45 μL διάλυμα κρυστάλλωσης + 0.05 μL διάλυμα σπόρων (5:9:1)

Με το πέρας της διαδικασίας το *plate* παρέμεινε στους 21 °C.

III.2.3 Αποτελέσματα

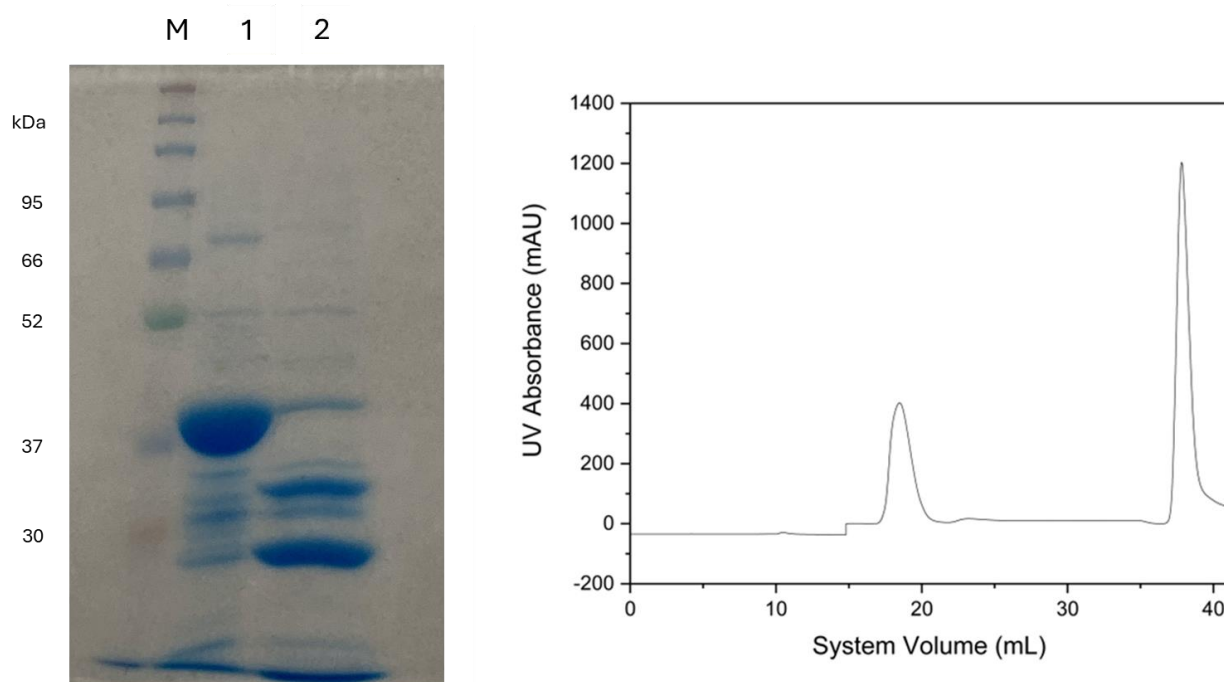
III.2.3.1 Έκφραση και Απομόνωση της LCMV ExoN

Σε πρώτη παρατήρηση, ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων κρίθηκε επιτυχής με την εμφάνιση μοναδιαίων αποικιών σε στερεό θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με τα αντιβιοτικά αμικικιλίνη και χλωραμφενικόλη. Η μετέπειτα πειραματική διαδικασία απέδωσε την υπερέκφραση και την απομόνωση της ExoN, με το αποτέλεσμα να αποτυπώνεται στο διάγραμμα χρωματογραφίας που εμφανίζει υψηλή κορυφή ως προς την πρωτεΐνη-στόχο αλλά και στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης που παρουσιάζει έντονη ζώνη στο αντίστοιχο μοριακό βάρος (Εικόνα III.2.3).



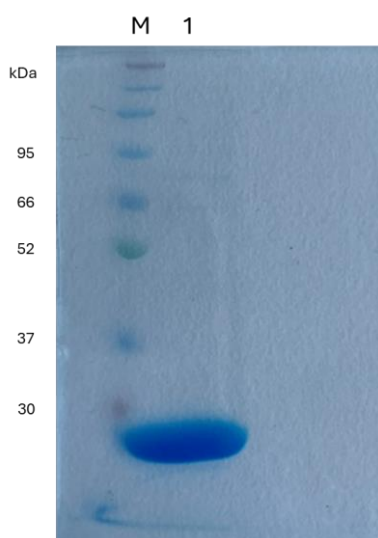
Εικόνα III.2.3. Αριστερά: Διάγραμμα οπτικής απορρόφησης στα 280 nm συναρτήσει του όγκου που διέρχεται από το σύστημα κατά τη διαδικασία της IMAC. Η πρώτη κορυφή, που παρουσιάζει πλατό, αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες που διέρχονται από τη στήλη χωρίς να αλληλεπιδράσουν με αυτή. Η δεύτερη κορυφή αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες που προσδένονται μη ειδικά στη στήλη. Η τρίτη κορυφή αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες που δεσμεύονται ειδικά στη στήλη, συμπεριλαμβανομένου της ExoN. Δεξιά: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης για την ExoN έπειτα από τη διαδικασία της 1^{ης} IMAC. M: Μάρτυρας μοριακού βάρους, 1: Κυτταρικά εκχυλίσματα, 2: Πρωτεΐνες που διέρχονται από τη στήλη χωρίς να αλληλεπιδράσουν με αυτή, 3: Διάλυμα της ExoN έπειτα από τη διαδικασία της 1^{ης} IMAC.

Σε επόμενο στάδιο της απομόνωσης, η απομάκρυνση της αλληλουχίας TRX-His₆ tag με τη δράση της TEVpro χαρακτηρίστηκε επιτυχής και επέτρεψε την τελική απομόνωση της πρωτεΐνης στην αμιγή μορφή της. Το αποτέλεσμα της πέψης αξιολογήθηκε μέσω SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα της παρατίθεται στην Εικόνα III.2.2. Όπως παρατηρείται στο πήκτωμα, το ένζυμο της TEVpro έδρασε αποτελεσματικά πέπτοντας την πλειονότητα των μορίων της ExoN, ενώ ένα ποσοστό των εξωνουκλεασικών μορίων διατήρησε την αλληλουχία TRX-His₆. Επιπλέον, στην Εικόνα III.2.4 περιλαμβάνεται το διάγραμμα της 2^{ης} χρωματογραφίας IMAC, κατά την οποία συλλέγεται η ExoN χωρίς να αλληλεπιδράσει με τη στήλη, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες εμφανίζοντας υψηλή συγγένεια με τη στήλη εκλούνται τελευταίες.



Εικόνα III.2.4. Αριστερά: Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης για το στάδιο πέψης της TRX-His₆-ExoN. M: Μάρτυρας μοριακού βάρους, 1: Διάλυμα της ExoN έπειτα από την διαδικασία της 1^{ης} IMAC, 2: Αποτέλεσμα επώασης της ExoN (24.5 kDa) με την TEVpro (33.4 kDa). Η μη πρωτεολυμένη ExoN αντιστοιχεί στη ζώνη στα ~39 kDa. Δεξιά: Διάγραμμα οπτικής απορρόφησης στα 280 nm συναρτήσει του όγκου που διέρχεται από το σύστημα κατά τη διαδικασία της 2^{ης} IMAC. Η πρώτη κορυφή αντιστοιχεί στην ExoN απουσία της ουράς TRX- His₆, ενώ η δεύτερη κορυφή αντιστοιχεί στην TEVpro και στα μόρια της ExoN που δεν υπέστησαν πέψη.

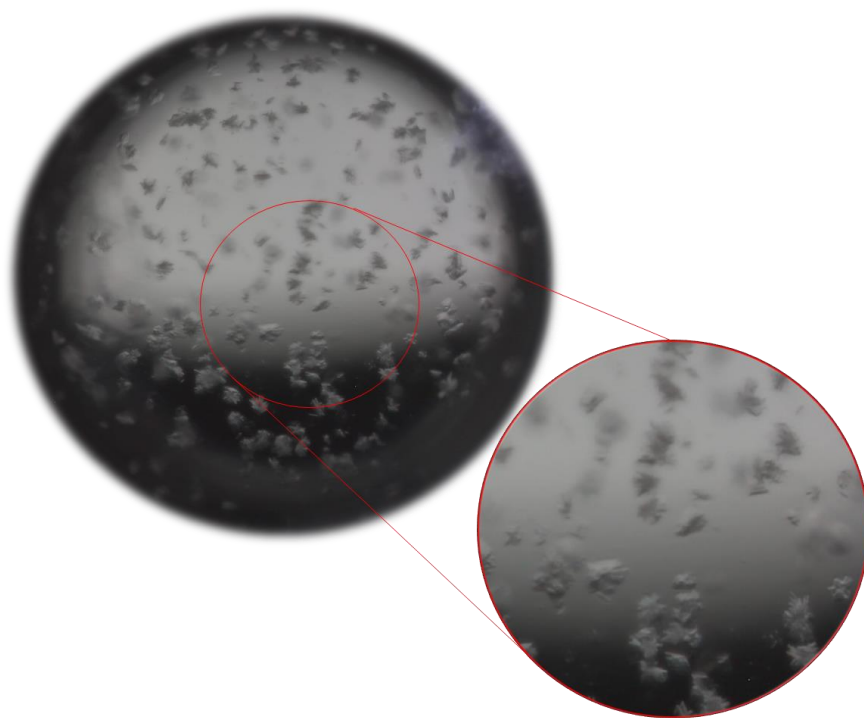
Η ολοκλήρωση της 2^{ης} χρωματογραφίας ακολουθήθηκε, όπως προαναφέρθηκε από την αλλαγή του διαλύματος της συλλεχθείσας πρωτεΐνης με το τελικό διάλυμα της φύλαξης και την ταυτόχρονη συμπύκνωση του δείγματος. Η παρουσία αλλά και η καθαρότητα της πρωτεολυμένης ExoN επιβεβαιώθηκε από το αποτέλεσμα της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης που περιγράφεται από την Εικόνα III.2.5.



Εικόνα III.2.5. Πήκτωμα SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης έπειτα από την απομόνωση της ExoN χωρίς την παρουσία της αλληλουχίας TRX-His₆. M: Μάρτυρας μοριακού βάρους, 1: Διάλυμα της ExoN έπειτα από τη 2^η χρωματογραφία IMAC.

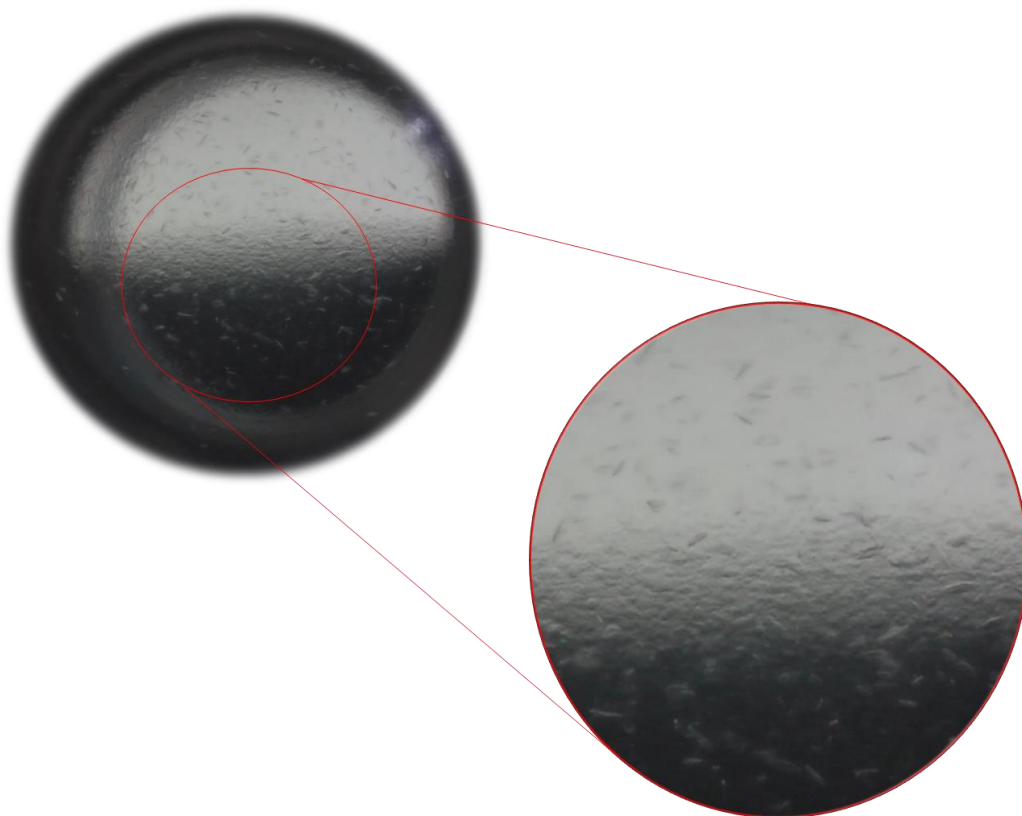
III.2.3.2 Δοκιμές Κρυστάλλωσης της LCMV ExoN

Η πρώτη διερεύνηση των συνθηκών κρυστάλλωσης, κατά την οποία εξετάστηκε ένα εύρος συγκεντρώσεων των $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και MgSO_4 , απέδωσε το σχηματισμό πολυάριθμων μικροσκοπικών κρυστάλλων, οι οποίοι εμφανίζονται σε συσσωματώματα. Ένα ενδεικτικό αποτέλεσμα αποτυπώνεται στην Εικόνα III.2.6, στην οποία παρατίθεται μια σταγόνα κρυστάλλωσης, με την ExoN και το διάλυμα κρυστάλλωσης να έχουν αναμειχθεί σε αναλογία 1:1.

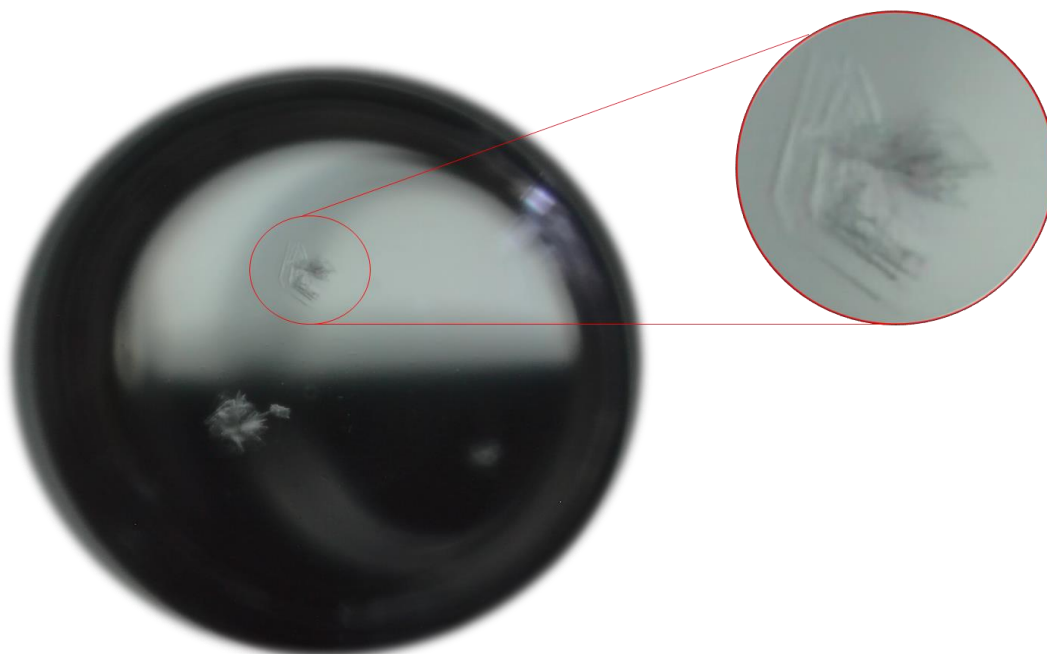


Εικόνα III.2.6. Εικόνα μικροκρυσταλλικών σχηματισμών με μορφή συσσωματωμάτων, όπως λήφθηκε μέσω οπτικής μικροσκοπίας. Η σταγόνα αντιστοιχεί στη συνθήκη A6 [50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ (pH 6.8), 2.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM MgSO_4] και φέρει τα δύο διαλύματα σε αναλογία 1:1.

Σημειώνεται πως η συνθήκη A5, η οποία αξιοποιήθηκε στην παραγωγή του διαλύματος σπόρων, παρουσίασε όμοιο αποτέλεσμα με αυτό της συνθήκης A6 που παρατίθεται στην Εικόνα III.2.4. Η διερεύνηση που εφαρμόστηκε σε δεύτερο επίπεδο με την τεχνική μικροσποράς επέτρεψε τη βελτίωση της μορφολογίας των μικροκρυστάλλων στις συνθήκες που έφεραν τα διαλύματα της ExoN, των παραγόντων καθίζησης και των σπόρων σε αναλογία 10:9:1 ενώ συνθήκη που έφερε τα τρία διαλύματα σε αναλογία 10:4:1 (ExoN : διάλυμα κρυστάλλωσης : διάλυμα σπόρων) απέδωσε το σχηματισμό συστάδας δισδιάστατων κρυσταλλικών σχηματισμών (*plates*). Στην Εικόνα III.2.7 παρουσιάζεται η επίδραση της μικροσποράς στη βελτίωση της μορφολογίας των μικροκρυστάλλων, ενώ στην Εικόνα III.2.8 παρατίθεται η παρατήρηση της συστάδας των δισδιάστατων κρυσταλλικών σχηματισμών.



Εικόνα III.2.7. Εικόνα μικροκρυσταλλικών σχηματισμών, όπως λήφθηκε μέσω οπτικής μικροσκοπίας. Η σταγόνα αντιστοιχεί στη συνθήκη A6 [50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ (pH 6.8), 2.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM MgSO_4] και φέρει τα διαλύματα ExoN, παραγόντων καθίζησης και σπόρων σε αναλογία 10:9:1.

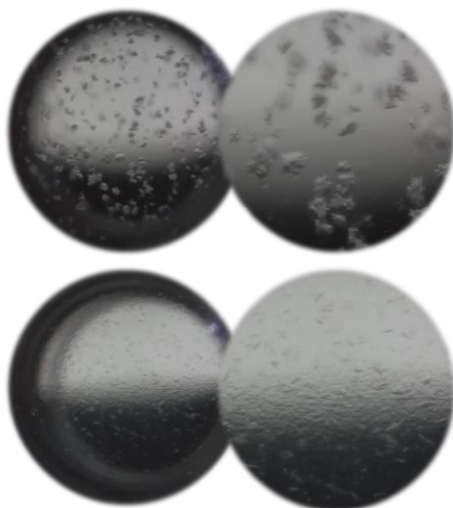


Εικόνα III.2.8. Εικόνα συστάδας δισδιάστατων κρυστάλλων, όπως λήφθηκε μέσω οπτικής μικροσκοπίας. Η σταγόνα αντιστοιχεί στη συνθήκη C4 [50 mM $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ (pH 6.8), 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 40 mM MgSO_4] και φέρει τα διαλύματα ExoN, παραγόντων καθίζησης και σπόρων σε αναλογία 10:4:1.

III.2.4 Συμπεράσματα – Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη κατέστη δυνατή με την επιτυχή υπερέκφραση της ExoN σε βακτηριακό σύστημα *E. coli*. Παρά τις ποσοτικές απώλειες που υπήρξαν στο στάδιο πέψης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, εξασφαλίστηκε επαρκής ποσότητα της ExoN σε υψηλή συγκέντρωση, γεγονός που επέτρεψε τη διεξαγωγή των δοκιμών κρυστάλλωσης που αναλύθηκαν στο υποκεφάλαιο II.2.3.2. Για την επίτευξη του καλύτερου δυνατού αποτελέσματος των δοκιμών κρυστάλλωσης, αλλά και για την ασφαλέστερη αποθήκευση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε προσθήκη $MnCl_2$ στο διάλυμα φύλαξης της πρωτεΐνης, λόγω της σταθερότητας που προσφέρει στην πρωτεΐνη η παρουσία των ιόντων Mn^{2+} . Η συμβολή των ιόντων Mn^{2+} στη σταθερότητα της πρωτεΐνης έχει μελετηθεί σε προγενέστερο στάδιο μέσω της μεθόδου θερμικής σταθερότητας (*Thermal Shift Assay*, TSA), υποδεικνύοντας την αύξηση της θερμοκρασίας τήξης της πρωτεΐνης παρουσία $MnCl_2$ (Σπηλιοπούλου, 2023). Επιπλέον, πρότερες δοκιμές κρυστάλλωσης που δεν περιλάμβαναν την προσθήκη $MnCl_2$ στο διάλυμα της πρωτεΐνης απέδωσαν το σχηματισμό αχινειδών κρυσταλλικών σχηματισμών σε συνθήκες παρεμφερείς με αυτές που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία (Κονταρίνης, 2024). Το προαναφερόμενο αποτέλεσμα των αχινειδών κρυσταλλικών δομών, συγκριτικά με το σχηματισμό των μικροκρυσταλλικών δομών που παρατίθενται στην Εικόνα III.2.4 υπογραμμίζει περεταίρω τη συμβολή του $MnCl_2$ στη μορφολογία του κρυσταλλικού αποτελέσματος.

Όσον αφορά τη διερεύνηση που ακολουθήθηκε στις δοκιμές κρυστάλλωσης, βασίστηκε στη βιβλιογραφική συνθήκη 0.05 M $C_2H_6AsNaO_2$ pH 6.8, 0.01 M $MgSO_4$, 2 M $(NH_4)_2SO_4$, με απώτερο στόχο τον προσδιορισμό επιτυχούς και επαναλήψιμης συνθήκης που να αποδίδει κρυστάλλους υψηλής ποιότητας. Η συγκεκριμένη συνθήκη, αν και απέδωσε μέσω περίθλασης ακτίνων Χ, το δομικό μοντέλο *8cni*, δεν ήταν δυνατή η αναπαραγωγή του επιτυχούς αποτελέσματος. Η πρωταρχική διερεύνηση που αναλύθηκε στην παρούσα εργασία απέδωσε κρυσταλλικό αποτέλεσμα – ωστόσο, κατόπιν μικροσκοπικής παρατήρησης κρίθηκε ακατάλληλο για πείραμα περίθλασης ακτίνων Χ. Δεδομένου των αρχικών αποτελεσμάτων, για τη βελτίωση της ποιότητας των κρυστάλλων, εφαρμόστηκε η τεχνική της μικροσποράς, η οποία επέφερε τη βελτίωση της μορφολογίας των κρυστάλλων. Στην Εικόνα III.2.9 είναι διακριτή η επίδραση της χρήσης σπόρων στην ποιότητα του κρυσταλλικού αποτελέσματος.



Εικόνα III.2.9. Συγκριτική απεικόνιση του αποτελέσματος της συνθήκης A6 [50 mM $C_2H_6AsNaO_2$ (pH 6.8), 2.4 M $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM $MgSO_4$], με και χωρίς την εφαρμογή της τεχνικής της μικροσποράς. Στο **αριστερό** τμήμα της εικόνας απεικονίζονται ολόκληρες οι σταγόνες, ενώ **δεξιά** απεικονίζεται η εστίαση σε ένα τμήμα της κάθε σταγόνας. **Επάνω:** Μικροσκοπική παρατήρηση μικροκρυσταλλικών σχηματισμών με μορφή συσσωματωμάτων. Το αποτέλεσμα αυτό αντιστοιχεί στην πρώτη διερεύνηση. **Κάτω:** Μικροσκοπική παρατήρηση μικροκρυσταλλικών σχηματισμών με βελτιωμένη μορφολογία. Το αποτέλεσμα αυτό αντιστοιχεί στη διερεύνηση με τη χρήση της τεχνικής της μικροσποράς.

Τα αναφερόμενα αποτελέσματα που απέδωσε η τεχνική της μικροσποράς πρόκειται να αξιοποιηθούν σε επερχόμενο πείραμα SCXRD που θα διεξαχθεί από την ερευνητική ομάδα της εγκατάστασης *Biocrystal Facility* στο πλαίσιο του έργου ITACA.SB. Επιπροσθέτως, σε μελλοντικά πειράματα κρυστάλλωσης με την τεχνική της μικροσποράς περιλαμβάνεται η διερεύνηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης καθώς και της αραίωσης του διαλύματος των σπόρων για τη βελτιστοποίηση των σχηματιζόμενων κρυσταλλικών δομών, τόσο ως προς τη μορφολογία όσο και ως προς το μέγεθος τους.

Παράλληλα, χρήζει διερεύνησης η συγκέντρωση του $MnCl_2$, αφενός για τη βελτιστοποίηση της ποιότητας των κρυστάλλων – οι οποίοι μέχρι στιγμής φέρουν είτε μικροκρυσταλλική είτε δισδιάστατη μορφή – και αφετέρου για την επίτευξη ένταξης του ενεργού κέντρου της εξωνουκλεάσης, δεδομένης της απουσίας των ιόντων Mn^{2+} δομικό μοντέλο *8cni*.

Επιπλέον, μελλοντικές δοκιμές θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν την αξιοποίηση της μεθόδου *microbatch*. Ο σχηματισμός των πολυάριθμων μικροκρυστάλλων που απέδωσε η παρούσα διερεύνηση θα μπορούσε να αποτελεί ένα υποσχόμενο αποτέλεσμα για περίθλαση ακτίνων Χ από πολυκρυσταλλικό δείγμα. Η διεξαγωγή μιας διερεύνησης με την μέθοδο της *microbatch* αποτελεί το πρώτο βήμα για την επίτευξη ενός τέτοιου στόχου, ενώ το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει την κρυστάλλωση της πρωτεΐνης σε μεγαλύτερης κλίμακας πείραμα, με την προϋπόθεση ότι έχει εξασφαλιστεί αρκετά μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης και έχει προσδιοριστεί η ιδανική συνθήκη κρυστάλλωσης.

Τέλος, στους μελλοντικούς στόχους εμπεριέχεται επίσης η κρυστάλλωση μιας μεταλλαγμένης μορφής της ExoN, με την κωδική ονομασία *Δflap* (*Δf*), από την οποία απουσιάζει η βασική θηλιά. Η δομική μελέτη της μεταλλαγμένης μορφής της ExoN είναι απαραίτητη για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο η δομική αυτή αλλαγή επιδρά στη λειτουργία της εξωνουκλεάσης. Παλαιότερες δοκιμές κρυστάλλωσης, που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της δομικής μελέτης της μεταλλαγμένης ExoN, δεν έδωσαν κρυσταλλικό αποτέλεσμα που να επιτρέπει τον προσδιορισμό της δομής της (Σπηλιοπούλου, 2023). Η τεχνική της διασταυρωμένης σποράς (*cross seeding*) αποτελεί μια ιδανική τεχνική που θα μπορούσε να έχει καταλυτικό ρόλο στην κρυστάλλωση της μεταλλαγμένης ExoN, μέσω της αξιοποίησης σπόρων από κρυστάλλους της εγγενούς πρωτεΐνης.

IV Επίλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία συνεισφέρει στην εις βάθος κατανόηση της δομικής και λειτουργικής συμπεριφοράς των πρωτεϊνικών μορίων υπό μεταβαλλόμενες φυσικοχημικές συνθήκες, μέσω της συνδυαστικής χρήσης μεθόδων κρυστάλλωσης και τεχνικών κρυσταλλογραφίας. Η κρυσταλλογραφική μελέτη του συμπλόκου ανθρώπινης – 4-βρωμορεσορσινόλης ανέδειξε τον πολυμορφισμό της ινσουλίνης και τη σχέση του με το pH, τα ρυθμιστικά ιόντα και την παρουσία του φαινολικού υποκατάστατου. Συγκεκριμένα, τα ευρήματα κατέδειξαν το πολύμορφο $P2_{1(B)}$ ως την θερμοδυναμικά σταθερότερη φάση, ενώ η παρατηρούμενη συνύπαρξη των φάσεων υποδεικνύει πιθανή ενεργειακή ή δομική αλληλεξάρτηση των πολυμόρφων, γεγονός που τονίζει τη σημασία της ακριβούς καταγραφής των συνθηκών κρυστάλλωσης για την ορθή κατανόηση των πολυμορφικών μεταβάσεων.

Συμπληρωματικά, η διερεύνηση της συμπεριφοράς του πολυμόρφου $P2_{1(B)}$ υπό μεταβαλλόμενη σχετική υγρασία ανέδειξε τη σταθερότητα και δομική προσαρμοστικότητα του συμπλόκου της ινσουλίνης – 4-βρωμορεσορσινόλης. Η παρατηρούμενη διατήρηση της κρυσταλλικότητας επισημαίνει την προστατευτική δράση του προσδέτη έναντι των περιβαλλοντικών μεταβολών. Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν τη σημασία συνδυαστικών μελετών που θα συμπεριλαμβάνουν τη διερεύνηση της υγρασίας και της θερμοκρασίας, αλλά και συμπληρωματικές μεθόδους όπως SCXRD υπό ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος.

Σε δεύτερο σκέλος, η αξιοποίηση τεχνικών υπερέκφρασης και απομόνωσης πρωτεϊνών επέτρεψε την κρυσταλλογραφική μελέτη ικών πρωτεϊνών, όπως η 3Cpro και η ExoN. Τα ευρήματα που προέκυψαν από τη μελέτη της 3Cpro αναδεικνύουν τη ενδεχόμενη θετική επίδραση της μεθόδου της σποράς στην βελτίωση της ποιότητας και της ομοιογένειας των πολυκρυσταλλικών ιζημάτων, με τη συλλογή δεδομένων XRPD υψηλής ευκρίνειας να ενισχύει τη συμπληρωματικότητα της μεθόδου XRPD και τη σημασία της ως ένα ισχυρό εργαλείο της Δομικής Βιοχημείας. Επιπροσθέτως, μελλοντικά πειράματα SCXRD με τη συνδυαστική χρήση της μεθόδου σποράς θα θέσει τις βάσεις για πειράματα *fragment screening*, με απώτερο στόχο τη βέλτιστη δομική ανάλυση και την ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη της ExoN υπογραμμίζουν τη σημασία της μεθόδου σποράς αλλά και των ιόντων Mn^{2+} στην απόδοση κρυσταλλικών σχηματισμών, καθώς και στη βελτίωση της μορφολογίας τους. Μελλοντικά πειράματα SCXRD πρόκειται να αποσαφηνίσουν την επίδραση της μεθόδου σποράς στην ποιότητα των κρυστάλλων – ωστόσο, το μέγεθος και η μορφολογία των κρυστάλλων καθιστά μη προσιτή και δυσχερή τη συλλογή δεδομένων από μονοκρυστάλλους, γεγονός που ενισχύει τη σημασία της μεθόδου XRPD. Ως εκ τούτου, οι μελλοντικοί στόχοι περιλαμβάνουν – πέραν της διερεύνησης των συνθηκών για τη βελτίωση του μεγέθους των κρυστάλλων – τη διερεύνηση των συνθηκών με την τεχνική *microbatch* για την απόδοση πολυκρυσταλλικού ιζήματος.

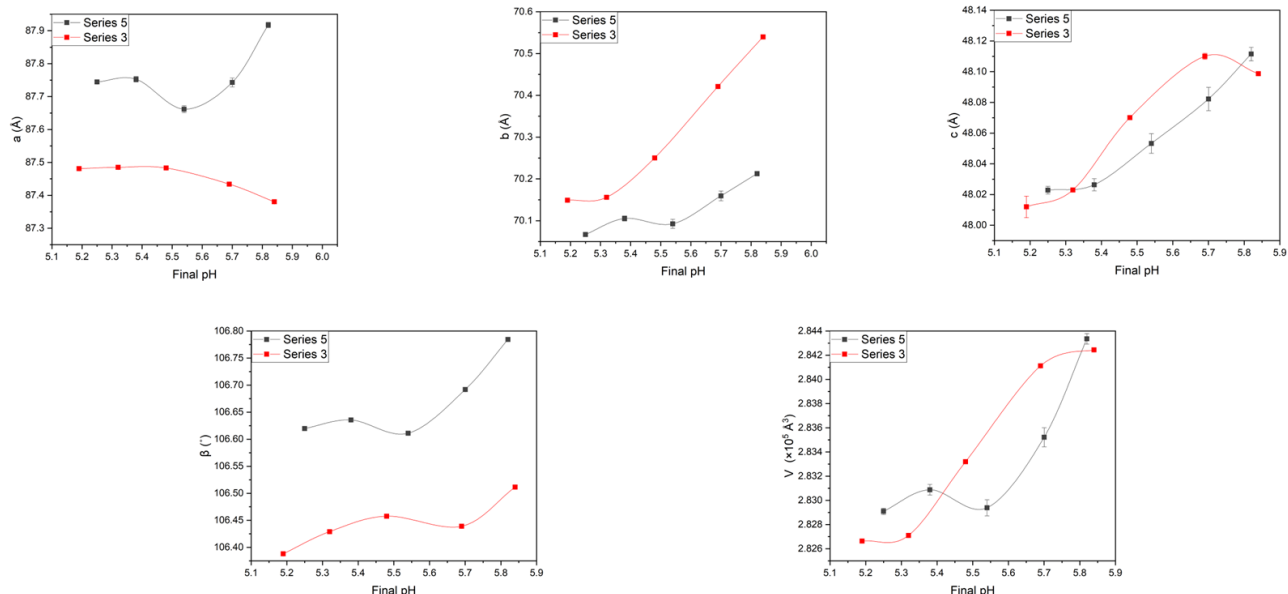
Εν κατακλείδι, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αναδεικνύουν τη σημασία της διερεύνησης των περιβαλλοντικών παραμέτρων και της χρήσης προσδετών για την κατανόηση της σταθερότητας και της δυναμικής φύσης των πρωτεϊνών, ενώ η μέθοδος σποράς φέρει καταλυτικό ρόλο στη διαδικασία της κρυστάλλωσης βελτιώνοντας τη μορφολογία των κρυστάλλων και ενδεχομένως την ποιότητα τους. Εκ των ανωτέρω διακρίνεται η σπουδαιότητα της συνδυαστικής χρήσης των μεθόδων XRPD, SCXRD και μεθοδολογιών για τη διερεύνηση των περιβαλλοντικών παραμέτρων, για την πλήρη αποσαφήνιση της σχέσης μεταξύ μοριακής διαμόρφωσης, πολυμορφισμού και λειτουργίας των πρωτεϊνικών μορίων, θέτοντας τις βάσεις για μελλοντικές μελέτες και την ανάπτυξη καινοτόμων θεραπευτικών στρατηγικών.

IV Παράρτημα

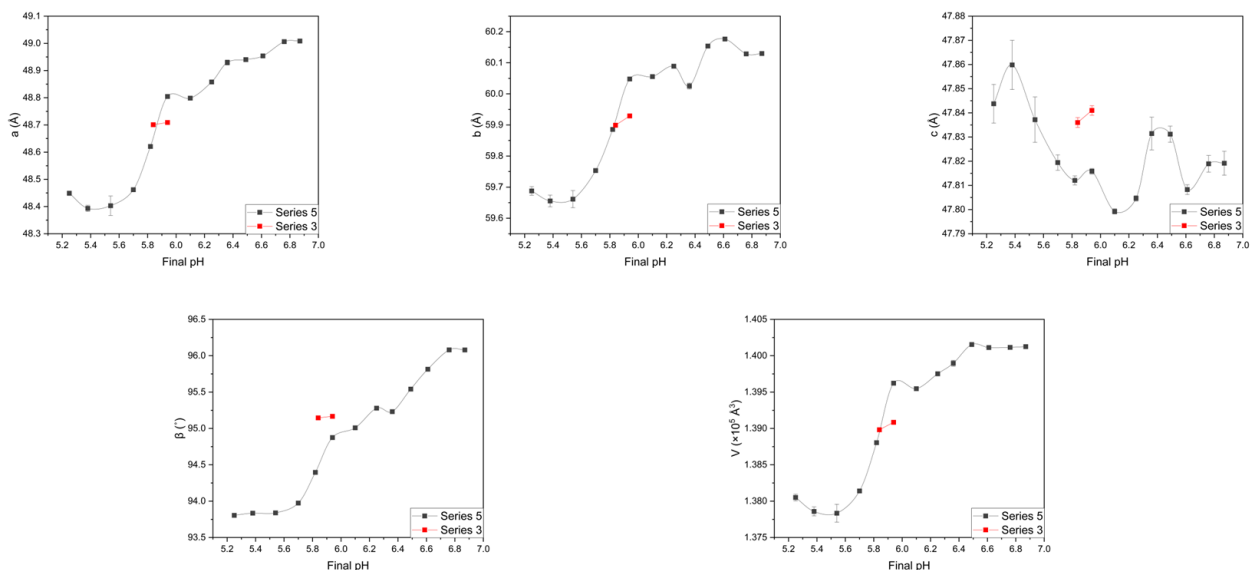
IV.1 Πολυμορφισμός Ανθρώπινης Ινσουλίνης Παρουσία της 4-Βρωμορεσορσινόλης

Πίνακας IV.1. Πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας για τα πολυκρυσταλλικά δείγματα της ανθρώπινης ινσουλίνης – 4-βρωμορεσορσινόλης της 5^{ης} σειράς κρυστάλλωσης.

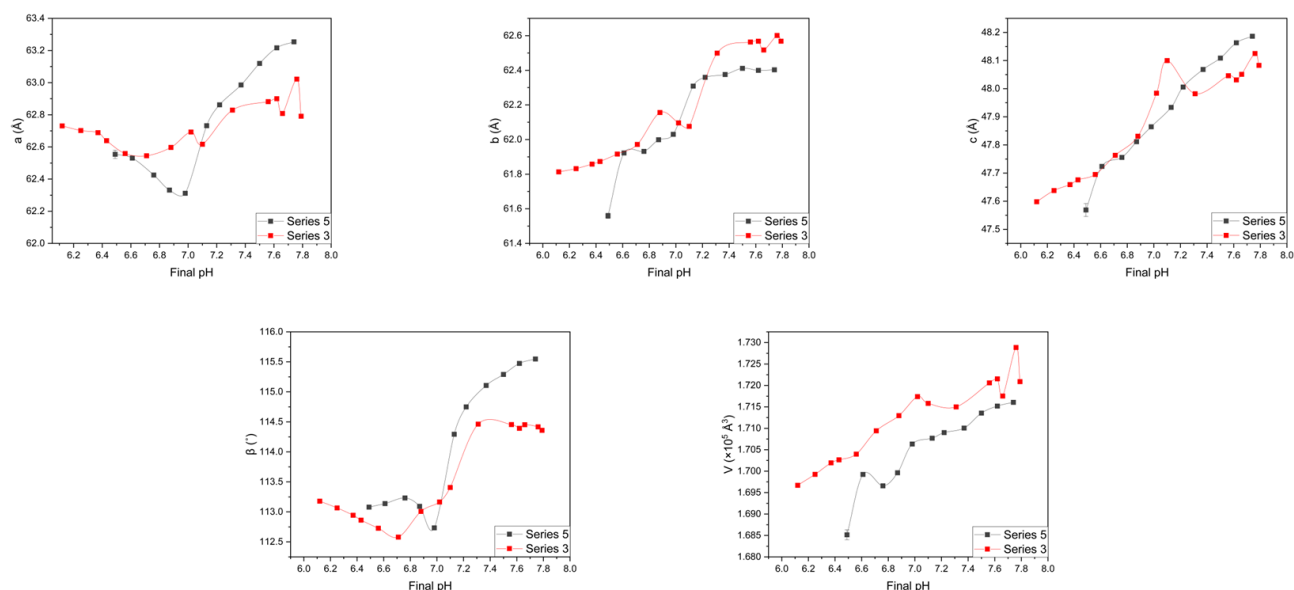
Κωδικός Δείγματος	pH		Space Group	Πλεγματικές Σταθερές				V (×10 ⁵ Å ³)	R _{wp} (%)	χ ²
	Αρχικό	Τελικό		a (Å)	b (Å)	c (Å)	β (°)			
brm51	4.20	5.25	P2 ₁ (γ)	87.744(5)	70.067(3)	48.023(2)	106.620(1)	2.8291(3)	5.1556	1.9337
			P2 ₁ (δ)	48.449(8)	59.69(1)	47.844(8)	93.805(5)	1.3805(5)		
brm52	4.40	5.38	P2 ₁ (γ)	87.752(8)	70.105(6)	48.026(4)	106.636(2)	2.8309(4)	6.2874	1.8634
			P2 ₁ (δ)	48.39(1)	59.66(2)	47.86(1)	93.834(7)	1.3786(6)		
brm53	4.60	5.54	P2 ₁ (γ)	87.66(1)	70.09(1)	48.053(6)	106.611(3)	2.8294(7)	5.0043	1.7617
			P2 ₁ (δ)	48.40(4)	59.66(3)	47.837(9)	93.838(9)	1.378(1)		
brm54	4.80	5.70	P2 ₁ (γ)	87.74(1)	70.16(1)	48.082(8)	106.692(3)	2.8352(8)	4.5881	1.8043
			P2 ₁ (δ)	48.462(4)	59.753(5)	47.819(3)	93.974(2)	1.3814(2)		
brm55	5.00	5.82	P2 ₁ (γ)	87.917(8)	70.213(6)	48.111(4)	106.785(2)	2.8434(4)	4.8860	1.9345
			P2 ₁ (δ)	48.621(2)	59.886(3)	47.812(2)	94.395(1)	1.3880(1)		
brm56	5.20	5.94	P2 ₁ (δ)	48.805(2)	60.048(2)	47.816(1)	94.8744(9)	1.39622(8)	5.8425	1.3501
brm57	5.40	6.10	P2 ₁ (δ)	48.798(2)	60.056(2)	47.799(1)	95.0081(8)	1.39546(7)	4.2611	1.3652
brm58	5.60	6.25	P2 ₁ (δ)	48.858(1)	60.089(1)	47.805(1)	95.2783(6)	1.39751(6)	3.9330	1.4214
brm59	5.80	6.36	P2 ₁ (δ)	48.930(9)	60.025(10)	47.831(7)	95.231(4)	1.3990(4)	5.1537	1.3383
brm510	6.00	6.49	P2 ₁ (δ)	48.940(5)	60.154(5)	47.831(3)	95.541(2)	1.4015(2)	4.9403	1.8457
			P2 ₁ (β)	62.55(3)	61.56(2)	47.57(2)	113.080(9)	1.685(1)		
brm511	6.20	6.61	P2 ₁ (δ)	48.954(3)	60.176(3)	47.808(2)	95.814(1)	1.4011(1)	4.5441	1.8740
			P2 ₁ (β)	62.531(9)	61.922(6)	47.724(6)	113.138(3)	1.6992(4)		
brm512	6.40	6.76	P2 ₁ (δ)	49.006(5)	60.129(6)	47.819(3)	96.079(2)	1.4011(2)	4.7424	1.9009
			P2 ₁ (β)	62.425(3)	61.932(3)	47.756(3)	113.232(1)	1.6966(2)		
brm513	6.60	6.87	P2 ₁ (δ)	49.009(5)	60.130(7)	47.819(5)	96.079(2)	1.4012(3)	4.5579	1.8318
			P2 ₁ (β)	62.332(4)	61.999(3)	47.811(3)	113.093(1)	1.6996(2)		
brm514	6.80	6.98	P2 ₁ (β)	62.312(3)	62.030(2)	47.865(2)	112.7337(7)	1.7063(1)	4.1545	1.7442
brm515	7.00	7.13	P2 ₁ (β)	62.732(2)	62.308(1)	47.934(1)	114.2937(5)	1.70769(7)	4.1203	1.9130
brm516	7.20	7.22	P2 ₁ (β)	62.862(2)	62.359(1)	48.006(1)	114.7493(5)	1.70900(8)	3.9936	1.6209
brm517	7.40	7.37	P2 ₁ (β)	62.985(3)	62.376(1)	48.068(2)	115.1070(6)	1.71005(10)	4.0288	1.8419
brm518	7.60	7.50	P2 ₁ (β)	63.120(2)	62.411(1)	48.109(2)	115.2897(5)	1.71355(9)	3.6861	1.7214
brm519	7.80	7.62	P2 ₁ (β)	63.217(3)	62.399(2)	48.163(2)	115.4739(8)	1.7152(1)	4.5587	1.6988
brm520	8.00	7.74	P2 ₁ (β)	63.254(3)	62.403(2)	48.186(2)	115.5479(8)	1.7161(1)	4.0245	1.6153



Εικόνα IV1. Διαγράμματα μεταβολής των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας συναρτήσει του pH για το πολύμορφο $P2_{1(V)}$. Πραγματοποιείται σύγκριση των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας μεταξύ των σειρών 3 (ESRF, $\lambda = 1.29989(3)$ Å) και 5 (ESRF, $\lambda = 1.07817(3)$ Å). Με γκρι χρώμα αναπαρίστανται οι μεταβολές των πλεγματικών παραμέτρων που αντιστοιχούν στη σειρά 5, ενώ με κόκκινο χρώμα περιγράφονται οι μεταβολές που παρατηρούνται στη σειρά 3.



Εικόνα IV2. Διαγράμματα μεταβολής των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας συναρτήσει του pH για το πολύμορφο $P2_{1(\delta)}$. Πραγματοποιείται σύγκριση των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας μεταξύ των σειρών 3 (ESRF, $\lambda = 1.29989(3)$ Å) και 5 (ESRF, $\lambda = 1.07817(3)$ Å). Με γκρι χρώμα αναπαρίστανται οι μεταβολές των πλεγματικών παραμέτρων που αντιστοιχούν στη σειρά 5, ενώ με κόκκινο χρώμα περιγράφονται οι μεταβολές που παρατηρούνται στη σειρά 3.



Εικόνα IV3. Διαγράμματα μεταβολής των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας συναρτήσει του pH για το πολύμορφο $P2_{1(\beta)}$. Πραγματοποιείται σύγκριση των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας μεταξύ των σειρών 3 (ESRF, $\lambda = 1.29989(3)$ Å) και 5 (ESRF, $\lambda = 1.07817(3)$ Å). Με γκρι χρώμα αναπαρίστανται οι μεταβολές των πλεγματικών παραμέτρων που αντιστοιχούν στη σειρά 5, ενώ με κόκκινο χρώμα περιγράφονται οι μεταβολές που παρατηρούνται στη σειρά 3.

IV.2 Κύκλοι Μεταβολής Υγρασίας – Σύμπλοκο Ινσουλίνης και 4-Βρωμορεσορσινόλης

1^η Σειρά - 1^{ος} Κύκλος

Σχετική Υγρασία (%)	Space Group	a (Å)	b (Å)	c (Å)	β(°)	V (× 10 ⁵ Å ³)	R _{wp}	χ ²
95	P2 _{1(β)}	64.51(3)	62.98(3)	48.35(2)	114.327(5)	1.790(1)	7.3892	4.93035
90		64.45(2)	62.91(1)	48.32(1)	114.288(4)	1.7859(9)	7.74	6.35352
85		64.412(2)	62.90(2)	48.30(2)	114.269(5)	1.7843(10)	6.5559	8.37602
80		64.43(1)	62.899(8)	48.306(9)	114.267(3)	1.7846(5)	4.7185	3.63657
75		64.42(3)	62.90(2)	48.30(2)	114.267(6)	1.7841(1)	3.5875	3.92853
80		64.51(3)	62.99(3)	48.54(2)	114.539(7)	1.794(2)	4.3598	4.44608
85		64.51(4)	63.01(2)	48.54(3)	114.551(9)	1.795(1)	4.6489	5.06298
90		64.53(3)	63.03(6)	48.56(5)	114.495(1)	1.797(3)	5.043	4.28253
95		64.53(4)	63.04(2)	48.56(3)	114.568(10)	1.796(2)	5.4111	5.77767

1 ^η Σειρά - 2 ^{ος} Κύκλος								
Σχετική Υγρασία (%)	Space Group	<i>a</i> (Å)	<i>b</i> (Å)	<i>c</i> (Å)	β(°)	<i>V</i> (*10 ⁵ Å ³)	<i>R_{wp}</i>	χ ²
95	<i>P2</i> _{1(β)}	64.53(4)	63.04(3)	48.57(2)	114.578(8)	1.797(2)	6.8962	6.50893
90		64.53(4)	63.03(4)	48.57(3)	114.57(1)	1.797(2)	6.9865	5.65871
85		64.51(5)	63.03(3)	48.56(4)	114.51(1)	1.796(2)	6.5544	5.10368
80		64.51(4)	63.02(5)	48.55(7)	114.50(2)	1.796(3)	3.052	2.38934
75		64.50(6)	63.02(7)	48.54(7)	114.48(2)	1.796(4)	2.9312	2.25525
80		64.51(5)	63.02(2)	48.55(5)	114.49(1)	1.796(2)	3.0041	2.47586
85		64.52(5)	63.02(4)	48.56(5)	114.49(1)	1.797(3)	3.7332	3.15938
90		64.53(3)	63.03(6)	48.56(5)	114.50(1)	1.797(3)	5.043	4.28253
95		64.54(6)	63.03(8)	48.56(6)	114.50(2)	1.798(4)	5.3448	4.53479

1 ^η Σειρά - 3 ^{ος} Κύκλος								
Σχετική Υγρασία (%)	Space Group	<i>a</i> (Å)	<i>b</i> (Å)	<i>c</i> (Å)	β(°)	<i>V</i> (*10 ⁵ Å ³)	<i>R_{wp}</i>	χ ²
95	<i>P2</i> _{1(β)}	64.54(4)	63.03(2)	48.56(3)	114.499(8)	1.798(2)	7.9263	6.19497
90		64.52(5)	63.02(5)	48.56(4)	114.49(1)	1.797(2)	6.1475	4.79303
85		64.52(4)	63.02(3)	48.56(3)	114.483(8)	1.797(2)	4.4352	3.82469
80		64.51(5)	62.91(5)	48.55(4)	114.48(1)	1.793(2)	3.0754	2.56364
75		64.51(6)	62.91(7)	48.54(4)	114.47(1)	1.793(3)	3.034	2.86225
80		64.50(6)	62.92(4)	48.55(5)	114.48(2)	1.793(3)	3.0802	2.56488
85		64.50(6)	62.94(6)	48.55(5)	114.48(2)	1.794(3)	3.0245	3.08061
90		64.52(8)	62.95(5)	48.56(5)	114.49(1)	1.795(3)	4.2098	3.84968
95		64.52(8)	62.95(6)	48.56(6)	114.50(2)	1.795(3)	4.3368	3.94858

1 ^η Σειρά - 4 ^{ος} Κύκλος								
Σχετική Υγρασία (%)	Space Group	<i>a</i> (Å)	<i>b</i> (Å)	<i>c</i> (Å)	β(°)	<i>V</i> (*10 ⁵ Å ³)	<i>R_{wp}</i>	χ ²
95	<i>P2</i> _{1(β)}	64.52(7)	62.96(7)	48.56(5)	114.50(1)	1.795(3)	5.9352	5.0205
90		64.52(5)	62.96(5)	48.56(4)	114.49(1)	1.795(3)	5.4487	4.63297
85		64.51(6)	62.96(2)	48.56(4)	114.49(1)	1.795(2)	4.7637	3.98694
80		64.48(2)	62.95(2)	48.55(1)	114.483(7)	1.794(1)	3.3492	2.69859
75		64.48(2)	62.942(8)	48.54(1)	114.480(5)	1.7928(8)	3.5408	3.04947
70		64.47(4)	62.94(3)	48.54(1)	114.478(6)	1.793(1)	3.387	2.56468
60		64.47(3)	62.94(3)	48.54(1)	114.478(6)	1.792(1)	3.5889	2.85653
50		64.47(2)	62.93(2)	48.54(3)	114.474(7)	1.792(1)	3.9523	3.14748
60		64.47(1)	62.936(10)	48.54(2)	114.475(6)	1.792(1)	3.5654	3.23398
70		64.48(3)	62.98(1)	48.54(2)	114.477(6)	1.794(1)	3.487	3.02507
75		64.48(2)	62.98(1)	48.55(1)	114.488(3)	1.7942(8)	3.348	2.67986
80		64.49(3)	62.97(1)	48.55(2)	114.496(5)	1.794(1)	3.2656	3.54445
85		64.49(3)	62.97(2)	48.56(2)	114.497(6)	1.794(1)	3.2105	2.88994
90		64.49(2)	62.989(10)	48.56(2)	114.499(6)	1.7951(9)	3.5196	3.07451
95		64.51(2)	62.994(10)	48.57(1)	114.508(5)	1.7958(7)	3.9545	3.55331

2^η Σειρά - 1^{ος} Κύκλος

Σχετική Υγρασία (%)	Space Group	a (Å)	b (Å)	c (Å)	β(°)	V (*10 ⁵ Å ³)	R _{wp}	χ ²
95	P2 ₁ (β)	63.39(4)	63.04(3)	48.17(2)	113.964(9)	1.759(2)	3.7363	2.81875
90		63.16(2)	62.91(1)	48.33(1)	113.966(6)	1.7551(8)	4.1195	2.7228
85		63.16(5)	62.91(3)	48.26(4)	113.82(1)	1.754(2)	3.8053	2.51741
80		62.81(6)	62.76(4)	48.24(3)	113.80(1)	1.740(2)	3.7938	2.39018
75		62.65(1)	61.4(1)	48.26(7)	113.83(4)	1.699(5)	3.6169	2.50925
80		62.8(1)	61.4(1)	48.40(6)	113.89(2)	1.707(5)	4.0221	3.18067
85		62.84(6)	61.44(5)	48.45(4)	113.92(1)	1.710(3)	3.599	3.33757
90		62.83(9)	61.43(7)	48.55(3)	113.93(2)	1.713(3)	4.0708	3.13189
95		62.82(4)	61.42(3)	48.59(2)	113.908(8)	1.714(1)	4.8193	3.49572

2^η Σειρά - 2^{ος} Κύκλος

Σχετική Υγρασία (%)	Space Group	a (Å)	b (Å)	c (Å)	β(°)	V (*10 ⁵ Å ³)	R _{wp}	χ ²
95	P2 ₁ (β)	62.80(4)	61.41(2)	48.60(2)	113.912(6)	1.713(1)	4.5042	4.17196
85		62.75(5)	61.38(5)	48.59(3)	113.890(10)	1.711(2)	4.3851	5.45877
75		62.74(5)	61.34(3)	48.58(3)	113.82(1)	1.710(2)	3.091	3.30016
60		62.74(9)	61.34(5)	48.56(9)	113.803(2)	1.710(4)	2.9167	3.47217
50		62.73(5)	61.29(3)	48.54(3)	113.791(9)	1.708(2)	2.8889	3.01677
60		62.75(6)	61.29(5)	48.55(1)	113.799(6)	1.708(2)	2.9363	2.52285
75		62.8(2)	61.3(1)	48.6(1)	113.80(3)	1.709(7)	3.1614	4.01939
85		62.76(8)	61.29(4)	48.59(8)	113.82(2)	1.710(4)	3.2127	4.53014
95		62.79(5)	61.30(3)	48.59(2)	113.836(9)	1.710(2)	4.4947	3.93402

V. Βιβλιογραφία

- Als-Nielsen, J., & McMorrow, D. (2011). *Elements of Modern X-ray Physics*.
- 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>
- Asif, A., Mohsin, H., Tanvir, R., & Rehman, Y. (2017). Revisiting the Mechanisms Involved in Calcium Chloride Induced Bacterial Transformation. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2169. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02169>
- 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, Julio de Paula, & James Keeler. (2020). *ATKINS Φυσικοχημεία*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Bazan, J. F., & Fletterick, R. J. (1988). Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: Structural and functional implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(21), 7872–7876. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.21.7872>
- Bergfors, T. (2003). Seeds to crystals. *Journal of Structural Biology*, 142(1), 66–76. [https://doi.org/10.1016/S1047-8477\(03\)00039-X](https://doi.org/10.1016/S1047-8477(03)00039-X)
- Bharti, A., & Goyal, N. (2019). Fundamental of Synchrotron Radiations. In D. Joseph (Ed.), *Synchrotron Radiation—Useful and Interesting Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82202>
- Bhatnagar, S., Srivastava, D., Jayadev, M. S. K., & Dubey, A. K. (2006). Molecular variants and derivatives of insulin for improved glycemic control in diabetes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 91(3), 199–228. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2005.05.012>
- Bijelic, A., & Rempel, A. (2018). Polyoxometalates: More than a phasing tool in protein crystallography. *ChemTexts*, 4(3), 10. <https://doi.org/10.1007/s40828-018-0064-1>
- Brange, J., Ribel, U., Hansen, J. F., Dodson, G., Hansen, M. T., Havelund, S., Melberg, S. G., Norris, F., Norris, K., Snel, L., Sørensen, A. R., & Voigt, H. O. (1988). Monomeric insulins obtained by protein engineering and their medical implications. *Nature*, 333(6174), 679–682. <https://doi.org/10.1038/333679a0>
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). In *Methods in Enzymology* (Vol. 541, pp. 151–159). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>
- Burgess, R. R. (2018). A brief practical review of size exclusion chromatography: Rules of thumb, limitations, and troubleshooting. *Protein Expression and Purification*, 150, 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.05.007>
- 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>
- Cheung, R. C. F., Wong, J. H., & Ng, T. B. (2012). Immobilized metal ion affinity chromatography: A review on its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(6), 1411–1420. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4507-0>
- D’Arcy, A., Bergfors, T., Cowan-Jacob, S. W., & Marsh, M. (2014). Microseed matrix screening for optimization in protein crystallization: What have we learned? *Acta Crystallographica Section F*

- Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Reynolds, C. D., Smith, G. D., Sparks, C., & Swenson, D. (1989). Phenol stabilizes more helix in a new symmetrical zinc insulin hexamer. *Nature*, 338(6216), 594–596. <https://doi.org/10.1038/338594a0>
- 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>
- Erdemir, D., Lee, A. Y., & Myerson, A. S. (2009). Nucleation of Crystals from Solution: Classical and Two-Step Models. *Accounts of Chemical Research*, 42(5), 621–629. <https://doi.org/10.1021/ar800217x>
- Fang, L., Jia, K.-Z., Tang, Y.-L., Ma, D.-Y., Yu, M., & Hua, Z.-C. (2007). An improved strategy for high-level production of TEV protease in *Escherichia coli* and its purification and characterization. *Protein Expression and Purification*, 51(1), 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.07.003>
- Fili, S., Valmas, A., Christopoulou, M., Spiliopoulou, M., Nikolopoulos, N., Lichière, J., Logotheti, S., Karavassili, F., Rosmaraki, E., Fitch, A., Wright, J., Beckers, D., Degen, T., Nénert, G., Hilgenfeld, R., Papageorgiou, N., Canard, B., Coutard, B., & Margiolaki, I. (2016). Cocksackievirus B3 protease 3C: Expression, purification, crystallization and preliminary structural insights. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 72(12), 877–884. <https://doi.org/10.1107/S2053230X16018513>
- Fili, S., Valmas, A., Norrman, M., Schluckebier, G., Beckers, D., Degen, T., Wright, J., Fitch, A., Gozzo, F., Giannopoulou, A. E., Karavassili, F., & Margiolaki, I. (2015). Human insulin polymorphism upon ligand binding and pH variation: The case of 4-ethylresorcinol. *IUCr*, 2(5), 534–544. <https://doi.org/10.1107/S2052252515013159>
- Fitch, A., Dejoie, C., Covacci, E., Confalonieri, G., Grendal, O., Claustre, L., Guillou, P., Kieffer, J., De Nolf, W., Petitdemange, S., Ruat, M., & Watier, Y. (2023). ID22 – the high-resolution powder-diffraction beamline at ESRF. *Journal of Synchrotron Radiation*, 30(5), 1003–1012. <https://doi.org/10.1107/S1600577523004915>
- Fukunaka, A., & Fujitani, Y. (2019). Role of Zinc Transporters in Type 2 Diabetes and Obesity. In T. Fukada & T. Kambe (Eds.), *Zinc Signaling* (pp. 229–242). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0557-7_12
- Galdo, J. A., Thurston, M. M., & Bourg, C. A. (2014). Clinical Considerations for Insulin Pharmacotherapy in Ambulatory Care, Part One: Introduction and Review of Current Products and Guidelines. *Clinical Diabetes*, 32(2), 66–75. <https://doi.org/10.2337/diaclin.32.2.66>
- Gallagher, S. R. (2012a). One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 68(1). <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1001s68>
- Gallagher, S. R. (2012b). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 6(1). <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0703s06>
- Garmaroudi, F. S., Marchant, D., Hendry, R., Luo, H., Yang, D., Ye, X., Shi, J., & McManus, B. M. (2015). Cocksackievirus B3 Replication and Pathogenesis. *Future Microbiology*, 10(4), 629–653. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.5>
- Giacovazzo, C. (Ed.). (1992). *Fundamentals of crystallography*. International Union of Crystallography ; Oxford University Press.
- Graf, F. E., Goodman, R. N., Gallichan, S., Forrest, S., Picton-Barlow, E., Fraser, A. J., Phan, M.-D., Mphasa, M., Hubbard, A. T. M., Musicha, P., Schembri, M. A., Roberts, A. P., Edwards, T., Lewis, J. M., & Feasey, N. A. (2024). Molecular mechanisms of re-emerging chloramphenicol susceptibility in extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacterales. *Nature Communications*, 15(1), 9019. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53391-2>

- Hastie, K. M., Kimberlin, C. R., Zandonatti, M. A., MacRae, I. J., & Saphire, E. O. (2011). Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsRNA-specific 3' to 5' exonuclease activity essential for immune suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(6), 2396–2401. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016404108>
- Held, D., & Kilz, P. (2021). Size-exclusion chromatography as a useful tool for the assessment of polymer quality and determination of macromolecular properties. *Chemistry Teacher International*, 3(2), 77–103. <https://doi.org/10.1515/cti-2020-0024>
- Hu, Y., Cheng, K., He, L., Zhang, X., Jiang, B., Jiang, L., Li, C., Wang, G., Yang, Y., & Liu, M. (2021). NMR-Based Methods for Protein Analysis. *Analytical Chemistry*, 93(4), 1866–1879. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03830>
- Huang, Q., Shao, J., Lan, S., Zhou, Y., Xing, J., Dong, C., Liang, Y., & Ly, H. (2015). *In Vitro* and *In Vivo* Characterizations of Pichinde Viral Nucleoprotein Exoribonuclease Functions. *Journal of Virology*, 89(13), 6595–6607. <https://doi.org/10.1128/JVI.00009-15>
- Joffret, M.-L., Polston, P. M., Razafindratsimandresy, R., Bessaud, M., Heraud, J.-M., & Delpeyroux, F. (2018). Whole Genome Sequencing of Enteroviruses Species A to D by High-Throughput Sequencing: Application for Viral Mixtures. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2339. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02339>
- Karavassili, F., Giannopoulou, A. E., Kotsiliti, E., Knight, L., Norrman, M., Schluckebier, G., Drube, L., Fitch, A. N., Wright, J. P., & Margiolaki, I. (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., Fili, S., Georgiou, C., & Margiolaki, I. (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>
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Purification of Polyhistidine-Tagged Proteins by Immobilized Metal Affinity Chromatography. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(6), pdb.prot102194. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102194>
- Kontarinis, A., Papaefthymiou, C., Kafetzi, S., Konstantopoulos, M., Koutoulas, D., Nanao, M., Schluckebier, G., Norrman, M., Dadivanyan, N., Beckers, D., Degen, T., Rosmaraki, E., Fitch, A., & 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>
- Köppl, C., Lingg, N., Fischer, A., Kröß, C., Loibl, J., Buchinger, W., Schneider, R., Jungbauer, A., Striedner, G., & Cserjan-Puschmann, M. (2022). Fusion Tag Design Influences Soluble Recombinant Protein Production in *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7678. <https://doi.org/10.3390/ijms23147678>
- Kotra, L. P., Haddad, J., & Mobashery, S. (2000). Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(12), 3249–3256. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.12.3249-3256.2000>
- Lin, J.-Y., Chen, T.-C., Weng, K.-F., Chang, S.-C., Chen, L.-L., & Shih, S.-R. (2009). Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *Journal of Biomedical Science*, 16(1), 103. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-16-103>
- Liu, D., Siguenza, N. E., Zarrinpar, A., & Ding, Y. (2022). Methods of DNA introduction for the engineering of commensal microbes. *Engineering Microbiology*, 2(4), 100048. <https://doi.org/10.1016/j.engmic.2022.100048>
- Liu, H., Zhao, Y., & Sun, J. (2023). Heterogeneous Nucleation in Protein Crystallization. *Biomimetics*, 8(1), 68. <https://doi.org/10.3390/biomimetics8010068>

- Logotheti, S., Valmas, A., Trampari, S., Fili, S., Saslis, S., Spiliopoulou, M., Beckers, D., Degen, T., Nénert, G., Fitch, A. N., Karavassili, F., & Margiolaki, I. (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>
- Madadlou, A., O’Sullivan, S., & Sheehan, D. (2011). Fast Protein Liquid Chromatography. In D. Walls & S. T. Loughran (Eds.), *Protein Chromatography* (Vol. 681, pp. 439–447). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_25
- Manns, J. M. (2011). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of Proteins. *Current Protocols in Microbiology*, 22(1). <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03ms22>
- Margiolaki, I., Wright, J. P., Fitch, A. N., Fox, G. C., Dreele, R. B. V., Miura, K., Gozzo, F., Besnard, C., Camus, F., Pattison, P., & Degen, T. (2007). *Powder diffraction studies on proteins: An overview of data collection approaches*. https://doi.org/10.1524/zkri.2007.2007.suppl_26.1
- Marintcheva, B. (2018). Viral Tools for Protein Expression and Purification. In *Harnessing the Power of Viruses* (pp. 103–131). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810514-6.00004-0>
- McPherson, A., & Gavira, J. A. (2014). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 70(1), 2–20. <https://doi.org/10.1107/S2053230X13033141>
- Nam, H., Hwang, B. J., Choi, D., Shin, S., & Choi, M. (2020). Tobacco etch virus (TEV) protease with multiple mutations to improve solubility and reduce self-cleavage exhibits enhanced enzymatic activity. *FEBS Open Bio*, 10(4), 619–626. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12828>
- Nettleship, J. E., Rada, H., & Owens, R. J. (2019). Overview of a High-Throughput Pipeline for Streamlining the Production of Recombinant Proteins. In R. Vincentelli (Ed.), *High-Throughput Protein Production and Purification* (Vol. 2025, pp. 33–49). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9624-7_2
- 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>
- Ojdana, D., Sieńko, A., Sacha, P., Majewski, P., Wieczorek, P., Wieczorek, A., & Tryniszewska, E. (2018). Genetic basis of enzymatic resistance of *E. coli* to aminoglycosides. *Advances in Medical Sciences*, 63(1), 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.004>
- Oong GC, Tadi P. Chloramphenicol. [Updated 2023 Jul 3]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555966/>
- Oliveira, C., & Domingues, L. (2018). Guidelines to reach high-quality purified recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), 81–92. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8623-8>
- Owens, R. J., & Gileadi, O. (2019). Streamlining the production of proteins for structural biology. *Biophysical Reviews*, 11(4), 533–534. <https://doi.org/10.1007/s12551-019-00565-8>
- Papageorgiou, N., Spiliopoulou, M., Nguyen, T.-H. V., Vaitopoulou, A., Laban, E. Y., Alvarez, K., Margiolaki, I., Canard, B., & Ferron, F. (2020). Brothers in Arms: Structure, Assembly and Function of Arenaviridae Nucleoprotein. *Viruses*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/v12070772>
- Park, S. Y., Gautier, J.-F., & Chon, S. (2021). Assessment of Insulin Secretion and Insulin Resistance in Human. *Diabetes & Metabolism Journal*, 45(5), 641–654. <https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0220>
- Pawley, G. S. (1981). Unit-cell refinement from powder diffraction scans. *Journal of Applied Crystallography*, 14(6), 357–361. <https://doi.org/10.1107/S0021889881009618>

- Peechakara BV, Basit H, Gupta M. Ampicillin. [Updated 2023 Aug 28]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519569/>
- Pontis, H. G. (2017). Protein and Carbohydrate Separation and Purification. In *Methods for Analysis of Carbohydrate Metabolism in Photosynthetic Organisms* (pp. 45–63). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803396-8.00003-X>
- Pyle, J. D., & Whelan, S. P. J. (2021). Isolation of Reconstructed Functional Ribonucleoprotein Complexes of Machupo Virus. *Journal of Virology*, 95(22), e01054-21. <https://doi.org/10.1128/JVI.01054-21>
- Rahuel-Clermont, S., French, C. A., Kaarsholm, N. C., & Dunn, M. F. (1997). *Mechanisms of Stabilization of the Insulin Hexamer through Allosteric Ligand Interactions*. <https://doi.org/10.1021/bi963038q>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Russo Krauss, I., Merlino, A., Vergara, A., & Sica, F. (2013). An Overview of Biological Macromolecule Crystallization. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11643–11691. <https://doi.org/10.3390/ijms140611643>
- Sarcar, S. N., & Miller, D. L. (2018). A specific, promoter-independent activity of T7 RNA polymerase suggests a general model for DNA/RNA editing in single subunit RNA Polymerases. *Scientific Reports*, 8(1), 13885. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32231-6>
- Sauter, C., Lorber, B., McPherson, A., & Giege, R. (2012). Chapter 4.1. General methods. In *International Tables of Crystallography, Vol F., Crystallography of Biological Macromolecules* (2n edition). John Wiley and Sons.
- Sherwood, L. (2016). *Εισαγωγή στη Φυσιολογία του Ανθρώπου* (1η Ελληνική). Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
- Smyth, D. R., Mrozkiewicz, M. K., McGrath, W. J., Listwan, P., & Kobe, B. (2003). Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags. *Protein Science*, 12(7), 1313–1322. <https://doi.org/10.1110/ps.0243403>
- Spiliopoulou, M., Triandafillidis, D.-P., Valmas, A., Kosinas, C., Fitch, A. N., Von Dreele, R. B., & Margiolaki, I. (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., Triandafillidis, D.-P., Fili, S., Christopoulou, M., Filopoulou, A. J., Piskopou, A., Papadea, P., Fitch, A. N., Beckers, D., Degen, T., Gozzo, F., Morin, M., Reinle-Schmitt, M. L., Karavassili, F., Rosmaraki, E., Chasapis, C. T., & Margiolaki, I. (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>
- Studier, F. W. (2018). T7 Expression Systems for Inducible Production of Proteins from Cloned Genes in *E. coli*. *Current Protocols in Molecular Biology*, 124(1), e63. <https://doi.org/10.1002/cpmb.63>
- Till, M., Robson, A., Byrne, M. J., Nair, A. V., Kolek, S. A., Shaw Stewart, P. D., & Race, P. R. (2013). Improving the Success Rate of Protein Crystallization by Random Microseed Matrix Screening. *Journal of Visualized Experiments*, 78, 50548. <https://doi.org/10.3791/50548>
- Trampani, S., Valmas, A., Logotheti, S., Saslis, S., Fili, S., Spiliopoulou, M., Beckers, D., Degen, T., Nénert, G., Fitch, A. N., Calamiotou, M., Karavassili, F., & Margiolaki, I. (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., Karavassili, F., Spiliopoulou, M., Valmas, A., Athanasiadou, M., Nikolaras, G., Fili, S., Kontou, P., Bowler, M. W., Chasapis, C. T., Von Dreele, R. B., Fitch, A. N., & Margiolaki, I. (2023). The T₂ structure of polycrystalline cubic human insulin. *Acta Crystallographica Section D Structural Biology*, 79(5), 374–386. <https://doi.org/10.1107/S2059798323001328>
- 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>
- Vekilov, P. G. (2015). Nucleation and Growth Mechanisms of Protein Crystals. In *Handbook of Crystal Growth* (pp. 795–871). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-56369-9.00019-8>
- Wang, S.-H., Wang, K., Zhao, K., Hua, S.-C., & Du, J. (2020). The Structure, Function, and Mechanisms of Action of Enterovirus Non-structural Protein 2C. *Frontiers in Microbiology*, 11, 615965. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.615965>
- Weidman, M. K., Sharma, R., Raychaudhuri, S., Kundu, P., Tsai, W., & Dasgupta, A. (2003). The interaction of cytoplasmic RNA viruses with the nucleus. *Virus Research*, 95(1–2), 75–85. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(03\)00164-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(03)00164-3)
- Weiss, M. A. (2009). Chapter 2 The Structure and Function of Insulin. In *Vitamins & Hormones* (Vol. 80, pp. 33–49). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)00602-X](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)00602-X)
- West, B. R., Hastie, K. M., & Saphire, E. O. (2014). Structure of the LCMV nucleoprotein provides a template for understanding arenavirus replication and immunosuppression. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 70(6), 1764–1769. <https://doi.org/10.1107/S1399004714007883>
- Ye, J., Li, Y., Bai, Y., Zhang, T., Jiang, W., Shi, T., Wu, Z., & Zhang, Y.-H. P. J. (2022). A facile and robust T7-promoter-based high-expression of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Bioresources and Bioprocessing*, 9(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00540-4>
- Yekwa, E., Khourieh, J., Canard, B., Papageorgiou, N., & Ferron, F. (2017). Activity inhibition and crystal polymorphism induced by active-site metal swapping. *Acta Crystallographica Section D Structural Biology*, 73(8), 641–649. <https://doi.org/10.1107/S205979831700866X>
- Yip, K. M., Fischer, N., Paknia, E., Chari, A., & Stark, H. (2020). Atomic-resolution protein structure determination by cryo-EM. *Nature*, 587(7832), 157–161. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2833-4>
- Zhou, R.-B., Cao, H.-L., Zhang, C.-Y., & Yin, D.-C. (2017). A review on recent advances for nucleants and nucleation in protein crystallization. *CrystEngComm*, 19(8), 1143–1155. <https://doi.org/10.1039/C6CE02562E>
- Zoete, V., Meuwly, M., & Karplus, M. (2005). Study of the insulin dimerization: Binding free energy calculations and per-residue free energy decomposition. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(1), 79–93. <https://doi.org/10.1002/prot.20528>
- Καραβασίλη, Φ. (2012). Μελέτη της πολυμορφικότητας πρωτεϊνών φαρμακευτικού ενδιαφέροντος: Η περίπτωση της ανθρώπινης ινσουλίνης. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Πατρών. <https://nemertes.library.upatras.gr/items/bd0b9e78-802e-4606-9983-fcdcc56a448a>
- Καφετζή, Σ. (υπό κατάθεση). Δομική και βιοχημική μελέτη βιολογικών μακρομορίων με στόχο τη βελτιστοποίηση φαρμακευτικών σκευασμάτων. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- Κονταρίνης, Α. (2024). Παραγωγή και δομική μελέτη πρωτεϊνικών μακρομορίων φαρμακευτικού ενδιαφέροντος. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Πατρών. <https://hdl.handle.net/10889/28489>

- Κοσίνας, Χ. (2020). Παραγωγή και δομική μελέτης της πρωτεΐνης 3Cpro του ιού *Coxsackie* με στόχο τη δημιουργία αντι-ιικών φαρμάκων (*drug design*). Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Πατρών. <https://nemertes.library.upatras.gr/items/ffd2bdeb-1a5c-4bab-905d-a033d16063b6>
- Κωνσταντόπουλος, Μ. (υπό κατάθεση). Συνδυαστική χρήση βιοφυσικών και βιοχημικών μεθόδων για το δομικό χαρακτηρισμό φαρμακευτικών πρωτεϊνών και πεπτιδίων. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- Λαμπροπούλου, Μ. (2025). Παραγωγή και Βιοχημικός Δομικός Χαρακτηρισμός της Πρωτεάσης 3C του ιού *Coxsackie*. Προπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Πατρών
- Παπαευθυμίου, Χ. (2024). Δομικές μελέτες φαρμακευτικών πρωτεϊνών & πεπτιδίων για την ανάπτυξη φαρμάκων με βελτιωμένες βιοχημικές και φυσικοχημικές ιδιότητες. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Πατρών. <https://hdl.handle.net/10889/28499>
- Σπηλιοπούλου, Μ. (2018). ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΙΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΣΤΟΧΩΝ. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Πατρών. <https://nemertes.library.upatras.gr/items/2507b5b3-a2a2-4675-9250-9d3e4e8371fb>
- Σπηλιοπούλου, Μ. (2023). Δομική Μελέτη Βιολογικών Μακρομορίων για τη Δημιουργία Φαρμακευτικών Στόχων. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Πατρών. <https://nemertes.library.upatras.gr/items/cb6c1390-48ec-401d-8cf8-216f077e295d>