



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ Ι: ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

---

# ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣΘΕΤΩΝ ΣΤΗΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΑΚΩΝ ΣΤΟΧΩΝ

---

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΒΑΣΙΛΑΚΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΔΕΤΣΗ, ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ  
ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2021



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Αναστασίας Δέτση της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (ΕΜΠ) σε συνεργασία με τη Δρ. Ευαγγελία Χρυσίνα, Κύρια Ερευνήτρια του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΙΧΒ-ΕΙΕ). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ, στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας του ΙΧΒ-ΕΙΕ και στην Εθνική Υποδομή Δομικής Βιολογίας Instruct-EL hub/Inspired.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αν. Καθηγήτρια κα Δέτση για την εμπιστοσύνη και την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στα πλαίσια αυτής της μοναδικής συνεργασίας, καθώς και για την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας.

Στη συνέχεια, ευχαριστώ θερμά την Δρ. Χρυσίνα για την αμέριστη υποστήριξη και συνεχή επίβλεψη τόσο στην εκτέλεση των πειραμάτων όσο και στη συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Οι πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές της και οι εύστοχες παρατηρήσεις της είχαν καθοριστικό ρόλο στην πορεία αυτής της εργασίας.

Έπειτα, θέλω να ευχαριστήσω τη Δρ. Ανδρομάχη Τζανή για το συνεχές ενδιαφέρον της και την πολύτιμη βοήθειά της στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ. Ευχαριστώ επίσης ιδιαίτερα την Δρ. Μαριάννα Χαραυγή, τις υποψήφιες διδάκτορες Πανδώρα Καρακούση και Αναστασία Σωτηροπούλου καθώς και τον μεταπτυχιακό φοιτητή Διονύση Νεόφυτο για την απλόχερη βοήθεια τους στο εργαστήριο Δοκιμής Βιολογίας του ΙΧΒ-ΕΙΕ. Οι πολύτιμες γνώσεις τους και το κλίμα συνεργασίας ήταν καθοριστικά για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Ακόμη, ευχαριστώ θερμά τη Δρ. Μαρία Ζερβού και τον Πάρη Χριστοδούλου για τη βοήθεια τους στη φασματοσκοπία NMR στο εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης του ΙΧΒ-ΕΙΕ.

Τέλος, ευχαριστώ όλους τους φίλους μου και την οικογένεια μου για την αμέριστη αγάπη και στήριξή τους. Ιδιαίτερα, ευχαριστώ τους γονείς μου και την αδερφή μου που με υποστήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου και με έμαθαν να προσπαθώ πάντα για το καλύτερο.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο προσδιορισμός της δομής των πρωτεϊνικών μορίων περιλαμβάνει την ανάπτυξη πρωτεϊνικών κρυστάλλων, ικανοποιητικής ποιότητας για περαιτέρω ανάλυση με περίθλαση ακτίνων Χ. Ωστόσο, η κρυστάλλωση είναι μια σύνθετη διαδικασία που δεν εξασφαλίζει την ανάπτυξη κατάλληλων κρυστάλλων για όλα τα πρωτεϊνικά μόρια. Πολλές προσπάθειες γίνονται ακόμη και σήμερα προκειμένου να βελτιωθεί η διαδικασία της κρυστάλλωσης με χρήση διάφορων ενώσεων ως πρόσθετα. Τα πρόσθετα αυτά μπορεί να επηρεάζουν τόσο την ποιότητα, το μέγεθος και τη μορφολογία των κρυστάλλων, όσο και τον ρυθμό πυρήνωσης και ανάπτυξής τους.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση ενός ιοντικού υγρού, του κυκλοεξανοϊκού δις(2-υδροξυ-αιθυλ)αμμωνίου, και ενός βαθέως ευτηκτικού διαλύτη, το χλωρίδιο χολίνης με γλυκερόλη σε μοριακή αναλογία 1:2, ως πρόσθετα στην κρυστάλλωση της λυσοζύμης από ασπράδι αυγού όρνιθας και της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού. Η τεχνική κρυστάλλωσης που επιλέχθηκε είναι η διάχυση ατμών καθήμενης σταγόνας, η οποία επιτρέπει τη δοκιμή διαφορετικών συνθηκών. Η μελέτη της επίδρασης των προσθέτων αξιολογήθηκε με βάση τον ρυθμό ανάπτυξης κρυστάλλων, το πλήθος και την μορφολογία αυτών με τη βοήθεια στερεοσκοπίου.

Το ιοντικό υγρό παρουσίασε διαφορές στο μέγεθος, τον αριθμό, το ρυθμό ανάπτυξης και τη μορφολογία των κρυστάλλων της λυσοζύμης. Τα βέλτιστα αποτελέσματα ελήφθησαν για συγκέντρωση ιοντικού υγρού 0.5 και 1 % (v/v) στη σταγόνα κρυστάλλωσης. Αντιθέτως, η χρήση του βαθέως ευτηκτικού διαλύτη δεν επέφερε βελτίωση στην κρυστάλλωση της λυσοζύμης, ενώ σε αυξημένες συγκεντρώσεις οδήγησε ακόμη και στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης κρυστάλλων. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου παρουσίασε μόνον έναν ευμεγέθη κρύσταλλο στη μέγιστη συγκέντρωση ιοντικού υγρού που δοκιμάστηκε (5% v/v). Συνεπώς, η χρήση του ιοντικού υγρού παρουσίασε ελπιδοφόρα αποτελέσματα ως προς την βελτίωση της κρυστάλλωσης των υπό μελέτη πρωτεϊνών, σε αντίθεση με τον βαθέως ευτηκτικό διαλύτη. Ο βασικός μηχανισμός επίδρασης των ιοντικών υγρών στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών φέρεται να είναι οι αλληλεπιδράσεις των ιόντων τους με τα πρωτεϊνικά μόρια.

Πραγματοποιήθηκε επίσης μελέτη για την εύρεση κρυοπροστατευτικών για τους κρυστάλλους λυσοζύμης που αναπτύχθηκαν. Από τα διαλύματα που εξετάστηκαν, το διάλυμα 51 % (v/v) μεθανόλης και 15 % (v/v) γλυκερόλης παρουσίασε τα βέλτιστα αποτελέσματα, καθώς δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός πάγου όταν αυτά εκτέθηκαν σε ρεύμα αζώτου 100K.

Συνεπώς, η επίδραση των προσθέτων ήταν διαφορετική για κάθε πρωτεΐνη που εξετάστηκε. Η παρούσα μελέτη αυτών των προσθέτων αποτελεί τη βάση για μελλοντικές μελέτες, με στόχο την ενδελεχή διερεύνηση της επίδρασης οργανικών προσθέτων στην πρωτεϊνική κρυστάλλωση, ώστε αυτά να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με τις ιδιότητες των μελετώμενων πρωτεϊνών.

Λέξεις κλειδιά: κρυστάλλωση, λυσοζύμη, φωσφορυλάση του γλυκογόνου, πρόσθετα, ιοντικά υγρά, βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες

## ABSTRACT

Structure determination of protein molecules involves the growth of good quality protein crystals, suitable for X-ray diffraction analysis. However, crystallization is a complex process that does not ensure that all protein molecules will produce high quality crystals. Many efforts have been underway towards improving the crystallization process by using various compounds as additives. These additives can affect the quality, size and morphology of crystals, as well as the nucleation and growth rate.

In the present work, the effect of an ionic liquid, bis(2-hydroxy-ethyl) ammonium cyclohexane, and a deep eutectic solvent, choline chloride with glycerol in a molecular ratio of 1:2, were studied as additives in the crystallization of lysozyme from hen egg white and glycogen phosphorylase from rabbit skeletal muscle. The crystallization technique chosen is the sitting drop vapor diffusion, which allows the screening of different conditions. The effect of the additives was evaluated using as criteria the crystal growth rate, the number of crystals after visual inspections with the aid of a stereoscope.

The ionic liquid showed differences in the size, number, growth rate and habit of lysozyme crystals. Optimal results were obtained for an ionic liquid concentration of 0.5 and 1 % (v/v) in the crystallization drop. In contrast, the deep eutectic solvent did not improve the crystallization of lysozyme, while at increased concentrations it even led to inhibition of crystal growth. Glycogen phosphorylase showed only one large crystal at the maximum ionic liquid concentration tested (5% v/v). Therefore, use of ionic liquid has shown promising results in improving the crystallization of the studied proteins, in contrast to the deep eutectic solvent. The main mechanism of action of ionic liquids on the crystallization of proteins probably depends on the interactions of the ions with the protein molecules.

A study was also performed to investigate possible cryoprotectants for lysozyme crystals. The solution of 51 % (v/v) methanol and 15 % (v/v) glycerol showed the best results, as no ice formation was observed when exposed to liquid nitrogen cryo stream at 100 K.

The effect of the additives explored was different for each studied protein. The present study of these additives paves the way for future experiments that will allow thorough investigation of the role of the additives in protein crystallization, improving our understanding on their function and fostering their classification based on the properties of the proteins of interest.

**Keywords:** crystallization, lysozyme, glycogen phosphorylase, additives, ionic liquids, deep eutectic solvents

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....                                                              | 1  |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....                                                             | 2  |
| ABSTRACT .....                                                             | 3  |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ .....                                                 | 7  |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ .....                                                    | 8  |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....                                                    | 11 |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ .....                                                   | 12 |
| ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....                                                       | 13 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΜΟΡΙΑ .....                                        | 13 |
| 1.1 Λυσοζύμη .....                                                         | 14 |
| 1.2 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου β.....                                      | 15 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ.....                     | 17 |
| 2.1 Βασικές Αρχές Κρυστάλλωσης .....                                       | 18 |
| 2.2 Στάδια Κρυστάλλωσης .....                                              | 19 |
| 2.3 Τεχνικές Κρυστάλλωσης .....                                            | 21 |
| 2.3.1 Εξάτμιση και Διάχυση ατμών (Vapor Diffusion) .....                   | 22 |
| 2.3.2 Άμεση προσθήκη του παράγοντα κατακρήμνισης (Batch).....              | 23 |
| 2.3.3 Διαπίδυση (Dialysis) .....                                           | 24 |
| 2.3.4 Διάχυση μεταξύ ελεύθερων επιφανειών (Free-Interface Diffusion) ..... | 24 |
| 2.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση .....                        | 25 |
| 2.4.1 Θερμοκρασία.....                                                     | 25 |
| 2.4.2 pH .....                                                             | 25 |
| 2.4.3 Παράγοντες κατακρήμνισης.....                                        | 26 |
| 2.4.4 Πρόσθετα (Additives) .....                                           | 26 |
| 2.5 Στρατηγική Κρυστάλλωσης .....                                          | 28 |
| 2.6 Πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι.....                                            | 30 |
| 2.7 Περίθλαση ακτίνων Χ .....                                              | 31 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΙΟΝΤΙΚΑ ΥΓΡΑ (ΙΥ) .....                                       | 34 |
| 3.1 Εισαγωγή .....                                                         | 34 |
| 3.2 Κατηγορίες ιοντικών υγρών .....                                        | 35 |
| 3.2.1 Απρωτικά και πρωτικά Ιοντικά Υγρά.....                               | 35 |
| 3.2.2 Ιοντικά Υγρά ειδικής αποστολής .....                                 | 35 |
| 3.2.3 Υποστηριζόμενα Ιοντικά Υγρά.....                                     | 36 |
| 3.2.4 Βιο-ιοντικά Υγρά.....                                                | 36 |
| 3.2.5 Χειρόμορφα Ιοντικά Υγρά .....                                        | 36 |

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.6 Πολυμερικά Ιοντικά Υγρά.....                                          | 36 |
| 3.2.7 Ενεργειακά Ιοντικά Υγρά .....                                         | 36 |
| 3.3 Πρωτικά Ιοντικά Υγρά.....                                               | 37 |
| 3.3.1 Σύνθεση Πρωτικών Ιοντικών Υγρών.....                                  | 37 |
| 3.4 Ιδιότητες Ιοντικών Υγρών .....                                          | 38 |
| 3.4.1 Θερμικές ιδιότητες .....                                              | 38 |
| 3.4.2 Τάση ατμών .....                                                      | 38 |
| 3.4.3 Πυκνότητα .....                                                       | 39 |
| 3.4.4 Ιξώδες .....                                                          | 39 |
| 3.5 Εφαρμογές Ιοντικών Υγρών.....                                           | 39 |
| 3.5.1 Χημική Βιομηχανία.....                                                | 40 |
| 3.5.2 Αναλυτική Χημεία.....                                                 | 40 |
| 3.5.3 Βιοτεχνολογία.....                                                    | 40 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΟΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ (Deep Eutectic Solvents, DES) ..... | 43 |
| 4.1 Εισαγωγή .....                                                          | 43 |
| 4.2 Μέθοδοι παρασκευής DES.....                                             | 44 |
| 4.3 Ιδιότητες των DES.....                                                  | 44 |
| 4.3.1 Σημείο τήξης .....                                                    | 45 |
| 4.3.2 Πυκνότητα .....                                                       | 45 |
| 4.3.3 Ιξώδες και ηλεκτρική αγωγιμότητα.....                                 | 45 |
| 4.3.4 Επιφανειακή τάση .....                                                | 45 |
| 4.4 Εφαρμογές DES .....                                                     | 46 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....                                                      | 48 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....                                        | 48 |
| 5.1 Σκοπός .....                                                            | 48 |
| 5.2 Όργανα και αντιδραστήρια .....                                          | 48 |
| 5.3 Σύνθεση ΙΥ και DES.....                                                 | 50 |
| 5.4 Δοκιμές Κρυστάλλωσης.....                                               | 51 |
| 5.4.1 Επιλογή πρωτεϊνικών στόχων .....                                      | 53 |
| 5.4.2 Διαλογή συνθηκών κρυστάλλωσης.....                                    | 53 |
| 5.5 Κρυστάλλωση Λυσοζύμης (LZ) .....                                        | 53 |
| 5.5.1 Παρασκευή διαλυμάτων .....                                            | 53 |
| 5.5.2 Πειραματική διαδικασία κρυστάλλωσης .....                             | 54 |
| 5.6 Κρυστάλλωση Φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (RMGPb).....                    | 57 |
| 5.6.1 Παρασκευή διαλυμάτων .....                                            | 57 |
| 5.6.2 Πειραματική διαδικασία κρυστάλλωσης .....                             | 57 |

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| 5.7 Κρυοπροστασία κρυστάλλων λυσοζύμης .....             | 58 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....                        | 60 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ .....           | 60 |
| 6.1 Χαρακτηρισμός ΙΥ και DES.....                        | 60 |
| 6.1.1 Κυκλοεξανοϊκό δις(2-υδροξυ-αιθυλ)αμμώνιο (ΙΥ)..... | 60 |
| 6.1.2 Χλωρίδιο χολίνης : γλυκερόλη (DES).....            | 61 |
| 6.2 Κρυστάλλωση Λυσοζύμης .....                          | 62 |
| 6.2.1 ΙΥ ως πρόσθετο.....                                | 63 |
| 6.2.2 DES ως πρόσθετο.....                               | 79 |
| 6.3 Κρυστάλλωση Φωσφορυλάσης γλυκογόνου .....            | 83 |
| 6.3.1 ΙΥ ως πρόσθετο.....                                | 83 |
| 6.3.2 DES ως πρόσθετο.....                               | 85 |
| 6.4 Επίδραση προσθέτων στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών .....  | 86 |
| 6.5 Κρυοπροστασία κρυστάλλων λυσοζύμης .....             | 89 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....                           | 92 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....                                       | 94 |



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

|                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Γράφημα 1: Διάγραμμα φάσεων κρυστάλλωσης. Αποτελείται από τρεις κυρίως φάσεις: την ακόρεστη, την υπερκορεσμένη και τη φάση της καθίζησης. ....                       | 20 |
| Γράφημα 2: Διάγραμμα φάσεων κρυστάλλωσης πρωτεΐνης. Παρουσιάζονται οι διαφορετικές διαδρομές που ακολουθούν οι τέσσερις βασικές μέθοδοι κρυστάλλωσης πρωτεϊνών ..... | 21 |
| Γράφημα 3: Ρυθμός αύξησης μεγέθους των κρυστάλλων λυσοζύμης παρουσία 4% (w/v) NaCl για διαφορετικές συγκεντρώσεις ΙΥ. ....                                           | 74 |
| Γράφημα 4: Μέγεθος κρυστάλλων λυσοζύμης της 2 <sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης μετά από 24 ώρες, συναρτήσει της συγκέντρωσης του ΙΥ στη σταγόνα κρυστάλλωσης.....  | 77 |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

|                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Εικόνα 1: Τα τέσσερα επίπεδα δομής των πρωτεϊνών. ....                                                                                                                                                                                                        | 13 |
| Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της τριδιάστατης δομής της λυσοζύμης από ασπράδι αυγού όρνιθας (HEWL).....                                                                                                                                                   | 15 |
| Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της τριδιάστατης διμερής δομής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου β (GPb) από μυ κουνελιού .....                                                                                                                                | 16 |
| Εικόνα 4: Μοτίβο διάθλασης κρυστάλλου λυσοζύμης που αναπτύχθηκε σε 30% ((w/v)) 1-εθυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο χλωρίου, 0,1M HEPES pH 7.0.....                                                                                                                       | 32 |
| Εικόνα 5: Στα αριστερά η πειραματική διάταξη σύνθεσης του ΙΥ. Στα δεξιά ο φασματογράφος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, μέρος της Υποδομής Δομικής Βιολογίας Instruct-EL hub/Inspired ..... | 51 |
| Εικόνα 6: Πλάκα κρυστάλλωσης καθήμενης σταγόνας 24 θέσεων.....                                                                                                                                                                                                | 51 |
| Εικόνα 7: Στερεοσκόπιο Leica MZ16 εγκατεστημένο στην Υποδομή Δομικής Βιολογίας του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. ....                                                                                                          | 52 |
| Εικόνα 8: Μονάδα πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, εγκατεστημένη στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών .....                                                                                                                   | 59 |
| Εικόνα 9: Φάσμα $^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) του κυκλοεξανοϊκού δις(2-υδροξυ-αιθυλ)αμμωνίου (ΙΥ) .....                                                                                                                                        | 61 |
| Εικόνα 10: Φάσμα $^1\text{H}$ NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ) του χλωριδίου χολίνης-γλυκερόλης (DES)62                                                                                                                                                      |    |
| Εικόνα 11: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα του συστήματος βαθμολόγησης για τους κρυστάλλους λυσοζύμης.....                                                                                                                                                      | 62 |
| Εικόνα 12: Κρύσταλλοι λυσοζύμης που αναπτύχθηκαν παρουσία 4% (w/v) NaCl απουσία προσθέτων με την πάροδο του χρόνου. ....                                                                                                                                      | 64 |
| Εικόνα 13: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 0.5% (v/v) ΙΥ με την πάροδο του χρόνου. ....                                                                                                                                                       | 65 |
| Εικόνα 14: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 1% (v/v) ΙΥ με την πάροδο του χρόνου. ....                                                                                                                                                         | 65 |
| Εικόνα 15: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 3% (v/v) ΙΥ (πάνω) και 5% (v/v) ΙΥ (κάτω) μετά από 2 ώρες και 1 εβδομάδα.....                                                                                                                      | 66 |
| Εικόνα 16: Αποτελέσματα κρυστάλλωσης της λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 10% (v/v) ΙΥ μετά από 2 ώρες και 1 εβδομάδα. ....                                                                                                                               | 66 |
| Εικόνα 17: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 2% (w/v) NaCl απουσία ΙΥ μετά από 1 μέρα και 1 εβδομάδα. ....                                                                                                                                                             | 67 |

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Εικόνα 18: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 2% (w/v) NaCl παρουσία 3% (v/v) ΙΥ με την πάροδο του χρόνου. ....                                                                   | 67 |
| Εικόνα 19: Αριστερά κρύσταλλοι λυσοζύμης παρουσία 4% (w/v) NaCl και 3% (v/v) ΙΥ. Δεξιά κρύσταλλοι λυσοζύμης παρουσία 2% (w/v) NaCl και 3% (v/v) ΙΥ .....                | 68 |
| Εικόνα 20: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 2% (v/v) ΙΥ με την πάροδο του χρόνου. ....                                                                   | 70 |
| Εικόνα 21: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 3% (w/v) NaCl απουσία ΙΥ με την πάροδο του χρόνου. ....                                                                             | 70 |
| Εικόνα 22: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 3% (w/v) NaCl και 0.5% (v/v) ΙΥ με την πάροδο του χρόνου. ....                                                                      | 71 |
| Εικόνα 23: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 3% (w/v) NaCl και 1% (v/v) ΙΥ με την πάροδο του χρόνου. ....                                                                        | 71 |
| Εικόνα 24: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 3% (w/v) NaCl και 2% (v/v) ΙΥ με την πάροδο του χρόνου. ....                                                                        | 72 |
| Εικόνα 25: Εξέλιξη του μεγέθους των κρυστάλλων λυσοζύμης παρουσία 0.5 και 1% (v/v) ΙΥ μετά από 1, 3 και 5 ώρες σε σχέση με την συνθήκη αναφοράς για 4% (w/v) NaCl. .... | 73 |
| Εικόνα 26: Εξέλιξη κρυστάλλων λυσοζύμης παρουσία 0.5 και 1% (v/v) ΙΥ μετά από 1, 3 και 5 ώρες σε σχέση με την συνθήκη αναφοράς για 3% (w/v) NaCl. ....                  | 75 |
| Εικόνα 27: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl μετά από 24 ώρες, παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης ΙΥ ως προσθέτου. ....                                            | 76 |
| Εικόνα 28: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 3% (w/v) NaCl μετά από 24 ώρες, παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης ΙΥ ως προσθέτου. ....                                            | 76 |
| Εικόνα 29: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl μετά από 24 ώρες, παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης ΙΥ ως προσθέτου. ....                                            | 78 |
| Εικόνα 30: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 3% (w/v) NaCl μετά από 24 ώρες, παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης ΙΥ ως προσθέτου. ....                                            | 78 |
| Εικόνα 31: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 0.5% (v/v) DES με την πάροδο του χρόνου. ....                                                                | 80 |
| Εικόνα 32: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 1% (v/v) DES με την πάροδο του χρόνου. ....                                                                  | 80 |
| Εικόνα 33: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 3% (v/v) DES με την πάροδο του χρόνου. ....                                                                  | 81 |
| Εικόνα 34: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 5% (v/v) DES μετά από 1 εβδομάδα. ....                                                                       | 81 |

|                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Εικόνα 35: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 10% (v/v) DES με την πάροδο του χρόνου.....                                                                                                        | 82 |
| Εικόνα 36: Αποτελέσματα κρυστάλλωσης λυσοζύμης για 2% (w/v) NaCl μετά από μία εβδομάδα .....                                                                                                                  | 82 |
| Εικόνα 37: Κρύσταλλοι φωσφορυλάσης γλυκογόνου μετά από 6 μέρες για απουσία (τυφλό) και παρουσία 0.5% και 1% (v/v) ΙΥ ως πρόσθετο (Συνθήκες κρυστάλλωσης: 12.4 mg/ml GPb, BES buffer, 3mM DTT, 1Mm IMP). ..... | 84 |
| Εικόνα 38: Κρύσταλλοι φωσφορυλάσης του γλυκογόνου παρουσία 12.4 mg/ml GPb, BES buffer, 3mM DTT, 1Mm IMP και 5% (v/v) ΙΥ. ....                                                                                 | 84 |
| Εικόνα 39: Κρύσταλλοι φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μετά από 6 μέρες, απουσία DTT, με 3% (v/v) ΙΥ ως πρόσθετο (Συνθήκες κρυστάλλωσης: 12.4 mg/ml GPb, BES buffer, 1Mm IMP, 3% (v/v) ΙΥ).....                    | 85 |
| Εικόνα 40: Αποτελέσματα της κρυστάλλωσης της GPb παρουσία 3% (v/v) (αριστερά) και 5% (v/v) (δεξιά) DES .....                                                                                                  | 85 |
| Εικόνα 41: Αποτελέσματα της κρυστάλλωσης της GPb παρουσία 3% (v/v) DES και απουσία DTT. Παρατηρείται έντονη καθίζηση της πρωτεΐνης. ....                                                                      | 86 |
| Εικόνα 42: Δοκιμή Parabar 10312 (Hampton Research) ως κρυστοπροστατευτικό σε κρύσταλλο λυσοζύμης (HEWL) που αναπτύχθηκε παρουσία 4% (w/v) NaCl, 0.1M NaAcetate pH 4.8....                                     | 90 |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Πίνακας 1: Κατηγορίες προσθέτων στην κρυστάλλωση μακρομορίων.....                                         | 27 |
| Πίνακας 2: Αντιδραστήρια πειραματικού μέρους .....                                                        | 48 |
| Πίνακας 3: Συνθήκες κρυστάλλωσης λυσοζύμης (LZ) στην 1 <sup>η</sup> δοκιμή.....                           | 55 |
| Πίνακας 4: Συνθήκες κρυστάλλωσης λυσοζύμης (LZ) στην 2 <sup>η</sup> δοκιμή.....                           | 56 |
| Πίνακας 5: Συνθήκες κρυστάλλωσης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (RMGPb) .....                                | 58 |
| Πίνακας 6: Αποτελέσματα 1 <sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης της λυσοζύμης παρουσία ΙΥ ως προσθέτου.....  | 68 |
| Πίνακας 7: Αποτελέσματα 2 <sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης της λυσοζύμης παρουσία ΙΥ ως προσθέτου.....  | 72 |
| Πίνακας 8: Αποτελέσματα 1 <sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης της λυσοζύμης παρουσία DES ως προσθέτου..... | 83 |
| Πίνακας 9: Αποτελέσματα των δοκιμαζόμενων κρυστοπροστατευτικών διαλυμάτων.....                            | 90 |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

|                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Σχήμα 1: Τα βήματα από την επιλογή της πρωτεΐνης-στόχου μέχρι την ανακάλυψη ενός δυνάμει φαρμάκου .....                                                           | 17 |
| Σχήμα 2: Σχηματική αναπαράσταση συσσωμάτωσης κατά την αύξηση του υπερκορεσμού.19                                                                                  |    |
| Σχήμα 3: Σχηματική απεικόνιση των τεχνικών κρυστάλλωσης .....                                                                                                     | 25 |
| Σχήμα 4: Σχηματική απεικόνιση της περίθλασης ακτίνων Χ σε κρυστάλλους .....                                                                                       | 31 |
| Σχήμα 5: Συνηθέστερα κατιόντα και ανιόντα που χρησιμοποιούνται στα ΙΥ.....                                                                                        | 34 |
| Σχήμα 6: Κυριότερες κατηγορίες ΙΥ.....                                                                                                                            | 35 |
| Σχήμα 7: Σύνθεση πρωτικών ιοντικών υγρών μέσω μεταφοράς πρωτονίου μεταξύ της Brønsted οξέος (HA) και μιας Brønsted βάσης (B).....                                 | 37 |
| Σχήμα 8: Ορισμένα ΠΙΥ που συντέθηκαν με απευθείας πρωτονίωση ( $X^-[NTf_2]^-$ , $[CF_3SO_3]^-$ , $[CH_3SO_3]^-$ , $[HCOO]^-$ , $[HSO_4]^-$ , $[H_2PO_3]^-$ )..... | 37 |
| Σχήμα 9: Εφαρμογές των ΙΥ στις πρωτεΐνες.....                                                                                                                     | 41 |
| Σχήμα 10: Παρασκευή DES από $ChCl$ και αλκοόλες (HBD) .....                                                                                                       | 43 |
| Σχήμα 11: Τυπικά άλατα με ανιόν αλογόνου και δότες δεσμών υδρογόνου που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση DES. ....                                                    | 44 |
| Σχήμα 12: Κυκλοεξανοϊκό δις(2-υδροξυ-αιθυλ)αμμώνιο (ΙΥ).....                                                                                                      | 50 |
| Σχήμα 13: Χλωρίδιο χολίνης : Γλυκερόλη (DES).....                                                                                                                 | 50 |
| Σχήμα 14: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου κρυστάλλωσης που εφαρμόστηκε κατά το πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας. ....                                     | 52 |
| Σχήμα 15: Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της 1 <sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης της λυσοζύμης παρουσία ΙΥ ως πρόσθετο μετά από 1 εβδομάδα. ....         | 63 |
| Σχήμα 16: Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της 2 <sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης της λυσοζύμης παρουσία ΙΥ ως πρόσθετο μετά από 1 μέρα.....              | 69 |
| Σχήμα 17: Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της 1 <sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης της λυσοζύμης παρουσία DES ως πρόσθετο μετά από 1 εβδομάδα.....         | 79 |
| Σχήμα 18: Γραφική αναπαράσταση της παρουσίας ιόντων σε πρωτεϊνικό διάλυμα. ....                                                                                   | 88 |

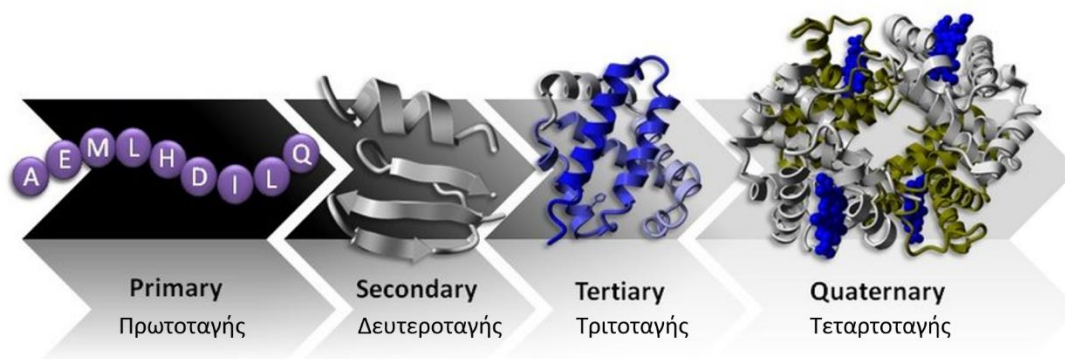
## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΜΟΡΙΑ

Οι πρωτεΐνες είναι μόρια μεγάλου μεγέθους (μακρομόρια) που αποτελούνται από αμινοξέα, τις δομικές μονάδες τους. Συνολικά υπάρχουν 20 διαφορετικά αμινοξέα στις πρωτεΐνες και εκατοντάδες έως χιλιάδες από αυτά τα αμινοξέα συνδέονται το ένα με το άλλο σε μεγάλες αλυσίδες για να σχηματίσουν μια πρωτεΐνη. Κάθε πρωτεΐνη έχει μοναδική αλληλουχία αμινοξέων που είναι ίδια για κάθε μόριό της. [1]

Μια γραμμική αλυσίδα αμινοξέων διπλώνεται σε μια συγκεκριμένη τριδιάστατη διαμόρφωση που προσδιορίζεται από την αλληλουχία των αμινοξέων στην αλυσίδα. Αυτό αποτελεί την πρωτοταγή δομή, το βασικό επίπεδο δομής της πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες λαμβάνουν την τελική τους διαμόρφωση στον χώρο λόγω αλληλεπιδράσεων όπως δεσμοί υδρογόνου, δισουλφιδικοί δεσμοί και γεφυρών αλατιού, καθώς και υδρόφοβων και υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων που τις αναγκάζουν να λαμβάνουν επί μέρους δευτερεύουσες δομές όπως η  $\alpha$ -έλικα και το  $\beta$ -πτυχωτό φύλλο. Οι ίδιες δυνάμεις που αναγκάζουν την πρωτεΐνη να διπλωθεί σε μια δευτερεύουσα δομή προκαλούν ακόμη μεγαλύτερη αναδίπλωση ολόκληρης της αλυσίδας, όπως στην περίπτωση των σφαιρικών πρωτεϊνών, δημιουργώντας μια τριτοταγή δομή. Όταν μια πρωτεΐνη περιέχει περισσότερες από μία αλυσίδες πολυπεπτιδίων, η συνολική διαμόρφωση δημιουργεί μια τεταρτοταγή δομή. [2]

Η πρωτοταγής δομή των πρωτεϊνών παίζει θεμελιώδη ρόλο στον προσδιορισμό της διαμόρφωσής τους. Οι δυνάμεις και οι αλληλεπιδράσεις που διατηρούν τις δευτεροταγείς, τριτοταγείς και τεταρτοταγείς δομές προκύπτουν από την παρουσία ορισμένων αμινοξέων σε καθορισμένες θέσεις στο πρωτεϊνικό μόριο. Για το λόγο αυτό, μικρές αλλαγές στη σειρά των αμινοξέων μπορεί να προκαλέσει μεγάλες αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης. [1]



Εικόνα 1: Τα τέσσερα επίπεδα δομής των πρωτεϊνών. [3]

Στις πρωτεΐνες η δομή είναι αναπόσπαστα συνδεδεμένη με τη λειτουργία. Η διαμόρφωση μιας πρωτεΐνης της προσδίδει μια μοναδική λειτουργία που βασίζεται στις χημικές ιδιότητές της και στον τρόπο σύνδεσης με άλλα μόρια (προσδέτες). [4] Τα ένζυμα είναι μια ειδική κατηγορία πρωτεϊνών που μπορούν να καταλύουν βιοχημικές αντιδράσεις, μετατρέποντας ένα υπόστρωμα σε προϊόντα με υψηλούς ρυθμούς αντίδρασης. Σήμερα, τα ένζυμα αποτελούν βασικό πυλώνα της βιοτεχνολογίας, καθώς είναι τα κύρια εργαλεία για διάφορες βιοτεχνολογικές τεχνικές (κλωνοποίηση), βιολογικές διεργασίες (ζύμωση και κυτταρική καλλιέργεια) και στην ανάπτυξη φαρμάκων για ανθρώπους και ζώα. Επιπλέον,

βρίσκουν εφαρμογές σε αρκετές άλλες βιομηχανίες, όπως τρόφιμα, καλλυντικά, επεξεργασία λυμάτων και απορριμμάτων κλπ. [5] Το πλήθος των πρωτεϊνικών δομών αυξάνει, με αποτέλεσμα να γίνεται πιο κατανοητός ο ρόλος που διαδραματίζουν καθώς και η χρήση τους. Συνέπεια αυτού είναι η αύξηση του αριθμού θεραπευτικών μέσων (therapeutic agents) ή/και των φαρμάκων που βρίσκονται ήδη στην αγορά και έχουν ανακαλυφθεί με τη μέθοδο του κατευθυνόμενου-από τη δομή- του αντίστοιχου πρωτεϊνικού στόχου σχεδιασμού. Η αναστολή της λειτουργίας ενός συγκεκριμένου ενζύμου αποτελεί βασικό μηχανισμό ορισμένων φαρμάκων. Για παράδειγμα, η ανακάλυψη της δομής της πρωτεάσης του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη εμπορικών φαρμακευτικών σκευασμάτων, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους αναστολείς αυτής της πρωτεάσης. [6]

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για τον προσδιορισμό της τριδιάστατης δομής είναι η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ και η ανάπτυξη κρυστάλλων αποτελεί στάδιο κλειδί σε αυτήν τη διαδικασία. Προκειμένου για την ανάπτυξη νέων μεθοδολογιών που αφορούν στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται καλά χαρακτηρισμένα ένζυμα όπως, η λυσοζύμη, ένα ένζυμο βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος. Αντιστοίχως, αξιοποιούνται καλά μελετημένα ένζυμα όπως η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, το οποίο χρησιμοποιείται ως στόχος για τον κατευθυνόμενο-από τη δομή- σχεδιασμό δυνάμει αντιδιαβητικών φαρμάκων, ενώ μεγάλος αριθμός τριδιάστατων δομών του έχουν κατατεθεί στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων ως συμπλόκων με αναστολείς της δράσης του. Παρακάτω παρουσιάζεται μια σύντομη περιγραφή των δύο αυτών ενζύμων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα εργασία.

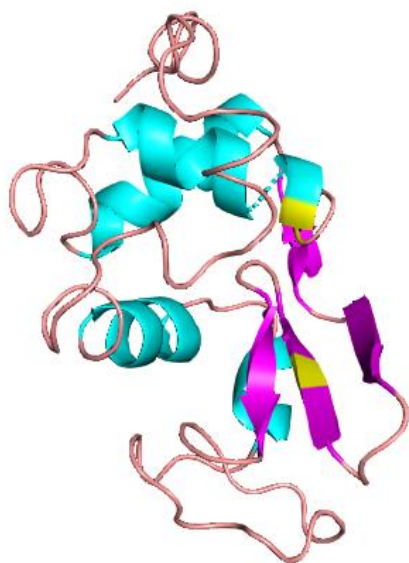
## 1.1 Λυσοζύμη

Η λυσοζύμη είναι ένα ένζυμο που ανακαλύφθηκε το 1922 από τον Alexander Fleming και απαντάται ευρέως στο ζωικό και φυτικό βασίλειο. Λόγω της υδρολυτικής της ικανότητας ονομάζεται επίσης και 1,4-β-N-ακετυλο-μουραμιδο-γλυκανο-ϋδρολάση. Το μοριακό της βάρος είναι περίπου 14 kDa και αποτελείται από 129 αμινοξέα συνδεδεμένα με τέσσερις (4) δισουλφιδικές γέφυρες. [7]

Η λυσοζύμη έχει βρεθεί σε βακτήρια, βακτηριοφάγα, φυτά και ζώα. Οι λυσοζύμες που προέρχονται από διαφορετικές πηγές, διαφέρουν στην αλληλουχία αμινοξέων, στο ενεργό κέντρο και στην ενζυμική δράση. Η εμπορική πηγή λυσοζύμης σήμερα είναι το ασπράδι αυγού όρνιθας, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων. [8]

Το 1965 ανακαλύφθηκε η δομή της λυσοζύμης από ασπράδι αυγού όρνιθας (Hen Egg White Lysozyme - HEWL) μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ σε ανάλυση 2 Å ενώ το 1975 προσδιορίστηκε το ενεργό της κέντρο. Η λυσοζύμη έχει δύο βασικές περιοχές: η περιοχή α του μορίου αποτελείται κυρίως από α-έλικες, ενώ η περιοχή β περιέχει β-πτυχωτά ελάσματα και έλικες. Το ενεργό κέντρο βρίσκεται εντός της οπής που δημιουργείται μεταξύ των δύο περιοχών. [9], [10]





Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της τριδιάστατης δομής της λυσοζύμης από ασπράδι αυγού όρνιθας (HEWL) (PDB code: 1LYZ). Με μπλε χρώμα υποδεικνύονται οι έλικες του μορίου ενώ με μωβ τα β-πτυχωτά ελάσματα. Τα καταλυτικά αμινοξέα αναπαριστώνται με κίτρινο χρώμα. Η αναπαράσταση έγινε με χρήση του λογισμικού PyMOL 2. (Πηγή: <https://www.rcsb.org>)

Η λυσοζύμη χαρακτηρίζεται από αντιμικροβιακή δράση και γι' αυτό θεωρείται ως βακτηριοκτόνο. Ο μηχανισμός θανάτωσης βακτηριδίων από τη λυσοζύμη συμβαίνει μέσω της υδρόλυσης της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. [11] Χάρη σε αυτήν τη δράση της αξιοποιείται ευρέως στην ιατρική, στα καλλυντικά και στη βιομηχανία τροφίμων. Για παράδειγμα, η λυσοζύμη χρησιμοποιείται στην παραγωγή τυριών και κρασιού με στόχο την αναστολή οργανισμών αλλοίωσης των τροφίμων. Επίσης, χρησιμοποιείται ως ενισχυτικός παράγοντας σε θεραπείες με αντιβιοτικά, σε οφθαλμικές σταγόνες, σε προϊόντα καθαρισμού του στόματος, ενώ έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη του ιού HIV-1 σε *in vitro* πειράματα. [7]

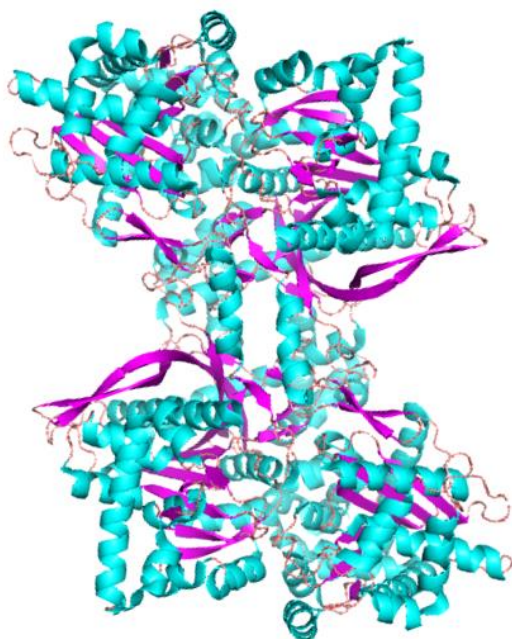
Η λυσοζύμη, ως το πρώτο ένζυμο που μελετήθηκε με περίθλαση ακτίνων Χ, χρησιμοποιείται ευρέως ακόμη και σήμερα για την ανάπτυξη μεθοδολογιών που αφορούν στην εφαρμογή της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ. [10] Η λυσοζύμη από ασπράδι αυγού όρνιθας (HEWL) αναφέρεται ευρέως στη βιβλιογραφία ως μια πρωτεΐνη-πρότυπο (model protein) για κρυσταλλογραφικές μελέτες. [12], [13] Η ευκολία διαχείρισης, η μεγάλη διαθεσιμότητα εμπορικών σκευασμάτων και οι απλές συνθήκες κρυστάλλωσης, είναι μερικά από τα χαρακτηριστικά της λυσοζύμης που την καθιστούν ως δημοφιλή/διαδεδομένο πρωτεϊνικό στόχο σε πληθώρα δημοσιεύσεων.

## 1.2 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου β

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (Glycogen Phosphorylase - GP) είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο που αποτελείται από 842 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος περίπου 96 kDa. Το ένζυμο αυτό απαντάται σε δύο μορφές: στην GP<sub>a</sub> που είναι η φωσφορυλιωμένη μορφή και είναι κυρίως ενεργή (*R* διαμόρφωση) και στην GP<sub>b</sub> που είναι η αποφωσφορυλιωμένη μορφή και είναι κυρίως ανενεργή (*T* διαμόρφωση). [14]

Η τριδιάστατη δομή του ενζύμου αυτού έχει χαρακτηριστεί εις βάθος αφού περισσότερες από 200 δομές έχουν κατατεθεί στην RCSB Protein Data Bank. Οι περισσότερες από αυτές τις δομές έχουν ληφθεί σε υψηλή ανάλυση, με μορφή συμπλόκου με αναστολείς της δράσης του. Με βάση αυτές τις δομές έχουν ανακαλυφθεί διαφορετικά αλλοστερικά

κέντρα του ενζύμου πέραν του καταλυτικού, το αλλοστερικό κέντρο, το νέο αλλοστερικό, το κέντρο αναστολής και το αποθηκευτικό κέντρο του γλυκογόνου. [15]



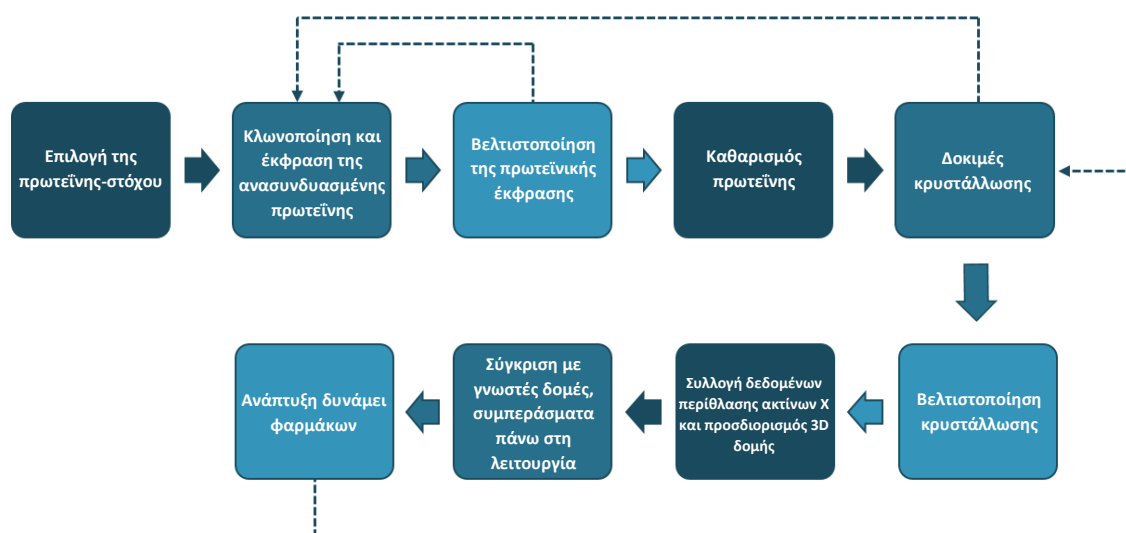
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της τριδιάστατης διμερής δομής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου β (GPb) από μυ κουνελιού (PDB code: 1GPB). Με μπλε χρώμα υποδεικνύονται οι έλικες του μορίου ενώ με μωβ τα β-πτυχωτά ελάσματα. Η αναπαράσταση έγινε με χρήση του λογισμικού PyMOL 2. (Πηγή: <https://www.rcsb.org>)

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αποικοδόμηση γλυκογόνου σε 1-φωσφορική γλυκόζη (Glc-1-P), η οποία με τη σειρά της, μετατρέπεται σε γλυκόζη στο ήπαρ και τελικά απελευθερώνεται στη ροή του αίματος. Το ένζυμο αυτό εκφράζεται σε τρεις διαφορετικούς ιστούς στο ανθρώπινο σώμα: στο ήπαρ, τους μύες και τον εγκέφαλο. Λόγω του ρόλου του στη ρύθμιση της παραγωγής γλυκόζης στο ήπαρ, υπάρχει ενδιαφέρον για το σχεδιασμό ισχυρών αναστολέων, δυνάμει φαρμάκων, για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2. Η δομή της GPb έχει αξιοποιηθεί ως στόχος για το σχεδιασμό ενώσεων με βάση τη γλυκόζη που αναστέλλουν την ενζυμική δράση, εμποδίζοντας τη γλυκογονόλυση και ενεργώντας ως ρυθμιστές των επιπέδων γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος. [14], [16], [17]

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ

Οι μελέτες προσδιορισμού αλληλουχίας γονιδιωμάτων έχουν παράσχει μια σχεδόν πλήρη λίστα των μορίων που υπάρχουν σε έναν οργανισμό και οι μετα-γονιδιωματικές μελέτες στοχεύουν στην καταγραφή των σχέσεων μεταξύ τους. [18] Όπως αναφέρθηκε και στο ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΜΟΡΙΑ, η μοριακή δομή είναι αυτή που καθορίζει τις ιδιότητες και τη λειτουργία των πρωτεϊνών. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ είναι μια από τις πλέον διαδεδομένες μεθοδολογίες προσδιορισμού της πρωτεϊνικής δομής καθώς ακριβή μοντέλα μοριακής δομής, συχνά με λεπτομέρειες σε επίπεδο ατομικής ανάλυσης, μπορούν να ληφθούν γρήγορα και αξιόπιστα. [6] Περίπου το 88% όλων των δομών που έχουν κατατεθεί στην Protein Data Bank (PDB) έχουν προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και 3D ηλεκτρονική μικροσκοπία. [19]

Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ παρέχει τα θεμέλια της σύγχρονης δομικής βιολογίας και ανακάλυψης φαρμάκων με βάση τη δομή. Η αναζήτηση νέων θεραπευτικών μέσων έχει ξεκινήσει μαζικές προσπάθειες για τον προσδιορισμό των λεπτομερειών των αλληλεπιδράσεων φαρμάκου-στόχου. [6] Η βασική διαδικασία σχεδιασμού φαρμάκων μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1: Τα βήματα από την επιλογή της πρωτεΐνης-στόχου μέχρι την ανακάλυψη ενός δυνάμει φαρμάκου. Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης και η κρυστάλλωση είναι τα πιο απαιτητικά βήματα της διεργασίας. [20]

Πολλές φορές ο προσδιορισμός της δομής μιας πρωτεΐνης είναι εξαιρετικά δύσκολος, λόγω της αδυναμίας εύρεσης συνθηκών που προάγουν την ανάπτυξη υψηλής ποιότητας κρυστάλλων. Παρά τη σημασία της κρυστάλλωσης των πρωτεϊνών, οι γνώσεις για αυτήν τη διαδικασία είναι ακόμη περιορισμένες και προς το παρόν δεν υπάρχουν συστηματικές μέθοδοι για να διασφαλιστεί η ανάπτυξη κρυστάλλων με καλή περιθλαστική ικανότητα των ακτίνων Χ. Αυτό το πρόβλημα έχει οδηγήσει τους επιστήμονες σε συνεχείς προσπάθειες για τη βελτίωση της. [18]

## 2.1 Βασικές Αρχές Κρυστάλλωσης

Το πρώτο απαραίτητο βήμα σε οποιοδήποτε πείραμα κρυστάλλωσης είναι να «απομακρυνθεί» αργά η πρωτεΐνη από το διάλυμα ώστε κατά τη διαδικασία του διαχωρισμού φάσεων να αναπτυχθούν κρύσταλλοι. Η διαλυτότητα μιας πρωτεΐνης μπορεί να μειωθεί προσθέτοντας κατάλληλες ουσίες (παράγοντες κατακρήμνισης) στο διάλυμα, με απομάκρυνση του διαλύτη (νερό) από το πρωτεϊνικό διάλυμα ή με συνδυασμό και των δύο. [6]

Σε ένα κορεσμένο διάλυμα, υπάρχουν δύο καταστάσεις στην ισορροπία: η στερεή φάση και μία φάση που αποτελείται από μόρια ελεύθερα στο διάλυμα. Κατά τον κορεσμό, δεν μπορεί να προκληθεί αύξηση του ποσοστού της στερεάς φάσης, δεδομένου ότι θα αντισταθμιζόταν με ισοδύναμη διάλυση. Έτσι, οι κρύσταλλοι δεν αναπτύσσονται από ένα κορεσμένο διάλυμα. Το σύστημα πρέπει να είναι σε κατάσταση μη-ισορροπίας ή αλλιώς σε μια υπερκορεσμένη κατάσταση που παρέχει τη θερμοδυναμική ενέργεια που απαιτείται για την κρυστάλλωση. Όταν ο στόχος είναι να αναπτυχθούν κρύσταλλοι οποιασδήποτε ένωσης, ένα διάλυμα της πρέπει να μετατραπεί ή να φτάσει σε υπερκορεσμένη κατάσταση, όπου η επιστροφή στην ισορροπία αναγκάζει τον εγκλεισμό των διαλυμένων μορίων στο στερεό, δηλαδή τον κρύσταλλο. Εάν, από ένα κορεσμένο διάλυμα για παράδειγμα, ο διαλύτης απομακρύνεται σταδιακά με εξάτμιση, η θερμοκρασία μειώνεται ή αυξάνεται κατάλληλα, ή κάποια άλλη ιδιότητα του συστήματος αλλάζει, τότε το όριο διαλυτότητας μπορεί να ξεπεραστεί και το διάλυμα να υπερκορεστεί. Εάν υπάρχει ή εισαχθεί στερεή φάση, τότε ο κορεσμός θα αποκατασταθεί καθώς τα μόρια αφήνουν τον διαλύτη, ενώνονται στη στερεά φάση και η ισορροπία ανακτάται. [21]

Η θεμελιώδης εξίσωση για την ελεύθερη ενέργεια της κρυστάλλωσης  $\Delta G_c$  δίνεται από την εξίσωση:

$$\Delta G_c = \Delta H_c - T(\Delta S_{\text{πρωτεΐνης}} + \Delta S_{\text{διαλύτη}})$$

Ο σχηματισμός της πρωτεΐνης σε κρυστάλλους απαιτεί μια μείωση της ελεύθερης ενέργειας που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Δηλαδή, η ελεύθερη ενέργεια της κρυστάλλωσης  $\Delta G$ , πρέπει να είναι αρνητική. Ο σχηματισμός του κρυσταλλικού πλέγματος οδηγεί σε σημαντική απώλεια στο βαθμό ελευθερίας, καθώς η μεταφορά και η περιστροφή των μορίων μειώνεται. Αυτή η μεγάλη απώλεια εντροπίας, δεδομένου του αρνητικού πρόσημου στον όρο της εντροπίας στην εξίσωση, έχει ως αποτέλεσμα μια θετική συνεισφορά στον όρο  $\Delta G$ . Συνεπώς, πρέπει να αντισταθμιστεί από κάποιο άλλο αποτέλεσμα. Ο αριθμός των επαφών μεταξύ των μορίων είναι σχετικά χαμηλός και οι αλληλεπιδράσεις είναι αδύναμες. Οι μετρήσεις έχουν δείξει ότι πράγματι η ενθαλπική συνεισφορά  $\Delta H_c$  (θερμότητα σχηματισμού) είναι συνήθως αρνητική ή πρακτικά ασήμαντη (μεταξύ -17 και 0 kcal/mol) για τον σχηματισμό κρυστάλλων πρωτεΐνης. Η απελευθέρωση μορίων νερού κατά μήκος των υδρόφοβων και πολικών επιφανειών κατά τον σχηματισμό ενός κρυστάλλου συμβάλλει στην αύξηση της εντροπίας του διαλύτη, ξεπερνώντας τις απώλειες εντροπίας που προκαλούνται σε μεγάλο βαθμό από την απώλεια κίνησης ελευθερίας κατά την κρυστάλλωση. [6]

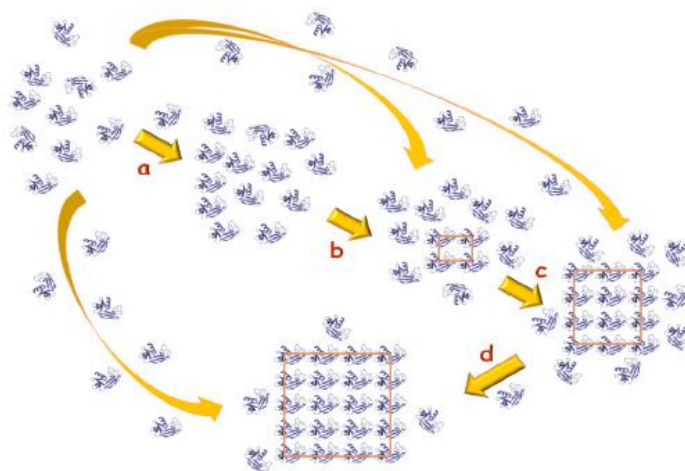
Η θερμοδυναμική εξίσωση υπογραμμίζει ότι μια λεπτή ισορροπία μεταξύ ενθαλπικών κερδών και οι εντροπικών αλλαγών κατά την κρυστάλλωση πρέπει να καθοριστούν προκειμένου να επιτευχθεί η κρυστάλλωση. Αυτό εξηγεί γιατί πολύ μικρές αλλαγές μπορούν να επηρεάσουν την ευαίσθητη ισορροπία μεταξύ ενός κρυστάλλου και του

περιβάλλοντος διαλύματος. Η επίτευξη μιας κατάστασης με αρνητικό  $\Delta G$  είναι απαραίτητη θερμοδυναμική απαίτηση αλλά όχι επαρκής συνθήκη για την κρυστάλλωση, καθώς διάφορα μικροσκοπικά κινητικά φαινόμενα στη φάση πυρήνωσης και ανάπτυξης κρυστάλλων επηρεάζουν καθοριστικά την κρυστάλλωση. [6]

Με βάση τη θερμοδυναμική της κρυστάλλωσης γίνεται σαφές γιατί τα μόρια διατάσσονται σε κρυσταλλικά πλέγματα, ενώ θα μπορούσαν εξίσου να σχηματίσουν τυχαία συσσωματώματα, τα οποία συνήθως αναφέρονται ως ιζήμα. Τα μόρια της διαλυμένης ουσίας αφήνουν τη φάση του διαλύματος για να σχηματίσουν μεγαλύτερο αριθμό σταθερών δεσμών για την ελαχιστοποίηση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος. Ενώ τα ιζήματα αντιπροσωπεύουν, γενικά, μια στερεά κατάσταση χαμηλής ενέργειας σε ισορροπία με μια φάση διαλύματος, οι κρύσταλλοι είναι καταστάσεις χαμηλότερης ελεύθερης ενέργειας λόγω της σταθερότητας των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διατεταγμένων μορίων. [21]

## 2.2 Στάδια Κρυστάλλωσης

Τα τρία στάδια της κρυστάλλωσης κοινά για όλα τα μόρια είναι η πυρήνωση, η ανάπτυξη του κρυστάλλου και παύση της ανάπτυξης. Κατά τη διάρκεια της πυρήνωσης, μια επαρκής ποσότητα μορίων σχηματίζει ένα θερμοδυναμικά σταθερό συσσωμάτωμα, τον λεγόμενο κρίσιμο πυρήνα, ο οποίος παρέχει επιφάνειες κατάλληλες για ανάπτυξη κρυστάλλων. Το στάδιο ανάπτυξης, που ακολουθεί αμέσως μετά την πυρήνωση, διέπεται από την εναπόθεση των μορίων στην επιφάνεια των πυρήνων και τη διευθέτησή τους σε έναν αναπτυσσόμενο κρύσταλλο. Ο σχηματισμός πρωτεϊνικών κρυστάλλων απαιτεί αλληλεπιδράσεις που είναι συγκεκριμένες και οργανωμένες με τέτοιο τρόπο που είναι κατάλληλος για τον σχηματισμό ενός τριδιάστατου κρυσταλλικού πλέγματος. [18] Η ανάπτυξη των κρυστάλλων σταματά τελικά είτε επειδή επιτυγχάνεται ισορροπία είτε για άλλους κινητικούς λόγους. [6]

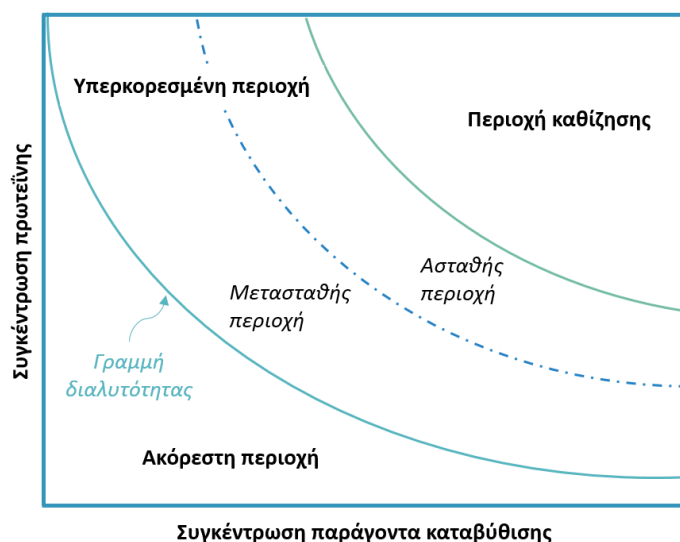


Σχήμα 2: Σχηματική αναπαράσταση συσσωμάτωσης κατά την αύξηση του υπερκορεσμού. (α) Τα μόρια προσανατολίζονται και διανέμονται σε γεωμετρικά αυστηρές αλληλεπιδράσεις (b) Αυτές οι αλληλεπιδράσεις παράγουν έναν πυρήνα (c) Ο πυρήνας εξελίσσεται σε κρύσταλλο (d) Τα ελεύθερα μόρια προσροφώνται στην κρυσταλλική επιφάνεια και αυξάνουν το μέγεθος του κρυστάλλου [18]

Ολόκληρη η διαδικασία ανάπτυξης κρυστάλλων μπορεί να απεικονιστεί εύκολα σε ένα διδιάστατο διάγραμμα φάσεων που αντιπροσωπεύει τις σταθερές καταστάσεις (διάλυμα,



κρύσταλλος, παράγοντας κατακρήμνισης) ως συνάρτηση δύο μεταβλητών κρυστάλλωσης (Γράφημα 1). [18] Σε ένα τυπικό διάγραμμα φάσεων κρυστάλλωσης, διακρίνονται τέσσερες περιοχές: περιοχή με πολύ υψηλό κορεσμό (περιοχή καθίζησης), όπου η πρωτεΐνη καθιζάνει, μία περιοχή μέσου κορεσμού (ασταθής περιοχή), όπου πραγματοποιείται αυθόρμητη πυρήνωση, μία περιοχή χαμηλότερου κορεσμού όπου αναπτύσσονται μόνο κρύσταλλοι χωρίς περαιτέρω πυρήνωση (μετασταθής περιοχή) και μια ακόρεστη περιοχή, όπου η πρωτεΐνη είναι πλήρως διαλυμένη και δε μπορεί να κρυσταλλωθεί. [20] Επειδή αυτές οι περιοχές σχετίζονται με κινητικές παραμέτρους, τα όρια μεταξύ τους δεν είναι καλά καθορισμένα. [18]



Γράφημα 1: Διάγραμμα φάσεων κρυστάλλωσης. Αποτελείται από τρεις κυρίως φάσεις: την ακόρεστη, την υπερκορεσμένη και τη φάση της καθίζησης. Στην ακόρεστη περιοχή, η πρωτεΐνη παραμένει στο διάλυμα, ενώ στην περιοχή καθίζησης, η πρωτεΐνη καθιζάνει με τη μορφή ενός άμορφου ιζήματος. Η υπερκορεσμένη περιοχή χωρίζεται στη μετασταθή, όπου πραγματοποιείται ανάπτυξη κρυστάλλων και στην ασταθή περιοχή όπου πραγματοποιείται αυθόρμητη πυρήνωση. Στη γραμμή διαλυτότητας της πρωτεΐνης, η στερεή κατάσταση είναι σε ισορροπία με τα διαλυμένα μόρια. [21]

Στο πρωτεϊνικό διάλυμα, τα μόρια βρίσκονται σε τυχαίους προσανατολισμούς και περιβάλλονται από διαλύτη (μόρια νερού και παράγοντα καταβύθισης). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαλύτη και πρωτεΐνης είναι ισχυρότερες από ότι αυτές μεταξύ των μορίων της πρωτεΐνης. Το διάλυμα αυτό είναι αρχικά μονοφασικό και σταθερό. [6] Στη συνέχεια, ο σχηματισμός κρυστάλλων εμφανίζεται σε δύο στάδια, την πυρήνωση και την ανάπτυξη. Μια ιδανική στρατηγική είναι να εφαρμοστούν συνθήκες που αντιστοιχούν στην ασταθή αλλά κοντά στη μετασταθή περιοχή του διαγράμματος φάσης, και έπειτα, αφού σχηματιστούν πυρήνες, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα μειώνεται σταδιακά οδηγώντας το σύστημα στη μετασταθή περιοχή, όπου ανάπτυξη κρυστάλλων, αλλά όχι πρόσθετη πυρήνωση, μπορεί να συμβεί. [22]

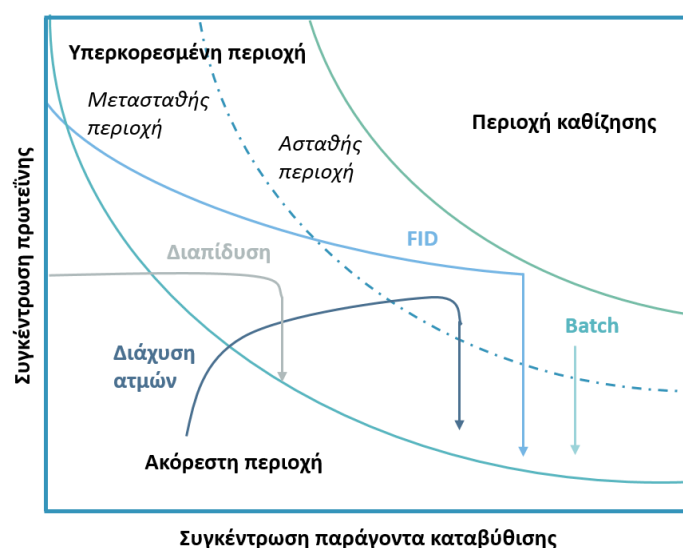
Ωστόσο, είναι πολύ δύσκολο να προσδιοριστούν αυτές οι ιδανικές συνθήκες και δεν είναι εύκολο να προβλεφθούν από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της πρωτεΐνης. Αλλαγές σε μία μόνο πειραματική παράμετρο μπορεί ταυτόχρονα να επηρεάσει διάφορες πτυχές ενός πειράματος κρυστάλλωσης. [18] Συχνά εμφανίζεται υπερβολική πυρήνωση, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό πολλών κρυστάλλων χαμηλής ποιότητας. Επηρεάζοντας την κινητική της κρυστάλλωσης και παρακάμπτοντας τη ζώνη πυρήνωσης, μπορεί να ξεπεραστούν τα προβλήματα χαμηλής ποιότητας κρυστάλλων ή ανάπτυξης ιζημάτων. [20]

## 2.3 Τεχνικές Κρυστάλλωσης

Κατά κανόνα, η κρυστάλλωση μιας νέας πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας οποιαδήποτε μέθοδο είναι απρόβλεπτη και δεν εγγυάται την επιτυχία. Κάθε μακρομόριο έχει μοναδικές φυσικές και χημικές ιδιότητες επειδή κάθε αμινοξύ ή νουκλεοτιδική αλληλουχία παράγει μια μοναδική τριδιάστατη δομή που έχει διακριτικά χαρακτηριστικά επιφάνειας. Λόγω της πολυπλοκότητας των αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαλυμένης ουσίας και διαλύτη, και της αλλαγής του χαρακτήρα της πρωτεΐνης, οι μέθοδοι κρυστάλλωσης πρέπει συνήθως να εφαρμόζονται σε ένα ευρύ φάσμα συνθηκών με στόχο την ανακάλυψη της συγκεκριμένης συνθήκης που αποδίδει κρυστάλλους. [21]

Οι κρύσταλλοι μιας ανόργανης ουσίας μπορούν συχνά να αναπτυχθούν με την παρασκευή ενός ζεστού, κορεσμένου διαλύματος της ουσίας που στη συνέχεια ψύχεται με αργό ρυθμό. Πολικές οργανικές ενώσεις μπορούν μερικές φορές να κρυσταλλωθούν με παρόμοιες τεχνικές ή με αργή καθίζηση από υδατικά διαλύματα με προσθήκη οργανικών διαλυτών. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες συνήθως μετουσιώνονται με έκθεση σε θερμότητα ή σε οργανικούς διαλύτες, έτσι οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για «μικρά» μόρια δεν είναι κατάλληλες. [22]

Έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές για τη μεταφορά ενός διαλύματος πρωτεΐνης στην υπερκορεσμένη κατάσταση. Οι πιο συμβατικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την κρυστάλλωση μακρομορίων είναι: η εξάτμιση και διάχυση ατμών (vapor diffusion), η άμεση προσθήκη του παράγοντα κατακρήμνισης (batch), η διαπίδυση (dialysis) και η διάχυση μεταξύ ελεύθερων επιφανειών (free-interface diffusion, FID). Στο Γράφημα 2 παρουσιάζονται οι διαφορετικές διαδρομές που χρησιμοποιούν οι μέθοδοι κρυστάλλωσης για να φτάσουν στη μετασταθή περιοχή του διαγράμματος φάσεων. [18] Η μέθοδος batch επιτυγχάνει υπερκορεσμό αμέσως μετά την ανάμιξη, ενώ σε όλες τις άλλες μεθόδους που βασίζονται στη διάχυση, το πρωτεϊνικό διάλυμα είναι ακόρεστο στην αρχή και σταδιακά φτάνει στον υπερκορεσμό. [20]



Γράφημα 2: Διάγραμμα φάσεων κρυστάλλωσης πρωτεΐνης. Παρουσιάζονται οι διαφορετικές διαδρομές που ακολουθούν οι τέσσερις βασικές μέθοδοι κρυστάλλωσης πρωτεϊνών. [18]

### 2.3.1 Εξάτμιση και Διάχυση ατμών (Vapor Diffusion)

Αυτήν τη στιγμή η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την επίτευξη υπερκορεσμού σε σταγονίδια διαλύματος πρωτεΐνης είναι η διάχυση ατμών. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην εξάτμιση και διάχυση είτε ύδατος είτε κάποιου πτητικού παράγοντα μεταξύ ενός μικρού σταγονιδίου (0.5 - 10  $\mu\text{L}$ ) που περιέχει την πρωτεΐνη σε ρυθμιστικό διάλυμα και τον παράγοντα κατακρήμνισης και ενός πολύ μεγαλύτερου διαλύματος δεξαμενής (reservoir) (500 - 1000  $\mu\text{L}$ ) που περιέχει το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα και παράγοντα κατακρήμνισης αλλά σε υψηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με το σταγονίδιο. [21] Η δεξαμενή και η σταγόνα βρίσκονται μέσα σε ένα πηγάδι (well) το οποίο σφραγίζεται, αφήνοντας τα διαλύματα να εξισορροπήσουν. Η διαφορά μεταξύ της συγκέντρωσης του παράγοντα κατακρήμνισης στην σταγόνα και στο διάλυμα της δεξαμενής προκαλεί την εξάτμιση του νερού από την σταγόνα έως ότου η συγκέντρωση του παράγοντα κατακρήμνισης να ισούται με εκείνη του διαλύματος δεξαμενής. Επειδή ο όγκος του διαλύματος δεξαμενής είναι πολύ μεγαλύτερος από τον όγκο της σταγόνας, η αραίωσή του λόγω των υδρατμών που αφήνουν το σταγονίδιο είναι αμελητέα. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χωριστεί σε εκείνες τις τεχνικές που χρησιμοποιούν την «καθήμενη σταγόνα» (sitting drop), την «κρεμάμενη σταγόνα» (hanging drop) και τη «σταγόνα σάντουιτς» (sandwich drop). [18]

- Κρεμάμενη σταγόνα: Στην τεχνική διάχυσης ατμών κρεμάμενης σταγόνας, η σταγόνα του διαλύματος πρωτεΐνης τοποθετείται σε μια γυάλινη πλάκα-καλυπτρίδα που φέρει επίστρωση σιλικόνης και αναμιγνύεται με περίπου ίση ποσότητα του διαλύματος δεξαμενής. Το πηγάδι σφραγίζεται με το κάλυμμα και έτσι η σταγόνα αιωρείται πάνω από τη δεξαμενή. Στο προκύπτον κλειστό σύστημα, οι υδρατμοί διαχέονται από την κρεμάμενη σταγόνα στη δεξαμενή, που περιέχει περίπου διπλάσια συγκέντρωση παράγοντα κατακρήμνισης από τη σταγόνα. Τα ξεχωριστά πηγάδια της πλάκας είναι βολικά στο άνοιγμά τους και μπορούν εύκολα να σφραγιστούν ξανά με το ίδιο κάλυμμα. Μερικά από τα μειονεκτήματα της τεχνικής είναι το σχετικά υψηλό κόστος των καλυπτρίδων, η πιθανότητα ότι οι σταγόνες με μικρή επιφανειακή τάση θα εξαπλωθούν ή ακόμη και θα γλιστρήσουν από την καλυπτρίδα κατά την περιστροφή του και η αναγκαιότητα λίπανσης για στεγανοποίηση των πηγαδιών. [6]
- Καθήμενη σταγόνα: Η διάχυση ατμών καθήμενης σταγόνας ακολουθεί τις ίδιες αρχές με την κρεμάμενη σταγόνα, εκτός από το γεγονός ότι η σταγόνα εδώ στηρίζεται πάνω σε μια κοίλη θέση ενός στηρίγματος, η οποία μπορεί να είναι ήδη διαμορφωμένη στην ίδια τη μικροπλάκα. Δεν υπάρχει ανάγκη για χρήση καλυπτρίδων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί κολλητική ταινία. Η διάχυση ατμών καθήμενης σταγόνας έχει βελτιστοποιηθεί για αυτοματοποίηση με χρήση ρομποτικών συστημάτων ενώ διατίθενται τυποποιημένες μικροπλάκες 96 πηγαδιών σε πολλές παραλλαγές. Ο σχηματισμός των σταγόνων κρυστάλλωσης ορίζεται από το ρομπότ κρυστάλλωσης και το πιάτο σφραγίζεται με κολλητική ταινία από τον χρήστη. Τα περισσότερα ρομποτικά μηχανήματα είναι ικανά να διανέμουν μικρές σταγόνες στην περιοχή των 100 nL. [6] Το μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η σχετικά μεγάλη χρονική καθυστέρηση μεταξύ της τοποθέτησης της πρώτης σταγόνας και της ταινίας σφράγισης. Ωστόσο αυτό έχει ξεπεραστεί τα τελευταία χρόνια με χρήση ενός καλύμματος της μικροπλάκας κατά την εκτέλεση του πειράματος. Επίσης μερικές φορές οι κρύσταλλοι μπορεί να προσκολληθούν πάνω στην επιφάνεια στήριξης, δυσχεραίνοντας τη συλλογή τους. [18]



- Σταγόνα sandwich: Σε αυτή την τεχνική η πρωτεΐνη αναμιγνύεται με τον παράγοντα καταβύθισης και η σταγόνα τοποθετείται μεταξύ δύο γυάλινων πλακών, η μία από τις οποίες σφραγίζει την επιφάνεια του πηγαδιού. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η μείωση της εκτεθειμένης επιφάνειας της σταγόνας και έτσι η μείωση του ρυθμού με τον οποίο το διάλυμα της δεξαμενής αντλεί νερό από το σταγονίδιο, επιβραδύνοντας τη διαδικασία εξισορρόπησης. [18]

Η διάχυση ατμών είναι η βέλτιστη τεχνική είτε για τον έλεγχο ενός μεγάλου αριθμού συνθηκών, αλλάζοντας τις συνθήκες για κάθε πηγάδι, είτε για αύξηση ή μείωση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στην κατάσταση ισορροπίας σε σχέση με την αρχική της συγκέντρωση, μεταβάλλοντας τον όγκο της πρωτεΐνης που αναμιγνύεται με το διάλυμα του πηγαδιού στην αρχική τοποθέτηση της σταγόνας. [18] Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις όπου η διάχυση ατμών δεν είναι ιδανική μέθοδος λόγω ορισμένων προβλημάτων. Αυτά περιλαμβάνουν τις ανεξέλεγκτες μεταβολές του όγκου και της ακριβούς σύνθεσης της σταγόνας κατά την κρυστάλλωση, τις μεταβολές στο pH λόγω πτητικών ιόντων και τις αλλαγές στη θερμοκρασία που μπορεί να προκαλέσει τη διάσπαση των κρυστάλλων. [20]

### 2.3.2 Άμεση προσθήκη του παράγοντα κατακρήμνισης (Batch)

Σε αυτήν τη μέθοδο ο υπερκορεσμός επιτυγχάνεται άμεσα και όχι με διάχυση. Η πρωτεΐνη και ο παράγοντας κατακρήμνισης αναμιγνύονται σε υψηλές συγκεντρώσεις για να δημιουργήσουν αμέσως ένα υπερκορεσμένο διάλυμα και το σύστημα αφήνεται σε ηρεμία ενώ πλησιάζει την ισορροπία. [6] Ενώ οι μέθοδοι που βασίζονται στη διάχυση είναι δυναμικά συστήματα στα οποία οι συνθήκες αλλάζουν καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας κρυστάλλωσης, σε αυτήν τη μέθοδο, τα διαλύματα αναμιγνύονται στην τελική τους συγκέντρωση στην αρχή του πειράματος. Έτσι, οι συνθήκες είναι σταθερές εντός ενός φυσιολογικού χρονικού πλαισίου ενός πειράματος κρυστάλλωσης (1-3 εβδομάδες). Συνήθως δεν υπάρχουν αλλαγές στον όγκο της σταγόνας ή το pH. [20] Για την απόκτηση καλής ποιότητας κρυστάλλων πρέπει η πυρήνωση να ξεκινήσει κατά την προετοιμασία της σταγόνας, όταν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης και διαλύματος καταβύθισης έρχονται σε επαφή μεταξύ τους, και μετά την ανάμιξη τους πρέπει να βρίσκονται στη μετασταθή ζώνη που εγγυάται την ομαλή ανάπτυξη κρυστάλλων. [18]

Μια υποκατηγορία της μεθόδου αυτής είναι η τεχνική microbatch, όπου τα σταγονίδια κρυστάλλωσης (0.5 - 1  $\mu$ L) εμβαπτίζονται σε αδρανές έλαιο, συνήθως παραφινέλαιο χαμηλής πυκνότητας. Τα σταγονίδια κρυστάλλωσης είναι πυκνότερα από το έλαιο, παραμένοντας έτσι κάτω από το αυτό, όπου προστατεύονται από την εξάτμιση και την ατμοσφαιρική μόλυνση. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κρυσταλλώσεις που περιέχουν μικρά πτητικά οργανικά μόρια όπως η φαινόλη, η διοξάνη ή η θυμόλη, επειδή αυτά τα μόρια διαλύονται σε έλαια. [20]

Η μέθοδος batch με έλαια χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια με επιτυχία. Πολύ μικρές σταγόνες μπορούν να τοποθετηθούν χωρίς βιασύνη καθώς προστατεύονται αμέσως από το έλαιο, χωρίς να υπάρχει καθυστέρηση μεταξύ τοποθέτησης και σφράγισης της σταγόνας. [6] Η μέθοδος αυτή έχει επίσης αυτοματοποιηθεί πλήρως με τη χρήση ρομπότ κρυστάλλωσης τα οποία διανέμουν σταγόνες ελάχιστων νανόλιτρων, κάνοντας την ελκυστική για έλεγχο, διαλογή και βελτιστοποίηση των πειραμάτων. Η μετατροπή των συνθηκών από διάχυση ατμών σε microbatch και το αντίστροφο είναι σχετικά εύκολο. [20] Το κύριο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι σε πολλές περιπτώσεις, η εξισορρόπηση

συμβαίνει πολύ γρήγορα, επηρεάζοντας έτσι τον ρυθμό ανάπτυξης κρυστάλλων και κατά συνέπεια την ποιότητά τους. [18]

### 2.3.3 Διαπίδυση (Dialysis)

Αυτή η μέθοδος στηρίζεται στη διάχυση των μορίων του παράγοντα κατακρήμνισης μέσω μιας ημιδιαπερατής μεμβράνης, προσεγγίζοντας αργά τη συγκέντρωση στην οποία το μακρομόριο κρυσταλλώνεται. Υπό την προϋπόθεση ότι ο παράγοντας καταβύθισης είναι ένα μικρό μόριο όπως ένα αλάτι ή μια αλκοόλη, μπορεί εύκολα να διεισδύει στη μεμβράνη διαπίδυσης, και η πρωτεΐνη να έρχεται αργά σε ισορροπία με το διάλυμα καταβύθισης. [18]

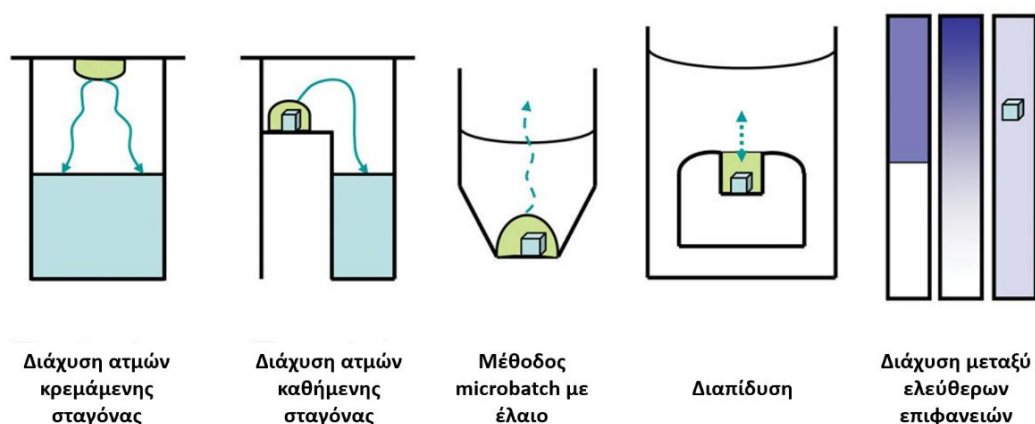
Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική διαπίδυσης περιλαμβάνει τη χρήση «κουμπιών» διαπίδυσης, τα οποία προσφέρουν τη δυνατότητα εκτέλεσης δοκιμών κρυστάλλωσης με μικρή ποσότητα δείγματος. Στην τελευταία περίπτωση, το δείγμα πρωτεΐνης τοποθετείται μέσα σε έναν μικρό θάλαμο, στο «κουμπί» διαπίδυσης, το οποίο μπορεί να φιλοξενήσει όγκους που κυμαίνονται από 5 έως 100  $\mu\text{L}$ , το δείγμα καλύπτεται με τη μεμβράνη διαπίδυσης και τοποθετείται σε ένα δοχείο που περιέχει το διάλυμα κατακρήμνισης. [18]

Η διαπίδυση έχει πολλά πλεονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένης της δυνατότητας το ίδιο το κουμπί διαπίδυσης με την πρωτεΐνη να εκτεθεί σε διαφορετικές συνθήκες διαλυμάτων καταβύθισης, απλά μετακινώντας το κουμπί από δοχείο σε δοχείο. Αυτό επιτρέπει τη συνεχή ανακύκλωση του διαλύματος πρωτεΐνης έως ότου βρεθούν οι σωστές συνθήκες κρυστάλλωσης. [6], [18] Από την άλλη, η μεμβράνη επιτρέπει στο νερό και τα μικρά μόρια να ανταλλάσσονται ελεύθερα αλλά μπλοκάρει τα πρωτεϊνικά μακρομόρια και τα υψηλού μοριακού βάρους PEGs. Συνεπώς η διαπίδυση εφαρμόζεται κυρίως όταν χρησιμοποιούνται άλατα ως παράγοντες κατακρήμνισης. [6]

### 2.3.4 Διάχυση μεταξύ ελεύθερων επιφανειών (Free-Interface Diffusion)

Η βασική αρχή της διάχυσης μεταξύ ελεύθερων επιφανειών είναι να φέρει το διάλυμα της πρωτεΐνης και του παράγοντα κατακρήμνισης σε επαφή μέσα σε στενό σωλήνα χωρίς προανάμιξη και αυτά να αφεθούν να ισορροπήσουν με διάχυση. [6] Το διάλυμα του παράγοντα καταβύθισης τοποθετείται προσεχτικά πάνω από το διάλυμα της πρωτεΐνης σε ένα τριχοειδή σωλήνα, τα άκρα του οποίου στη συνέχεια σφραγίζονται με κερί. Η στενή διάμετρος του τριχοειδούς σωλήνα ελαχιστοποιεί την ανάμιξη λόγω φυσικής μεταφοράς μέσα στο σύστημα. Έτσι, ο παράγοντας κατακρήμνισης και η πρωτεΐνη διαχέονται αργά και το σύστημα φτάνει στην ισορροπία μέσω διάχυσης. [18]

Κατά την αρχική επαφή του διαλύματος πρωτεΐνης με το διάλυμα καταβύθισης, η περιοχή επαφής του διαλύματος πρωτεΐνης κοντά στη διεπαφή γίνεται υπερκορεσμένη και δημιουργούνται έτσι οι ιδανικές συνθήκες για ανάπτυξη πυρήνων. [6] Με την πάροδο του χρόνου, τα δύο διαλύματα διαχέονται κατά μήκος του άξονα του τριχοειδούς σωλήνα και αραιώνονται μεταξύ τους, προωθώντας έτσι τη διάλυση των μικρότερων πυρήνων και την ανάπτυξη μεγαλύτερων. Η επίτευξη παροδικών συνθηκών πυρήνωσης στις περισσότερες περιπτώσεις επιτρέπει την απόκτηση κρυστάλλων υψηλής ποιότητας. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος δεν χρησιμοποιείται ευρέως λόγω του μεγάλου όγκου δείγματος που απαιτείται, της δυσκολίας δημιουργίας μιας καλής διεπαφής και της παρουσίας ρευμάτων μεταφοράς που σχετίζονται με διαφορές της πυκνότητας των δύο διαλυμάτων και διαταράσσουν τη διεπαφή. Το τελευταίο πρόβλημα μπορεί να λυθεί εν μέρει βάζοντας το πιο πυκνό διάλυμα στο κάτω μέρος, παγώνοντας ένα από τα δύο διαλύματα ή εκτελώντας το πείραμα στη μικροβαρύτητα, όπου η μεταφορά λόγω βαρύτητας εξαλείφεται. [18]



Σχήμα 3: Σχηματική απεικόνιση των τεχνικών κρυστάλλωσης [6]

## 2.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση

Η ανάπτυξη κρυστάλλων πρωτεΐνης είναι μια διεργασία που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, η θερμοκρασία, το pH, ο παράγοντας κατακρήμνισης, το ρυθμιστικό διάλυμα, η ύπαρξη προσθέτων κλπ. Όλες αυτές οι μεταβλητές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο του υπερκορεσμού στο σύστημα και επομένως, έμμεσα, τους ρυθμούς πυρήνωσης και ανάπτυξης κρυστάλλων. Παρακάτω περιγράφονται ορισμένες παράμετροι που επηρεάζουν την κρυστάλλωση πρωτεϊνών. [18]

### 2.4.1 Θερμοκρασία

Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών μπορεί είτε να αυξηθεί είτε να μειωθεί με μεταβολή της θερμοκρασίας. Η συνάρτηση θερμοκρασίας-διαλυτότητας δεν αποτελεί ιδιότητα της ίδιας της πρωτεΐνης, αλλά συνδέεται με το σύστημα διαλύματος-πρωτεΐνης. Η εξάρτηση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης από τη θερμοκρασία οφείλεται στη μεταβολή της σταθεράς της αντίδρασης οξέος/ βάσης των πλευρικών αλυσίδων της πρωτεΐνης ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Εξίσου σημαντική είναι η επίδραση της θερμοκρασίας στους ρυθμούς πυρήνωσης και ανάπτυξης κρυστάλλων. Γενικά, σε ένα εργαστήριο κρυστάλλωσης, τα πειράματα εκτελούνται συνήθως σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, 4 °C και 20 °C (θερμοκρασία δωματίου). [18] Αυτή επιλογή προκύπτει από το γεγονός ότι συνήθως οι πρωτεΐνες εκφράζονται και καθαρίζονται σε χαμηλή θερμοκρασία προκειμένου να επιβραδυνθεί η αποδόμηση από τις πρωτεάσες, κάτι που αποτελεί περισσότερο πρόβλημα στις πρωτεΐνες που απομονώνονται από ιστούς παρά σε αυτές που έχουν ληφθεί μέσω υπερέκφρασης με μεθόδους ανασυνδυασμένου DNA. Προς το παρόν δεν υπάρχουν συστηματικές έρευνες που αποδεικνύουν ένα σημαντικό πλεονέκτημα μιας συγκεκριμένης θερμοκρασίας για την κρυστάλλωση. Ωστόσο, ορισμένες πρωτεΐνες μπορεί να κρυσταλλωθούν καλύτερα σε κάποια θερμοκρασία, ενώ η επιλογή μιας χαμηλότερης θερμοκρασίας μπορεί να είναι χρήσιμη για την επιβράδυνση της ανάπτυξης των κρυστάλλων ή την αλλαγή της κρυσταλλικής μορφής. [6]

### 2.4.2 pH

Η αλλαγή του pH είναι μια βασική παράμετρος και εξαιρετικά χρήσιμη για τον έλεγχο της κρυστάλλωσης των πρωτεϊνών. Αν και το όριο διαλυτότητας αντιστοιχεί κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο pI (το pH στο οποίο το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης είναι μηδέν), οι πρωτεΐνες δεν κρυσταλλώνονται απαραίτητα καλύτερα στο pI τους. Αν και στο pI το καθαρό

φορτίο της πρωτεΐνης είναι μηδέν, εξακολουθούν να υπάρχουν τοπικά φορτία στην επιφάνεια της πρωτεΐνης. Η κατανομή αυτών των τοπικών φορτίων είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό ενός σημαντικού μέρους διαμοριακών αλληλεπιδράσεων που προκαλούν το σχηματισμό ενός κρυστάλλου. Συνεπώς, η επίδραση του pH στην κρυστάλλωση είναι πιθανότατα αποτέλεσμα που οφείλεται στην επήρεια της κατανομής του τοπικού φορτίου (δημιουργώντας έτσι συγκεκριμένες ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις) παρά της διαλυτότητας των πρωτεϊνών. Το pH ρυθμίζεται με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στη σταγόνα κρυστάλλωσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα θα πρέπει επομένως να έχει υψηλότερη συγκέντρωση από το ασθενώς ρυθμισμένο διάλυμα πρωτεΐνης, έτσι ώστε να κατευθύνει το pH στη σταγόνα. Ωστόσο, το πραγματικό pH στη σταγόνα κρυστάλλωσης σπάνια προσδιορίζεται πειραματικά και η τελική τιμή του pH στη σταγόνα όταν έχουν σχηματιστεί κρύσταλλοι δεν είναι ακριβώς γνωστή. [6]

#### 2.4.3 Παράγοντες κατακρήμνισης

Οι χημικές ενώσεις που μειώνουν τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών αναφέρονται ως παράγοντες κατακρήμνισης, καταβύθισης ή κρυστάλλωσης. Ενισχύουν τις έλξεις μεταξύ των πρωτεϊνών και ενεργούν συνήθως με τρεις (3) διαφορετικούς τρόπους: μεταβάλλοντας τον συντελεστή δραστηριότητας του νερού (άλατα), αλλάζοντας τη διηλεκτρική σταθερά του μέσου διαλυτοποίησης (οργανικοί διαλύτες) και αυξάνοντας τη μοριακή συσσωμάτωση (πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους). [18] Τα άλατα είναι οι πιο συχνοί παράγοντες καταβύθισης που χρησιμοποιούνται σε πειράματα κρυστάλλωσης. Μικρές ποσότητες αλάτων αυξάνουν συχνά τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης (salting-in), ενώ με περαιτέρω αύξηση της ποσότητας άλατος μειώνουν ξανά τη διαλυτότητα (salting-out).

Οι πιο συνήθεις οργανικοί παράγοντες καταβύθισης είναι οι πολυαλκοόλες όπως πολυβινυλική αλκοόλη, πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) και PEG-MME (PEG μονομεθυλαιθέρες) διαφορετικού μήκους αλυσίδας μεταξύ 200 και 15000 Da. Η προσθήκη PEG μειώνει τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης λόγω του ανταγωνισμού των πολυαλκοολών για τα μόρια νερού γύρω από την πρωτεΐνη, οδηγώντας τις πρωτεΐνες να αναζητήσουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους και όχι με τον πολικό διαλύτη, δηλαδή το νερό.

Οι αλκοόλες χαμηλού μοριακού βάρους λειτουργούν επίσης σαν παράγοντες καταβύθισης και ο μηχανισμός λειτουργίας τους εστιάζει στη μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς και συνεπώς της πολικότητας του διαλύτη. Η ακετόνη και παρόμοιες ενώσεις, λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο αλλά έχουν συνήθως πιο «απότομο» αποτέλεσμα και μπορούν εύκολα να μετουσιώσουν τις πρωτεΐνες. Ένα μειονέκτημα των μικρών αυτών αλκοολών, όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη ή η ισοπροπανόλη είναι η πτητικότητά τους, που κάνει δύσκολη τη μεταχείρισή τους, ιδιαίτερα σε μικρά σταγονίδια. [6] Οι κρύσταλλοι που λαμβάνονται με έναν τύπο παράγοντα κατακρήμνισης δεν σχηματίζονται συνήθως εάν αυτός αλλάξει με έναν άλλο λειτουργικά διαφορετικό. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι ο συνδυασμός διάφορων ενώσεων μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα ανάπτυξης κρυστάλλου. [18]

#### 2.4.4 Πρόσθετα (Additives)

Έχουν αναπτυχθεί και συνεχίζονται να βελτιώνονται εναλλακτικές στρατηγικές για τις τρέχουσες μεθόδους κρυστάλλωσης πρωτεϊνών που βασίζονται όχι στη βελτιστοποίηση παραδοσιακών μεταβλητών, όπως η συγκέντρωση του παράγοντα καταβύθισης και το pH αλλά στην ιδέα της προσθήκης συμβατικών και βιολογικά ενεργών «μικρών» μορίων που βοηθούν την κρυστάλλωση. [23] Αυτά τα μόρια συχνά αναφέρονται ως πρόσθετα (additives) και έχουν αποδειχθεί κρίσιμα για την κρυστάλλωση μακρομορίων. Μια κοινή

πρακτική στις στρατηγικές κρυστάλλωσης είναι η χρήση προσθέτων που επηρεάζουν την πυρήνωση και την ανάπτυξη κρυστάλλων. Κάθε ουσία εκτός αυτής που κρυσταλλώνεται, του ρυθμιστικού διαλύματος και του παράγοντα κατακρήμνισης θεωρείται ως πρόσθετο και έχει ως στόχο να διευκολύνει ή να βελτιώσει την κρυστάλλωση. [18] Συνήθεις λόγοι για την αναζήτηση πρόσθετων για τη βελτίωση της κρυστάλλωσης είναι η συσσωμάτωση, η κακή μορφολογία, το μικρό μέγεθος και η μη ισχυρή περίθλαση των ακτίνων Χ. Τα πρόσθετα συχνά χρησιμοποιούνται κατά το βήμα της βελτιστοποίησης της κρυστάλλωσης, με δύο προσεγγίσεις: προσθήκη στο διάλυμα των δεξαμενών ή/και απευθείας στα σταγονίδια. [6], [24]

Ένα πρόσθετο μπορεί να δεσμεύσει, να τροποποιήσει και/ή να σταθεροποιήσει τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, να διαταράξει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-διαλύτη, να επηρεάσει τις διάφορες φάσεις κρυστάλλωσης και να αλλάξει το επιφανειακό φορτίο του κρυστάλλου. Η πιο κοινή ερμηνεία των επιδράσεων ενός προσθέτου στην ανάπτυξη κρυστάλλων βασίζεται στην υπόθεση ότι δημιουργούνται ορισμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του προσθέτου και συγκεκριμένων περιοχών στην επιφάνεια της πρωτεΐνης. [18] Ωστόσο, πολλά πρόσθετα δρουν με διαφορετικούς τρόπους, και τα αποτελέσματά τους στο διάλυμα κρυστάλλωσης είναι συνεργιστικά. [6]

Πίνακας 1: Κατηγορίες προσθέτων στην κρυστάλλωση μακρομορίων[18]

| Μόρια                                              | Κατηγορία                                                                                                                                                                                                                 |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Φυσικά πρόσθετα</b>                             | Φυσιολογικά ή βιοχημικά παρόμοια «μικρά» μόρια, όπως συνένζυμα, ανάλογα υποστρώματος, αναστολείς, μεταλλικοί συμπράγοντες (cofactors) ή προσθετικές ομάδες                                                                |
| <b>Χημικά προστατευτικά</b>                        | Μόρια που διασφαλίζουν την ακεραιότητα της πρωτεΐνης όπως αναγωγικά μέσα και ενώσεις απομάκρυνσης ιόντων βαρέων μετάλλων                                                                                                  |
| <b>Διαλυτικά μέσα και καθαριστικά (detergents)</b> | Σουλφοβεταΐνες, χαμηλές συγκεντρώσεις χαστροπικών ουσιών, επιφανειοδραστικά και απορρυπαντικά (detergents) στην περίπτωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών                                                                       |
| <b>Δηλητήρια</b>                                   | Μικρά μόρια που παρεμποδίζουν μερικώς την πυρήνωση, επιτρέποντας την ανάπτυξη μερικών κρυστάλλων καλής ποιότητας, όπως το DMSO, DMF, χαμηλού μοριακού βάρους αλκοόλες και σάκχαρα.                                        |
| <b>Ωσμολύτες</b>                                   | Φυσικά μόρια που βοηθούν την πρωτεΐνη να προσαρμοστεί στην ωσμωτική πίεση διατηρώντας τη δομή και λειτουργία της, όπως το TMAO, η σαρκοσίνη και η βεταΐνη                                                                 |
| <b>Μη ομοιοπολικοί διασυνδετές (cross-linkers)</b> | Μόρια που σταθεροποιούν την κρυσταλλική δομή ρυθμίζοντας τη συσσωμάτωση μέσω αντιστρέψιμων διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, ηλεκτροστατικών ή υδροφοβικών, μεταξύ των επιφανειακών ομάδων των γειτονικών μορίων της πρωτεΐνης |
| <b>Ομοιοπολικοί διασυνδετές (cross-linkers)</b>    | Μόρια διασταυρωμένου δεσμού που μειώνουν την κινητικότητα της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης                                                                                                                                   |

Πολύ συχνά, μικρά άλατα χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα στο διάλυμα κρυστάλλωσης. Για τις περισσότερες πρωτεΐνες ο βαθμός διαλυτότητας εξαρτάται ασθενώς από το είδος του κατιόντος, αλλά έντονα από το είδος του ανιόντος. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα ιόντα είναι



απαραίτητα για τη βιολογική δράση της πρωτεΐνης και συμβάλλουν στη διατήρηση ορισμένων δομικών χαρακτηριστικών της. Σε άλλες περιπτώσεις, τα μεταλλικά ιόντα σταθεροποιούν τις διαμοριακές επαφές στον κρύσταλλο. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η εφαρμογή βιοσυμβατών υδατοδιαλυτών ιοντικών υγρών (όπως περιγράφεται παρακάτω στην παράγραφο 3.5 Εφαρμογές), οργανικών αλάτων και αλάτων με σημεία τήξης σε ή κάτω από τη θερμοκρασία δωματίου παρέχουν πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα ως πρόσθετα κρυστάλλωσης. Τα μικρά οργανικά μόρια αντιπροσωπεύουν μια άλλη κατηγορία πολύ χρήσιμων προσθέτων, τα οποία αυξάνουν τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μειώνοντας τη διηλεκτρική σταθερά, επηρεάζοντας τη δομή του διαλύτη και τροποποιώντας την υδροφοβικότητα. [18]

Για κάθε νέο και μοναδικό μακρομόριο δεν υπάρχει σίγουρη και αποτελεσματική εφαρμογή ενός προσθέτου ενώ υπάρχουν εκατοντάδες περιπτώσεις «μικρών» μορίων. Υπάρχουν επίσης διαθέσιμα εμπορικά σκευάσματα στο εμπόριο που περιέχουν ένα μεγάλο αριθμό μορίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα σε κρυσταλλώσεις μακρομορίων, διευκολύνοντας έτσι την επιλογή. [25] Χαρακτηριστικό είναι το Additive Screen της εταιρείας Hampton Research, το οποίο περιλαμβάνει αντιδραστήρια που επηρεάζουν τη διαλυτότητα και την κρυστάλλωση βιολογικών μακρομορίων, συμπεριλαμβανομένων και των μεμβρανικών πρωτεϊνών.

## 2.5 Στρατηγική Κρυστάλλωσης

Η παραγωγή κρυστάλλων πρωτεΐνης υψηλής ποιότητας είναι μια διαδικασία που μπορεί να χωριστεί σε δύο κύριες φάσεις: τη σάρωση των αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης (screening) και στη συνέχεια τη βελτιστοποίηση αυτών των συνθηκών (optimization). Κάθε στάδιο πραγματοποιείται με μια πολύ εμπειρική προσέγγιση. [18]

Η στρατηγική που χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση της κρυστάλλωσης είναι να καθοδηγηθεί το σύστημα πολύ αργά προς μια κατάσταση μειωμένης διαλυτότητας. Αυτό επιτυγχάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης των αντιδραστηρίων καταβύθισης, ή με την αλλαγή ορισμένων φυσικών ιδιοτήτων, όπως το pH και η θερμοκρασία. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να επιτευχθεί περιορισμένος βαθμός υπερκορεσμού. [21] Έχοντας επιλέξει λοιπόν μια κατάλληλη τεχνική κρυστάλλωσης, παραμένει το ερώτημα ποια αντιδραστήρια και παράμετροι θα επιλεγούν. Μια πρόβλεψη των συνθηκών κρυστάλλωσης μπορεί να γίνει με βάση τις ιδιότητες της πρωτεΐνης. Ορισμένα στατιστικά πρωτόκολλα επιτρέπουν την ανάπτυξη στρατηγικών που δοκιμάζουν με αποτελεσματικό τρόπο τον απεριόριστο συνδυασμό παραμέτρων της κρυστάλλωσης σε διαχειρίσιμο αριθμό πειραμάτων. [6] Η πιο δημοφιλής προσέγγιση περιλαμβάνει την αναζήτηση αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης με βάση συνθήκες που είναι γνωστό ότι είχαν επιτυχία στην ανάπτυξη κρυστάλλων άλλων παρόμοιων πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, συνθήκες κρυστάλλωσης που παρήγαγαν ποιοτικούς κρυστάλλους αναζητώνται σε διαδικτυακές βάσεις δεδομένων. [22] Επίσης, υπάρχουν πολλά έτοιμα εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα για σάρωση των συνθηκών κρυστάλλωσης και η χρήση τους είναι απλή και γρήγορη. [18]

Οι αρχικές δοκιμές κρυστάλλωσης καθορίζουν ποιες συνθήκες παράγουν καλούς πρωτεϊνικούς κρυστάλλους ή τουλάχιστον κάποια αποτελέσματα που κατόπιν δύνανται να βελτιστοποιηθούν και να οδηγήσουν σε υψηλής ποιότητας κρυστάλλους. Η βελτιστοποίηση αναφέρεται στην επιλογή αυτών των συνθηκών που θα οδηγήσουν στην απόκτηση καλής ποιότητας κρυστάλλων για τη συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ. Κάποιες ευρέως

χρησιμοποιούμενες μέθοδοι βελτιστοποίησης περιλαμβάνουν τη χρήση αλγορίθμων ή τη διερεύνηση κοντά στις υπάρχουσες συνθήκες που συνοδεύεται πολλές φορές με δοκιμή προσθέτων. [6]

Μια συχνή στρατηγική για την επιτυχία της κρυστάλλωσης περιλαμβάνει την εισαγωγή μέσω σποράς, ετερογενούς πυρήνωσης σε χαμηλό υπερκορεσμό, όπου η αργή ανάπτυξη είναι η βέλτιστη για το σχηματισμό κρυστάλλων. Υπάρχουν δύο γενικές μέθοδοι σποράς, μικρο- και μακροσπορά. Στη μικροσπορά μερικά μικροσκοπικά θραύσματα κρυσταλλικής ύλης, όχι απαραίτητα από καλά διαμορφωμένο κρύσταλλο, εισάγονται στο διάλυμα κρυστάλλωσης ενώ στη μακροσπορά μεταφέρεται ένας ήδη διαμορφωμένος κρύσταλλος στο διάλυμα κρυστάλλωσης με τα ίδια αντιδραστήρια, με σκοπό να μεγαλώσει σε μέγεθος κατάλληλο για περίθλαση των ακτίνων Χ. [6]

Η πρόκληση της αρχικής σάρωσης πλήθους συνθηκών αντιμετωπίζεται σε μεγάλο βαθμό με τη χρήση αυτοματοποιημένων συστημάτων (ρομπότ) κρυστάλλωσης ικανών να εκτελούν γρήγορα μεγάλο αριθμό δοκιμών με σταγονίδια μόλις μερικών νανολίτρων. Αυτά τα ρομπότ μειώνουν την ποσότητα πρωτεΐνης που απαιτείται για τον έλεγχο της κρυστάλλωσης ενώ επιτρέπουν έναν πιο συστηματικό πειραματισμό και συλλογή δεδομένων. [18] Σε πιο ανεπτυγμένα εργαστήρια, έχουν ενσωματωθεί ολοκληρωμένες πλατφόρμες κρυστάλλωσης οι οποίες αυτοματοποιούν πλήρως κάθε βήμα, συμπεριλαμβανομένης της προετοιμασίας των διαλυμάτων και της μικροπλάκας κρυστάλλωσης, τη σφράγιση και αποθήκευση της πλάκας και τη συλλογή των αποτελεσμάτων από τις παρατηρήσεις μέσω στερεοσκοπίου. Ακόμη, με χρήση εξειδικευμένου λογισμικού μπορεί να αξιολογηθούν τα αρχικά αποτελέσματα της δοκιμής της κρυστάλλωσης και έτσι να βελτιστοποιηθεί ο σχεδιασμός των πειραμάτων. [6]

Ένα θεμελιώδες βήμα για την επιτυχία των δοκιμών κρυστάλλωσης είναι η προσεκτική ανάλυση και βαθμολόγηση των αποτελεσμάτων. Οι κρύσταλλοι πρέπει να παρατηρούνται με ένα καλό στερεοσκόπιο. Ένας γενικός κανόνας για τη συχνότητα των παρατηρήσεων είναι ότι όσο μικρότερες είναι οι σταγόνες, τόσο πιο συχνές είναι οι παρατηρήσεις. Οι κρύσταλλοι συνήθως ταξινομούνται ως «καλοί» κρύσταλλοι όταν εμφανίζουν καλά καθορισμένες, αιχμηρές «άκρες» (ακμές) και έχουν ικανοποιητικές διαστάσεις για περίθλαση. Πολλές φορές, τα αποτελέσματα ποσοτικοποιούνται με τη βοήθεια ειδικών κλιμάκων βαθμολόγησης με βάση την παρατήρηση των κρυστάλλων στο στερεοσκόπιο. Ωστόσο, η εξωτερική εμφάνιση μπορεί να είναι παραπλανητική και οι κρύσταλλοι να μην δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα κατά την περίθλαση ακτίνων Χ γιατί παρά το γεγονός ότι η μορφολογία τους είναι τέτοια που παραπέμπει σε καλοσχηματισμένους κρυστάλλους, αυτό να μην ισχύει για την εσωτερική τους διάταξη. [6]

Ωστόσο, ανεξάρτητα από το πόσο εξελιγμένο είναι το σκεπτικό και τα στατιστικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται, αυξάνεται μόνο η πιθανότητα επιτυχίας της κρυστάλλωσης, χωρίς αυτή να εγγυάται το αποτέλεσμα για οποιαδήποτε πρωτεΐνη. Στατιστικές από διάφορες δοκιμές δείχνουν ότι για μια πρωτεΐνη, η πιθανότητα απόκτησης κρυστάλλων είναι 30-40% και μόλις το 30-40% αυτών θα δώσουν καλά αποτελέσματα περίθλασης των ακτίνων Χ που επιτρέπουν τον προσδιορισμό της τριδιάστατης δομής της. Συνεπώς, η επιλογή σωστής στρατηγικής, η ετοιμότητα για εναλλακτικές προσεγγίσεις καθώς και η προσεκτική παρατήρηση και ερμηνεία των δοκιμών κρυστάλλωσης, είναι απαραίτητες για να αυξηθούν οι πιθανότητες επιτυχίας. [6]

## 2.6 Πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι

Οι κρύσταλλοι είναι περιοδικές συνδέσεις θεμελιωδών δομικών μονάδων, που μπορεί να είναι άτομα, μικρά μόρια, ολόκληρες πρωτεΐνες ή σύμπλοκα νουκλεϊκών οξέων. [6] Η θεωρητική εικόνα ενός κρυστάλλου είναι μια τέλεια συστοιχία στοιχειωδών κυψελίδων. [22] Οι πρωτεΐνες, ως δομικά στοιχεία, αποτελούνται από μακριές μακρομοριακές αλυσίδες, οι οποίες αποτελούνται από συνδυασμούς 20 διαφορετικών αμινοξέων που διπλώνονται σε ένα τριδιάστατο μόριο πρωτεΐνης με ακανόνιστο σχήμα. Επειδή τα πρωτεϊνικά μόρια έχουν ακανόνιστα σχήματα και συχνά διαθέτουν αιωρούμενα άκρα (αμινοτελικό ή καρβοξυτελικό άκρο) ή εύκαμπτους βρόχους, δεν σχηματίζουν εύκολα ένα περιοδικό πλέγμα. [6]

Για την εύρεση της δομής μιας πρωτεΐνης απαιτούνται κρύσταλλοι υψηλής ποιότητας και σχετικά μεγάλοι σε μέγεθος (από 50  $\mu\text{m}$  μέχρι 0.5 mm). [6] Ενώ οι ανόργανοι κρύσταλλοι μπορούν συχνά να αναπτυχθούν σε διαστάσεις αρκετών εκατοστών ή μεγαλύτεροι, είναι συχνά αδύνατο να αναπτυχθούν κρύσταλλοι πρωτεϊνών τόσο μεγάλου μεγέθους. Σε γενικές γραμμές, η πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία απαιτεί τουλάχιστον έναν κρύσταλλο 0.2 mm στη μικρότερη διάστασή του, αν και οι σύγχρονες μέθοδοι συλλογής δεδομένων μπορούν μερικές φορές να δώσουν αποτελέσματα και με μικρότερους κρυστάλλους, ιδιαιτέρως όταν αυτοί εκτίθενται σε ακτίνες X που παράγονται από ισχυρές πηγές. [22]

Υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ κρυστάλλων ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους και κρυστάλλων πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Οι κρύσταλλοι των μικρών μορίων εμφανίζουν σταθερές δυνάμεις πλέγματος, είναι σκληροί και ανθεκτικοί, εύκολοι στο χειρισμό, συνήθως μπορούν να εκτεθούν στον αέρα, έχουν ισχυρές οπτικές ιδιότητες και περιθλούν τις ακτίνες X έντονα. Οι μακρομοριακοί κρύσταλλοι είναι συγκριτικά συνήθως πιο μαλακοί και εύθραυστοι, υφίστανται ζημιές εάν εκτεθούν παρατεταμένα στην ακτινοβολία, είναι ευαίσθητοι στη θερμοκρασία, εμφανίζουν αδύναμες οπτικές ιδιότητες και διαθλούν ελάχιστα τις ακτίνες X. [21]

Οι ανόργανοι κρύσταλλοι αντλούν τη δομική τους ακεραιότητα από τις ηλεκτροστατικές έλξεις των πλήρως φορτισμένων ιόντων τους. Από την άλλη πλευρά, οι κρύσταλλοι πρωτεΐνης συγκρατούνται από ασθενέστερες δυνάμεις, κυρίως δεσμούς υδρογόνου μέσω των παρεμβαλλόμενων μορίων νερού. [22] Σε αναλογία με τη μοριακή μάζα, ο αριθμός των δεσμών που σχηματίζει ένα συμβατικό μόριο σε έναν κρύσταλλο υπερβαίνει κατά πολύ αυτό που παρουσιάζεται στα κρυσταλλικά μακρομόρια. Δεδομένου ότι αυτές οι επαφές παρέχουν τις αλληλεπιδράσεις του κρυσταλλικού πλέγματος που διατηρούν την ακεραιότητα του κρυστάλλου, αυτό εξηγεί σε μεγάλο βαθμό τη διαφορά στις ιδιότητες μεταξύ κρυστάλλων αλάτων ή μικρών μορίων και μακρομορίων, καθώς και γιατί είναι τόσο δύσκολο να αναπτυχθούν κρύσταλλοι πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. [21]

Οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι αποτελούνται από περίπου 50 % διαλύτη κατά μέσο όρο, αν και αυτό μπορεί να κυμαίνεται από 25 % έως 90 %, ανάλογα με το συγκεκριμένο μακρομόριο ενώ η πρωτεΐνη ή το νουκλεϊκό οξύ καταλαμβάνει τον υπόλοιπο όγκο. Αυτό συμβάλλει σημαντικά στη χαμηλή περιθλαστική ικανότητα των πρωτεϊνικών κρυστάλλων. Η έκταση του περιθλασιγράμματος από έναν κρύσταλλο σχετίζεται άμεσα με τον βαθμό της εσωτερικής του τάξης. Όσο πιο εκτεταμένο είναι το περιθλασίγραμμα ή όσο υψηλότερη είναι η ανάλυση στην οποία επεκτείνεται, τόσο πιο ομοιόμορφα είναι τα μόρια στον κρύσταλλο. Οι κρύσταλλοι πρωτεΐνης, αποτελούμενοι από εύκαμπτα μόρια συγκρατημένα



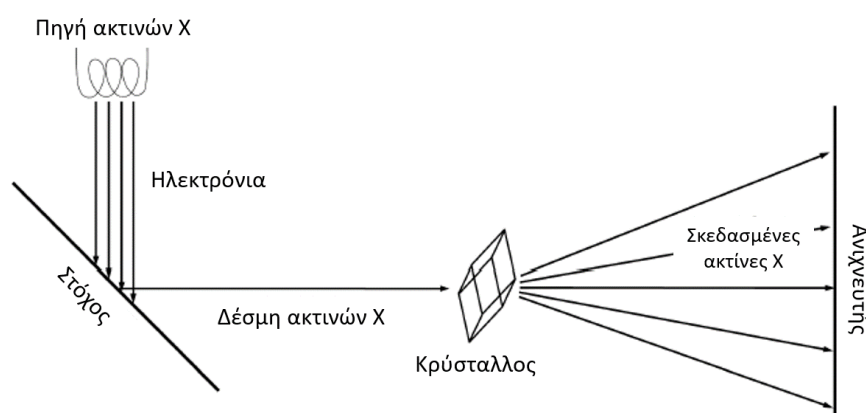
με αδύναμες δυνάμεις, συγκριτικά με αυτούς των συμβατικών μορίων, χαρακτηρίζονται από περιθλασιγράμματα περιορισμένης έκτασης. [21], [22]

Πολλές πρωτεΐνες δίνουν κρυστάλλους διαφορετικής μορφολογίας κάτω από διαφορετικές συνθήκες, ενώ μπορεί ακόμα να παρατηρηθούν και πολλαπλές μορφές κρυστάλλων μέσα σε μια σταγόνα κρυστάλλωσης. Κάθε διαφορετική μορφή κρυστάλλων δίνει και διαφορετική περίθλαση ακτίνων X. [6]

## 2.7 Περίθλαση ακτίνων X

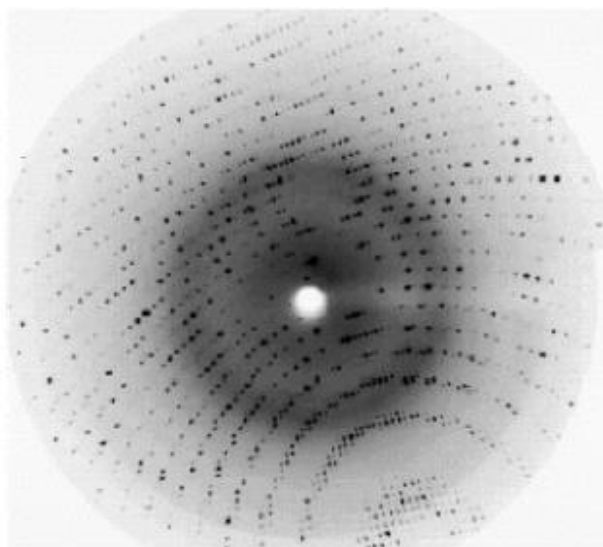
Οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι συλλέγονται προσεχτικά από το μητρικό τους υγρό και τοποθετούνται μεταξύ μιας πηγής ακτίνων X και ενός ανιχνευτή. Εξαιτίας της ευαισθησίας τους στην ακτινοβολία, η περίθλαση γίνεται συνήθως σε κρυογονικές θερμοκρασίες (100 K), όπου η ζημιά από την ακτινοβολία είναι πολύ μικρότερη και αργή. Κατά τη διάρκεια της ταχείας ψύξης σε ρεύμα αζώτου, θερμοκρασίας 100 K, ο σχηματισμός κρυσταλλικού πάγου στο μητρικό υγρό που περιβάλλει τον κρύσταλλο πρέπει να αποφεύγεται. Γι' αυτόν το λόγο, ο κρύσταλλος πριν την έκθεσή του στις ακτίνες X εμβαπτίζεται σε κατάλληλο κρυοπροστατευτικό διάλυμα. [22]

Όταν μια δέσμη μονοχρωματικών ακτίνων X κατευθύνεται σε ένα μακρομόριο, όπως η πρωτεΐνη, οι ακτίνες σκεδάζονται προς όλες τις κατευθύνσεις από τα ηλεκτρόνια κάθε ατόμου του μακρομορίου. Ο ανιχνευτής συλλέγει όλες αυτές τις σκεδαζόμενες ακτίνες. Η διάταξη αυτή απεικονίζεται στο Σχήμα 4. [21]



Σχήμα 4: Σχηματική απεικόνιση της περίθλασης ακτίνων X σε κρυστάλλους. Σε συμβατικές πηγές ακτίνων X, οι ακτίνες X παράγονται από την πρόσπτωση των ηλεκτρονίων υψηλής ταχύτητας σε μεταλλικό στόχο. Η παράλληλη δέσμη κατευθύνεται στον κρύσταλλο. Τα ηλεκτρόνια που περιβάλλουν τους πυρήνες των ατόμων του κρυστάλλου σκεδάζουν τις ακτίνες X προς διάφορες κατευθύνσεις και καθώς προσπίπτουν στην επιφάνεια ενός ανιχνευτή αφήνουν το «αποτύπωμά» τους. [21]

Ένα τυπικό μοτίβο περίθλασης που λαμβάνεται από τον ανιχνευτή φαίνεται στην Εικόνα 4. Κάθε μαύρο σημείο (ανάκλαση) αντιστοιχεί σε μία δέσμη σκεδασμένων ακτίνων X. Όσο πιο έντονη είναι η αμαύρωση, τόσο μεγαλύτερη είναι η ένταση των ακτίνων X. Οι ανακλάσεις εντοπίζονται οργανωμένες σε ένα γεωμετρικό σχήμα λόγω της περιοδικής και συμμετρικής διευθέτησης των ατόμων στον κρύσταλλο. [26] Για να καταγραφεί ολόκληρο το τριδιάστατο μοτίβο περίθλασης ακτίνων X, ο κρύσταλλος περιστρέφεται συνεχώς σε σχέση με τη δέσμη, ώστε να ληφθούν πληροφορίες για όλες τις όψεις του κρυστάλλου και να καταστεί δυνατή η ανασύσταση της θέσης των ατόμων της πρωτεΐνης. [21]



Εικόνα 4: Μοτίβο διάθλασης κρυστάλλου λυσοζύμης που αναπτύχθηκε σε 30% ((w/v)) 1-εθυλ-3-μεθυλμιδαζόλιο χλωρίου, 0,1M HEPES pH 7.0. Η διακριτική ικανότητα ήταν 1.9Å. [27]

Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από έναν ανιχνευτή μεταφέρονται σε ψηφιακή μορφή σε έναν υπολογιστή για ανάλυση. Εφόσον η περίθλαση των ακτίνων Χ στον κρύσταλλο γίνεται κυρίως από τα ηλεκτρόνια των ατόμων που τον απαρτίζουν, τότε το αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι η κατανομή των ηλεκτρονίων. Η ηλεκτρονική πυκνότητα είναι ένας τριδιάστατος χώρος, ο οποίος αναφέρεται και ως σύνθεση Fourier. Πρόκειται για ένα άθροισμα όρων, ένας για κάθε αντανάκλαση που παρατηρείται στο μοτίβο περίθλασης με απόλυτο μέγεθος τη σχετική ένταση κάθε περίθλασης. [21]

Προκειμένου να βρεθεί η σύνθεση Fourier απαιτούνται δεδομένα για τη διεύθυνση διάδοσης, το μήκος, το πλάτος και τη φάση των σκεδαζόμενων κυμάτων. Ο ανιχνευτής δίνει πληροφορίες για τη διεύθυνση διάδοσης των ακτίνων με βάση τη θέση πρόσπτωσης (θέση ανάκλασης) ενώ το πλάτος των κυμάτων υπολογίζεται από την ένταση τους με βάση το βαθμό αμαύρωσης του μοτίβου περίθλασης. Το μήκος κύματος είναι ίδιο με αυτό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ωστόσο, η μέτρηση των φάσεων των κυμάτων είναι αδύνατη λόγω της μεγάλης συχνότητας ( $\sim 10^{18}$  Hz) των ακτίνων Χ. Αυτός ο περιορισμός στην εύρεση των φάσεων αποτελεί θεμελιώδες κρυσταλλογραφικό πρόβλημα. [26]

Στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών, υπάρχουν δύο σημαντικές μέθοδοι για την λήψη των φάσεων των κυμάτων. Η πρώτη είναι η μοριακή αντικατάσταση κατά την οποία χρησιμοποιούνται αρχικές φάσεις από προηγούμενως γνωστά δομικά μοντέλα που έχουν κάποια ομοιότητα με τη δομή του υπό εξέταση μακρομορίου. Συνολικά, περίπου τα τρία τέταρτα όλων των δομών που έχουν κατατεθεί στην Protein Data Bank έχουν βρεθεί με μοριακή αντικατάσταση ενός δομικά παρόμοιου μοντέλου ως πηγή αρχικών φάσεων. Η δεύτερη μέθοδος είναι πειραματική και καλείται ισόμορφη αντικατάσταση, κατά την οποία συγκρίνονται τα μοτίβα περίθλασης μεταξύ φυσικών και τροποποιημένων με βαρέα άτομα κρυστάλλων. Σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις, οι αρχικές φάσεις που προκύπτουν βελτιώνονται περαιτέρω με διάφορες τροποποιήσεις έτσι ώστε να παρέχουν ένα βελτιωμένο χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας. [6]

Μόλις ληφθεί ο χάρτης της ηλεκτρονικής πυκνότητας, ξεκινάει η οικοδόμηση του μοντέλου της δομής της πρωτεΐνης πάνω του. Διάφορα εργαλεία προσαρμογής πυκνότητας ηλεκτρονίων και γεωμετρίας καθώς και αυτοματοποιημένα προγράμματα δημιουργίας

μοντέλων επιταχύνουν σημαντικά τη διαδικασία. Ο κρυσταλλογράφος εκμεταλλεύεται όλες τις τρέχουσες γνώσεις σχετικά με την πρωτεΐνη που διερευνάται, καθώς και τη γνώση σχετικά με τη γενική δομή των πρωτεϊνών. Το πιο σημαντικό στοιχείο αυτής της προηγούμενης γνώσης είναι η αλληλουχία αμινοξέων στην πρωτεΐνη, η οποία είναι συνήθως γνωστή πριν από την κρυσταλλογραφική δομή. [22]

Ωστόσο, το αρχικό μοντέλο συνήθως περιέχει πολλά μικρά σφάλματα, όπως λανθασμένα μήκη και γωνίες δεσμών ή κακή γεωμετρία, αλλά και σφάλματα που προκύπτουν από αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεϊνικής δομής έναντι του αρχικού μοντέλου που μπορεί να οφείλονται σε διάφορες παραμέτρους. Αυτά τα μικρά σφάλματα διορθώνονται κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης με ειδικά υπολογιστικά προγράμματα. [6] Το τελικό μοντέλο πρέπει να είναι σύμφωνο με την ηλεκτρονιακή πυκνότητα αλλά και χημικά ρεαλιστικό, δηλαδή να είναι σύμφωνο με τις αρχές της μοριακής δομής και στερεοχημείας. Με ένα τέτοιο ορθό μοντέλο το οποίο ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα, την τριδιάστατη δομή ενός μακρομορίου, ο κρυσταλλογράφος μπορεί να αρχίσει να παρατηρεί τη δομή αυτού και να εξάγει συμπεράσματα που αφορούν σχέσεις δομής-δράσης και τις πιθανές εφαρμογές του με βάση τη λειτουργία του. [22]

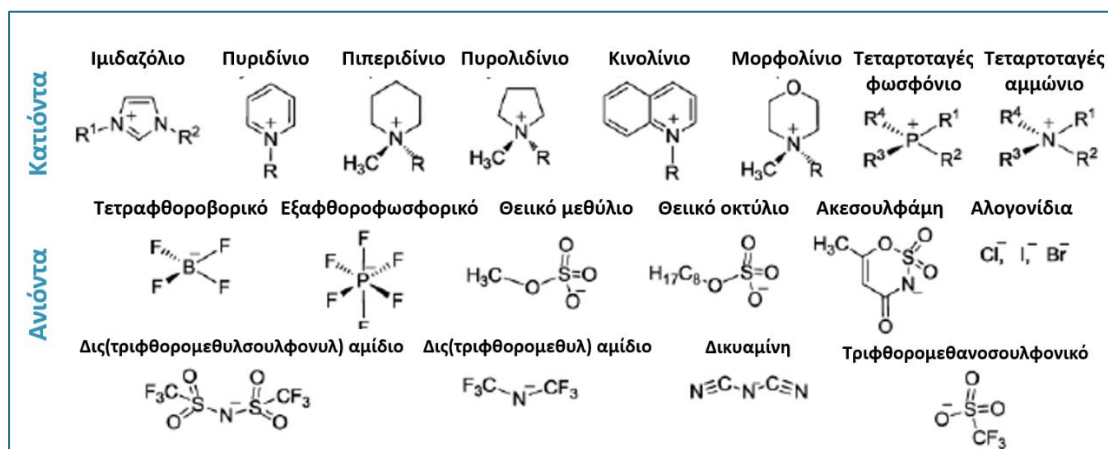
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΙΟΝΤΙΚΑ ΥΓΡΑ (ΙΥ)

### 3.1 Εισαγωγή

Τα ιοντικά υγρά (ΙΥ) συνήθως ορίζονται ως ενώσεις αποτελούμενες αποκλειστικά από ιόντα, με σημείο τήξης κάτω των 100 °C. [28] Μπορούν επίσης να οριστούν και ως καθαροί ηλεκτρολύτες καθώς οι ιδιότητές τους οφείλονται στις ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που διέπουν τη συμπεριφορά τους. Αν και αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι αρκετά ισχυρές, το μέγεθος και η φύση των κατιόντων είναι τέτοια ώστε να παραμένουν υγρά ακόμα και σε θερμοκρασία δωματίου. [29] Συχνά, ονομάζονται και ιοντικά υγρά θερμοκρασίας δωματίου, καθώς παραμένουν στην υγρή κατάσταση σε αυτή. [30]

Αποτελούνται από οργανικά κατιόντα όπως παράγωγα αμμωνίου, φωσφονίου, πυριδινίου, ιμιδαζολίου και πυρολιδινίου και οργανικά ή ανόργανα ανιόντα, όπως χλωρίου, βρωμίου κλπ. Λόγω της μεγάλης ποικιλίας ιόντων, μπορούν να συντεθούν διάφοροι τύποι ιοντικών υγρών. Υπολογίζεται ότι πάνω από ένα εκατομμύριο συνδυασμοί μεταξύ κατιόντων και ανιόντων μπορούν να σχηματίσουν ιοντικά υγρά. Μπορούν επίσης να συντεθούν ΙΥ με ειδικές ιδιότητες, ανάλογα με το σκοπό της έρευνας. [31]

Δεδομένου ότι αποτελούνται από τουλάχιστον δύο συστατικά που μπορούν να μεταβληθούν (το ανιόν και το κατιόν), οι διαλύτες αυτοί μπορούν να σχεδιαστούν λαμβάνοντας υπόψη μια συγκεκριμένη τελική χρήση ή να διαθέτουν ένα συγκεκριμένο σύνολο ιδιοτήτων. Ιδιότητες όπως το σημείο τήξης, το ιξώδες, η πυκνότητα και η υδροφοβικότητα μπορούν να μεταβληθούν με μικρές αλλαγές στη δομή των ιόντων. [32]



Σχήμα 5: Συνηθέστερα κατιόντα και ανιόντα που χρησιμοποιούνται στα ΙΥ. [31]

Το 1888 αναφέρθηκε από τον Gabriel το νιτρικό αιθανολαμμώνιο ως το πρώτο ΙΥ με σημείο τήξης 52 - 55 °C. [33] Λίγο αργότερα, το 1914, ο Paul Walden ανακάλυψε το νιτρικό αιθυλαμμώνιο ως το πρώτο ΙΥ θερμοκρασίας δωματίου με σημείο τήξης 13 - 14°C. [34] Έκτοτε, τα ΙΥ ως καινοτόμες ουσίες έχουν λάβει μεγάλη προσοχή τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Οι διαθέσιμοι τύποι ΙΥ έχουν επεκταθεί και περιλαμβάνουν πλέον νέες οικογένειες και γενιές ΙΥ με πιο συγκεκριμένες και στοχευμένες ιδιότητες. [35] Ο αριθμός των επιστημονικών δημοσιεύσεων για τα ΙΥ έχει αυξηθεί εκθετικά από λιγότερες από 300 το 1990 έως πάνω από 6500 το 2019, υπερβαίνοντας τους ετήσιους αριθμούς αύξησης άλλων δημοφιλών επιστημονικών τομέων. Αυτό αποδεικνύει ότι όλο και περισσότεροι ερευνητές ασχολούνται με τη μελέτη αυτής της διεπιστημονικής περιοχής, η οποία

περιλαμβάνει αρχές της χημείας, της επιστήμης των υλικών, της χημικής μηχανικής και της περιβαλλοντικής επιστήμης. [28]

### 3.2 Κατηγορίες ιοντικών υγρών

Καθώς η χημική τους ποικιλία έχει αυξηθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια, τα ΙΥ κατατάσσονται σε πολλές κατηγορίες, όπως πρωτικά, απρωτικά, ειδικής αποστολής, υποστηριζόμενα, βιο-ιοντικά, χειρόμορφα, πολυμερικά και ενεργειακά.



Σχήμα 6: Κυριότερες κατηγορίες ΙΥ.

#### 3.2.1 Απρωτικά και πρωτικά Ιοντικά Υγρά

Η ταξινόμηση σε απρωτικά και πρωτικά ΙΥ γίνεται με βάση την ιδιότητά τους να πρωτονιώνονται ή να αποπρωτονιώνονται σε υδατικά μέσα. [36] Τα απρωτικά είναι η πλειονότητα των ΙΥ και κυριαρχούν στη βιβλιογραφία. Περιλαμβάνουν οργανικά κατιόντα και έχουν χαμηλά σημεία τήξης λόγω της συνύπαρξης ενός μεγάλου ακανόνιστου οργανικού κατιόντος με ένα μονοατομικό ή πολυατομικό ανόργανο ανιόν. Παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι έχουν μεγάλη οικονομία απόδοσης και συντίθενται εύκολα καθώς η σύνθεσή τους δεν περιλαμβάνει το σχηματισμό παραπροϊόντων. [35] Εφαρμόζονται ως διαλύτες στην οργανική χημεία με στόχο τον πειραματικό προσδιορισμό χημικών και φυσικών ιδιοτήτων. [37] Αντίθετα, τα πρωτικά ΙΥ σχηματίζονται από την απλή μεταφορά ενός πρωτονίου από ένα Brønsted καθαρό οξύ σε μια καθαρή Brønsted βάση. Συνεπώς, τα πρωτικά ΙΥ έχουν ένα πρωτόνιο διαθέσιμο για δεσμούς υδρογόνου. [33] Μια σύγκριση των πρωτικών με τα απρωτικά ΙΥ αποκαλύπτει ότι τα πρωτικά έχουν υψηλότερη αγωγιμότητα και γι' αυτό υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την εφαρμογή τους ως ηλεκτρολύτες κυψελών καυσίμου. Ακόμη, οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις των πρωτικών ΙΥ είναι συνήθως μικρότερες από τις επιπτώσεις των απρωτικών, λόγω της απλούστερης δομής τους. [36]

#### 3.2.2 Ιοντικά Υγρά ειδικής αποστολής

Αυτά τα ΙΥ έχουν κερδίσει σημαντική προσοχή τις τελευταίες δεκαετίες λόγω των στοχευμένων ιδιοτήτων τους, οι οποίες μπορούν να τροποποιηθούν αλλάζοντας το συνδυασμό των ανιόντων και κατιόντων. [38] Πρόκειται για ενώσεις που έχουν μια

λειτουργική ομάδα ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το κατιόν ή/και ανιόν και δεν συμπεριφέρονται μόνο ως μέσο αντίδρασης αλλά έχουν και μια δεύτερη λειτουργία σαν αντιδρώντα ή/και καταλύτες. Αυτά τα ΙΥ συνήθως παράγονται ξεχωριστά για κάθε απαιτούμενη διεργασία, γεγονός το οποίο μπορεί να είναι περίπλοκο και χρονοβόρο. [39] Έχουν διερευνηθεί για τη δράση τους στην οργανική σύνθεση (εστεροποίηση, αφυδάτωση κλπ), στις καταλυτικές αντιδράσεις και σε μεθόδους διαχωρισμού. [40]

### 3.2.3 Υποστηριζόμενα Ιοντικά Υγρά

Με την ομοιοπολική ακινητοποίηση των ΙΥ σε ένα στερεό υπόστρωμα, το στρώμα του ΙΥ μπορεί να λειτουργήσει σαν ένας σταθερός καταλύτης ή διαλύτης σε χημικές αντιδράσεις. Αυτή η καινοτόμα τεχνική, περιλαμβάνει την ακινητοποίηση του ΙΥ σε μια επιφάνεια ενός πορώδους υλικού στήριξης και συνδυάζει τα πλεονεκτήματα των ΙΥ με τα στερεά υλικά στήριξης. [39] Η απαιτούμενη ποσότητα της ιοντικής φάσης μπορεί να μειωθεί σημαντικά ενώ δίνεται πλέον η δυνατότητα χρήσης συστημάτων αντιδραστών σταθερής κλίνης. Λόγω της χαμηλής πτητικότητας των ΙΥ, αυτοί οι καταλύτες είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι για αντιδράσεις αέριας φάσης. Επιπλέον, η χρήση μεμβρανών ή ζεολίθων με μεγάλους πόρους, επιτρέπει το σχεδιασμό νέων συστημάτων κατάλυσης που συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα της ομοιογενούς και ετερογενούς κατάλυσης. [41]

### 3.2.4 Βιο-ιοντικά Υγρά

Η χρήση μη τοξικών και ανανεώσιμων πρώτων υλών φυσικής προέλευσης, περιορίζει την τοξικότητα και αυξάνει την βιοαποικοδομησιμότητα των ΙΥ. [42] Τα βιο-ιοντικά υγρά (bionic liquids) προέρχονται από αμινοξέα [43] ή σάκχαρα [44] και παρουσιάζουν βελτιωμένο πράσινο χαρακτήρα σε σχέση με τα υπόλοιπα ΙΥ.

### 3.2.5 Χειρόμορφα Ιοντικά Υγρά

Τα χειρόμορφα ΙΥ (chiral ILs) διαθέτουν ένα χειρόμορφο κέντρο είτε στο κατιόν είτε στο ανιόν ή και στα δυο. [45] Εφαρμόζονται τόσο σε διεργασίες αέριας χρωματογραφίας όσο και στην κατάλυση οργανικών αντιδράσεων. [39], [46]

### 3.2.6 Πολυμερικά Ιοντικά Υγρά

Τα πολυμερικά ΙΥ είναι ειδικοί πολυ-ηλεκτρολύτες όπου τα κατιονικά ή ανιοντικά κέντρα περιλαμβάνονται στις επαναλαμβανόμενες μονάδες της αλυσίδας ενός πολυμερούς. Τα πολυμερικά ΙΥ συνδυάζουν τις μοναδικές ιδιότητες των ΙΥ όπως η ιοντική αγωγιμότητα και η θερμική και χημική σταθερότητα με εκείνες των πολυμερικών υλικών που διαθέτουν μηχανική σταθερότητα και ανθεκτικότητα. Εφαρμόζονται σε ηλεκτροχημικές συσκευές, μπαταρίες λιθίου, φωτοβολταϊκά στοιχεία, ενεργοποιητές, τρανζίστορ επίδρασης πεδίου και αισθητήρες ενώ ερευνάται η εφαρμογή τους στην αναλυτική χημεία, την επεξεργασία κυτταρίνης και την κατάλυση. [39], [47]

### 3.2.7 Ενεργειακά Ιοντικά Υγρά

Τα ενεργειακά ΙΥ (energetic ILs) παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον καθώς προσφέρουν βελτιωμένη σταθερότητα, υψηλότερες πυκνότητες, αμελητέα πίεση ατμών και επομένως τοξικότητα. Πρόκειται για ιοντικά υγρά υψηλής ενέργειας, τα οποία συνήθως αποτελούνται από μικρά οξειδωτικά ανιόντα όπως  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{N}(\text{NO}_2)_2^-$  και μεγάλα κατιόντα που περιέχουν τεταρτοταγείς ετεροκυκλικές ενώσεις αζώτου με μεγάλες και ασύμμετρες πλευρικές αλυσίδες. [48] Η ανάπτυξη τους οφείλεται στην ανάγκη για σχεδιασμό βιώσιμων και ισχυρών εναλλακτικών καυσίμων πυραύλων. [49]

### 3.3 Πρωτικά Ιοντικά Υγρά

Τα πρωτικά ιοντικά υγρά (ΠΙΥ) είναι μια μεγάλη κατηγορία των ΙΥ, η οποία έχει τραβήξει το ενδιαφέρον των επιστημόνων τα τελευταία χρόνια. Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 3.2.1, τα ΠΙΥ σχηματίζονται με απευθείας μεταφορά πρωτονίου από ένα Brønsted οξύ σε μια Brønsted βάση. [33] Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κατιόντων και των ανιόντων στα ΠΙΥ οφείλονται σε ένα συνδυασμό δεσμών υδρογόνου, Coulomb και δυνάμεων διασποράς. [50] Το μέγεθος των ιόντων των ΠΙΥ είναι μικρό ενώ τείνουν να τήκονται σε θερμοκρασίες μικρότερες από τα ανάλογα απρωτικά. Η προφανής διαφορά των πρωτικών σε σύγκριση με τα απρωτικά είναι η αναστρέψιμη μεταφορά υδρογόνου μεταξύ του οξέος και της βάσης. [36]

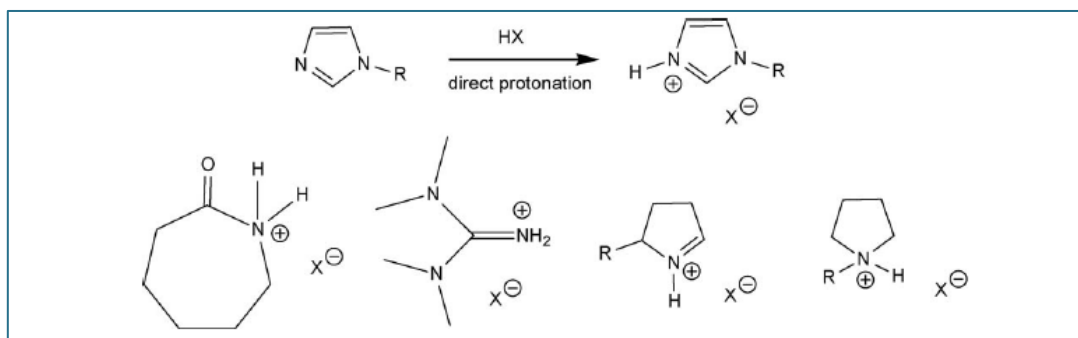
#### 3.3.1 Σύνθεση Πρωτικών Ιοντικών Υγρών

Σε γενικές γραμμές, η σύνθεση των ΠΙΥ είναι μια απλή αντίδραση εξουδετέρωσης με προσθήκη ενός οξέος κατά Brønsted σε μια βάση κατά Brønsted. Το διάλυμα που προκύπτει στη συνέχεια ξηραίνεται για να απομακρυνθούν τυχόν διαλύτες, όπως το νερό. Υπάρχει η πιθανότητα η μεταφορά πρωτονίου να είναι ατελής, με αποτέλεσμα να παραμείνουν κάποια μοριακά είδη. Επιπλέον, οι διαδικασίες ξήρανσης είναι πιθανό να αφαιρέσουν ένα ιόν περισσότερο από το άλλο, οδηγώντας σε μη στοιχειομετρικό μείγμα, εμπλουτισμένο με το λιγότερο πτητικό είδος. [50]



Σχήμα 7: Σύνθεση πρωτικών ιοντικών υγρών μέσω μεταφοράς πρωτονίου μεταξύ της Brønsted οξέος (HA) και μιας Brønsted βάσης (B).

Η διαδικασία μεταφοράς πρωτονίων μπορεί να βελτιωθεί μέσω της χρήσης ισχυρότερων οξέων ή/και βάσεων που έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μεγαλύτερης δύναμης για τη μεταφορά του πρωτονίου. Τα κατιόντα που χρησιμοποιούνται πιο συχνά στα ΠΙΥ περιλαμβάνουν πρωτοταγή, δευτεροταγή και τριτοταγή ιόντα αμμωνίου, ιόντα μονο- ή δι-ιμιδαζολίου, καπρολακτάμη και ιόντα γουανιδίνης. Τα ανιόντα περιλαμβάνουν οργανικά, όπως καρβοξυλικά, ανόργανα, όπως νιτρικό ή όξινο θειικό άλας και φθοριωμένα ιόντα. [33]



Σχήμα 8: Ορισμένα ΠΙΥ που συντέθηκαν με απευθείας πρωτονίωση ( $X^- = [NTf_2]^-$ ,  $[CF_3SO_3]^-$ ,  $[CH_3SO_3]^-$ ,  $[HCOO]^-$ ,  $[HSO_4]^-$ ,  $[H_2PO_3]^-$ ). [35]



### 3.4 Ιδιότητες Ιοντικών Υγρών

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των ΙΥ εξαρτώνται από τις διαμοριακές και ενδομοριακές δυνάμεις και, ως εκ τούτου, από τη δομή του κατιόντος και του ανιόντος. Η παρουσία μικρών κλασμάτων νερού ή οποιουδήποτε οργανικού διαλύτη ως πρόσμειξη επηρεάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ΙΥ. Τα ίχνη νερού στα ΙΥ έχουν εκπληκτική επίδραση στη βιοκαταλυτική δράση, την οξύτητα, την πυκνότητα, το ιξώδες, την ηλεκτρική αγωγιμότητα, την ενθαλπία και την επιφανειακή τάση. [38]

Οι εφαρμογές των ΙΥ εξαρτώνται άμεσα από τις ιδιότητές τους και η κατανόηση τους είναι απαραίτητη προκειμένου να σχεδιαστούν ανιόντα και κατιόντα που βελτιώνουν περαιτέρω τις ιδιότητες και την απόδοση των ΙΥ. Σε αυτήν την ενότητα παρουσιάζονται οι βασικές ιδιότητες των ΙΥ. [34]

#### 3.4.1 Θερμικές ιδιότητες

Το βασικό κριτήριο για την αξιολόγηση των ΙΥ είναι το σημείο τήξης τους. Τα ΙΥ έχουν οριστεί ότι έχουν σημεία τήξης κάτω των 100 °C και τα περισσότερα από αυτά είναι υγρά σε θερμοκρασία δωματίου. Υπάρχει μια σημαντική σχέση μεταξύ της δομής και της χημικής σύνθεσης των ΙΥ με το σημείο τήξης τους. Αλλαγές στο κατιόν και/ή στο ανιόν συμβάλλουν στη διαμόρφωση του σημείου τήξης των ΙΥ. Έχει παρατηρηθεί ότι αύξηση του μεγέθους των ανιόντων οδηγεί σε μείωση του σημείου τήξεως. [51]

Η πιο κοινή τεχνική μέτρησης του σημείου τήξης είναι η θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (DSC). Ωστόσο, για πολλά ΙΥ είναι δύσκολο να προσδιοριστεί το σημείο τήξης καθώς η μέτρηση του περιπλέκεται από την τάση πολλών ΙΥ να σχηματίζουν γυαλιά. [34] Γι' αυτό το λόγο τα ΙΥ συνήθως χαρακτηρίζονται με βάση τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης. Οι θερμοκρασίες αυτές τείνουν να είναι πολύ χαμηλές, μικρότερες από -50 °C. Για τυπικά ΙΥ, η θερμοκρασία βρασμού ( $T_b$ ) δεν μπορεί να προσδιοριστεί πειραματικά γιατί τα ΙΥ αποσυντίθενται σε χαμηλότερη θερμοκρασία. [34], [51], [52]

Η θερμική σταθερότητα των ΙΥ είναι ιδιαίτερα σημαντική για τις εφαρμογές τους και υπολογίζεται μέσω της θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA), όπου το ΙΥ θερμαίνεται με ελεγχόμενο ρυθμό και αναλύεται η μείωση της μάζας του δείγματος. [34] Γενικά, τα ΙΥ χαρακτηρίζονται από υψηλή θερμική σταθερότητα πάνω από 350 °C. [35] Η θερμοχωρητικότητα των ΙΥ (η ποσότητα θερμότητας που απαιτείται για την αύξηση της θερμοκρασίας κατά 1 °C) είναι ζωτικής σημασίας για την εφαρμογή τους ως ρευστά μεταφοράς θερμότητας. Η θερμοχωρητικότητα γενικά αυξάνεται γραμμικά με τη μοριακή μάζα των ΙΥ, ωστόσο αυτή η ιδιότητα δεν έχει μελετηθεί σε βάθος. [34]

#### 3.4.2 Τάση ατμών

Μια σημαντική ιδιότητα των ΙΥ που διεγείρει το ενδιαφέρον για τη χρήση τους στην πράσινη χημεία είναι ουσιαστικά η αμελητέα τάση ατμών τους ακόμη και σε υψηλές θερμοκρασίες. Τα ΙΥ είναι πράγματι μη πτητικά υπό την έννοια ότι σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος η τάση ατμών τους είναι αμελητέα. Επειδή η πτητικότητα είναι χαμηλή ή μηδενική, η τάση ατμών, το σημείο βρασμού, η κρίσιμη πίεση, η θερμότητα εξάτμισης και το σημείο ανάφλεξης δεν έχουν νόημα στα περισσότερα ιοντικά υγρά. Ωστόσο, ορισμένα απρωτικά ΙΥ μπορούν να αποσταχθούν στους 200-300 °C, αλλά υπό χαμηλή πίεση και σε πολύ χαμηλό ρυθμό απόσταξης (<0.01 g/h). [52]

Η αμελητέα πτητικότητα των ΙΥ σημαίνει πως δεν υπάρχει ανησυχία για την ατμοσφαιρική ρύπανση λόγω απελευθέρωσης αερίων. Συνεπώς, τα ΙΥ θεωρούνται μη εύφλεκτα σε

θερμοκρασίες περιβάλλοντος ή και υψηλότερες. Ωστόσο, η πιθανή απελευθέρωση ατμών ή προϊόντων αποσύνθεσης πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν χρησιμοποιούνται ΙΥ σε υψηλές θερμοκρασίες. [34], [51]

### 3.4.3 Πυκνότητα

Η πυκνότητα είναι μια από τις πιο σημαντικές ιδιότητες για οποιοδήποτε υγρό καθώς η γνώση της απαιτείται για το σχεδιασμό διαφορετικών τύπων εξοπλισμού στη βιομηχανία, όπως συμπυκνωτές, λέβητες ή ακόμη και δοχεία αποθήκευσης. [53] Η πυκνότητα εξαρτάται από το μέγεθος και το σχήμα των ιόντων καθώς και από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. [33] Η πυκνότητα είναι ίσως η πιο απλή φυσική ιδιότητα ΙΥ που μπορεί να προσδιοριστεί εύκολα, μέσω σταθμικής μέτρησης με κατάλληλο εξοπλισμό ακριβείας (δηλαδή, το δείγμα μπορεί να ζυγιστεί). [54] Τα ΙΥ είναι γενικά πυκνότερα από τους οργανικούς διαλύτες και το νερό, με τυπικές τιμές πυκνότητες από 1 έως 1.6 g/cm<sup>3</sup>. [35] Η πυκνότητά τους έχει βρεθεί ότι μειώνεται με αύξηση του μήκος της αλκυλικής αλυσίδας στο κατιόν. [51]

### 3.4.4 Ιξώδες

Το ιξώδες των ΙΥ επηρεάζει τις ιδιότητες μεταφοράς τους και μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα σε καταλυτικές εφαρμογές, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάδευση και σε εργασίες ανάμιξης και άντλησης. Ο πειραματικός προσδιορισμός του ιξώδους απαιτεί καθαρό ΙΥ και μέτρηση υπό αδρανείς συνθήκες. Έχει βρεθεί ότι για ένα μεγάλο εύρος ΙΥ, το ιξώδες κυμαίνεται από 66 έως 1110 cP στους 20 – 25 °C. Το ιξώδες πολλών ΙΥ είναι σχετικά υψηλό σε σύγκριση με τους συμβατικούς διαλύτες, μια έως τρεις τάξεις μεγέθους υψηλότερο. [35] Αυτό είναι αποτέλεσμα των ισχυρών διαμοριακών αλληλεπιδράσεων: δυνάμεις Van der Waals, δεσμοί υδρογόνου και δυνάμεις Coulomb. Ανάμιξη ΙΥ με μοριακούς διαλύτες είναι ένας πολύ αποτελεσματικός τρόπος μείωσης του ιξώδους, αλλά αυτό γενικά συνοδεύεται με αύξηση της τάσης ατμών, της ευφλεκτότητας και χαμηλότερη ηλεκτροχημική σταθερότητα. Το ιξώδες των ιοντικών υγρών μειώνεται αρκετά με αύξηση της θερμοκρασίας και αυτό μπορεί να αξιοποιηθεί για ευκολία διαχείρισης στο εργαστήριο ή στο σχεδιασμό εμπορικών αντιδραστήρων μεγάλης κλίμακας. Ωστόσο, ο σχεδιασμός ΙΥ με χαμηλό ιξώδες εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση. [34], [35]

## 3.5 Εφαρμογές Ιοντικών Υγρών

Τα ΙΥ είναι μια από τις πιο ελπιδοφόρες κατηγορίες νέων ενώσεων που ερευνήθηκαν τις τελευταίες δεκαετίες. Οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες καθιστούν τα ΙΥ πιο ελκυστικούς διαλύτες σε σχέση με τους κοινούς οργανικούς. Συγκεκριμένα παραμένουν υγρά σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, είναι εξαιρετικοί διαλύτες για ένα μεγάλο εύρος ανόργανων, οργανικών και πολυμερών υλικών, είναι μη πτητικά, παρουσιάζουν υψηλή θερμική σταθερότητα, είναι σχετικά φθηνά και εύκολα στη σύνθεση από αντιδραστήρια που είναι ευρέως εμπορικά διαθέσιμα ενώ υπάρχει ευελιξία κατά τη σύνθεσή τους καθώς αποτελούνται από δύο μέρη (ανιόν και κατιόν). [30], [55]

Χάρη σε αυτές τις ιδιότητες, τα ΙΥ απευθύνονται σε πληθώρα τεχνολογικών εφαρμογών, όπως η χημική βιομηχανία, η ηλεκτροχημεία, η αναλυτική χημεία, η περιβαλλοντική χημεία, η βιοτεχνολογία και η νανοτεχνολογία. [29] Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένες εφαρμογές των ΙΥ, με έμφαση στη βιοτεχνολογία, που αποτελεί και μέρος της μελέτης της παρούσας εργασίας.

### 3.5.1 Χημική Βιομηχανία

Υπάρχει ανάγκη για μεγάλες ποσότητες διαλυτών για τις χημικές αντιδράσεις. Οι δημοφιλείς διαλύτες περιλαμβάνουν πετρελαιοειδή, αλκοόλες, κετόνες, εστέρες, αλκυλαλογονίδια και αλκυλιωμένες αρωματικές ενώσεις, οι οποίες καλύπτουν τις ανάγκες διαφόρων ειδών χημικών διεργασιών βιομηχανικής παραγωγής. Η υπερβολική χρήση πτητικών οργανικών διαλυτών έχει ήδη προκαλέσει μεγάλη ζημιά στο περιβάλλον και τον άνθρωπο. Έτσι, η έρευνα για νέους καθαρούς διαλύτες ως εναλλακτική λύση στους παραδοσιακούς οργανικούς διαλύτες έχει μεγάλη σημασία. Πολλοί καθαροί διαλύτες όπως το νερό, τα ιοντικά υγρά, τα υπερκρίσιμα υγρά και η πολυγλυκόλη χρησιμοποιούνται για την αντικατάσταση των συμβατικών οργανικών διαλυτών. Μεταξύ αυτών, τα ΙΥ έχουν προσελκύσει σημαντική προσοχή ως καθαροί διαλύτες τόσο σε ακαδημαϊκές έρευνες όσο και στη βιομηχανία. Μέχρι στιγμής, τα ΙΥ ως καθαροί διαλύτες και καταλύτες εφαρμόζονται εκτενώς σε οργανικές αντιδράσεις, όπως η αλκυλίωση, η εστεροποίηση, αντιδράσεις σύζευξης και αναδιάταξης. [33], [56], [57]

Τα ΙΥ έχουν σημαντική επίδραση στη δραστικότητα και την εκλεκτικότητα των αντιδράσεων στις οποίες υποκαθιστούν τους μοριακούς διαλύτες και για το μεγαλύτερο μέρος των αντιδράσεων, μπορούν να απλοποιήσουν την απομόνωση του προϊόντος και να βοηθήσουν το σύστημα καταλύτη-διαλύτη να ανακυκλώνεται και να επαναχρησιμοποιείται για αρκετές φορές χωρίς να μειώνεται σημαντικά η δραστικότητα των καταλυτών. [33], [56] Από την άλλη, τα ΙΥ εφαρμόζονται ως καταλύτες μέσω των υποστηριζόμενων ΙΥ, όπου η καταλυτική αντίδραση πραγματοποιείται στη διεπιφάνεια μεταξύ του ιοντικού υγρού (αντί του στερεού) και τα αντιδραστήρια. [58]

### 3.5.2 Αναλυτική Χημεία

Τα ΙΥ εφαρμόζονται σε διεργασίες διαχωρισμού, εκχύλισης, στην ηλεκτροανάλυση και στη φασματοσκοπία. Για παράδειγμα, ορισμένα πρωτικά ΙΥ εφαρμόζονται σε χρωματογραφικές αναλύσεις, καθώς είναι πολικά, φθηνά, εύκολο να συντεθούν, αναμίξιμα με το νερό, σταθερά στον αέρα και στην υγρασία και έχουν υψηλή εκλεκτικότητα. Εμφανίζονται είτε ως στάσιμες φάσεις στην αέρια-υγρή χρωματογραφία είτε ως κινητές φάσεις στην υγρή χρωματογραφία. Στις εκχυλίσεις, τα ΙΥ εφαρμόζονται κυρίως για το διαχωρισμό μεταλλικών ιόντων. Ακόμη, τα ΙΥ χρησιμοποιούνται ως ηλεκτρολύτες, σε φωτοηλεκτροχημικά κελιά, σε πυκνωτές και ως διαλύτες για την ηλεκτροαπόθεση μετάλλων. Όσο οι φυσικοχημικές ιδιότητες αυτών των νέων ενώσεων ανακαλύπτονται και προσδιορίζονται σε βάθος, ο αριθμός των αναλυτικών εφαρμογών τους θα αυξάνεται ραγδαία. [33], [59]

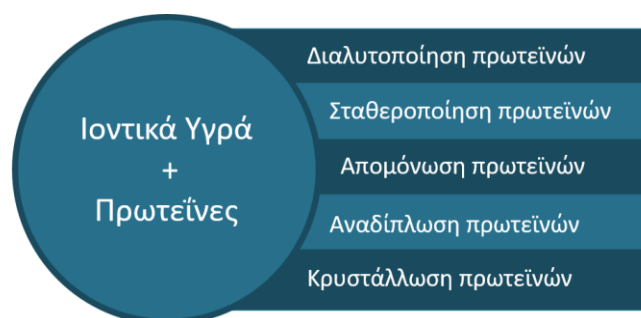
### 3.5.3 Βιοτεχνολογία

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες έχει γίνει μεγάλη έρευνα στον τομέα της βιοκατάλυσης στα ΙΥ. Ο λόγος για την ταχεία αύξηση των μελετών είναι ότι παρουσιάζεται εξαιρετική ενζυμική δραστηριότητα, σταθερότητα και εκλεκτικότητα κατά τη χρήση ΙΥ στη βιοκατάλυση. Επιπλέον, τα ΙΥ μπορούν να συντεθούν στοχευμένα (ειδικής αποστολής ΙΥ) για μια συγκεκριμένη αντίδραση, επιλέγοντας κατάλληλους συνδυασμούς κατιόντων και ανιόντων. Ωστόσο, το εύρος των ΙΥ κατάλληλα για βιοκαταλυτικές εφαρμογές είναι ακόμη περιορισμένο. [60]

Τα ΙΥ ενεργούν ως διαλύτες, παρέχοντας επαρκές περιβάλλον για την καταλυτική δράση του ενζύμου (φαινόμενα μεταφοράς μάζας) ενώ μπορούν να ακινητοποιήσουν την υγρή φάση, λόγω αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ενζύμου και του ΙΥ (δεσμοί υδρογόνου, Van der Waals, ιοντικοί δεσμοί κ.λπ.). Για καταλυτικές αντιδράσεις με ένζυμα, τα ΙΥ μπορούν να

χρησιμοποιηθούν ως συνδιαλύτες στην υδατική φάση ή ως καθαροί διαλύτες. Μερικά ένζυμα παραμένουν σταθερά και ενεργά στα ΙΥ, παρόλο που δεν είναι σταθερά και ενεργά σε πολικούς οργανικούς διαλύτες, ενώ άλλα απενεργοποιούνται πολύ γρήγορα παρουσία ΙΥ. [60] Η φύση των δεσμών υδρογόνου των συστατικών ιόντων του ΙΥ μπορεί να είναι σημαντική για τη διατήρηση της ακεραιότητας της φυσικής διαμόρφωσης του ενζύμου. Ωστόσο, πολύ ισχυροί δεσμοί υδρογόνου μπορεί να είναι επιζήμιοι, οδηγώντας στην κατάρρευση της δομής της πρωτεΐνης και στη μετουσίωσή της. [56]

Τα τελευταία χρόνια, τα ΙΥ εφαρμόζονται επιτυχώς για πρωτεϊνικές αναλύσεις, όπως φαίνεται στο Σχήμα 9. Ωστόσο, μέχρι στιγμής δεν έχει δοθεί έμφαση στον μηχανισμό αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών και ΙΥ, ο οποίος παραμένει σχετικά άγνωστος. Στη συνέχεια παρουσιάζονται περιληπτικά ορισμένοι πρωτεϊνικοί τομείς στους οποίους εφαρμόζονται τα ΙΥ.



Σχήμα 9: Εφαρμογές των ΙΥ στις πρωτεΐνες.

#### ➤ Διαλυτοποίηση πρωτεϊνών:

Το νερό θεωρείται εδώ και χρόνια ως ο μοναδικός διαλύτης για τις πρωτεΐνες, καθώς οι πρωτεΐνες είναι ελάχιστα διαλυτές στα κοινά οργανικά μέσα. Ωστόσο, τα υδατικά μέσα έχουν κάποιες αδυναμίες, όπως, περιορισμένο εύρος θερμοκρασιών, πτητικότητα και μικρό εύρος pH για τη σταθερότητα των πρωτεϊνών. Αντιθέτως, τα ΙΥ θεωρούνται ως νέοι βιοσυμβατοί διαλύτες πρωτεϊνών. Πολλές αναφορές μάλιστα έχουν δείξει ότι τα ΙΥ λειτουργούν καλύτερα ως συνδιαλύτες σε μείγματα νερού/ΙΥ. Παρά την πληθώρα μελετών σχετικά με τη συμπεριφορά διαλυτοποίησης των πρωτεϊνών σε ΙΥ, δεν υπάρχει ακόμα κάποια συστηματική θεωρία που θα μπορούσε να καθοδηγήσει την επιλογή κατάλληλων ΙΥ για πρωτεΐνες-στόχους, καθώς και να προβλέψει τη συμπεριφορά διαλυτοποίησης των ΙΥ. Συνεπώς, απαιτούνται περισσότερες ολοκληρωμένες μελέτες για την κατανόηση του μοριακού μηχανισμού της διαλυτοποίησης πρωτεϊνών σε ΙΥ. [31], [61], [62]

#### ➤ Σταθεροποίηση πρωτεϊνών:

Μικρές αλλαγές στο περιβάλλον της πρωτεΐνης μπορούν να αλλάξουν τη δομή της και να επηρεάσουν τη δραστηριότητά της. Η σταθερότητα και δραστηριότητα των πρωτεϊνών επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες των ΙΥ, όπως η πολικότητα, η υδροφοβικότητα και η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Πολλές μελέτες έδειξαν ότι η σειρά Hofmeister είναι ικανή να εξηγήσει την σταθερότητα των πρωτεϊνών στα ΙΥ, ενώ άλλες απέδωσαν το φαινόμενο στο υψηλό ιξώδες των ΙΥ, το οποίο επιβραδύνει τη μεταφορά της πρωτεΐνης από την ενεργή στην ανενεργή διαμόρφωση. Επιπλέον, ορισμένες έρευνες έχουν δείξει ότι όσο μεγαλύτερη είναι η κατιοντική αλκυλική αλυσίδα, τόσο ισχυρότερο είναι το αντίστοιχο επιφανειοδραστικό αποτέλεσμα, το οποίο επηρεάζει τη σταθερότητα και τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης. Συνεπώς, η συμπεριφορά των ΙΥ είναι διαφορετική για κάθε

περίπτωση και απαιτείται περαιτέρω προσπάθεια για να αποκαλυφθεί μια μεθοδολογία επιλογής ΙΥ που βελτιώνει τη διαλυτότητα και τη σταθερότητα των πρωτεϊνών. [31], [63]–[65]

➤ Απομόνωση πρωτεϊνών:

Η κύρια προϋπόθεση για την ανάπτυξη ερευνών σε πρωτεΐνες είναι η απομόνωση και ο καθαρισμός τους από ένα σύνθετο μείγμα μακρομορίων. Τα ΙΥ χρησιμοποιούνται ευρέως στην εκχύλιση και απομόνωση πρωτεϊνών. Η τρέχουσα διαδικασία εκχύλισης και απομόνωσης πρωτεϊνών έχει κάποια μειονεκτήματα καθώς περιλαμβάνει σκληρές συνθήκες, υψηλή ενεργειακή κατανάλωση και παρουσία τοξικών πτητικών οργανικών διαλυτών, οδηγώντας σε απώλεια της πρωτεϊνικής δράσης. Οι υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις προτείνονται ως κινητήριες δυνάμεις στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε ένα υδατικό σύστημα δύο φάσεων με ΙΥ, το οποίο εξαρτάται από τον τύπο της πρωτεΐνης καθώς και από τα συστατικά που σχηματίζουν τις φάσεις. Ιοντικά υγρά με ειδικές λειτουργίες μπορεί να σχεδιαστούν για να βελτιώσουν την απόδοσή τους και για να ανταποκριθούν στις απαιτήσεις του διαχωρισμού. [31], [66]–[68]

➤ Αναδίπλωση πρωτεϊνών:

Τα ΙΥ έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης για την αναστολή της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών ή την επαναφορά της δραστηρότητάς τους μετά από μετουσίωση. Η ανάπτυξη πρωτεϊνικών φαρμάκων απαιτεί τη σωστή διαμόρφωση της πρωτεΐνης για να διατηρηθεί η δραστηρότητά της. Η αναδίπλωση πρωτεϊνών θεωρείται συχνά ως εμπόδιο στο βιομηχανικό καθαρισμό των πρωτεϊνών. Η χρήση ΙΥ ως αναστολείς της αναδίπλωσης πρωτεϊνών έχει λάβει προσοχή τα τελευταία χρόνια. Δεδομένου ότι τα ΙΥ μπορούν να σχεδιαστούν από εκατομμύρια συνδυασμούς κατιόντων και ανιόντων, αποτελούν μια χρήσιμη επιλογή για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνικών φαρμάκων στο μέλλον. [31], [69], [70]

➤ Κρυστάλλωση πρωτεϊνών:

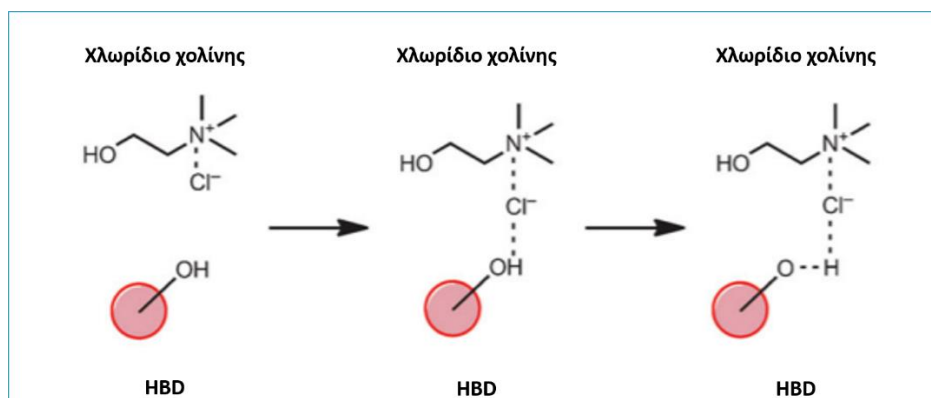
Τα τελευταία χρόνια, εφαρμογές ΙΥ ως παράγοντες καταβύθισης ή πρόσθετα (όπως περιεγράφηκε στην παράγραφο 2.4.4 Πρόσθετα (Additives)) στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών με υψηλές αποδόσεις και καλή επαναληψιμότητα προσελκύουν σταδιακά την προσοχή των ερευνητών. Η εφαρμογή των ΙΥ βελτιώνει τις συνθήκες κρυστάλλωσης για την απόκτηση υψηλής ποιότητας κρυστάλλων, αλλά και βοηθάει στην επιλεκτική κρυστάλλωση πρωτεϊνικών στόχων παρουσία διάφορων άλλων πρωτεϊνών. Τα ιόντα μπορούν να προσδεθούν στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, να εξουδετερώσουν τα επιφανειακά φορτία της ώστε να μειωθούν οι απωθήσεις και ως εκ τούτου να προάγουν την κρυστάλλωση. Διαφορετικός συνδυασμός ανιόντων και κατιόντων προσφέρει μια εξαιρετική επιλογή για τον έλεγχο συνθηκών κρυστάλλωσης πρωτεΐνης. Σύμφωνα με τον τύπο και τα χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης, ένα ΙΥ που είναι ευεργετικό για την κρυστάλλωση μπορεί να σχεδιαστεί έτσι ώστε η διαδικασία κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης να ελεγχθεί με βάση τις απαιτήσεις της εφαρμογής. Η εφαρμογή ΙΥ στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών έχει ήδη λάβει καλά πειραματικά αποτελέσματα και αναμένεται να ξεπεράσει πολλά προβλήματα στην κρυσταλλογραφία. [27], [31], [71], [72]

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΟΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ (Deep Eutectic Solvents, DES)

### 4.1 Εισαγωγή

Την τελευταία εικοσαετία έχει αναπτυχθεί μια νέα κατηγορία διαλυτών, οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Deep Eutectic Solvents, DES). Τα DES αποτελούνται συνήθως από δύο ή περισσότερα φθηνά και ασφαλή συστατικά που αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους μέσω δεσμών υδρογόνου, για το σχηματισμό ενός ευτηκτικού μίγματος. Όταν οι ενώσεις που αποτελούν το DES είναι πρωτογενείς μεταβολίτες, δηλαδή αμινοξέα, οργανικά οξέα, σάκχαρα ή παράγωγα χολίνης, τότε το DES ονομάζεται φυσικός βαθέως ευτηκτικός διαλύτης (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDES). [73] Γενικά, τα DES είναι υγρά σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 150 °C, με τα περισσότερα από αυτά να παραμένουν υγρά ακόμη και μεταξύ θερμοκρασίας δωματίου και 70 °C. Πολλές φορές στη βιβλιογραφία, τα DES συγχέονται με τα Ιοντικά Υγρά. Όμως, τα DES δεν μπορούν να θεωρηθούν ΙΥ επειδή δεν αποτελούνται εξ ολοκλήρου από ιοντικά είδη και μπορούν επίσης να ληφθούν από μη ιοντικά είδη. [74], [75]

Ένα από τα πιο διαδεδομένα συστατικά που χρησιμοποιούνται για τον σχηματισμό αυτών των DES είναι το χλωρίδιο χολίνης (ChCl). Πρόκειται για ένα πολύ φθηνό, βιοαποικοδομήσιμο και μη τοξικό άλας τεταρτοταγούς αμμωνίου που είτε εξάγεται από βιομάζα είτε συντίθεται εύκολα από ορυκτά αποθέματα μέσω μιας διαδικασίας υψηλής οικονομίας ατόμου. Μάλιστα, το πρώτο DES που αναφέρεται στη βιβλιογραφία αποτελείται από χλωρίδιο της χολίνης και ουρία σε μοριακή αναλογία 1:2. Έπειτα, το χλωρίδιο χολίνης χρησιμοποιήθηκε ως άλας για την παραγωγή ευτηκτικών μιγμάτων με φθηνές και ασφαλείς ενώσεις δότες δεσμού υδρογόνου (Hydrogen Bond Donors, HBD) όπως η ουρία, η γλυκερόλη, οι πολυόλες που προέρχονται από υδατάνθρακες ή ανανεώσιμες πηγές και καρβοξυλικά οξέα. [74]–[76]



Σχήμα 10: Παρασκευή DES από ChCl και αλκοόλες (HBD). [77]

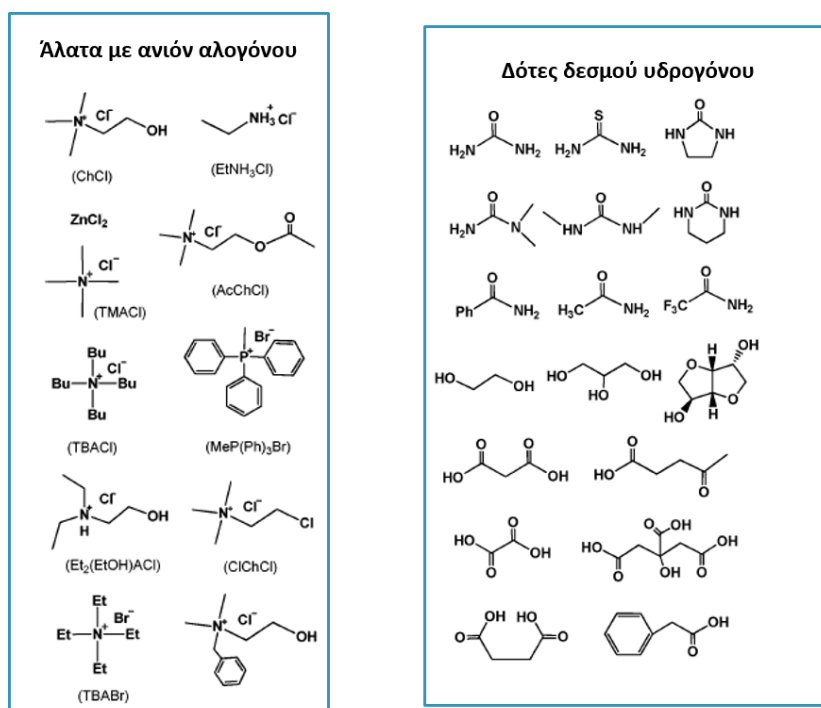
Σε σύγκριση με τους παραδοσιακούς οργανικούς διαλύτες, τα DES δεν θεωρούνται πτητικά και εύφλεκτα. Επιπλέον, η σύνθεση των DES είναι 100% οικονομική, εύκολη στο χειρισμό, δεν απαιτεί περαιτέρω καθαρισμό, διευκολύνοντας έτσι την εφαρμογή τους σε βιομηχανική κλίμακα. Σε σύγκριση με τα παραδοσιακά ΙΥ, τα DES προσφέρουν περισσότερα πλεονεκτήματα όπως η χαμηλή τιμή, η χημική αδράνεια με το νερό που διευκολύνει την αποθήκευσή τους, η εύκολη προετοιμασία τους ενώ τα περισσότερα από αυτά είναι βιοαποικοδομήσιμα, βιοσυμβατά και μη τοξικά. Εφόσον διαθέτουν παρόμοιες



φυσικοχημικές ιδιότητες με τα ΙΥ, μπορούν να τα αντικαταστήσουν σε πολλές εφαρμογές, ενισχύοντας τον πράσινο χαρακτήρα τους. [74], [75]

## 4.2 Μέθοδοι παρασκευής DES

Στις περισσότερες περιπτώσεις, ένα DES λαμβάνεται με απλή ανάμιξη ενός τεταρτοταγούς άλατος αμμωνίου με μεταλλικά άλατα ή με ένα δότη δεσμού υδρογόνου (HBD) που έχει τη δυνατότητα να σχηματίσει ένα σύμπλοκο με το ανιόν αλογόνου του τεταρτοταγούς άλατος αμμωνίου. Στο Σχήμα 11 συνοψίζονται τα διαφορετικά άλατα τεταρτοταγούς αμμωνίου που χρησιμοποιούνται ευρέως σε συνδυασμό με διάφορα HBD προς σχηματισμό DES. [74], [76]



Σχήμα 11: Τυπικά άλατα με ανιόν αλογόνου και δότες δεσμών υδρογόνου που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση DES.[74]

Στη βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί δύο μέθοδοι για την προετοιμασία DES: η μέθοδος λυοφιλοποίησης (freeze drying) και η μέθοδος θέρμανσης. Κατά τη μέθοδο της λυοφιλοποίησης, τα υδατικά διαλύματα των δύο συστατικών αναμιγνύονται στην επιθυμητή μοριακή αναλογία και στη συνέχεια ξηραίνονται με κατάψυξη για την επίτευξη διαυγών, ιξωδών υγρών. [78], [79] Κατά τη μέθοδο της θέρμανσης, τα συστατικά αναμιγνύονται και θερμαίνονται στους 80°C υπό συνεχή ανάδευση. [78]

## 4.3 Ιδιότητες των DES

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των DES, όπως η πυκνότητα, το ιξώδες, η αγωγιμότητα, το σημείο τήξεως και η επιφανειακή τάση, είναι παρόμοιες με εκείνες των κοινών ΙΥ. Παρακάτω περιγράφονται περιληπτικά ορισμένες από τις πιο σημαντικές ιδιότητες των DES.



#### 4.3.1 Σημείο τήξης

Τα DES που προκύπτουν από απλή ανάμιξη των συστατικών τους χαρακτηρίζονται γενικά από χαμηλότερο σημείο τήξης από αυτό των μεμονωμένων συστατικών τους. Για παράδειγμα, όταν  $\text{CHCl}_3$  και ουρία αναμιγνύονται μαζί σε μοριακή αναλογία 1:2, το σημείο τήξης του μίγματος είναι  $12^\circ\text{C}$ , το οποίο είναι πολύ χαμηλότερο από εκείνα των  $\text{CHCl}_3$  και της ουρίας ( $302^\circ\text{C}$  και  $133^\circ\text{C}$  αντίστοιχα). Η σημαντική μείωση του σημείου τήξης προέρχεται από την αλληλεπίδραση μεταξύ του ανιόντος αλογονιδίου και του δότη δεσμού υδρογόνου. Τα περισσότερα DES έχουν σημεία τήξης κάτω των  $150^\circ\text{C}$ , ενώ γενικά αυτά με σημείο τήξης μικρότερα από  $50^\circ\text{C}$  είναι πιο ελκυστικά ως φθinhoί και ασφαλείς διαλύτες. [74], [76]

#### 4.3.2 Πυκνότητα

Η πυκνότητα είναι μία από τις πιο σημαντικές φυσικές ιδιότητες για έναν διαλύτη. Γενικά, οι πυκνότητες των DES καθορίζονται με σταθμική μέτρηση. Τα περισσότερα DES εμφανίζουν πυκνότητες υψηλότερες από νερό. [74] Η πυκνότητα κυμαίνεται από 1 έως  $1.35\text{ g/cm}^3$ , ενώ αυτά που περιέχουν μεταλλικά άλατα έχουν λίγο μεγαλύτερη. Τα μοριακά χαρακτηριστικά των συστατικών και η γραμμομοριακή αναλογία στην οποία σχηματίζεται το DES έχουν μεγάλη επίδραση στην πυκνότητα του. Ο μεγάλος αριθμός πιθανών συνδυασμών συστατικών, μαζί με την πρακτική σημασία της πυκνότητας για βιομηχανικές εφαρμογές, οδηγεί στην ανάγκη ανάπτυξης μοντέλων που επιτρέπουν αποτελεσματικό έλεγχο των DES. [76]

#### 4.3.3 Ιξώδες και ηλεκτρική αγωγιμότητα

Τα περισσότερα DES παρουσιάζουν σχετικά υψηλό ιξώδες ( $>100\text{ cP}$ ) σε θερμοκρασία δωματίου, με εξαίρεση εκείνα που περιέχουν χλωρίδιο της χολίνης με αιθυλενογλυκόλη ή ιμιδαζόλη. Το υψηλό ιξώδες των DES συχνά αποδίδεται στην παρουσία ενός εκτεταμένου δικτύου δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συστατικών, το οποίο οδηγεί σε χαμηλότερη κινητικότητα των ελεύθερων μορίων εντός του DES. Γενικά, τα ιξώδη των ευτηκτικών μιγμάτων εξαρτώνται κυρίως από τη χημική φύση των συστατικών τους, τη θερμοκρασία και την περιεκτικότητα σε νερό. [74]

Λόγω των εφαρμογών τους ως πράσινοι διαλύτες, η ανάπτυξη DES με χαμηλό ιξώδες είναι ιδιαίτερα επιθυμητή. Η δυνατότητα μείωσης του ιξώδους των DES προσθέτοντας ελεγχόμενες ποσότητες νερού είναι μια ελκυστική επιλογή για εξαιρετικά παχύρρευστα DES. Ωστόσο, αυτό πρέπει να γίνει με προσοχή γιατί μπορεί να επηρεάσει και να αλλάξει άλλες ιδιότητες του DES. Επίσης, η θερμοκρασία έχει μεγάλη επίδραση στο ιξώδες των DES, και συνεπώς πολύ ιξώδη DES, τα οποία δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν κοντά σε συνθήκες περιβάλλοντος, θα μπορούσαν να εξεταστούν για εφαρμογές σε υψηλότερες θερμοκρασίες, καθώς το ιξώδες μειώνεται με αύξηση της θερμοκρασίας. [74]–[76]

Η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι άμεσα εξαρτημένη από το ιξώδες: όσο μεγαλύτερο είναι το ιξώδες, τόσο χαμηλότερη είναι η αγωγιμότητα. Έτσι, τα περισσότερα από τα διαθέσιμα DES έχουν πολύ χαμηλά επίπεδα αγωγιμότητας (χαμηλότερη από  $1\text{ mS/cm}^1$  σε θερμοκρασία περιβάλλοντος), που μπορεί να είναι ένα πρόβλημα για ορισμένες ηλεκτροχημικές εφαρμογές. [76]

#### 4.3.4 Επιφανειακή τάση

Η επιφανειακή τάση των περισσότερων DES είναι εξαιρετικά υψηλή και συνήθως μεγαλύτερη από αυτή των ιοντικών υγρών. Η επιφανειακή τάση ακολουθεί παρόμοια τάση

με το ιξώδες δεδομένου ότι εξαρτάται αυστηρά από τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που διέπουν το σχηματισμό DES. Συγκεκριμένα, η επιφανειακή τάση διαφόρων DES  $\text{ChCl}$  / γλυκερόλης έδειξε μια γραμμική συσχέτιση με τη θερμοκρασία. Αύξηση της συγκέντρωσης του  $\text{ChCl}$ , μειώνει την επιφανειακή τάση του DES, καθώς επηρεάζεται το δίκτυο δεσμών υδρογόνου της γλυκερόλης. [74], [76]

#### 4.4 Εφαρμογές DES

Χάρη στο χαμηλό οικολογικό τους αποτύπωμα και τις ελκυστικές τους ιδιότητες, οι διαλύτες DES αποκτούν όλο και περισσότερο ενδιαφέρον τόσο στον ακαδημαϊκό όσο και στο βιομηχανικό χώρο ενώ ο αριθμός των δημοσιεύσεων που αφορούν τη χρήση DES αυξάνεται ραγδαία. [74] Στη συνέχεια, παρουσιάζονται ορισμένες βασικές εφαρμογές των DES που συναντώνται ευρέως στη βιβλιογραφία.

Μια από τις σημαντικότερες εφαρμογές των DES είναι η προσρόφηση διοξειδίου του άνθρακα. Η προσρόφηση και η απομόνωση του  $\text{CO}_2$  είναι ένα τρέχον φλέγον ζήτημα με στόχο τη μείωση της υπερθέρμανσης του πλανήτη. Οι μεγαλύτερες προσπάθειες εστιάζονται στην ανάπτυξη πηγών ενέργειας που δεν εκπέμπουν  $\text{CO}_2$ , ωστόσο αυτές δεν βρίσκονται ακόμα στο στάδιο όπου μπορούν να εφαρμοστούν σε μεγάλη κλίμακα. Ο σχεδιασμός βιώσιμων, ανακυκλώσιμων προσροφητικών υλικών που εμφανίζουν ενισχυμένη ικανότητα προσρόφησης  $\text{CO}_2$  είναι ζωτικής σημασίας. [75] Λόγω της υψηλής διαλυτότητας του  $\text{CO}_2$  στα ιοντικά υγρά, αυτά έχουν βρει εφαρμογή ως διαλύτες για δέσμευση  $\text{CO}_2$ . Ωστόσο, τα DES έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά με τα ΙΥ και ειδικότερα τα  $\text{NaDES}$  παρουσιάζουν μια βιώσιμη εναλλακτική λύση, καθώς είναι φθηνότερα, βιοαποικοδομήσιμα και βιοσυμβατά. [73] Επομένως, λόγω των πολλά υποσχόμενων χαρακτηριστικών των DES στην προσρόφηση  $\text{CO}_2$ , μπορούν να αναπτυχθούν μελλοντικές βιώσιμες διεργασίες απορρόφησης  $\text{CO}_2$ . [76]

Τα DES εφαρμόζονται επίσης στην ηλεκτροχημεία ως ηλεκτρολύτες για ηλεκτροαπόθεση μετάλλων, ως διαλύτες για ηλεκτροχημικές αντιδράσεις και για επιφανειακή επεξεργασία αφαίρεσης οξειδωμένων μετάλλων (electropolishing). [74] Τα βασικά πλεονεκτήματα της χρήσης DES αντί υδατικών ηλεκτρολυτών είναι η υψηλή διαλυτότητα σε μεταλλικά άλατα, η απουσία νερού και η υψηλή αγωγιμότητα σε σύγκριση με τους μη υδατικούς διαλύτες. [75]

Μέχρι σήμερα, οι εφαρμογές των DES έχουν δείξει ιδιαίτερα ελπιδοφόρα αποτελέσματα στο βιοτεχνολογικό τομέα. Στη βιοκατάλυση, η χρήση του νερού ως διαλύτη χαρακτηρίζεται από περιορισμένη διαλυτότητα, ανεπιθύμητες παράλληλες αντιδράσεις, αστάθεια ενζύμων και κίνδυνο μικροβιακής μόλυνσης. Αντίθετα η χρήση DES ως διαλύτες σε βιοκαταλυτικές αντιδράσεις παρουσιάζει βελτιωμένα χαρακτηριστικά σε σχέση με παραδοσιακούς διαλύτες, όσον αφορά τις αποδόσεις της αντίδρασης, την καθαρότητα των προϊόντων, τη διαθεσιμότητα των αντιδραστηρίων, το χρόνο αντίδρασης, την εκλεκτικότητα του καταλύτη, την ανακύκλωση του καταλύτη και του διαλύτη και τη σταθερότητα και δραστικότητα του βιοκαταλύτη. [80] Αν και ορισμένα DES αποτελούνται από συστατικά που είναι γνωστά ότι μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες, όπως το κιτρικό οξύ και η ουρία, πολλά ένζυμα παραμένουν ενεργά σε DES, όπως οι λιπάσες στην παραγωγή βιοντίζελ. [73] Αυτά τα ανώτερα χαρακτηριστικά αποδίδονται στα εγγενή χαρακτηριστικά των DES, όπως το ευρύ και ισχυρό δίκτυο δεσμών υδρογόνου. Για παράδειγμα, η σταθερότητα ενός ενζύμου στα DES προέρχεται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών DES (HBD, ανιόν και κατιόν του άλατος) και τα επιφανειακά τμήματα του ενζύμου. Ως αποτέλεσμα, η επιφάνεια του

ενζύμου ακινητοποιείται στη δομή του DES, προωθώντας τη σταθερότητα των πρωτεϊνών. [80]

Λόγω του ισχυρού συστήματος δότη δεσμών υδρογόνου, τα συστατικά του DES (ειδικά το HBD) μπορούν να ανταγωνιστούν με τον καταλύτη για το υπόστρωμα (ανάλογα με την πολικότητά του), μειώνοντας την αντιδραστικότητά του. Ως εκ τούτου, είναι συχνά απαραίτητο να προστεθεί ένας συνδιαλύτης προκειμένου να καταστεί το υπόστρωμα περισσότερο διαθέσιμο για αντίδραση. Όταν προστίθεται νερό ως συνδιαλύτης, οι αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου μεταξύ των μορίων νερού και DES αυξάνονται, ελευθερώνοντας έτσι το υπόστρωμα. [80]

Γενικά, προβλέπεται ότι τα DES λόγω του χαμηλού κόστους τους, της βιοαποικοδομησιμότητας και βιοσυμβατότητάς τους θα εφαρμόζονται ευρέως ως διαλύτες για βιοκαταλυτικές αντιδράσεις, ειδικά σε βιομηχανίες φαρμάκων και καλλυντικών όπου η βιοσυμβατότητα με το προϊόν είναι ένα σημαντικό ζήτημα. [73]

Εκτός από τη βιοκατάλυση, τα DES έχουν εφαρμοστεί και στην εκχύλιση φυσικών προϊόντων από ζωντανούς οργανισμούς, τους δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι φυσικές βιοδραστικές αυτές ενώσεις βρίσκονται σε διαφορετικούς οργανισμούς, όπως φυτά, μικροοργανισμούς, φύκια και μύκητες. Σε γενικές γραμμές, οι κύριες ανησυχίες σχετικά με τις διαδικασίες εκχύλισης είναι οι φυσικοχημικές ιδιότητες των διαλυτών που χρησιμοποιούνται. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται σήμερα έχουν εγκριθεί από διάφορες αρχές (FDA και η Ευρωπαϊκή Ένωση) και αυτές οι αρχές παρακολουθούν τη χρήση τους. Μέχρι σήμερα, το νερό και οι οργανικοί διαλύτες παραμένουν οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι διαλύτες στα τρόφιμα, στα γεωργικά προϊόντα και στις βιομηχανίες φαρμάκων και καλλυντικών. Το νερό είναι ένας αποτελεσματικός διαλύτης για υδρόφιλες και πολικές ενώσεις, ενώ οι οργανικοί διαλύτες για υδρόφοβες και μη πολικές ουσίες. Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στο ρόλο των DES ως υποψήφιοι βιώσιμοι διαλύτες για την εκχύλιση μεταβολιτών, όπως φλαβονοειδή, τερπενοειδή και φαινολικά οξέα, παρουσιάζοντας πολλές φορές μεγαλύτερες αποδόσεις ανάκτησης σε σχέση με συμβατικούς διαλύτες. [80]

Τέλος, μεγάλη είναι και η συνεισφορά των DES στο σχεδιασμό, την ανάπτυξη και την ανάλυση φαρμακευτικών και βιοϊατρικών υλικών. Τα εν λόγω φαρμακευτικά υλικά βασίζονται σε πολυμερή υλικά και χρησιμοποιούνται είτε ως βιοαποικοδομήσιμα ελαστομερή στη βιοϊατρική είτε ως οχήματα διαλυτοποίησης φαρμάκων σε φαρμακευτικά προϊόντα. Για παράδειγμα, τα DES εφαρμόζονται ως διαλύτες στη σύνθεση ελαστομερών με αντιβακτηριακή δράση, ενώ έχει παρατηρηθεί υψηλότερη διαλυτότητα φαρμάκων, όπως η ιβουπροφένη, η δαναζόλη, η γκριζεοφουλβίνη σε DES απ' ότι σε παραδοσιακούς διαλύτες. [73], [80]

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 5.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της δράσης οργανικών ενώσεων ως προσθέτων στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν δύο είδη οργανικών ενώσεων, ένα ιοντικό υγρό, το κυκλοεξανοϊκό δις(2-υδροξυ-αιθυλ)αμμώνιο, και ένας βαθέως ευτηκτικός διαλύτης, το χλωρίδιο χολίνης-γλυκερόλης, ενώ η λυσοζύμη και η φωσφορυλάση γλυκογόνου επιλέχθηκαν ως πρωτεΐνες. Οι συνθήκες της κρυστάλλωσης περιλάμβαναν διαφορετικές συγκεντρώσεις προσθέτων και παραγόντων καταβύθισης. Η επίδραση των προσθέτων στην κρυστάλλωση των πρωτεϊνικών στόχων εξετάστηκε με τη βοήθεια στερεοσκοπίου με κριτήρια τον χρόνο σχηματισμού κρυστάλλων, το μέγεθος και τη μορφολογία των κρυστάλλων.

#### 5.2 Όργανα και αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος της εργασίας συνοψίζονται παρακάτω:

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια πειραματικού μέρους

| Αντιδραστήριο                                                     | Χημικός Τύπος             | Προμηθευτής                                        |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------|
| 2-μεθυλο-2,4-πεντανεδιόλη (MPD)                                   | $C_6H_{14}O_2$            | Sigma-Aldrich                                      |
| Αζίδιο του νατρίου                                                | $NaN_3$                   | Merck                                              |
| Αιθυλενογλυκόλη                                                   | $C_2H_6O_2$               | Sigma-Aldrich                                      |
| Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA)                              | $C_{10}H_{16}N_2O_8$      | SERVA                                              |
| Άνυδρη γλυκερόλη (για σύνθεση DES)                                | $C_3H_8O_3$               | Penta                                              |
| Άνυδρη γλυκερόλη (για κρυοπροστατευτικό)                          | $C_3H_8O_3$               | Lach:ner                                           |
| Απιονισμένο νερό                                                  | $H_2O$                    | -                                                  |
| Διαιθανολαμίνη                                                    | $C_4H_{11}NO_2$           | Merck                                              |
| Διθειοθρεϊτόλη (DTT)                                              | $C_4H_{10}O_2S_2$         | SERVA                                              |
| Ινοσίνη 5'-μονοφωσφορικό οξύ άλας δινατρίου (IMP)                 | $C_{10}H_{11}N_4O_8PNa_2$ | BDH                                                |
| Κυκλοεξανοϊκό δις(2-υδροξυ-αιθυλ)αμμώνιο (IY)                     | $C_{11}H_{23}NO_4$        | Σύνθεση στο Εργ. Οργ. Χημείας Σχολής Χημ. Μηχ. ΕΜΠ |
| Κυκλοεξανοϊκό οξύ 98+%                                            | $C_7H_{12}O_2$            | ACROS Organics                                     |
| Λυσοζύμη από ασπράδι αυγού όρνιθας (λυοφιλοποιημένη σκόνη) (HEWL) | -                         | Sigma-Aldrich                                      |
| Μεθανόλη                                                          | $CH_4O$                   | Fisher                                             |
| Οξικό νάτριο                                                      | $C_2H_3NaO_2$             | Merck                                              |
| Οξικό οξύ 99.7%                                                   | $C_2H_4O_2$               | Fisher                                             |
| Υδροξείδιο του νατρίου                                            | $NaOH$                    | Sigma-Aldrich                                      |
| Φωσφορυλάση του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού          | -                         | Παρασκεύασμα IXB-EIE                               |
| Χλωρίδιο χολίνης 98+%                                             | $C_5H_{14}ClNO$           | Alfa Aesar                                         |

|                                                                        |                      |                                                    |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------------------------------------|
| Χλωρίδιο χολίνης-γλυκερόλη (DES)                                       | $C_{11}H_{30}ClNO_7$ | Σύνθεση στο Εργ. Οργ. Χημείας Σχολής Χημ. Μηχ. ΕΜΠ |
| Χλωριούχο νάτριο                                                       | NaCl                 | Sigma-Aldrich                                      |
| BES 99+% (σουλφονικό άλας του N,N-δισ(2-υδροξυαιθυλο)-2-αμινοαιθανίου) | $C_6H_{15}NO_5S$     | ACROS Organics                                     |
| Parabar 10312                                                          | -                    | Hampton Research                                   |
| Silicone oil                                                           | -                    | Jena Bioscience                                    |

Όργανα (όλα βρίσκονται στις υποδομές του IXB-EIE και του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ):

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας / Σχολή Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ

- Αντλία υψηλού κενού Edwards RV-5
- Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού Rotavapor R-114/Waterbath B-480, Buchi

Εργαστήριο Δομικής Βιολογίας, IXB-EIE

- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας  $\pm 0.0005$  g (Sartorius)
- Συσκευή προσδιορισμού pH, Metrohm 744 (Metrohm AG)
- Συσκευή ανάδευσης (Vortex)
- Πιπέτες Gilson P1000-P200-P100-P10 (Gilson)

Εργαστήριο Δομικής Βιολογίας, IXB-EIE & Υποδομή Δομικής Βιολογίας Instruct-EL hub/Inspired.

- Στερεοσκόπιο εξοπλισμένο με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή, 160X, Leica MZ16 (Leica Microsystems GmbH)
- Μονάδα πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας ακτίνων X

Εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης, IXB-EIE & Υποδομή Δομικής Βιολογίας Instruct-EL hub/Inspired.

- Μονάδα φασματοσκοπίας NMR Varian V600 MHz

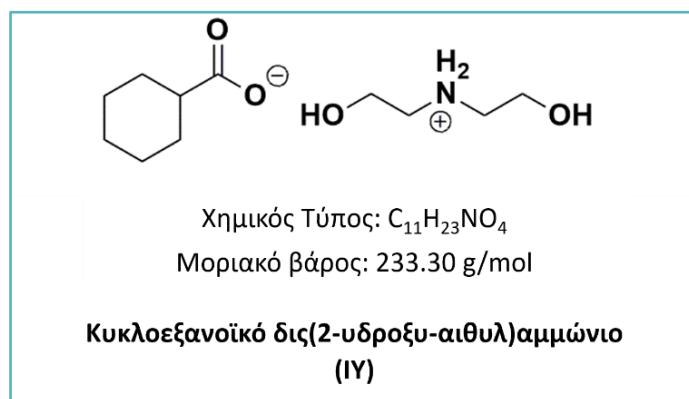
Άλλα υλικά:

- Διαχωριστική χοάνη εκχύλισης 100mL
- Σφαιρικές φιάλες 250mL
- Γυάλινο ταυ προσαρτημένο σε μπαλόνι αζώτου
- Φίλτρα 0.22μm για φίλτρανση διαλυμάτων
- Πλάκες κρυστάλλωσης 24 θέσεων
- Διάφανη κολλητική ταινία κάλυψης μικροπλακών κρυστάλλωσης
- Ποτήρια ζέσεως 25-50-100 mL
- Ογκομετρικοί κύλινδροι 10-25 mL
- Πλαστικοί περιέκτες διαλυμάτων 15-50 mL
- Πλαστικοί περιέκτες διαλυμάτων 1.5 mL (ependorfs)
- Πλαστικά ρύγχη Gilson (tips) 10-100-200-1000 μL

### 5.3 Σύνθεση ΙΥ και DES

#### Σύνθεση κυκλοεξανοϊκού δις(2-υδροξυ-αιθυλ)αμμωνίου (ΙΥ):

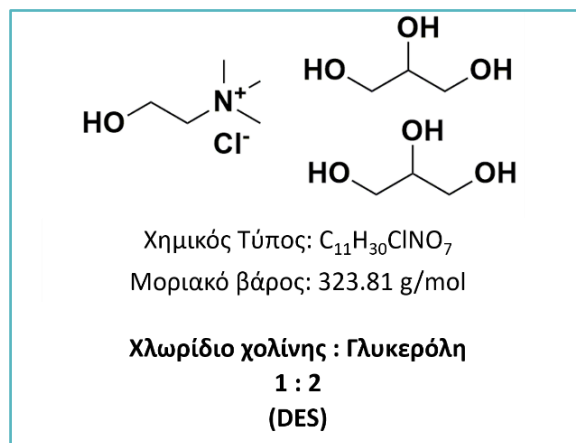
Ζυγίζεται ποσότητα διαιθανολαμίνης (3.92 g) σε σφαιρική φιάλη. Η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο προκειμένου η θερμοκρασία να μην αυξηθεί, λόγω της εξώθερμης αντίδρασης εξουδετέρωσης. Στο σύστημα προσαρμόζεται ένας μαγνητικός αναδευτήρας για παροχή συνεχής ανάδευσης, με παράλληλη διοχέτευση αζώτου για την επίτευξη αδρανών συνθηκών. Προστίθεται στην κωνική φιάλη 4.64 mL κυκλοεξανοϊκού οξέος στάγδην μέσω διαχωριστική χοάνης, ώστε να επιτευχθεί στοιχειομετρική αναλογία 1:1. Το σύστημα αφήνεται για 24 ώρες σε συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, το ιοντικό υγρό μεταφέρεται σε αντλία υψηλού κενού υπό θέρμανση στους 50 °C προκειμένου να απομακρυνθεί η υγρασία.



Σχήμα 12: Κυκλοεξανοϊκό δις(2-υδροξυ-αιθυλ)αμμώνιο (ΙΥ)

#### Σύνθεση χλωριδίου χολίνης-γλυκερόλης (DES):

Ζυγίζονται 5.3774 g χλωριδίου χολίνης σε κωνική φιάλη και τοποθετούνται σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού για 1 ώρα, λόγω της υγροσκοπικής φύσης της χολίνης. Μόλις αφαιρεθεί όλη η υγρασία, το χλωρίδιο χολίνης ζυγίζεται ξανά στα 5.3546 g και μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη. Προστίθενται 5.607 mL γλυκερόλης στη φιάλη, ώστε η μοριακή αναλογία των δύο συστατικών να είναι 1:2. Το σύστημα αφήνεται για 24 ώρες σε συνεχή ανάδευση υπό θέρμανση (40 °C) και αδρανείς συνθήκες. Τέλος, το διάλυμα ξηραίνεται υπό θέρμανση στους 50 °C σε αντλία υψηλού κενού.



Σχήμα 13: Χλωρίδιο χολίνης : Γλυκερόλη (DES)



Τα δύο διαλύματα ταυτοποιήθηκαν στη συνέχεια με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR  $H^1$  στην Υποδομή Δομικής Βιολογίας Instruct-EL hub/Inspired του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.



Εικόνα 5: Στα αριστερά η πειραματική διάταξη σύνθεσης του IV. Στα δεξιά ο φασματογράφος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, μέρος της Υποδομής Δομικής Βιολογίας Instruct-EL hub/Inspired

## 5.4 Δοκιμές Κρυστάλλωσης

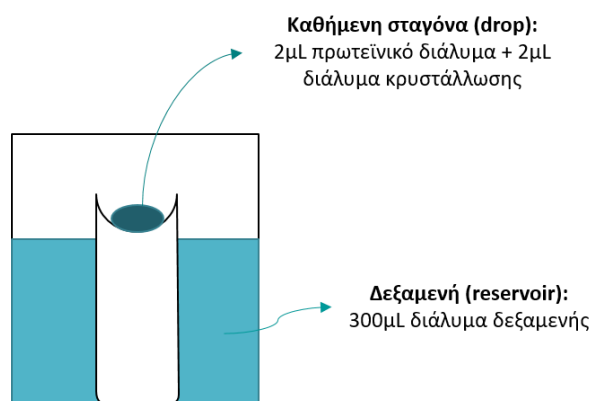
Οι δοκιμές κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο διάχυσης ατμών καθήμενης σταγόνας σε πλάκες 24 πηγαδιών (wells) με το χέρι, όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.1 Εξάτμιση και Διάχυση ατμών (Vapor Diffusion). Κάθε πλάκα έχει 4 γραμμές και 6 στήλες. Οι γραμμές αριθμούνται με λατινικούς χαρακτήρες από το A μέχρι το D, ενώ οι στήλες με αριθμούς από το 1 έως το 6. Συνεπώς, κάθε πηγάδι περιγράφεται μοναδικά με ένα χαρακτήρα και έναν αριθμό, ανάλογα με τη θέση του στην πλάκα.



Εικόνα 6: Πλάκα κρυστάλλωσης καθήμενης σταγόνας 24 θέσεων [81]



Στη δεξαμενή τοποθετούνται 300  $\mu\text{L}$  διαλύματος δεξαμενής ενώ η σταγόνα αποτελείται από 4  $\mu\text{L}$  διαλύματος, το οποίο περιέχει το πρωτεϊνικό διάλυμα και το διάλυμα κρυστάλλωσης. Το πρωτεϊνικό διάλυμα περιέχει μόνο την πρωτεΐνη διαλυμένη σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ενώ το διάλυμα κρυστάλλωσης περιέχει τους παράγοντες κρυστάλλωσης, το ρυθμιστικό διάλυμα και τα πρόσθετα. Σε κάθε πλάκα υπάρχουν διαφορετικές συνθήκες, στις οποίες μεταβάλλεται η συγκέντρωση των προσθέτων καθώς και η συγκέντρωση του παράγοντα κατακρήμνισης στη σταγόνα κρυστάλλωσης. Κάθε συνθήκη κρυστάλλωσης είναι ίδια ανά τρία πηγάδια, προκειμένου να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα των πειραμάτων. Επίσης, υπάρχουν και οι αντίστοιχες συνθήκες αναφοράς, δηλαδή απουσία προσθέτου, προκειμένου να γίνουν οι απαραίτητες συγκρίσεις.



Σχήμα 14: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου κρυστάλλωσης που εφαρμόστηκε κατά το πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας.

Μόλις ολοκληρωθεί η τοποθέτηση των διαλυμάτων στις πλάκες κρυστάλλωσης, αυτές σφραγίζονται προσεκτικά με διάφανη κολλητική ταινία και φυλάσσονται στους 20  $^{\circ}\text{C}$  (στην περίπτωση της λυσοζύμης) ή στους 16  $^{\circ}\text{C}$  (στην περίπτωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου). Οι πλάκες παρατηρούνται συνεχώς τις πρώτες ώρες καθώς και μετά από μερικές μέρες, προκειμένου να παρακολουθείται η εξέλιξη των πειραμάτων. Η παρατήρηση γίνεται μέσω κατάλληλου στερεοσκοπίου, εξοπλισμένου με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή.



Εικόνα 7: Στερεοσκόπιο Leica MZ16 εγκατεστημένο στην Υποδομή Δομικής Βιολογίας του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

#### 5.4.1 Επιλογή πρωτεϊνικών στόχων

Η λυσοζύμη από ασπράδι αυγού όρνιθας (HEWL) επιλέχθηκε αρχικά ως πρωτεϊνικός στόχος με βάση τη διαθέσιμη βιβλιογραφία. Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 1.1, η λυσοζύμη είναι μια πρωτεΐνη-πρότυπο για κρυσταλλογραφικές μελέτες που αφορούν στην ανάπτυξη νέας μεθοδολογίας. Οι συνθήκες κρυστάλλωσης της είναι ευρέως γνωστές, διευκολύνοντας τη δυνατότητα διερεύνησης της επίδρασης προσθέτων. Σε παρόμοιες έρευνες για τη μελέτη της επίδρασης προσθέτων, όπως ιοντικών υγρών, στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών, η λυσοζύμη χρησιμοποιείται ευρέως για αυτόν τον σκοπό. [27], [71], [72], [82], [83] Συνεπώς, λόγω της διαθεσιμότητας πληροφοριών σχετικά με τη δομή και τις ιδιότητες της αλλά και τις εφαρμογές σε παρόμοιες μελέτες, η λυσοζύμη αποτελεί έναν πρωτεϊνικό στόχο που επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη δράση των υπό μελέτη προσθέτων στην διαδικασία κρυστάλλωσής της.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου στην ανενεργό T διαμόρφωση (T state GPb) επιλέχθηκε ως δευτερεύον πρωτεϊνικός στόχος, λόγω της σημασίας της ως φαρμακευτικός στόχος για τον έλεγχο της γλυκόζης στο αίμα. Το ένζυμο κρυσταλλώνεται πιο δύσκολα σε σχέση με τη λυσοζύμη, καθώς είναι μεγαλύτερο και πιο σύνθετο μόριο ενώ απαιτεί και περισσότερα αντιδραστήρια κρυστάλλωσης. [17] Η επιλογή αυτή επιτρέπει τον έλεγχο της δράσης των υπό μελέτη προσθέτων σε πιο σύνθετες και δύσκολες κρυσταλλώσεις.

#### 5.4.2 Διαλογή συνθηκών κρυστάλλωσης

Η διαλογή των συνθηκών κρυστάλλωσης για τις δύο πρωτεΐνες έγινε με βάση τη βιβλιογραφία και προηγούμενες μελέτες της ομάδας της Δρ. Χρυσίνα, στο IXB-EIE. Οι συνθήκες αυτές ελέγχθηκαν, δοκιμάστηκαν εκ νέου και βελτιστοποιήθηκαν με βάση τις ανάγκες των πειραμάτων. Στην περίπτωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν εφαρμόζονται με τη μέθοδο κρυστάλλωσης microbatch. Οι συνθήκες αυτές προσαρμόστηκαν για τη μέθοδο καθημερινής σταγόνας, αντικαθιστώντας τη σπερμίνη, η οποία χρησιμοποιείται ως πρόσθετο, με τα υπό μελέτη IY και DES.

Οι συνθήκες των προσθέτων καθώς και η μέθοδος τοποθέτησής τους επιλέχθηκαν με βάση της οδηγίες χρήσης του Additive Screen Kit της εταιρείας Hampton Research όπως αυτές τροποποιήθηκαν για τη μελέτη του εν λόγω συστήματος. Συγκεκριμένα, τα πρόσθετα τοποθετούνται μόνο στη σταγόνα, σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές των οργανικών ενώσεων που υπάρχουν στο εμπορικό σκεύασμα.

### 5.5 Κρυστάλλωση Λυσοζύμης (LZ)

#### 5.5.1 Παρασκευή διαλυμάτων

Αρχικά διαλύματα (stock) κρυστάλλωσης:

- 0.5M NaAcetate pH 4.8
- 20% (w/v) NaCl

Παρασκευάζονται 50 mL από το κάθε διάλυμα. Το διάλυμα οξικού νατρίου (NaAcetate) παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση του εμπορικού διαθέσιμου αντιδραστηρίου σε νερό και το pH ρυθμίζεται στα 4.8 με οξικό οξύ 99.7% (CH<sub>3</sub>COOH). Το διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl) παρασκευάζεται ομοίως με διαλυτοποίηση κατάλληλης ποσότητας του εμπορικού σκευάσματος σε νερό. Και στα δύο διαλύματα προστίθεται μικροποσότητα αζιδίου του νατρίου (NaN<sub>3</sub>) με τελική συγκέντρωση 0.02% (w/v), το οποίο δρα ως βακτηριοστατικό

συντηρητικό. Τα διαλύματα φιλτράρονται μέσω φίλτρου διαμέτρου 0.22μm για την αφαίρεση πιθανών αιωρούμενων σωματιδίων και σκόνης και φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.

#### Διαλύματα προσθέτων:

Τα πρόσθετα IY και DES (100% v/v) αραιώνονται σε κατάλληλες συγκεντρώσεις, ώστε να είναι δυνατή η χρήση τους σε μικροποσότητες της τάξης μL. Συγκεκριμένα, ποσότητα προσθέτων με χρήση ειδικής πιπέτας για ιξώδη διαλύματα, αραιώνεται σε νερό και με διαδοχικές αραιώσεις λαμβάνονται διαλύματα 50 %, 25 % και 12.5 % (v/v) για κάθε πρόσθετο, όγκου 600, 400 και 400 μL αντίστοιχα.

#### Διαλύματα δεξαμενής (reservoir):

Διερευνήθηκαν τρία διαφορετικά διαλύματα δεξαμενής με διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος με απλή ανάμιξη των stock διαλυμάτων σε τελικές συγκεντρώσεις:

- 8% (w/v) NaCl, 0.1M NaAcetate pH 4.8
- 6% (w/v) NaCl, 0.1M NaAcetate pH 4.8
- 4% (w/v) NaCl, 0.1M NaAcetate pH 4.8

#### Πρωτεϊνικό διάλυμα λυσοζύμης:

Το πρωτεϊνικό διάλυμα του κάθε πειράματος παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση στερεής ποσότητας εμπορικού σκευάσματος λυσοζύμης HEWL (LZ) στο ρυθμιστικό διάλυμα NaAcetate pH 4.8 και σε νερό, ώστε η τελική συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος να είναι:

- 40mg/mL LZ, 0.1M NaAcetate pH 4.8

Η διαλυτοποίηση γίνεται με ελαφριά ανάδευση προκειμένου να αποφευχθεί μηχανική καταπόνηση της πρωτεΐνης. Έπειτα, το πρωτεϊνικό διάλυμα φυγοκεντρείται στους 4 °C, στα 5000 rpm για 10-15 λεπτά και χρησιμοποιείται αμέσως στα πειράματα κρυστάλλωσης.

#### Διαλύματα κρυστάλλωσης:

Αυτά τα διαλύματα περιέχουν το πρόσθετο, τον παράγοντα κρυστάλλωσης (NaCl) και το ρυθμιστικό διάλυμα NaAcetate σε κατάλληλες συγκεντρώσεις, ώστε μετά από την ανάμιξη με το πρωτεϊνικό διάλυμα, η σταγόνα κρυστάλλωσης να έχει τις επιθυμητές συνθήκες. Η παρασκευή αυτών των διαλυμάτων περιλαμβάνει την απλή ανάμιξη των συστατικών και την ηπία ανάδευση για τη δημιουργία ενός ομογενούς διαλύματος.

#### 5.5.2 Πειραματική διαδικασία κρυστάλλωσης

Η τοποθέτηση των διαλυμάτων στην πλάκα κρυστάλλωσης γίνεται με το χέρι. Πρώτα τοποθετείται το διάλυμα δεξαμενής (300 μL) ενώ η καθημερινή σταγόνα σχηματίζεται με προσεχτική ανάμιξη 2 μL πρωτεϊνικού διαλύματος και 2 μL του διαλύματος κρυστάλλωσης (4 μL συνολικά). Στην περίπτωση των σταγόνων αναφοράς (τυφλών), δηλαδή αυτών που δεν περιέχουν πρόσθετο, το διάλυμα κρυστάλλωσης της σταγόνας αντικαθίσταται από το διάλυμα δεξαμενής.

### 1<sup>η</sup> δοκιμή κρυστάλλωσης:

Οι παρακάτω συνθήκες δοκιμάστηκαν και για τα δύο πρόσθετα σε δύο διαφορετικές πλάκες:

Πίνακας 3: Συνθήκες κρυστάλλωσης λυσοζύμης (LZ) στην 1<sup>η</sup> δοκιμή. Οι συνθήκες εφαρμόστηκαν και για τα δύο πρόσθετα, σε δύο διαφορετικές πλάκες. Διερευνώνται διαφορετικές συνθήκες ανά τρεις θέσεις της πλάκας. Με γκρι χρώμα παρουσιάζονται οι σταγόνες αναφοράς. Με έντονη γραφή παρουσιάζονται οι διαφορετικές συγκεντρώσεις προσθέτου που δοκιμάστηκαν.

|   | 1                                                                                                                                                             | 2 | 3 | 4                                                                                                                                                               | 5 | 6 |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---|
| A | Σταγόνα:<br>20mg/mL LZ<br>0.1M NaAcetate pH 4.8<br>4% (w/v) NaCl<br><br>Δ/μα δεξαμενής:<br>8% (w/v) NaCl<br>0.1M NaAcetate pH 4.8                             |   |   | Σταγόνα:<br>20mg/mL LZ<br>0.1M NaAcetate pH 4.8<br>4% (w/v) NaCl<br><b>0.5% (v/v) πρόσθετο</b><br><br>Δ/μα δεξαμενής:<br>8% (w/v) NaCl<br>0.1M NaAcetate pH 4.8 |   |   |
| B | Σταγόνα:<br>20mg/mL LZ<br>0.1M NaAcetate pH 4.8<br>4% (w/v) NaCl<br><b>1% (v/v) πρόσθετο</b><br><br>Δ/μα δεξαμενής:<br>8% (w/v) NaCl<br>0.1M NaAcetate pH 4.8 |   |   | Σταγόνα:<br>20mg/mL LZ<br>0.1M NaAcetate pH 4.8<br>4% (w/v) NaCl<br><b>3% (v/v) πρόσθετο</b><br><br>Δ/μα δεξαμενής:<br>8% (w/v) NaCl<br>0.1M NaAcetate pH 4.8   |   |   |
| C | Σταγόνα:<br>20mg/mL LZ<br>0.1M NaAcetate pH 4.8<br>4% (w/v) NaCl<br><b>5% (v/v) πρόσθετο</b><br><br>Δ/μα δεξαμενής:<br>8% (w/v) NaCl<br>0.1M NaAcetate pH 4.8 |   |   | Σταγόνα:<br>20mg/mL LZ<br>0.1M NaAcetate pH 4.8<br>4% (w/v) NaCl<br><b>10% (v/v) πρόσθετο</b><br><br>Δ/μα δεξαμενής:<br>8% (w/v) NaCl<br>0.1M NaAcetate pH 4.8  |   |   |
| D | Σταγόνα:<br>20mg/mL LZ<br>0.1M NaAcetate pH 4.8,<br>2% (w/v) NaCl<br><br>Δ/μα δεξαμενής:<br>4% (w/v) NaCl<br>0.1M NaAcetate pH 4.8                            |   |   | Σταγόνα:<br>20mg/mL LZ<br>0.1M NaAcetate pH 4.8<br>2% (w/v) NaCl<br><b>3% (v/v) πρόσθετο</b><br><br>Δ/μα δεξαμενής:<br>4% (w/v) NaCl<br>0.1M NaAcetate pH 4.8   |   |   |

## 2<sup>η</sup> δοκιμή κρυστάλλωσης:

Οι παρακάτω συνθήκες δοκιμάστηκαν μόνο για το ΙΥ:

Πίνακας 4: Συνθήκες κρυστάλλωσης λυσοζύμης (LZ) στην 2<sup>η</sup> δοκιμή. Οι συνθήκες εφαρμόστηκαν μόνο για το ΙΥ ως πρόσθετο. Διερευνώνται διαφορετικές συνθήκες ανά τρεις θέσεις της πλάκας. Με γκρι χρώμα παρουσιάζονται οι σταγόνες αναφοράς. Με έντονη γραφή παρουσιάζονται οι διαφορετικές συγκεντρώσεις προσθέτου που δοκιμάστηκαν.

|          | 1                                                                                                                                                             | 2 | 3 | 4                                                                                                                                                               | 5 | 6 |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---|
| <b>A</b> | Σταγόνα:<br>20mg/mL LZ<br>0.1M NaAcetate pH 4.8<br>4% (w/v) NaCl<br><br>Δ/μα δεξαμενής:<br>8% (w/v) NaCl<br>0.1M NaAcetate pH 4.8                             |   |   | Σταγόνα:<br>20mg/mL LZ<br>0.1M NaAcetate pH 4.8<br>4% (w/v) NaCl<br><b>0.5% (v/v) πρόσθετο</b><br><br>Δ/μα δεξαμενής:<br>8% (w/v) NaCl<br>0.1M NaAcetate pH 4.8 |   |   |
| <b>B</b> | Σταγόνα:<br>20mg/mL LZ<br>0.1M NaAcetate pH 4.8<br>4% (w/v) NaCl<br><b>1% (v/v) πρόσθετο</b><br><br>Δ/μα δεξαμενής:<br>8% (w/v) NaCl<br>0.1M NaAcetate pH 4.8 |   |   | Σταγόνα:<br>20mg/mL LZ<br>0.1M NaAcetate pH 4.8<br>4% (w/v) NaCl<br><b>2% (v/v) πρόσθετο</b><br><br>Δ/μα δεξαμενής:<br>8% (w/v) NaCl<br>0.1M NaAcetate pH 4.8   |   |   |
| <b>C</b> | Σταγόνα:<br>20mg/mL LZ<br>0.1M NaAcetate pH 4.8<br>3% (w/v) NaCl<br><br>Δ/μα δεξαμενής:<br>6% (w/v) NaCl<br>0.1M NaAcetate pH 4.8                             |   |   | Σταγόνα:<br>20mg/mL LZ<br>0.1M NaAcetate pH 4.8<br>3% (w/v) NaCl<br><b>0.5% (v/v) πρόσθετο</b><br><br>Δ/μα δεξαμενής:<br>6% (w/v) NaCl<br>0.1M NaAcetate pH 4.8 |   |   |
| <b>D</b> | Σταγόνα:<br>20mg/mL LZ<br>0.1M NaAcetate pH 4.8<br>3% (w/v) NaCl<br><b>1% (v/v) πρόσθετο</b><br><br>Δ/μα δεξαμενής:<br>6% (w/v) NaCl<br>0.1M NaAcetate pH 4.8 |   |   | Σταγόνα:<br>20mg/mL LZ<br>0.1M NaAcetate pH 4.8<br>3% (w/v) NaCl<br><b>2% (v/v) πρόσθετο</b><br><br>Δ/μα δεξαμενής:<br>6% (w/v) NaCl<br>0.1M NaAcetate pH 4.8   |   |   |

## 5.6 Κρυστάλλωση Φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (RMGPb)

### 5.6.1 Παρασκευή διαλυμάτων

#### Αρχικά διαλύματα (stock) κρυστάλλωσης:

- 200 mM DTT (1,4-διθειοθρεϊτόλη)
- 100 mM IMP (ινοσινικό οξύ)
- BES buffer stock pH 6.7 (100mM BES, 1mM EDTA, 0.1% (w/v)  $\text{NaN}_3$ )

Όλα τα διαλύματα παρασκευάζονται με απλή διαλυτοποίηση ποσότητας του διαθέσιμου εμπορικού σκευάσματος σε νερό. Το pH του BES buffer ρυθμίζεται στα 6.7 με  $\text{NaOH}$  1N. Όλα τα διαλύματα φιλτράρονται μέσω φίλτρου διαμέτρου 0.22 $\mu\text{m}$ . Το BES buffer φυλάσσεται στους 4 °C ενώ τα διαλύματα DTT και IMP στους -20 °C.

#### Διαλύματα προσθέτων:

Χρησιμοποιούνται τα ίδια διαλύματα που παρασκευάστηκαν κατά την πειραματική διαδικασία της κρυστάλλωσης της λυσοζύμης.

#### Διάλυμα δεξαμενής (reservoir):

Το διάλυμα δεξαμενής λαμβάνεται με απλή αραιώση 1:10 του BES buffer stock pH 6.7.

- BES buffer pH 6.7 (10mM BES, 0.1mM EDTA, 0.01% (w/v)  $\text{NaN}_3$ )

#### Πρωτεϊνικό διάλυμα φωσφορυλάσης του γλυκογόνου:

Το πρωτεϊνικό διάλυμα ελήφθηκε έτοιμο από προηγούμενες ερευνητικές μελέτες στην παρακάτω σύσταση:

- 24.8 mg/mL GPb, BES buffer pH 6.7 (10mM BES, 0.1mM EDTA, 0.01% (w/v)  $\text{NaN}_3$ )

#### Διαλύματα κρυστάλλωσης:

Αυτά τα διαλύματα περιέχουν το πρόσθετο, τους παράγοντες DTT και IMP και το ρυθμιστικό διάλυμα BES buffer σε κατάλληλες συγκεντρώσεις, ώστε μετά από την ανάμιξη με το πρωτεϊνικό διάλυμα, η σταγόνα κρυστάλλωσης να έχει τις επιθυμητές συνθήκες του Πίνακα 5. Η παρασκευή αυτών των διαλυμάτων περιλαμβάνει την απλή ανάμιξη των συστατικών και την ηπία ανάδευση για τη δημιουργία ενός ομογενούς διαλύματος.

### 5.6.2 Πειραματική διαδικασία κρυστάλλωσης

Η τοποθέτηση των διαλυμάτων στην πλάκα κρυστάλλωσης γίνεται με όμοιο τρόπο, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.5.2 Πειραματική διαδικασία κρυστάλλωσης Στην περίπτωση των σταγόνων αναφοράς, δηλαδή αυτών που δεν περιέχουν πρόσθετο, το διάλυμα κρυστάλλωσης της σταγόνας αντικαθίσταται από κατάλληλη ποσότητα διαλύματος IMP και DTT, προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση αυτών.

Οι παρακάτω συνθήκες δοκιμάστηκαν και για τα δύο πρόσθετα σε δύο διαφορετικές πλάκες:

Πίνακας 5: Συνθήκες κρυστάλλωσης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (RMGPb). Οι συνθήκες εφαρμόστηκαν για τα δύο πρόσθετα, σε δύο διαφορετικές πλάκες. Διερευνώνται διαφορετικές συνθήκες ανά τρεις θέσεις της πλάκας. Με γκρι χρώμα παρουσιάζονται οι σταγόνες αναφοράς. Με έντονη γραφή παρουσιάζονται οι διαφορετικές συγκεντρώσεις προσθέτου που δοκιμάστηκαν.

|          | 1                                                                                                                                           | 2 | 3 | 4                                                                                                                                           | 5 | 6 |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---|
| <b>A</b> | Σταγόνα:<br>12.4mg/mL GPb<br>BES buffer pH 6.7,<br>3mM DTT<br>1mM IMP<br><br>Δ/μα δεξαμενής: BES buffer pH 6.7                              |   |   | Σταγόνα:<br>12.4mg/mL GPb<br>BES buffer pH 6.7<br>3mM DTT<br>1mM IMP<br><b>0.1% (v/v) πρόσθετο</b><br><br>Δ/μα δεξαμενής: BES buffer pH 6.7 |   |   |
| <b>B</b> | Σταγόνα:<br>12.4mg/mL GPb<br>BES buffer pH 6.7<br>3mM DTT<br>1mM IMP<br><b>0.5% (v/v) πρόσθετο</b><br><br>Δ/μα δεξαμενής: BES buffer pH 6.7 |   |   | Σταγόνα:<br>12.4mg/mL GPb<br>BES buffer pH 6.7<br>3mM DTT<br>1mM IMP<br><b>1% (v/v) πρόσθετο</b><br><br>Δ/μα δεξαμενής: BES buffer pH 6.7   |   |   |
| <b>C</b> | Σταγόνα:<br>12.4mg/mL GPb<br>BES buffer pH 6.7<br>3mM DTT<br>1mM IMP<br><b>3% (v/v) πρόσθετο</b><br><br>Δ/μα δεξαμενής: BES buffer pH 6.7   |   |   | Σταγόνα:<br>12.4mg/mL GPb<br>BES buffer pH 6.7<br>3mM DTT<br>1mM IMP<br><b>5% (v/v) πρόσθετο</b><br><br>Δ/μα δεξαμενής: BES buffer pH 6.7   |   |   |
| <b>D</b> | Σταγόνα:<br>12.4mg/mL GPb<br>BES buffer pH 6.7<br>1mM IMP<br><b>1% (v/v) πρόσθετο</b><br><br>Δ/μα δεξαμενής: BES buffer pH 6.7              |   |   | Σταγόνα:<br>12.4mg/mL GPb<br>BES buffer pH 6.7<br>1mM IMP<br><b>5% (v/v) πρόσθετο</b><br><br>Δ/μα δεξαμενής: BES buffer pH 6.7              |   |   |

## 5.7 Κρυσπροστασία κρυστάλλων λυσοζύμης

Προκειμένου για την αξιολόγηση των κρυστάλλων λυσοζύμης που αναπτύχθηκαν παρουσία των προσθέτων προγραμματίστηκε η έκθεση αυτών στη δέσμη ακτίνων X που παράγεται από την συμβατική πηγή ακτίνων X που είναι εγκατεστημένη στο IXB-EIE και είναι μέρος της υποδομής Δομικής Βιολογίας, Instruct-EL hub / Inspired.



Για τον σκοπό αυτό, δοκιμάστηκε αρχικά μια σειρά από πιθανά κρυοπροστατευτικά σε κρυστάλλους λυσοζύμης, που αναπτύχθηκαν απουσία προσθέτων σε 4% (w/v) NaCl, 0.1M NaAcetate pH 4.8. Τα περισσότερα από τα κρυοπροστατευτικά που δοκιμάστηκαν περιγράφονται στην βιβλιογραφία και είναι τα εξής:

- 25%, 30% (v/v) γλυκερόλη
- 30%, 40%, 50%, 60% (v/v) μεθανόλη
- 30% (v/v) αιθυλενογλυκόλη
- 30% (v/v) MPD
- Parabar 10312
- 20% (w/v) NaCl, 25% (v/v) γλυκερόλη
- Silicone oil
- 70% (v/v) Silicone oil + 30% (v/v) αιθυλενογλυκόλη
- 51% (v/v) MeOH + 15% (v/v) γλυκερόλη

Η παρασκευή των κρυοπροστατευτικών γίνεται με απλή ανάμιξη των διαθέσιμων εμπορικών σκευασμάτων με το διάλυμα δεξαμενής (8% (w/v) NaCl, 0.1M NaAcetate pH 4.8), προκειμένου να ληφθεί η επιθυμητή συγκέντρωση διαλύματος, η οποία είναι η πλησιέστερη αυτής που αναπτύχθηκε ο κρύσταλλος. Το Parabar δοκιμάστηκε και μόνο του, χωρίς ανάμιξη με το διάλυμα δεξαμενής.

Οι κρύσταλλοι λαμβάνονται με προσοχή από την καθήμενη σταγόνα που βρίσκεται στην πλάκα και εμβαπτίζονται στο κρυοπροστατευτικό. Στη συνέχεια, τοποθετούνται στην κεφαλή γωνιομέτρου και εκτίθενται στη δέσμη ακτίνων Χ, υπό το ρεύμα αζώτου στους 100K, όπου εξετάζεται ο σχηματισμός πάγου .



Εικόνα 8: Μονάδα πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, εγκατεστημένη στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

#### 6.1 Χαρακτηρισμός ΙΥ και DES

Τα φάσματα που συλλέχθηκαν από τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, επεξεργάστηκαν με το λογισμικό MestrelNova V.14 (Mnova). Τα δύο διαλύματα είναι ήδη χαρακτηρισμένα στη βιβλιογραφία. [84], [85] Η φασματοσκοπία πραγματοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των ενώσεων, ώστε να επιβεβαιωθεί η σωστή σύνθεσή τους στο εργαστήριο.

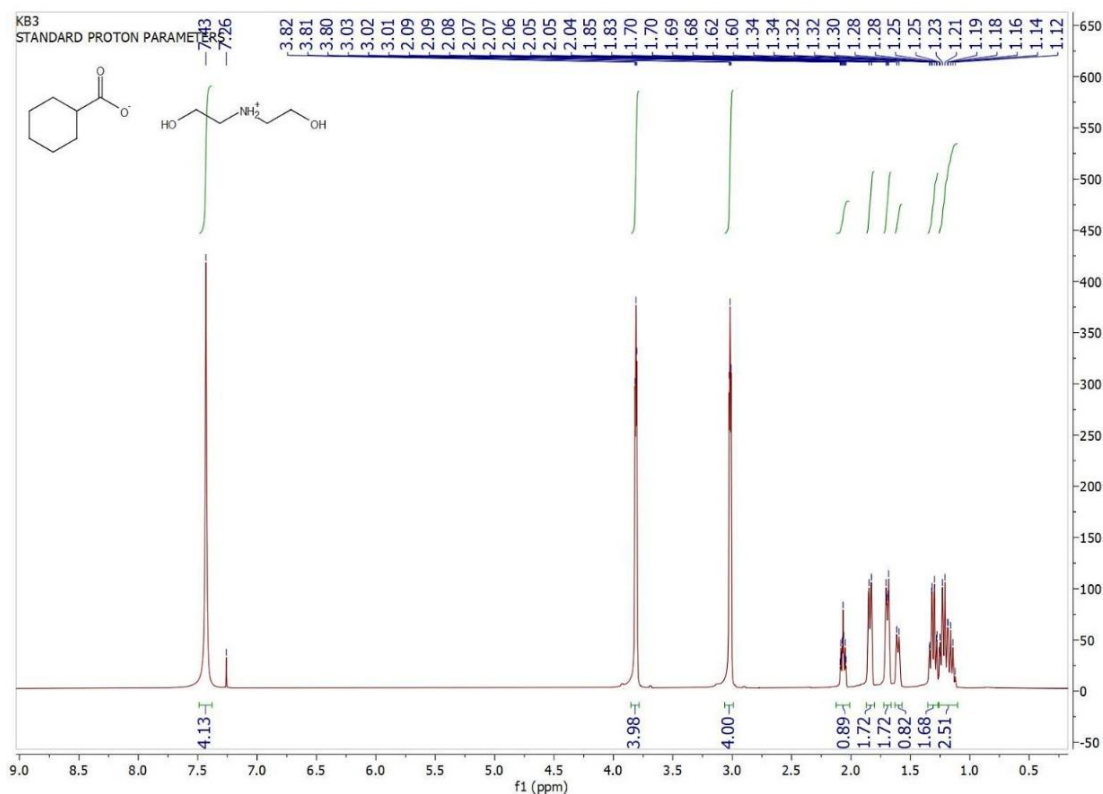
Σε ένα φάσμα  $^1\text{H}$  NMR, οι χημικά μη ισοδύναμοι πυρήνες συντονίζονται σε διαφορετικές συχνότητες και δίνουν διαφορετικά σήματα (χημική μετατόπιση). Οι πιο αποπροστατευμένοι πυρήνες συντονίζονται στα χαμηλά πεδία, δηλαδή εκεί που η συχνότητα είναι υψηλή, ενώ οι πιο προστατευμένοι στα υψηλά πεδία. Η ολοκλήρωση των σημάτων δείχνει τη σχετική αναλογία των πρωτονίων που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση κάθε σήματος. Η πολλαπλότητα κάθε σήματος αντιπροσωπεύει τον αριθμό των γειτονικών, χημικά ισοδύναμων ή μη, πρωτονίων. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, παρουσιάζεται παρακάτω η ερμηνεία των φασμάτων και ο χαρακτηρισμός των ουσιών.

##### 6.1.1 Κυκλοεξανοϊκό δις(2-υδροξυ-αιθυλ)αμμώνιο (ΙΥ)

Για τη φασματομέτρηση του κυκλοεξανοϊκού δις(2-υδροξυ-αιθυλ)αμμωνίου στα 600MHz χρησιμοποιήθηκε το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο  $\text{CDCl}_3$  ως διαλύτης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:

**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$ /ppm: 7.43 (s, 4H,  $\text{NH}_2^+$  & 2(OH)), 3.83 – 3.79 (m, 4H, 2(- $\text{CH}_2\text{OH}$ )), 3.04 – 2.99 (m, 4H,  $\text{NH}_2^+(\text{CH}_2)_2$ ), 2.07 (tt,  $J = 11.4$ , 3.4 Hz, 1H,  $\text{CH}$ ), 1.84 (d,  $J = 12.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.73 – 1.66 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.61 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 1.37 – 1.26 (m, 2H), 1.26 – 1.07 (m, 3H)

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 9, ξεκινώντας από τα χαμηλά πεδία, η απλή ευρεία κορυφή στα 7.43 ppm ολοκληρώνεται για 4 πρωτόνια, όσα δηλαδή ακριβώς είναι τα ευκίνητα πρωτόνια των ομάδων  $-\text{NH}_2^+$  και 2(-OH) της διαιθυνολαμίνης. Η επόμενη κορυφή στα 7.26 ppm αντιστοιχεί στον διαλύτη. Οι δύο επόμενες κορυφές ολοκληρώνονται για 4 + 4 πρωτόνια που αντιστοιχούν στα μεθύλια της διαιθυνολαμίνης. Συγκεκριμένα, η κορυφή στα 3.83-3.79 ppm αντιστοιχεί στα 4 πρωτόνια των μεθυλενίων που είναι κοντά στα υδροξύλια (2(- $\text{CH}_2\text{OH}$ )), καθώς είναι πιο απροστάτευτα λόγω της ηλεκτραρνητικότητας του οξυγόνου. Επομένως, η κορυφή στα 3.04-2.99 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια των μεθυλενίων που είναι κοντά στην αμινομάδα ( $\text{NH}_2^+(\text{CH}_2)_2$ ). Οι υπόλοιπες κορυφές στα υψηλότερα επίπεδα ολοκληρώνονται συνολικά για 11 πρωτόνια, όσα δηλαδή είναι και τα πρωτόνια του δακτυλίου του οξέος. Το πρωτόνιο που βρίσκεται πάνω στον αλκυκλικό δακτύλιο και κοντά στο καρβονύλιο είναι το πιο αποπροστατευμένο και αντιστοιχεί στην κορυφή 2.07 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο. Τα υπόλοιπα πρωτόνια των μεθυλενίων του δακτυλίου δεν είναι δυνατό να αντιστοιχηθούν με ακρίβεια, καθώς απαιτείται περαιτέρω ταυτοποίηση με φασματοσκοπία 2D.



Εικόνα 9: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) του κυκλοεξανοϊκού δις(2-υδροξυ-αιθυλ)αμμωνίου (IY)

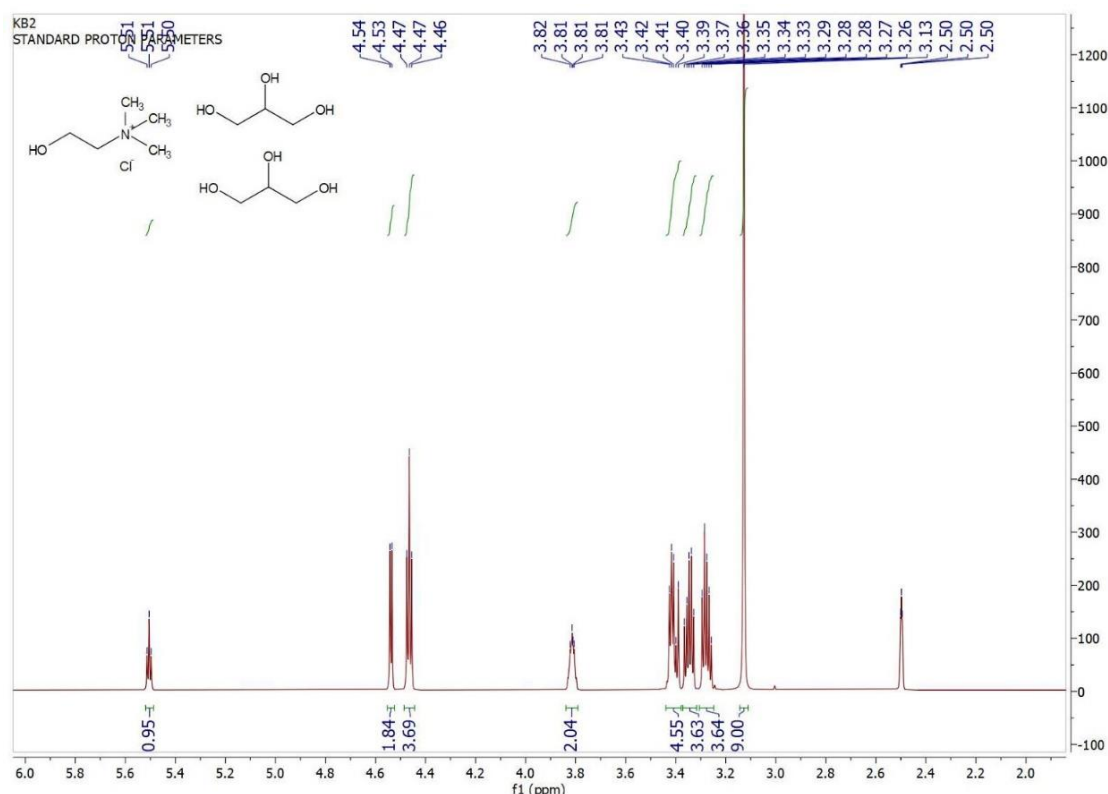
### 6.1.2 Χλωρίδιο χολίνης : γλυκερόλη (DES)

Για τη φασματομέτρηση του χλωριδίου χολίνης-γλυκερόλης στα 600MHz χρησιμοποιήθηκε το δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο ( $\text{DMSO-d}_6$ ) ως διαλύτης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:

**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )**  $\delta$ /ppm: 5.51 (t,  $J = 5.1$  Hz, 1H,  $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ), 4.54 (d,  $J = 4.8$  Hz, 2H, 2(-CHOH)), 4.47 (t,  $J = 5.8$  Hz, 4H, 2(2(-CH $_2$ OH))), 3.85 – 3.78 (m, 2H), 3.47 – 3.38 (m, 4H), 3.35 (dt,  $J = 11.2, 5.7$  Hz, 4H), 3.28 (dt,  $J = 11.0, 5.6$  Hz, 4H), 3.13 (s, 9H, 3(-CH $_3$ ))

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 10, ξεκινώντας από τα υψηλά πεδία, η απλή κορύφη στα 3.13 ppm ολοκληρώνεται για 9 πρωτόνια, τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια των τριών μεθυλίων της χολίνης που είναι τα πιο προστατευμένα. Η κορυφή 2.5 ppm στα χαμηλά πεδία αντιστοιχεί στο διαλύτη ενώ η κορυφή στα 5.51 ppm που ολοκληρώνεται για 1 πρωτόνιο, αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της χολίνης που είναι το πιο απροστάτευτο. Η διπλή κορυφή στα 4.54 ppm ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των υδροξυλίων των δύο μορίων γλυκερόλης που είναι γειτονικά στο μεθυλένιο CH. Η πολλαπλότητα της κορυφής δικαιολογείται από την παρουσία του γειτονικού πρωτονίου στο μεθυλένιο CH. Η τριπλή κορυφή στα 4.47 ppm ολοκληρώνεται για 4 πρωτόνια που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των υδροξυλίων των δύο μορίων γλυκερόλης που είναι γειτονικά με τα  $\text{CH}_2$ . Ομοίως, η παρουσία δύο γειτονικών πρωτονίων δικαιολογεί την πολλαπλότητα της κορυφής. Οι υπόλοιπες κορυφές ολοκληρώνονται για 12 πρωτόνια, όσο και τα 5+5 πρωτόνια των μορίων γλυκερόλης και τα δύο πρωτόνια της χολίνης δίπλα στο  $\text{N}^+$ . Η κορυφή στα 3.85-3.78 ppm ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια που αντιστοιχούν στο  $\text{CH}_2$  που βρίσκεται δίπλα στο  $\text{N}^+$  της χολίνης, τα οποία είναι και πιο αποστράτευτα. Για τα υπόλοιπα πρωτόνια της γλυκερόλης απαιτείται ανάλυση

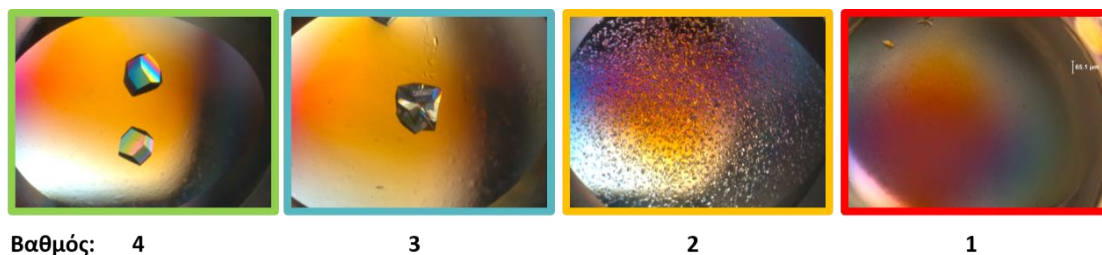
2D για πλήρη ταυτοποίηση. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνονται με βάση τη διαθέσιμη βιβλιογραφία. [85]



Εικόνα 10: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) του χλωριδίου χολίνης-γλυκερόλης (DES)

## 6.2 Κρυστάλλωση Λυσοζύμης

Προκειμένου να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα εύκολα και γρήγορα για κάθε συνθήκη, χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα βαθμολόγησης. Η βαθμολογία του συστήματος κυμαίνεται από 0 έως 4 με βάση την ποιότητα των κρυστάλλων όπως αυτή αποτυπώνεται με οπτική παρατήρηση, με το 4 να ορίζεται ως το βέλτιστο αποτέλεσμα. Επίσης, κάθε βαθμός αντιστοιχίζεται σε ένα χρώμα ως εξής: 0-λευκό, 1-κόκκινο, 2-πορτοκαλί, 3-γαλάζιο, 4-πράσινο (Εικόνα 11, το χρώμα υποδεικνύεται με πλαίσιο γύρω από κάθε φωτογραφία). Το πράσινο αντιπροσωπεύει ευμεγέθεις μονοκρυστάλλους κατάλληλης ποιότητας για περίθλαση ακτίνων Χ, το μπλε μικρότερους μονοκρυστάλλους, παραμορφωμένους ή συσσωματωμένους κρυστάλλους, το πορτοκαλί μικροκρυστάλλους, το κόκκινο καθίζηση και το λευκό διαυγή σταγόνα (clear drop) χωρίς σχηματισμό κρυστάλλων. Στην Εικόνα 11 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά παραδείγματα του συστήματος βαθμολόγησης που χρησιμοποιείται για τους κρυστάλλους λυσοζύμης στην παρούσα εργασία.



Εικόνα 11: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα του συστήματος βαθμολόγησης για τους κρυστάλλους λυσοζύμης.

Καθώς είναι γνωστό ότι η λυσοζύμη κρυσταλλώνεται με σχετική ευκολία σε ευμεγέθεις κρυστάλλους, πολύ μεγαλύτερους από άλλες πρωτεΐνες, στο εξής μεγάλοι θεωρούνται οι κρύσταλλοι που είναι μεγαλύτεροι από 120μm, ενώ μικροκρύσταλλοι θεωρούνται όσοι είναι κάτω από 50μm. Αυτή η παραδοχή βοηθάει να γίνει μια πρώτη εκτίμηση και σύγκριση των μεγεθών των κρυστάλλων για τις διάφορες συνθήκες, ενώ πρέπει να τονιστεί ότι αυτό ισχύει μόνο για τα αποτελέσματα της κρυστάλλωσης της λυσοζύμης.

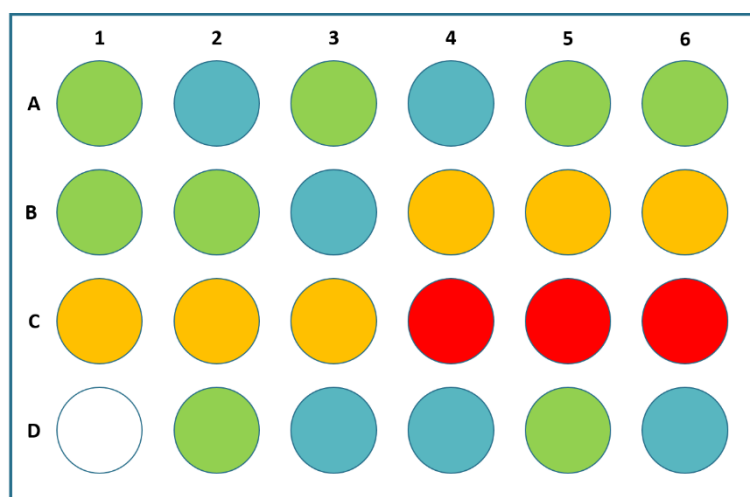
Επίσης, πρέπει να διευκρινιστεί ότι στην περίπτωση που παρατηρείται η παρουσία τόσο μεγάλων κρυστάλλων υψηλής ποιότητας όσο και παραμορφωμένων κρυστάλλων στην ίδια σταγόνα, τότε η συνθήκη χαρακτηρίζεται με βάση την ποιότητα της πλειοψηφίας των κρυστάλλων.

Το σύστημα βαθμολόγησης στηρίζεται μόνο στην εξωτερική ποιότητα των κρυστάλλων, χωρίς να λαμβάνει υπόψιν μικροδιαφορές στο μέγεθος των κρυστάλλων καθώς και το χρόνο σχηματισμού τους. Γι' αυτόν τον λόγο χρησιμοποιείται ως ένα αρχικό εργαλείο διαλογής των επιτυχημένων συνθηκών κατά τις πρώτες δοκιμές κρυστάλλωσης, προκειμένου αυτές να βελτιστοποιηθούν. Η διερεύνηση των υπολοίπων χαρακτηριστικών της κρυστάλλωσης γίνεται στη συνέχεια αναλυτικά.

### 6.2.1 ΙΥ ως πρόσθετο

#### 1<sup>η</sup> δοκιμή κρυστάλλωσης

Μια αρχική δοκιμή κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκε με τη λυσοζύμη για τη διερεύνηση της ικανότητας του ΙΥ να επηρεάσει την κρυστάλλωση. Η πλάκα κρυστάλλωσης καθήμενης σταγόνας περιείχε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις παράγοντα καταβύθισης (NaCl) και διαφορετικές συγκεντρώσεις ΙΥ, ενώ ανά 3 πηγάδια η συνθήκη επαναλαμβάνεται, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως στον Πίνακα 3. Η πλάκα κρυστάλλωσης της 1<sup>ης</sup> δοκιμής ελέγχθηκε για σχηματισμό κρυστάλλων μετά από 2 ώρες, 5 ώρες, 1 μέρα και 1 εβδομάδα. Τα αποτελέσματα της 1<sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης της λυσοζύμης παρουσία ΙΥ ως πρόσθετο μετά από 1 εβδομάδα συνοψίζονται στο Σχήμα 15 με βάση το εφαρμοζόμενο σύστημα βαθμολόγησης.



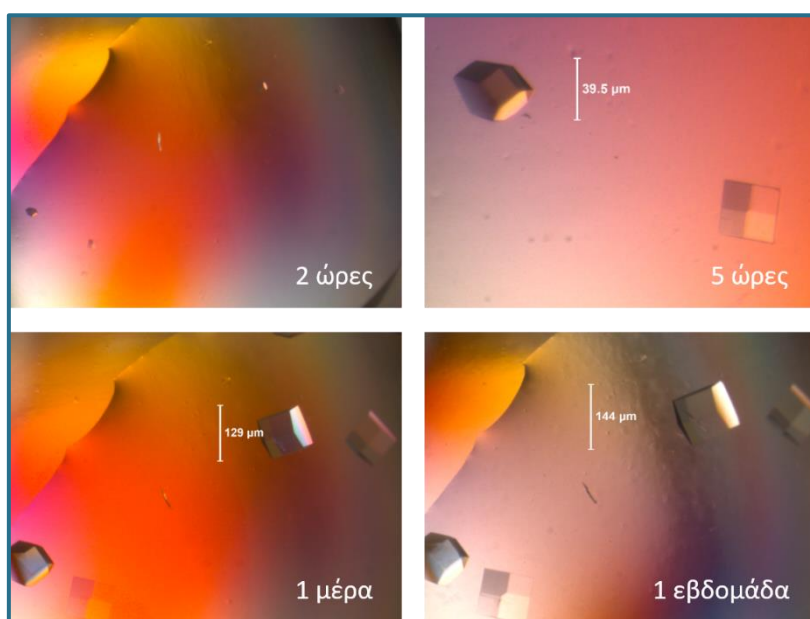
Σχήμα 15: Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της 1<sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης της λυσοζύμης παρουσία ΙΥ ως πρόσθετο μετά από 1 εβδομάδα. Τα A1-A3 είναι τα πειράματα αναφοράς (απουσία ΙΥ) για 4% (w/v) NaCl και τα D1-D3 για 2% (w/v) NaCl.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 15, τα αποτελέσματα της 1<sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης δείχνουν ότι το ΙΥ ως πρόσθετο επηρέασε την κρυστάλλωση της λυσοζύμης, αφού ελήφθησαν



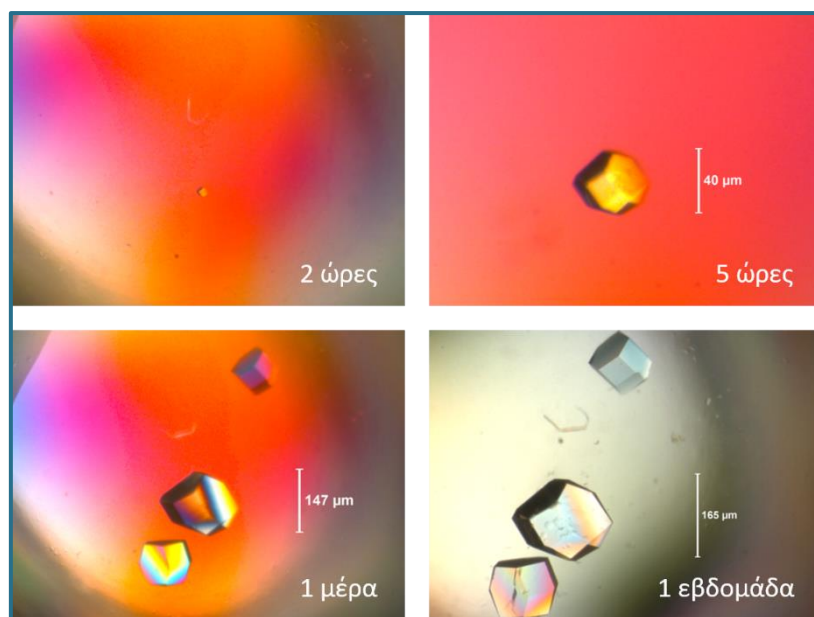
κρύσταλλοι για όλες τις συνθήκες της πλάκας. Ωστόσο, ο χρόνος σχηματισμού, ο αριθμός, το μέγεθος και η μορφολογία των κρυστάλλων παρουσιάζουν διαφορές. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται περιληπτικά τα αποτελέσματα για κάθε συνθήκη της 1<sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης.

Η συνθήκη αναφοράς παρουσία 4% (w/v) NaCl οδήγησε στον σχηματισμό κρυστάλλων, αντίστοιχων με αυτούς που περιγράφονται στη βιβλιογραφία, τετραγωνικού πλέγματος συμμετρίας, ήδη από τις πρώτες 2 ώρες παρατήρησης, όπως αναμενόταν. [71] Μετά από 5 ώρες, οι κρύσταλλοι είχαν ήδη φτάσει σε μέγεθος > 35  $\mu\text{m}$ , καταλήγοντας στην τάξη των 130 - 200  $\mu\text{m}$  σε μέγεθος μετά από 1 εβδομάδα. Παρατηρείται επίσης αύξηση του αριθμού κρυστάλλων στη σταγόνα μετά από 1 μέρα. Οι περισσότεροι από τους κρυστάλλους είναι μονοκρύσταλλοι, καλοσχηματισμένοι, με καθορισμένες ακμές, υψηλής ποιότητας για περίθλαση ακτίνων Χ, ενώ παρατηρήθηκε και ο σχηματισμός ορισμένων παραμορφωμένων κρυστάλλων με ημιτελή άκρα και ρωγμές.



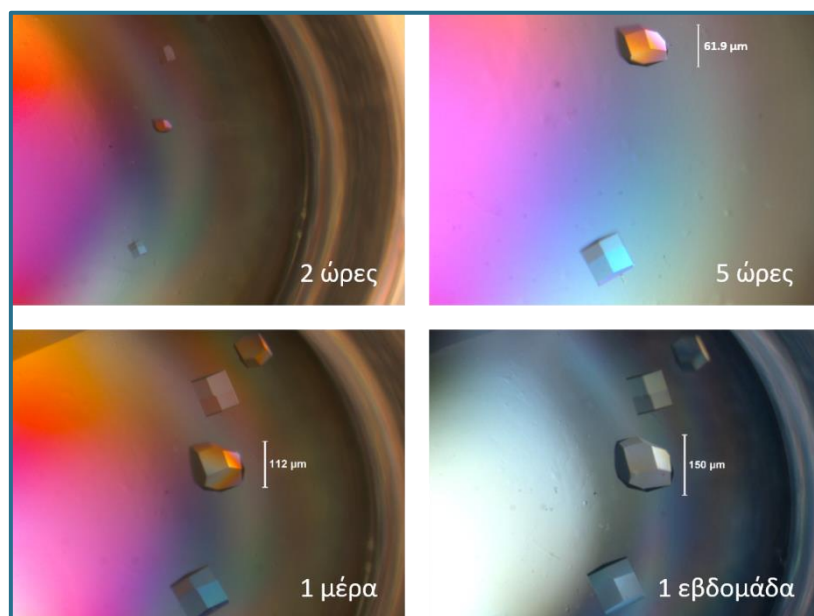
Εικόνα 12: Κρύσταλλοι λυσοζύμης που αναπτύχθηκαν παρουσία 4% (w/v) NaCl απουσία προσθέτων με την πάροδο του χρόνου.

Παρουσία 0.5% (w/v) ΙΥ ως πρόσθετου, παρατηρούνται σχεδόν ίδια αποτελέσματα με την συνθήκη αναφοράς. Οι κρύσταλλοι αναπτύσσονται με παρόμοιο ρυθμό ενώ καταλήγουν σε όμοια τάξη μεγέθους, με αρκετούς κρυστάλλους να ξεπερνούν σε μέγεθος αυτούς της συνθήκης αναφοράς. Η μορφολογία και η ποιότητα των κρυστάλλων παραμένει ίδια, όπως φαίνεται στην Εικόνα 13.



Εικόνα 13: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 0.5% (v/v) ΙΥ με την πάροδο του χρόνου.

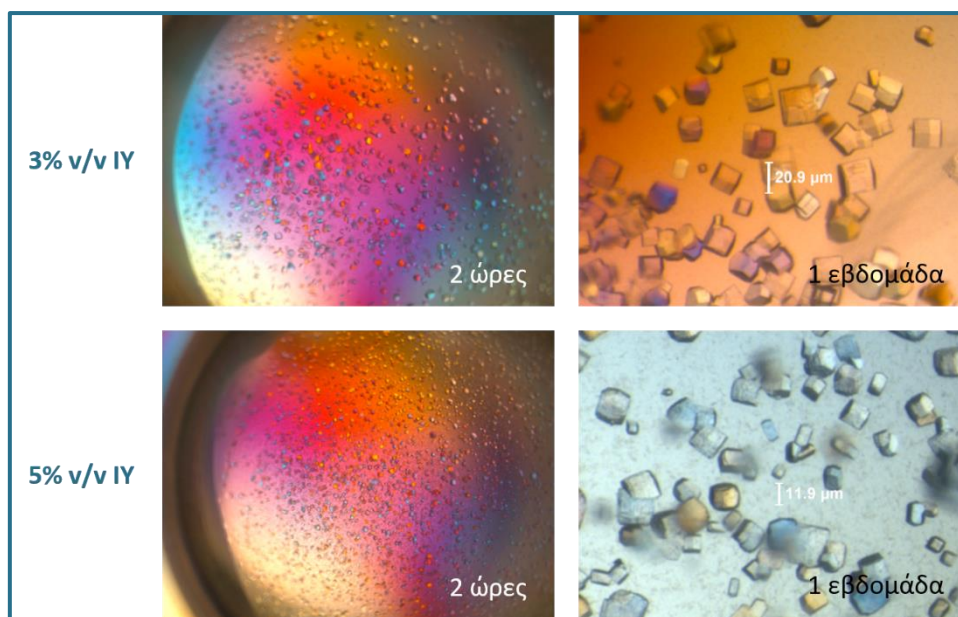
Παρουσία 1% (w/v) ΙΥ ως πρόσθετου, παρατηρούνται παρόμοια αποτελέσματα με τη συνθήκη αναφοράς. Ωστόσο, ο ρυθμός αύξησης του μεγέθους των κρυστάλλων είναι μεγαλύτερος κατά τις πρώτες ώρες. Χαρακτηριστικά, συγκρίνοντας την Εικόνα 12 με την Εικόνα 14, παρατηρείται ότι μετά από 5 ώρες οι κρύσταλλοι παρουσία 1% (v/v) ΙΥ είναι σχεδόν κατά 40% μεγαλύτεροι (60  $\mu\text{m}$ ) σε μέγεθος σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (40  $\mu\text{m}$ ). Η μορφολογία και η ποιότητα των κρυστάλλων παραμένει και εδώ ίδια.



Εικόνα 14: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 1% (v/v) ΙΥ με την πάροδο του χρόνου.

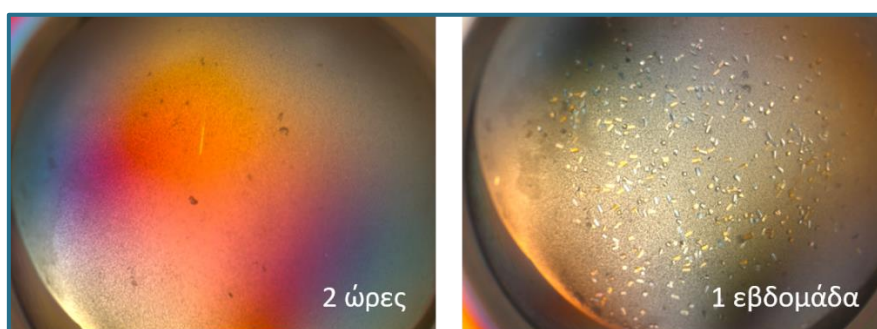
Αυξάνοντας τη συγκέντρωση του ΙΥ στη σταγόνα κρυστάλλωσης, παρατηρούνται μικρότεροι και περισσότεροι κρύσταλλοι. Συγκεκριμένα, παρουσία 3 και 5 % (v/v) ΙΥ, σχηματίστηκαν πολλοί κρύσταλλοι μεγέθους της τάξης των 20 και 10  $\mu\text{m}$  αντίστοιχα για κάθε συνθήκη ήδη από τις πρώτες 2 ώρες, ενώ τα αποτελέσματα παρέμειναν αμετάβλητα με την πάροδο του χρόνου, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 15.





Εικόνα 15: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 3% (v/v) ΙΥ (πάνω) και 5% (v/v) ΙΥ (κάτω) μετά από 2 ώρες και 1 εβδομάδα.

Τέλος, παρουσία 10% (v/v) ΙΥ, παρατηρήθηκαν τα χειρότερα αποτελέσματα. Αυτή η συγκέντρωση προσθέτου ήταν η μεγαλύτερη που δοκιμάστηκε και είχε ως αποτέλεσμα την έντονη καθίζηση της πρωτεΐνης ήδη από τις πρώτες 2 ώρες. Σταδιακά, παρατηρήθηκε και ο σχηματισμός μικροκρυστάλλων 20-40 μm.

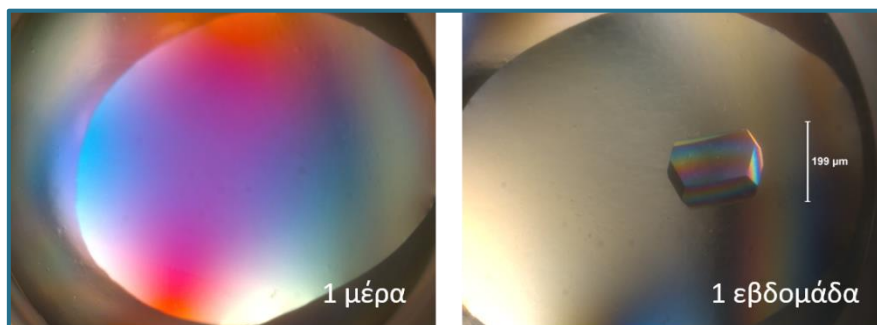


Εικόνα 16: Αποτελέσματα κρυστάλλωσης της λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 10% (v/v) ΙΥ μετά από 2 ώρες και 1 εβδομάδα.

Συνοψίζοντας τις παρατηρήσεις για 4% (w/v) συγκέντρωση του παράγοντα κατακρήμνισης NaCl, τα βέλτιστα αποτελέσματα παρουσιάζονται για τις δύο μικρότερες συγκεντρώσεις ΙΥ που δοκιμάστηκαν, δηλαδή 0.5 και 1% (v/v) στην σταγόνα κρυστάλλωσης. Τα αποτελέσματα αυτά είναι παρόμοια με της συνθήκης αναφοράς, όμως παρουσιάζουν ορισμένες διαφορές ως προς τον ρυθμό αύξησης τους μεγέθους των κρυστάλλων και το τελικό τους μέγεθος. Η ποιότητα των κρυστάλλων είναι επίσης όμοια, ενώ παρατηρήθηκε και ο σχηματισμός ορισμένων παραμορφωμένων κρυστάλλων με ρωγμές για αυτές τις συνθήκες σε ορισμένες σταγόνες. Αντιθέτως, υψηλότερες συγκεντρώσεις ΙΥ είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των κρυστάλλων και τη ραγδαία μείωση του μεγέθους τους. Συγκεκριμένα, η τάξη μεγέθους των κρυστάλλων των προηγούμενων συνθηκών, συμπεριλαμβανομένης και της συνθήκης αναφοράς, είναι 140-200 μm ενώ τώρα μόλις 10-20 μm. Τέλος, η μεγαλύτερη συγκέντρωση προσθέτου που εφαρμόστηκε σε αυτήν τη δοκιμή, δηλαδή 10% (v/v) ΙΥ, οδήγησε στην καθίζηση της λυσοζύμης με

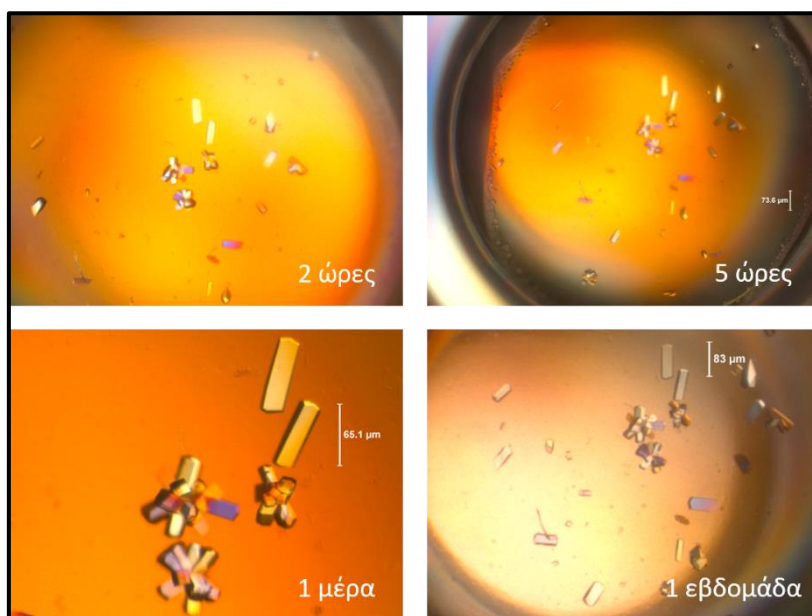
παράλληλη ανάπτυξη μικροκρυστάλλων. Όλες οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν για τη συγκεκριμένη συγκέντρωση παράγοντα κατακρήμνισης, οδήγησαν στο σχηματισμό κρυστάλλων ίδιας μορφολογίας με τη συνθήκη αναφοράς.

Σε αυτήν τη δοκιμή, εξετάστηκε επίσης η επίδραση του ΙΥ, μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση του παράγοντα κατακρήμνισης (NaCl) από 4% (w/v) σε 2% (w/v) στη σταγόνα κρυστάλλωσης. Δοκιμάστηκε μία μόνο συγκέντρωση προσθέτου ΙΥ στα 3% (v/v), προκειμένου να γίνει μία πρώτη εκτίμηση. Πράγματι, απουσία προσθέτου σχηματίστηκε μόνο ένας μεγάλος, καλής ποιότητας κρύσταλλος σε ένα μόνο πηγάδι, ο οποίος παρατηρήθηκε μετά από 1 εβδομάδα.



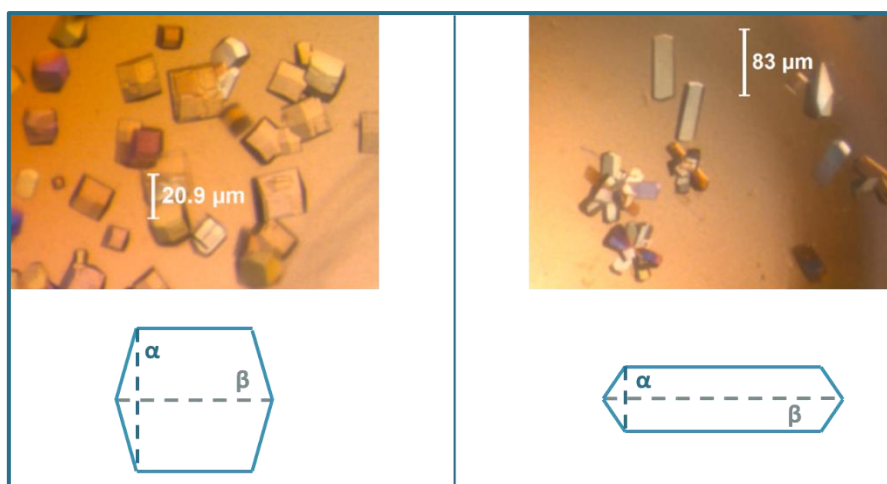
Εικόνα 17: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 2% (w/v) NaCl απουσία ΙΥ μετά από 1 μέρα και 1 εβδομάδα.

Παρουσία 3% (v/v) ΙΥ, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κρυστάλλων ήδη μέσα στις πρώτες 2 ώρες σε όλα τα πηγάδια. Οι κρύσταλλοι μεταβλήθηκαν ελάχιστα με την πάροδο του χρόνου, παραμένοντας στην τάξη των 60-80 μm σε μέγεθος.



Εικόνα 18: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 2% (w/v) NaCl παρουσία 3% (v/v) ΙΥ με την πάροδο του χρόνου.

Ωστόσο, η πιο ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι για 2% (w/v) NaCl και 3% (v/v) ΙΥ σχηματίζονται κρύσταλλοι διαφορετικής μορφολογίας σε σχέση με όλες τις προηγούμενες συνθήκες του πιάτου, ακόμη και της συνθήκης αναφοράς για 2% (w/v) NaCl. Συγκεκριμένα, οι περισσότεροι κρύσταλλοι που σχηματίζονται είναι ραβδόμορφοι, ενώ πολλοί από αυτούς συμμετέχουν στο σχηματισμό μεγαλύτερων συμπλεγμάτων (clusters). Η σύγκριση της μορφολογίας των κρυστάλλων υποδεικνύεται στην Εικόνα 19.



Εικόνα 19: Αριστερά κρύσταλλοι λυσοζύμης παρουσία 4% (w/v) NaCl και 3% (v/v) ΙΥ. Δεξιά κρύσταλλοι λυσοζύμης παρουσία 2% (w/v) NaCl και 3% (v/v) ΙΥ. Στα δεξιά οι κρύσταλλοι είναι ραβδόμορφοι, καθώς παρουσιάζεται μεγαλύτερη ανάπτυξη προς μια μόνο κατεύθυνση (β), σε αντίθεση με τους κρυστάλλους στα αριστερά που αναπτύσσονται παρόμοια και στις δύο κατευθύνσεις (α και β).

Με βάση όλες τις παραπάνω παρατηρήσεις παρουσιάζεται αναλυτικά η βαθμολογία των συνθηκών στον Πίνακα 6, με βάση το μέσο όρο της βαθμολογίας των τριών σταγόνων κάθε συνθήκης.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα 1<sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης της λυσοζύμης παρουσία ΙΥ ως προσθέτου. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος της βαθμολογίας των τριών σταγόνων κάθε συνθήκης.

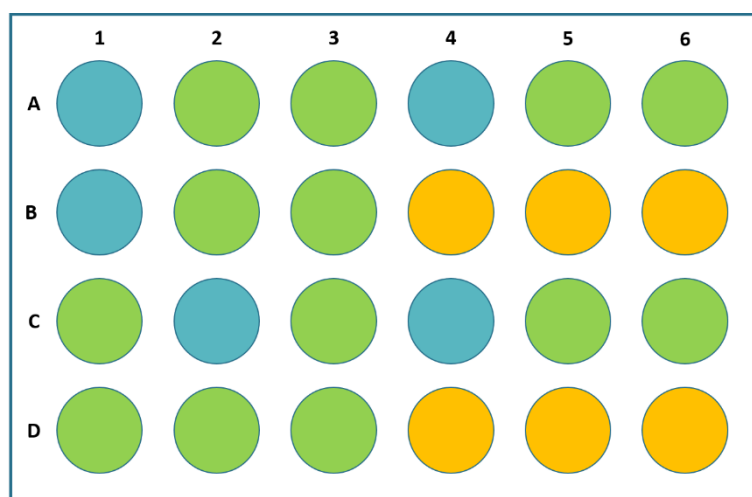
| Συνθήκη                        | Μέσος όρος βαθμολογίας |
|--------------------------------|------------------------|
| <b>Αναφοράς: 4% (w/v) NaCl</b> | <b>3.7</b>             |
| 0.5% (v/v) ΙΥ                  | 3.7                    |
| 1% (v/v) ΙΥ                    | 3.7                    |
| 3% (v/v) ΙΥ                    | 2.0                    |
| 5% (v/v) ΙΥ                    | 2.0                    |
| 10% (v/v) ΙΥ                   | 1.0                    |
| <b>Αναφοράς: 2% (w/v) NaCl</b> | <b>2.3</b>             |
| 3% (v/v) ΙΥ                    | 3.3                    |

Με βάση τη βαθμολογία των συνθηκών είναι σαφές ότι το ΙΥ είχε επίδραση στην κρυστάλλωση της λυσοζύμης, αφού οι συνθήκες παρουσιάζουν μεταβολή της βαθμολογίας. Για 4% (w/v) συγκέντρωση παράγοντα κατακρήμνισης NaCl, οι συγκεντρώσεις 0.5 και 1% (v/v) ΙΥ είχαν παρόμοια αποτελέσματα στην ποιότητα των κρυστάλλων σε σχέση με την συνθήκη αναφοράς, γι' αυτό παρουσιάζουν και ίδια βαθμολογία. Ωστόσο, οι διαφορές έγκεινται κυρίως στον χρόνο ανάπτυξης των κρυστάλλων καθώς και στο τελικό τους μέγεθος. Αντιθέτως, μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ΙΥ είχαν χειρότερα αποτελέσματα σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς, παρουσιάζοντας μικρότερη βαθμολογία. Για 2% (w/v) συγκέντρωση παράγοντα κατακρήμνισης NaCl, η παρουσία ΙΥ οδήγησε στο σχηματισμό διαφορετικής μορφολογίας κρυστάλλων ήδη από τις πρώτες δύο ώρες. Αντιθέτως, στην συνθήκη αναφοράς παρουσιάστηκε ο σχηματισμός ενός μόνο μεγάλου κρυστάλλου μετά

από 1 εβδομάδα, χωρίς επαναληψιμότητα στα υπόλοιπα πηγάδια. Γι' αυτό το λόγο, η συνθήκη παρουσίας προσθέτου παρουσιάζει υψηλότερη βαθμολογία από την συνθήκη αναφοράς.

### 2<sup>η</sup> δοκιμή κρυστάλλωσης:

Οι παραπάνω παρατηρήσεις και το σύστημα βαθμολόγησης αποτέλεσαν τη βάση της 2<sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης της λυσοζύμης με χρήση ΙΥ ως πρόσθετου. Ο στόχος αυτής της δοκιμής είναι η επιβεβαίωση των προηγούμενων αποτελεσμάτων και η περαιτέρω βελτιστοποίηση των συνθηκών κρυστάλλωσης με χρήση ΙΥ ως πρόσθετου. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν εκ νέου οι συνθήκες με 4% NaCl και 0.5% και 1% (v/v) ΙΥ, προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα προηγούμενα αποτελέσματα. Επίσης, δοκιμάστηκε και η συγκέντρωση 2% (v/v) ΙΥ, μικρότερη από τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της 1<sup>ης</sup> δοκιμής που είχαν χειρότερα αποτελέσματα από την συνθήκη αναφοράς, προκειμένου να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση ΙΥ. Ακόμη, η συγκέντρωση του παράγοντα κατακρήμνισης NaCl μεταβλήθηκε σε συγκέντρωση 3% (w/v), η οποία πιθανότατα δίνει καλύτερα και γρηγορότερα αποτελέσματα στην συνθήκη αναφοράς από 2% (w/v) και μπορεί να ερευνηθεί εκ νέου η επίδραση του προσθέτου σε σχέση με τη συγκέντρωση του παράγοντα κατακρήμνισης. Η πλάκα κρυστάλλωσης ελέγχθηκε μετά από 1 ώρα, 3 ώρες, 5 ώρες και 1 μέρα, προκειμένου να διερευνηθεί ο χρόνος ανάπτυξης των κρυστάλλων πιο νωρίς από τις 2 ώρες, σε σχέση με την προηγούμενη δοκιμή. Τα αποτελέσματα της 2<sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης της λυσοζύμης μετά από 1 μέρα παρουσία ΙΥ ως προσθέτου συνοψίζονται στο Σχήμα 16.



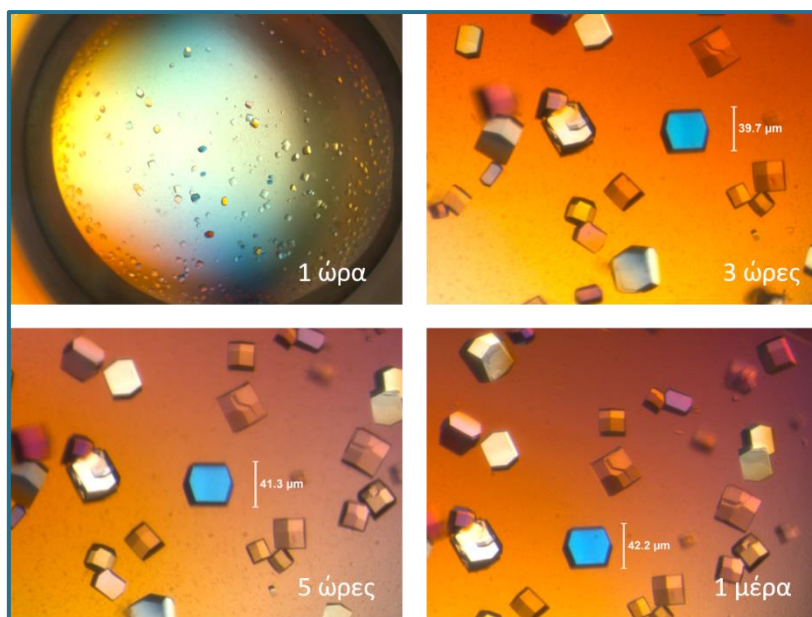
Σχήμα 16: Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της 2<sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης της λυσοζύμης παρουσία ΙΥ ως πρόσθετο μετά από 1 μέρα. Τα A1-A3 είναι τα πειράματα αναφοράς (απουσία ΙΥ) για 4% (w/v) NaCl και τα C1-C3 για 3% (w/v) NaCl. Τα αποτελέσματα χρωματίζονται με βάση το σύστημα βαθμολόγησης.

Πράγματι τα αποτελέσματα για 4% (w/v) NaCl επιβεβαιώνουν τις προηγούμενες παρατηρήσεις της 1<sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης. Τόσο η συνθήκη αναφοράς όσο και οι συνθήκες με 0.5 και 1% (v/v) ΙΥ, παρουσιάζουν όμοια αποτελέσματα με αυτά της 1<sup>ης</sup> δοκιμής. Οι κρύσταλλοι σχηματίζονται για όλες τις συνθήκες ήδη από την 1<sup>η</sup> ώρα παρατήρησης, καταλήγοντας σε τάξη μεγέθους 130-200 μm. Η ποιότητα, η μορφή και το μέγεθος των τελικών κρυστάλλων καθώς και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων είναι παρόμοια και για τις 3 συνθήκες, όπως παρουσιάστηκε κατά την 1<sup>η</sup> δοκιμή κρυστάλλωσης.

Όπως υποδεικνύεται και από το Σχήμα 16, η συγκέντρωση 2% (v/v) ΙΥ οδήγησε στον σχηματισμό μικροκρυστάλλων. Ομοίως με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ΙΥ που εξετάστηκαν στην 1<sup>η</sup> δοκιμή κρυστάλλωσης, οι κρύσταλλοι σχηματιστήκαν ήδη από την 1<sup>η</sup>

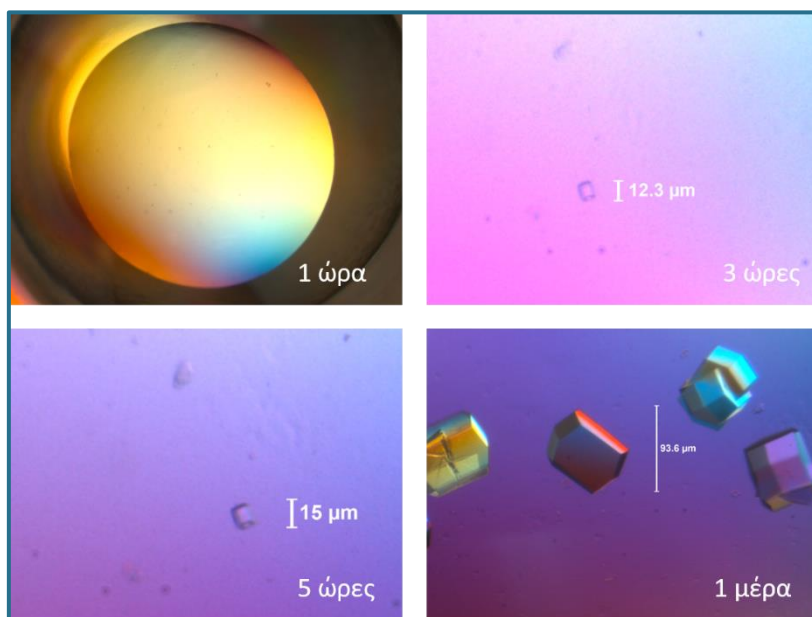


ώρα παρατήρησης και παρέμειναν σχεδόν αμετάβλητοι με την πάροδο του χρόνου. Ωστόσο, όπως προκύπτει και από την Εικόνα 20, είναι εμφανώς μεγαλύτεροι αφού είναι της τάξης μεγέθους 40 - 45  $\mu\text{m}$ , δηλαδή διπλάσιοι σε σχέση με αυτούς που σχηματίστηκαν παρουσία 3% (v/v) ΙΥ (περίπου 20  $\mu\text{m}$ ), ενώ είναι και πολύ μικρότεροι σε αριθμό.



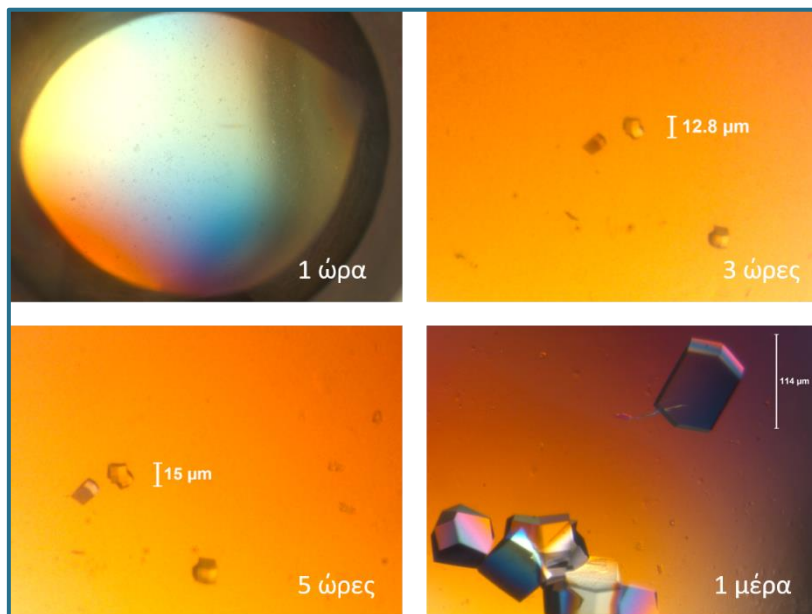
Εικόνα 20: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 2% (v/v) ΙΥ με την πάροδο του χρόνου.

Στην ίδια δοκιμή κρυστάλλωσης, διερευνήθηκε και μια δεύτερη συγκέντρωση παράγοντα κατακρήμνισης NaCl, στα 3% (w/v). Εφόσον αυτή η συγκέντρωση είναι νέα και δεν εξετάστηκε κατά την 1<sup>η</sup> δοκιμή, στη συνέχεια παρουσιάζεται περιληπτικά κάθε συνθήκη της. Για την συνθήκη αναφοράς 3% (w/v) NaCl, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κρυστάλλων ήδη από τις πρώτες 3 ώρες, χωρίς αυτό ωστόσο να εμφανίζει επαναληψιμότητα για όλες τις σταγόνες. Μετά από 1 μέρα παρατηρείται μεγαλύτερος αριθμός κρυστάλλων της τάξης των 90-110  $\mu\text{m}$ .



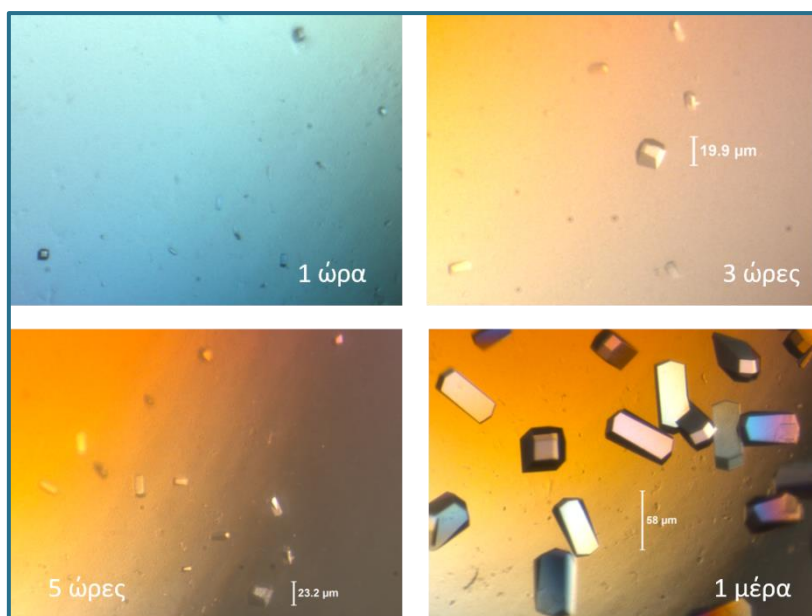
Εικόνα 21: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 3% (w/v) NaCl απουσία ΙΥ με την πάροδο του χρόνου.

Παρουσία 0.5% (v/v) ΙΥ στη σταγόνα κρυστάλλωσης παρατηρείται η ανάπτυξη μικροκρυστάλλων μετά από 3 ώρες. Οι κρύσταλλοι αυτοί αναπτύσσονται με όμοιο ρυθμό με τη συνθήκη αναφοράς, καταλήγοντας σε παρόμοιο τελικό μέγεθος. Παρατηρείται ο σχηματισμός κρυστάλλων όμοιας μορφολογίας με την σταγόνα αναφοράς αλλά και κρύσταλλοι που μοιάζουν με ραβδόμορφους.



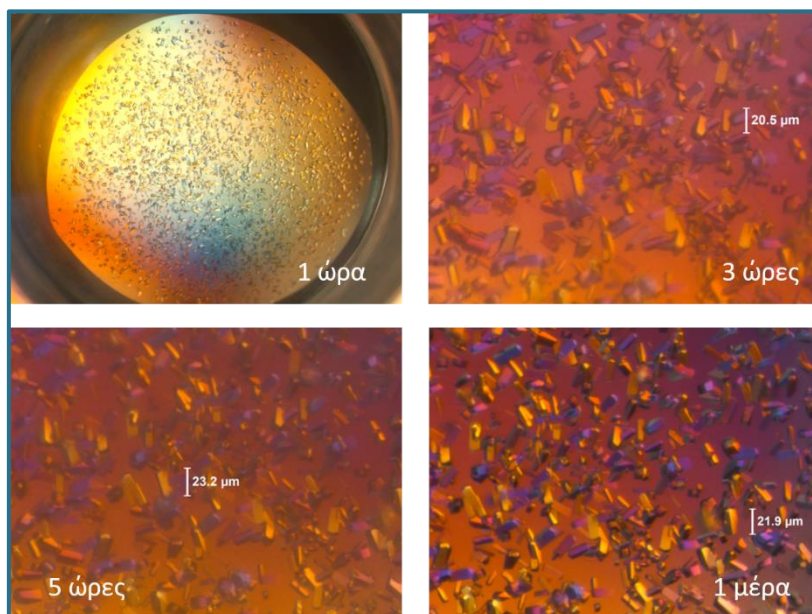
Εικόνα 22: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 3% (w/v) NaCl και 0.5% (v/v) ΙΥ με την πάροδο του χρόνου.

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και για 1% (v/v) ΙΥ. Μικροκρύσταλλοι σχηματίζονται από την 1<sup>η</sup> ώρα κρυστάλλωσης και αναπτύσσονται σταδιακά σε μεγαλύτερους κρυστάλλους. Οι περισσότεροι κρύσταλλοι εδώ είναι ραβδόμορφοι, μικρότερου τελικού μεγέθους από ότι οι προηγούμενες συνθήκες.



Εικόνα 23: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 3% (w/v) NaCl και 1% (v/v) ΙΥ με την πάροδο του χρόνου.

Τέλος, παρουσία 2% (v/v) ΙΥ, σχηματίστηκαν πολλοί μικροκρύσταλλοι γύρω στα 20μm, ήδη από την 1<sup>η</sup> ώρα κρυστάλλωσης. Η εικόνα των σταγόνων παρέμεινε ίδια με την πάροδο του χρόνου. Όλοι οι κρύσταλλοι που σχηματίστηκαν είναι ραβδόμορφοι.



Εικόνα 24: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 3% (w/v) NaCl και 2% (v/v) ΙΥ με την πάροδο του χρόνου.

Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις συνοψίζονται στον Πίνακα 7, όπου παρουσιάζεται η αναλυτική βαθμολογία των συνθηκών που δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα 2<sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης της λυσοζύμης παρουσία ΙΥ ως προσθέτου. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος της βαθμολογίας των τριών σταγόνων κάθε συνθήκης.

| Συνθήκη                        | Μέσος όρος βαθμολογίας |
|--------------------------------|------------------------|
| <b>Αναφοράς: 4% (w/v) NaCl</b> | <b>3.7</b>             |
| 0.5% (v/v) ΙΥ                  | 3.7                    |
| 1% (v/v) ΙΥ                    | 3.7                    |
| 2% (v/v) ΙΥ                    | 2.0                    |
| <b>Αναφοράς: 3% (w/v) NaCl</b> | <b>3.7</b>             |
| 0.5% (v/v) ΙΥ                  | 3.7                    |
| 1% (v/v) ΙΥ                    | 4.0                    |
| 2% (v/v) ΙΥ                    | 2.0                    |

Η βαθμολογία των συνθηκών οδηγεί σε παρόμοιες παρατηρήσεις με την 1<sup>η</sup> δοκιμή, αφού τα αποτελέσματα για 4% (w/v) NaCl και 0.5 και 1% (v/v) ΙΥ παρουσιάζουν ίδια βαθμολογία. Ωστόσο, η νέα συγκέντρωση παράγοντα κατακρήμνισης που δοκιμάστηκε στα 3% (w/v) NaCl, εμφανίζει καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με 2% (w/v). Οι συγκεντρώσεις 0.5 και 1% (v/v) ΙΥ παρουσιάζουν τα βέλτιστα αποτελέσματα και για τις δύο συγκεντρώσεις παράγοντα κατακρήμνισης, ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ΙΥ φαίνεται πως οδηγούν σε χειρότερα αποτελέσματα σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς.

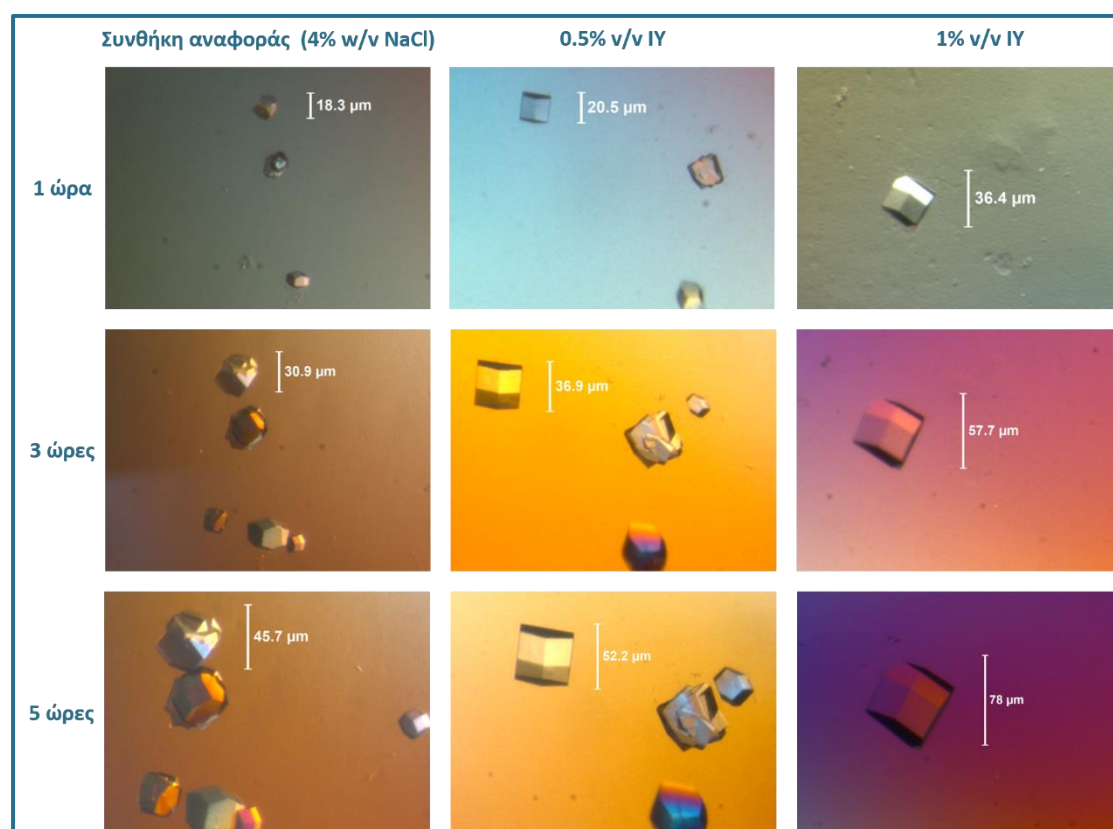


Εφόσον παρουσιάστηκαν τα αποτελέσματα κάθε συνθήκης της 2<sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης της λυσοζύμης παρουσία ΙΥ ως προσθέτου, τα οποία επιβεβαιώνουν και τις παρατηρήσεις της 1<sup>ης</sup> δοκιμής, στη συνέχεια γίνεται μια πιο λεπτομερής ανάλυση των αποτελεσμάτων ως προς το ρυθμό αύξησης μεγέθους, τον αριθμό, τη μορφολογία και το τελικό μέγεθος των κρυστάλλων.

#### *Ρυθμός αύξησης μεγέθους κρυστάλλων λυσοζύμης*

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι συνθήκες με βάση το σύστημα βαθμολόγησης παρουσιάζουν όμοια αποτελέσματα μετά από 24 ώρες. Ωστόσο, η βασική διαφορά έγκειται στον ρυθμό ανάπτυξης του μεγέθους των κρυστάλλων τις πρώτες ώρες της κρυστάλλωσης.

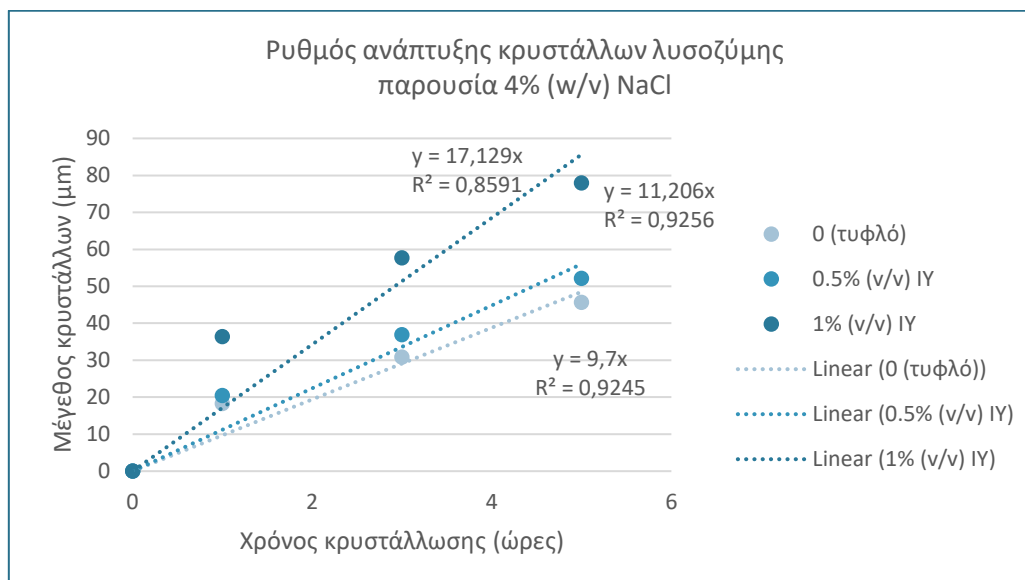
Στην περίπτωση της συγκέντρωσης 4% (w/v) NaCl και παρουσία ΙΥ, παρατηρείται επιτάχυνση της διαδικασίας κρυστάλλωσης, ήδη από τις πρώτες ώρες της κρυστάλλωσης. Σε συγκέντρωση 1% (v/v) ΙΥ, οι κρύσταλλοι που σχηματίζονται είναι πιο μεγάλοι στον ίδιο χρόνο σε σχέση με την συνθήκη αναφοράς. Η διαφορά του μεγέθους των κρυστάλλων είναι κατά 20  $\mu\text{m}$  περίπου. Για 0.5% (v/v) ΙΥ, παρατηρείται ελάχιστη αύξηση του ρυθμού αύξησης των κρυστάλλων. Ενδεικτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 25 τις πρώτες ώρες της κρυστάλλωσης. Η συνθήκη 2% (v/v) ΙΥ δεν περιλαμβάνεται καθώς οι κρύσταλλοι παραμένουν σχετικά αμετάβλητοι με την πάροδο του χρόνου, όπως παρουσιάστηκε και στην Εικόνα 20.



Εικόνα 25: Εξέλιξη του μεγέθους των κρυστάλλων λυσοζύμης παρουσία 0.5 και 1% (v/v) ΙΥ μετά από 1, 3 και 5 ώρες σε σχέση με την συνθήκη αναφοράς για 4% (w/v) NaCl.

Τα δεδομένα της Εικόνα 25 ποσοτικοποιούνται επίσης και παρουσιάζονται με τη μορφή διαγράμματος στο Γράφημα 3. Πράγματι, παρατηρείται ο σχηματισμός μεγαλύτερων κρυστάλλων παρουσία ΙΥ στον ίδιο χρόνο. Τα ταχύτερα αποτελέσματα παρουσιάζονται για

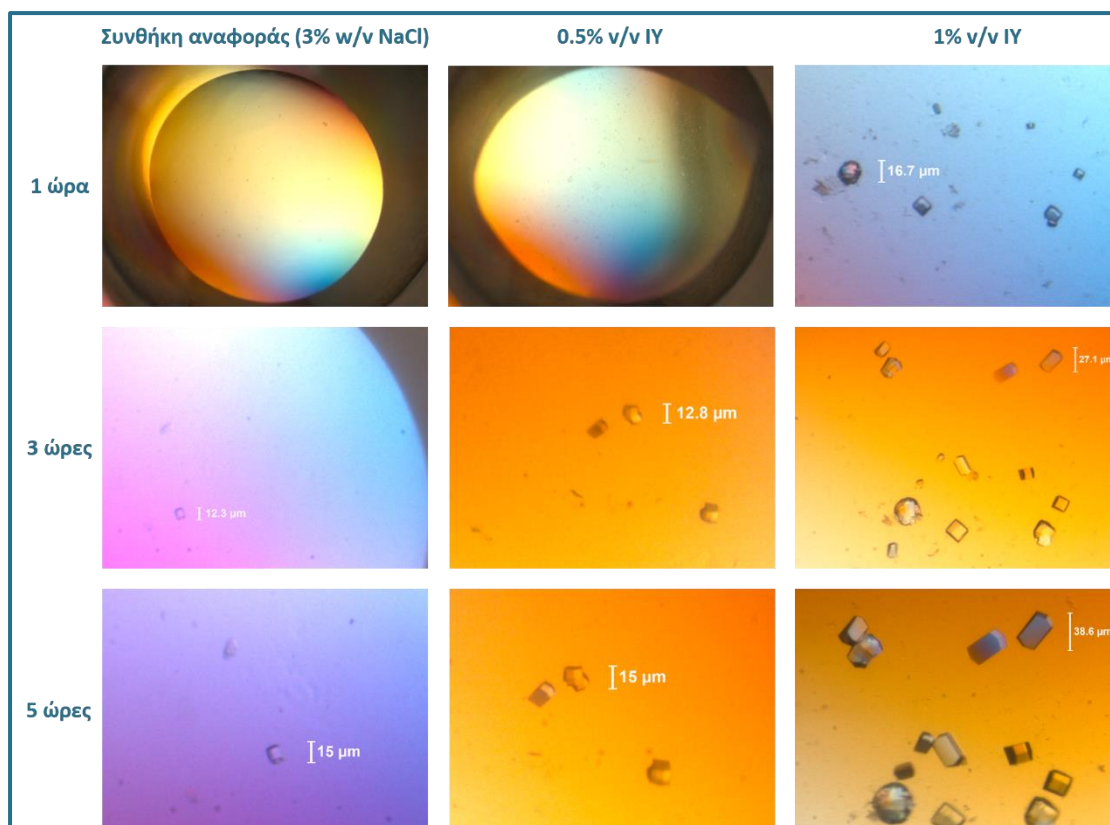
συγκέντρωση 1% (v/v) ΙΥ στη σταγόνα κρυστάλλωσης, αφού ήδη από την 1<sup>η</sup> ώρα παρατήρησης, σχηματίζονται κρύσταλλοι της τάξης των 35μm.



Γράφημα 3: Ρυθμός αύξησης μεγέθους των κρυστάλλων λυσοζύμης παρουσία 4% (w/v) NaCl για διαφορετικές συγκεντρώσεις ΙΥ.

Όλες οι συνθήκες παρουσιάζουν γραμμική αύξηση του μεγέθους των κρυστάλλων συναρτήσει του χρόνου κρυστάλλωσης. Με βάση την κλίση, υπολογίζεται ο ρυθμός αύξησης μεγέθους των κρυστάλλων λυσοζύμης τις πρώτες ώρες της κρυστάλλωσης. Για 1% (v/v) ΙΥ, παρατηρείται ο μεγαλύτερος ρυθμός στα 17.1 μm/ώρα, ενώ ακολουθεί η συγκέντρωση 0.5% (v/v) με 11.2 μm/ώρα.

Παρόμοια αποτελέσματα αλλά όχι τόσο έντονα παρατηρούνται και για 3% (w/v) NaCl, όπως παρουσιάζονται ενδεικτικά στην Εικόνα 26 για την συνθήκη αναφοράς και για παρουσία 0.5 και 1% (v/v) ΙΥ. Τόσο η συνθήκη αναφοράς όσο και η μικρότερη συγκέντρωση ΙΥ που δοκιμάστηκε, απέδωσαν μικροκρυστάλλους της τάξης των 10-15 μm μετά από 3 ώρες, οι οποίοι παρουσιάζουν παρόμοια μεταβολή μεγέθους. Ωστόσο, αυτή η παρατήρηση δεν παρουσιάζει επαναληψιμότητα καθώς παρατηρήθηκε μόνο για μια σταγόνα με τη συνθήκη αναφοράς. Αντιθέτως, υψηλότερη συγκέντρωση ΙΥ απέδωσε κρυστάλλους ήδη από την 1<sup>η</sup> ώρα παρατήρησης για όλες τις σταγόνες. Για 1% (v/v) ΙΥ, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κρυστάλλων 15μm την 1<sup>η</sup> ώρα, οι οποίοι σταδιακά αναπτύσσονται σε μέγεθος. Ωστόσο, οι κρύσταλλοι που είναι μεγαλύτεροι σε μέγεθος κατά την ίδια ώρα παρατήρησης σε σχέση με τις προηγούμενες συνθήκες, διαφέρουν ως προς τη μορφολογία. Συνεπώς, η εύρεση του ρυθμού αύξησης του μεγέθους των κρυστάλλων σε αυτή την περίπτωση δεν κρίνεται αναγκαία, αφού διαφορετικής μορφολογίας κρύσταλλοι, αναπτύσσονται με διαφορετικό ρυθμό και καταλήγουν σε διαφορετικό τελικό μέγεθος.

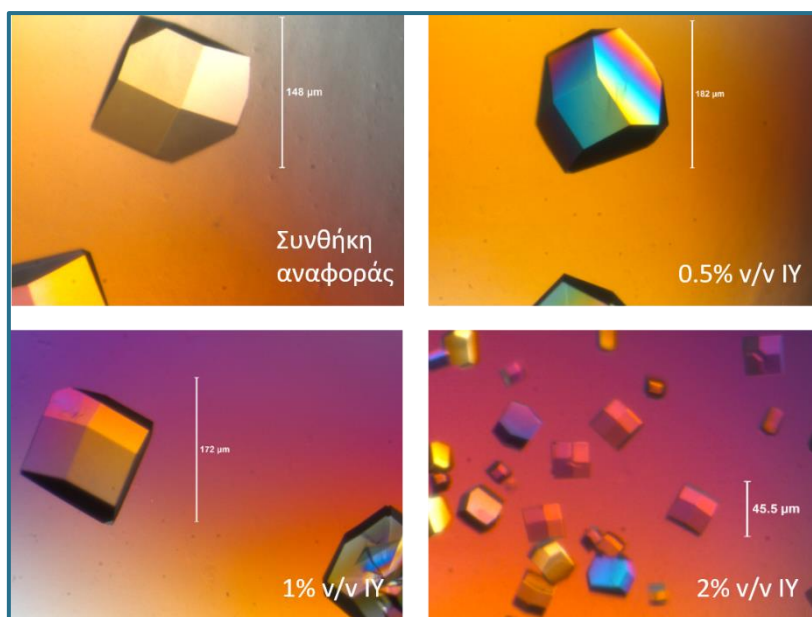


Εικόνα 26: Εξέλιξη κρυστάλλων λυσοζύμης παρουσία 0.5 και 1% (v/v) ΙΥ μετά από 1, 3 και 5 ώρες σε σχέση με την συνθήκη αναφοράς για 3% (w/v) NaCl.

#### Μέγεθος και μορφολογία κρυστάλλων λυσοζύμης

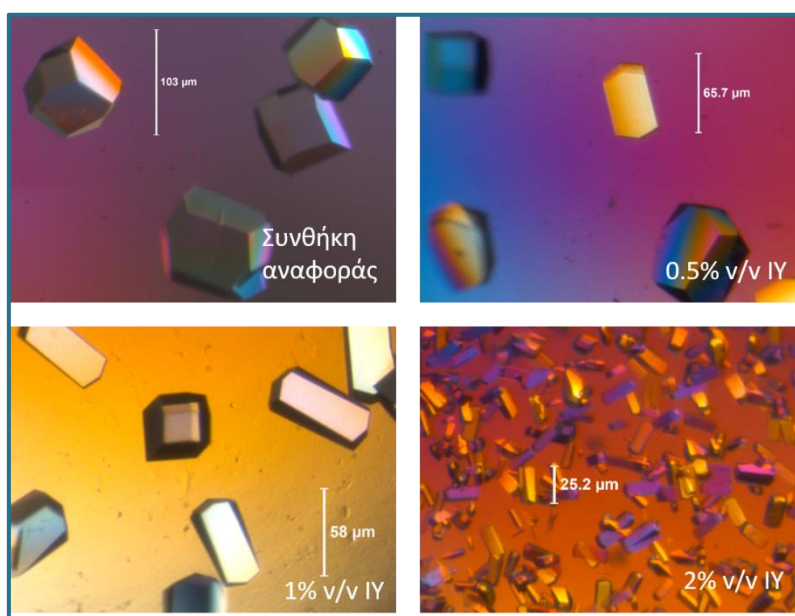
Σε αυτή την περίπτωση μελετάται το τελικό μέγεθος των κρυστάλλων της λυσοζύμης, όπως καταγράφηκε κατά την τελευταία παρατήρηση καθώς και η μορφολογία τους.

Ορισμένα ενδεικτικά αποτελέσματα για όλες τις συνθήκες παρουσία 4% (w/v) NaCl μετά από 24 ώρες παρουσιάζονται στην Εικόνα 27. Οι συγκεντρώσεις 0.5 και 1% (v/v) ΙΥ παρουσιάζουν λίγο μεγαλύτερους κρυστάλλους από την συνθήκη αναφοράς, περίπου 30 - 40  $\mu\text{m}$ . Ωστόσο, αυτό παρατηρείται για ορισμένους μόνο κρυστάλλους, χωρίς επαναληψιμότητα σε όλες τις σταγόνες με την ίδια συνθήκη. Μεγαλύτερη συγκέντρωση ΙΥ από 1% (v/v), επιβεβαιώνει τις προηγούμενες παρατηρήσεις πως επηρεάζει ραγδαία την κρυστάλλωση, σχηματίζοντας μεγάλο αριθμό κρυστάλλων πολύ μικρότερου μεγέθους, γύρω στα 40-45 $\mu\text{m}$ . Τέλος, σε όλες τις συνθήκες παρατηρείται ο σχηματισμός κρυστάλλων ίδιας μορφολογίας με τη συνθήκη αναφοράς, η οποία αντιστοιχεί πιθανότατα σε τετραγωνικό σύμπλεγμα συμμετρίας με βάση τη διαθέσιμη βιβλιογραφία. [86]



Εικόνα 27: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl μετά από 24 ώρες, παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης ΙΥ ως προσθέτου.

Ομοίως παρουσιάζονται ορισμένα ενδεικτικά αποτελέσματα για όλες τις συνθήκες παρουσία 3% (w/v) NaCl μετά από 24 ώρες στην Εικόνα 28. Αντιθέτως με τις παρατηρήσεις που έγιναν παραπάνω, παρουσία 3% (w/v) NaCl, το ΙΥ επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο το μέγεθος και τη μορφολογία των κρυστάλλων.



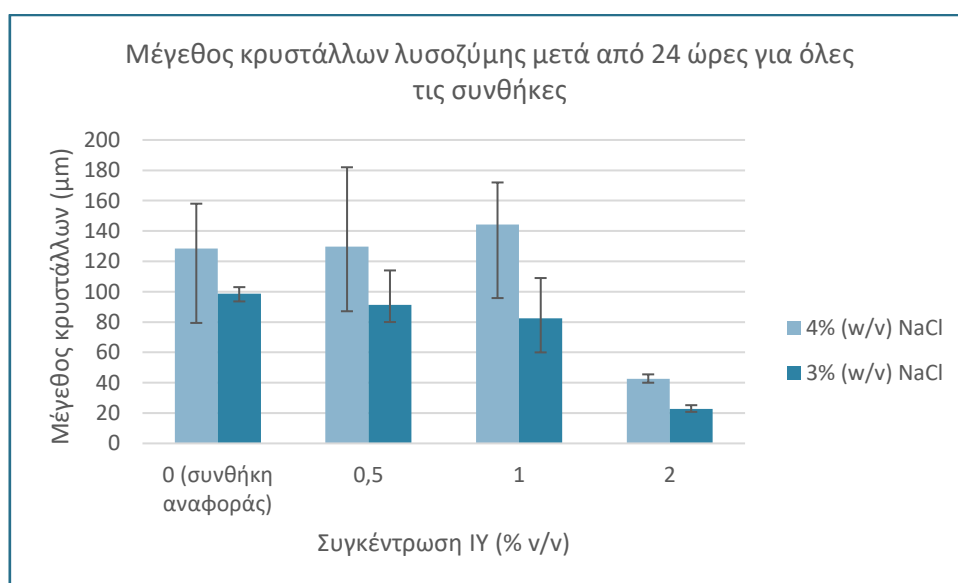
Εικόνα 28: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 3% (w/v) NaCl μετά από 24 ώρες, παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης ΙΥ ως προσθέτου.

Η πρώτη βασική παρατήρηση που γίνεται είναι η μεταβολή της μορφολογίας των κρυστάλλων. Οι συγκεντρώσεις 0.5, 1 και 2% (v/v) ΙΥ παρουσιάζουν διαφορετικής μορφής κρυστάλλους από τη συνθήκη αναφοράς. Σε όλες τις συνθήκες παρουσία ΙΥ, παρατηρείται ο σχηματισμός ραβδόμορφων κρυστάλλων σε αντίθεση με τη συνθήκη αναφοράς, όπως είχε παρατηρηθεί και στην 1<sup>η</sup> δοκιμή κρυστάλλωσης για 2% (w/v) NaCl. Πρέπει να διευκρινιστεί ότι για 0.5% (v/v) ΙΥ, σχηματίστηκαν και αρκετοί κρύσταλλοι ίδιας μορφολογίας με τη

συνθήκη αναφοράς, ενώ για 1% (v/v) ΙΥ το φαινόμενο παρατηρείται σε πολύ μικρότερο βαθμό και για ορισμένες μόνο σταγόνες. Αντιθέτως για συγκέντρωση 2% (v/v) ΙΥ, όλοι οι κρύσταλλοι που σχηματίστηκαν είναι ραβδόμορφοι γεγονός που υποδεικνύει την άμεση επίδραση του ΙΥ στην μεταβολή της μορφολογίας των σχηματιζόμενων κρυστάλλων.

Ως προς το μέγεθος των κρυστάλλων, μεγαλύτεροι κρύσταλλοι παρατηρούνται στην συνθήκη αναφοράς. Αυξάνοντας τη συγκέντρωση του ΙΥ, παρατηρείται μείωση του μεγέθους των κρυστάλλων. Συγκεκριμένα, για 0.5 και 1% (v/v) ΙΥ παρατηρείται παρόμοιο μέγεθος ενώ συγκέντρωση 2% (v/v) ΙΥ οδηγεί σε ακόμη μικρότερους κρυστάλλους της τάξης των 20 - 25μm.

Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις και δεδομένα συνοψίζονται στο Γράφημα 4, και για τις δύο συγκεντρώσεις NaCl, προκειμένου να γίνει και μια σύγκριση μεταξύ τους. Στο γράφημα αυτό το μέγεθος των κρυστάλλων ερευνάται συναρτήσει της συγκέντρωσης του προσθέτου μετά από 24 ώρες. Το μέγεθος των κρυστάλλων εκφράζεται ως ο μέσος όρος των μεγεθών των μεγαλύτερων κρυστάλλων όλων των σταγόνων με την ίδια συνθήκη κρυστάλλωσης. Παρουσιάζεται επίσης και η διακύμανση των μεγεθών με κατάλληλες μπάρες.



Γράφημα 4: Μέγεθος κρυστάλλων λυσοζύμης της 2<sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης μετά από 24 ώρες, συναρτήσει της συγκέντρωσης του ΙΥ στη σταγόνα κρυστάλλωσης. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και για τις δύο συγκεντρώσεις παράγοντα κατακρήμνισης NaCl.

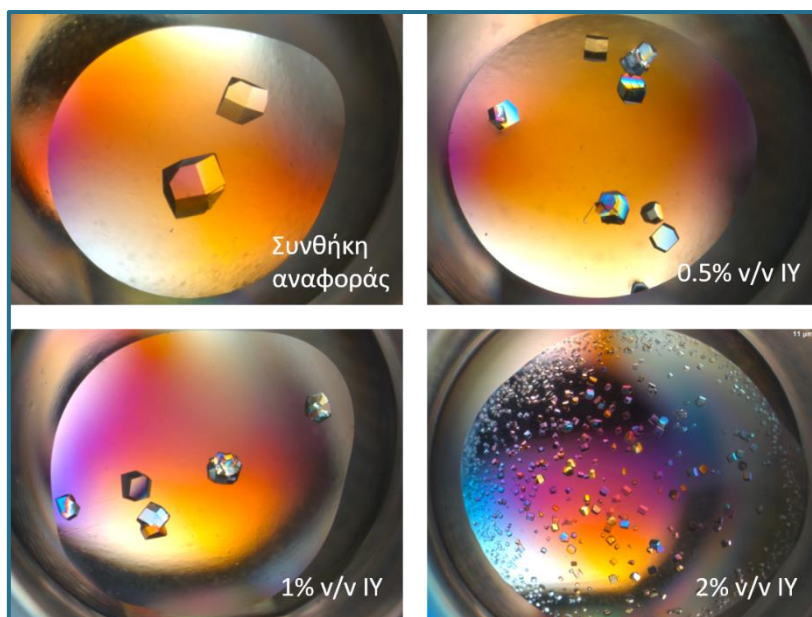
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω με βάση την Εικόνα 27, παρουσία 4% (w/v) NaCl, οι κρύσταλλοι δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές από τη συνθήκη αναφοράς, εκτός από τη συνθήκη της μεγαλύτερης συγκέντρωσης ΙΥ, όπου οι κρύσταλλοι είναι εμφανώς πολύ μικρότεροι. Οι μεγαλύτεροι κρύσταλλοι κατά μέσο όρο παρουσιάζονται για 1% (v/v) ΙΥ, αν και ο μεγαλύτερος κρύσταλλος παρατηρήθηκε για 0.5% (v/v) ΙΥ, όπως υποδηλώνεται από τις μπάρες διακύμανσης. Ακόμη, σημαντική είναι και η παρατήρηση ότι στην υψηλότερη συγκέντρωση ΙΥ που δοκιμάστηκε, η διακύμανση των μεγεθών των κρυστάλλων στις σταγόνες είναι πολύ μικρή, υποδεικνύοντας μια ομοιογένεια και επαναληψιμότητα στο μέγεθος των κρυστάλλων για την ίδια συνθήκη.

#### Αριθμός κρυστάλλων λυσοζύμης

Για 4% (w/v) NaCl, παρατηρείται αύξηση του αριθμού κρυστάλλων παρουσία ΙΥ. Ωστόσο, αυτό δεν εμφανίζει επαναληψιμότητα και δεν επιβεβαιώνεται για όλες τις σταγόνες με την

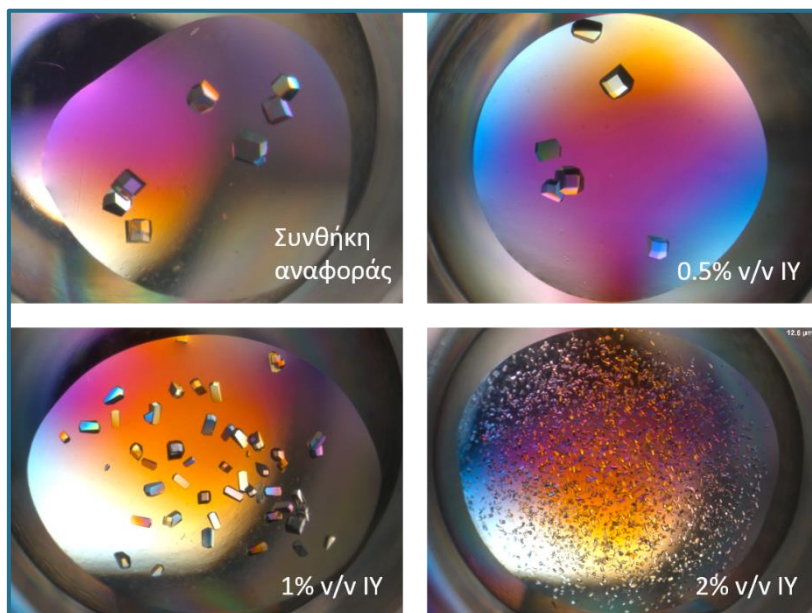


ίδια συνθήκη. Συγκέντρωση 0.5 και 1% (v/v) ΙΥ παρουσιάζει σχεδόν τα ίδια αποτελέσματα όσο αφορά τον αριθμό των κρυστάλλων. Η πιο εμφανής επίδραση του ΙΥ στον αριθμό των κρυστάλλων είναι για μεγαλύτερη συγκέντρωση από 1% (v/v), όπου παρατηρείται ραγδαία αύξηση του αριθμού.



Εικόνα 29: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl μετά από 24 ώρες, παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης ΙΥ ως προσθέτου.

Για 3% (w/v) NaCl, παρατηρείται μια πιο ξεκάθαρη αύξηση του αριθμού των κρυστάλλων παρουσία 1% (v/v) ΙΥ σε σχέση με τις προηγούμενες δύο συνθήκες. Η συγκέντρωση 2% (v/v) ΙΥ παρουσιάζει ραγδαία αύξηση του αριθμού των κρυστάλλων ενώ για 0.5% (v/v) ΙΥ δεν φαίνεται κάποια ουσιαστική διαφορά σε σχέση με το τυφλό.



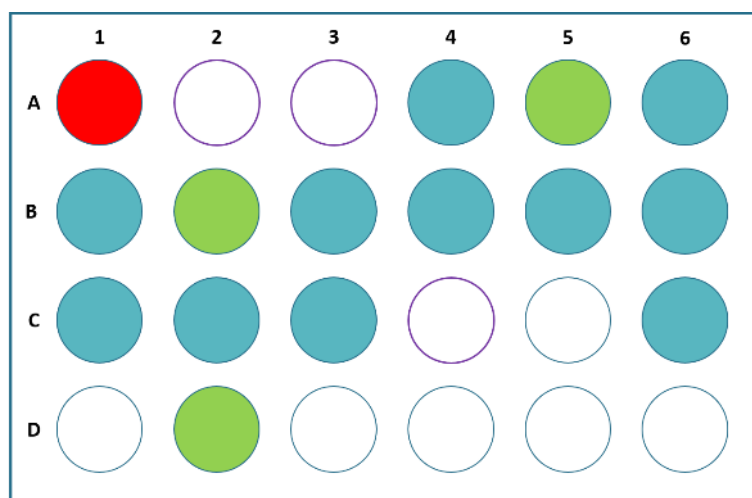
Εικόνα 30: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 3% (w/v) NaCl μετά από 24 ώρες, παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης ΙΥ ως προσθέτου.



Τέλος συγκρίνοντας τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl, είναι εμφανές ότι για 1 και 2% (v/v) ΙΥ, σχηματίζονται περισσότεροι κρύσταλλοι για 3% (w/v) NaCl. Επίσης, η παρουσία 1% (v/v) ΙΥ οδηγεί σε μεγαλύτερη αύξηση του αριθμού των κρυστάλλων παρουσία 3% (w/v) NaCl απ' ότι για 4% (w/v) NaCl.

### 6.2.2 DES ως πρόσθετο

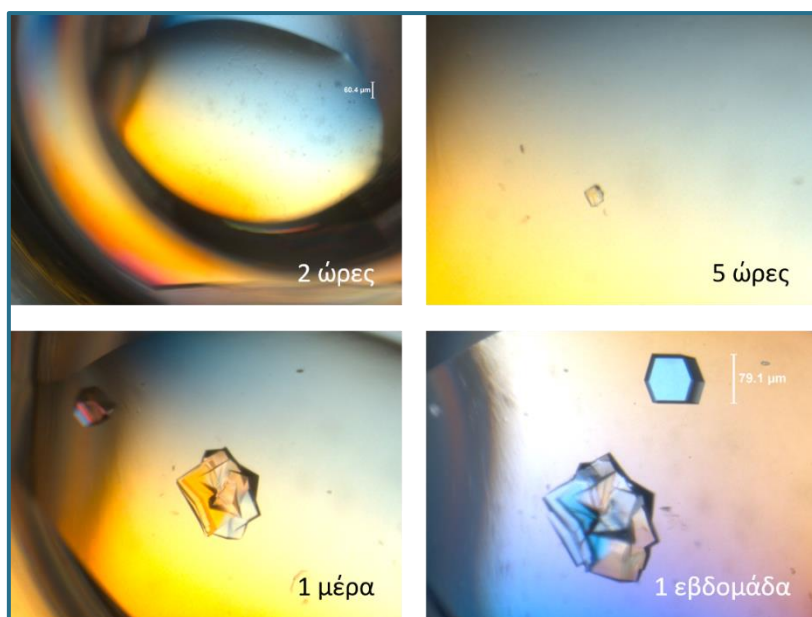
Ομοίως με το ΙΥ, μια αρχική δοκιμή κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκε για τη διερεύνηση της επίδρασης του DES στην κρυστάλλωση της λυσοζύμης. Η πλάκα κρυστάλλωσης καθημένης σταγόνας περιείχε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις παράγοντα καταβύθισης (NaCl) και διαφορετικές συγκεντρώσεις ΙΥ ανά 3 πηγάδια, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3. Η πλάκα κρυστάλλωσης ελέγχθηκε για σχηματισμό κρυστάλλων μετά από 2 ώρες, 5 ώρες, 1 μέρα και 1 εβδομάδα. Τα αποτελέσματα της 1<sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης της λυσοζύμης παρουσία DES ως πρόσθετο συνοψίζονται στο Σχήμα 17.



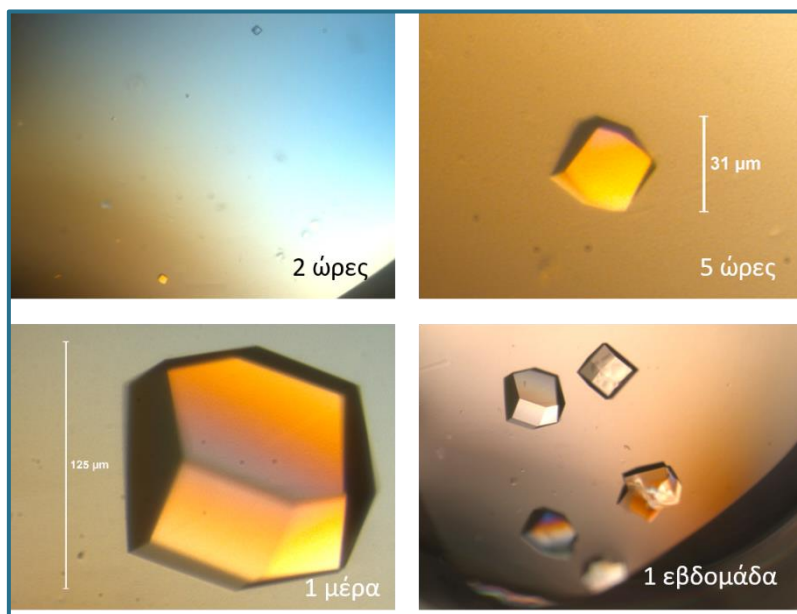
Σχήμα 17: Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της 1<sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης της λυσοζύμης παρουσία DES ως πρόσθετο μετά από 1 εβδομάδα. Τα Α1-Α3 είναι τα πειράματα αναφοράς (τυφλό απουσία DES) για 4% (w/v) NaCl και τα Δ1-Δ3 για 2% (w/v) NaCl. Το μωβ περίγραμμα υποδηλώνει σφάλμα κατά την πειραματική διαδικασία.

Όπως προκύπτει και από το Σχήμα 17, η συνθήκη αναφοράς για 4% (w/v) NaCl δεν απέδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, λόγω σφαλμάτων κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Συγκεκριμένα, λάθος χειρισμός της πιπέτας, οδήγησε στη μη σωστή ανάμιξη των διαλυμάτων πρωτεΐνης και δεξαμενής. Γι' αυτόν το λόγο, τα αποτελέσματα αυτά απορρίπτονται και στο εξής η σύγκριση των υπόλοιπων συνθηκών της πλάκας γίνεται με την συνθήκη αναφοράς για 4% (w/v) NaCl του πιάτου της 1<sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης με ΙΥ ως πρόσθετο. Η συνθήκη αναφοράς είναι η ίδια, ενώ και οι δύο δοκιμές πραγματοποιήθηκαν την ίδια μέρα χρησιμοποιώντας τα ίδια διαλύματα.

Η παρουσία DES σε συγκέντρωση 0.5 και 1% (v/v) στη σταγόνα κρυστάλλωσης οδήγησε σε παρόμοια αποτελέσματα με τη συνθήκη αναφοράς. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κρυστάλλων ήδη από τις πρώτες 2 ώρες, με την ανάπτυξη των κρυστάλλων να ακολουθεί την ίδια πορεία με αυτή της συνθήκης αναφοράς, όπως παρουσιάστηκε προηγουμένως στην Εικόνα 12. Τόσο η μορφολογία των κρυστάλλων όσο και το μέγεθός τους είναι παρόμοια για όλες τις συνθήκες. Στην Εικόνα 31 και στην Εικόνα 32 παρουσιάζονται ενδεικτικά αποτελέσματα της πορείας ανάπτυξης των κρυστάλλων παρουσία 0.5 και 1% (v/v) DES αντίστοιχα.

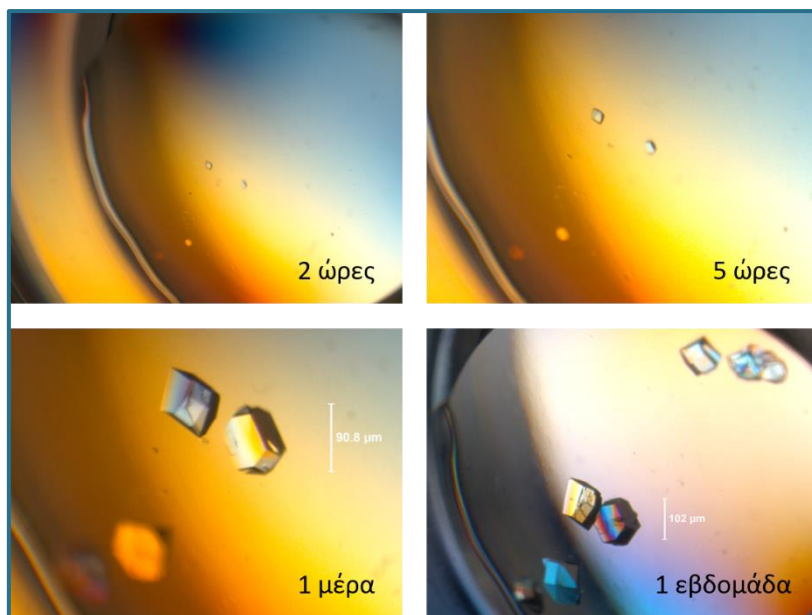


Εικόνα 31: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 0.5% (v/v) DES με την πάροδο του χρόνου.



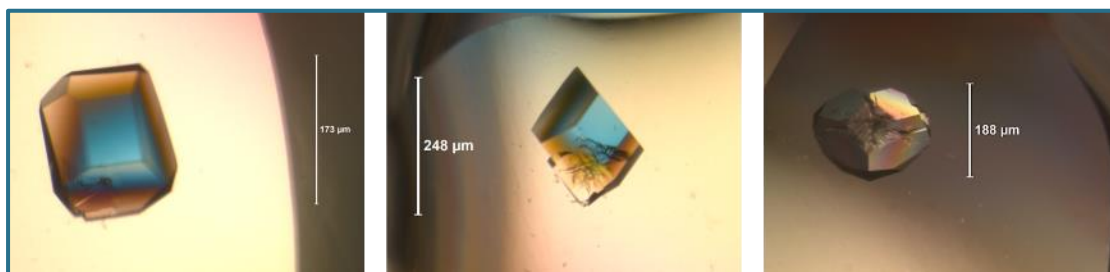
Εικόνα 32: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 1% (v/v) DES με την πάροδο του χρόνου.

Παρουσία 3% (v/v) DES, παρατηρούνται όμοια αποτελέσματα με τις προηγούμενες συνθήκες. Οι κρύσταλλοι αναπτύσσονται ήδη από τις πρώτες ώρες, καταλήγοντας σε ευμεγέθεις κρυστάλλους μετά από 1 εβδομάδα, τάξης μεγέθους > από 110 μm. Ωστόσο, μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι η πλειοψηφία των κρυστάλλων που αναπτύσσονται και στις 3 σταγόνες κρυστάλλωσης είναι παραμορφωμένοι ή εμφανίζονται ως συμπλέγματα (clusters). Ενδεικτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 33.



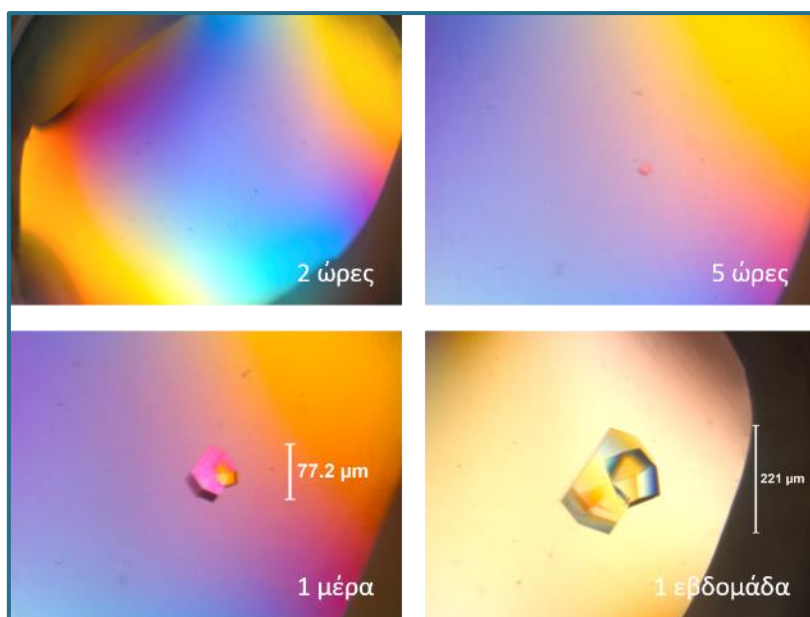
Εικόνα 33: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 3% (v/v) DES με την πάροδο του χρόνου.

Για προσθήκη 5% (v/v) DES, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός μικροκρυστάλλων από τις πρώτες ώρες, με παρόμοιο ρυθμό ανάπτυξης με τις προηγούμενες συνθήκες. Ωστόσο, σε όλα τα πηγάδια σχηματίστηκε ένας ή δύο το πολύ κρύσταλλοι. Μετά από 1 εβδομάδα παρατήρησης, όλοι οι κρύσταλλοι είναι μεγάλοι σε μέγεθος, πάνω από την τάξη των 170  $\mu\text{m}$ , ενώ είναι χαρακτηριστικό ότι όλοι είναι παραμορφωμένοι, με σπασμένα άκρα και ρωγμές.



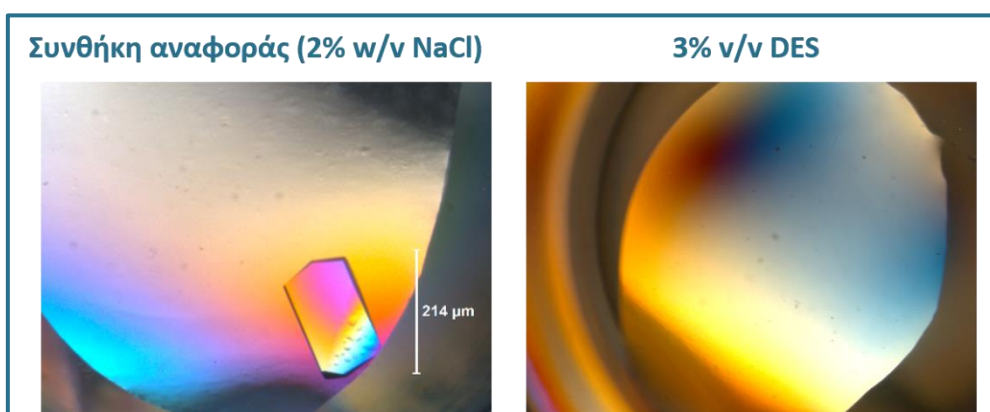
Εικόνα 34: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 5% (v/v) DES μετά από 1 εβδομάδα.

Αυξάνοντας περαιτέρω τη συγκέντρωση του DES σε 10% (v/v) στη σταγόνα κρυστάλλωσης, τα αποτελέσματα είναι χειρότερα από όλες τις υπόλοιπες συνθήκες. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός δύο προσκολλημένων κρυστάλλων σε ένα μόνο πηγάδι μετά από 5 ώρες. Το σύμπλεγμα αυτό των κρυστάλλων αναπτύχθηκε σε πάνω από 220  $\mu\text{m}$  μετά από 1 εβδομάδα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 35. Συνεπώς, με βάση και τις προηγούμενες παρατηρήσεις για τη συγκέντρωση 5% (v/v) DES, η αυξανόμενη συγκέντρωση του DES δείχνει να επηρεάζει αρνητικά την κρυστάλλωση της λυσοζύμης, οδηγώντας σε χαμηλής ποιότητας κρυστάλλους, ακατάλληλους για περίθλαση ακτίνων Χ.



Εικόνα 35: Κρύσταλλοι λυσοζύμης για 4% (w/v) NaCl παρουσία 10% (v/v) DES με την πάροδο του χρόνου.

Για τη δεύτερη συγκέντρωση παράγοντα κατακρήμνισης NaCl που δοκιμάστηκε, στα 2% (w/v), παρατηρήθηκαν ίδια αποτελέσματα για τη συνθήκη αναφοράς με αυτή του πιάτου της 1<sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης της λυσοζύμης με ΙΥ ως πρόσθετο. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός ενός μόνο μεγάλου, μονοκρυστάλλου, καλής ποιότητας σε μια μόνο σταγόνα, χωρίς επαναληψιμότητα στις υπόλοιπες σταγόνες, μετά από 1 εβδομάδα παρατήρησης. Για την ίδια συγκέντρωση παράγοντα κατακρήμνισης και παρουσία 3% (v/v) DES, δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κρυστάλλων σε καμία από τις 3 επαναλαμβανόμενες σταγόνες μετά από 1 εβδομάδα. Συνεπώς, η παρουσία DES δεν προήγαγε την κρυστάλλωση της λυσοζύμης σε μικρότερη συγκέντρωση παράγοντα κατακρήμνισης.



Εικόνα 36: Αποτελέσματα κρυστάλλωσης λυσοζύμης για 2% (w/v) NaCl μετά από μία εβδομάδα. Αριστερά είναι η συνθήκη αναφοράς απουσία DES και δεξιά η συνθήκη παρουσία 3% (v/v) DES.

Με βάση όλες τις παραπάνω παρατηρήσεις, παρουσιάζεται η αναλυτική βαθμολογία των συνθηκών που δοκιμάστηκαν στον Πίνακα 8. Όπως διευκρινίστηκε και προηγουμένως, η συνθήκη αναφοράς για 4% (w/v) NaCl της συγκεκριμένης πλάκας κρυστάλλωσης απορρίπτεται και αντικαθίσταται από την ίδια συνθήκη της πλάκας της 1<sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης της λυσοζύμης παρουσία ΙΥ ως προσθέτου.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα 1<sup>ης</sup> δοκιμής κρυστάλλωσης της λυσοζύμης παρουσία DES ως προσθέτου. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος της βαθμολογίας των τριών πηγαδιών κάθε συνθήκης.

| Συνθήκη                        | Μέσος όρος βαθμολογίας |
|--------------------------------|------------------------|
| <b>Αναφοράς: 4% (w/v) NaCl</b> | <b>3.7</b>             |
| 0.5% (v/v) DES                 | 3.3                    |
| 1% (v/v) DES                   | 3.3                    |
| 3% (v/v) DES                   | 3.0                    |
| 5% (v/v) DES                   | 3.0                    |
| 10% (v/v) DES                  | 1.5                    |
| <b>Αναφοράς: 2% (w/v) NaCl</b> | <b>1.3</b>             |
| 3% (v/v) DES                   | 0.0                    |

Με βάση τη βαθμολογία των συνθηκών, είναι εμφανές ότι η χρήση DES ως πρόσθετο δεν επέφερε θετικά αποτελέσματα στην κρυστάλλωση της λυσοζύμης. Καμία συνθήκη που δοκιμάστηκε δεν κατάφερε να ξεπεράσει σε βαθμολογία τις αντίστοιχες συνθήκες αναφοράς. Αντιθέτως, υψηλότερες συγκεντρώσεις του DES, φάνηκε να δυσχεραίνουν την κρυστάλλωση, αναπτύσσοντας παραμορφωμένους κρυστάλλους ή εμποδίζοντας ακόμα και τον σχηματισμό τους. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις DES δεν μετέβαλλαν πρακτικά την κρυστάλλωση, αφού το μέγεθος, ο αριθμός, η μορφολογία και ο χρόνος ανάπτυξης των κρυστάλλων παρέμειναν ίδια με την συνθήκη αναφοράς. Ωστόσο παρουσιάστηκε μεγαλύτερος αριθμός παραμορφωμένων κρυστάλλων, γι' αυτό και η βαθμολογία τους είναι μικρότερη από τη συνθήκη αναφοράς. Συνεπώς, το πρόσθετο αυτό δεν προχώρησε σε περαιτέρω δοκιμές κρυστάλλωσης και βελτιστοποίησης των συνθηκών.

### 6.3 Κρυστάλλωση Φωσφορυλάσης γλυκογόνου

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αναπτύσσονται με τη μέθοδο batch σε γυάλινους σωλήνες παρουσία κρυστάλλων πυρήνωσης. Στην παρούσα εργασία επιδιώχθηκε η μεταφορά της μεθόδου σε μικροπλάκες, όπου οι χρησιμοποιούμενοι όγκοι των αντιδραστηρίων ήταν της τάξης μεγέθους  $\mu\text{L}$  έναντι  $\text{mL}$  που χρησιμοποιούνται συνήθως, απουσία των κρυστάλλων πυρήνωσης. Η μεταφορά αυτή της μεθόδου δεν έχει ακόμα βελτιστοποιηθεί και γι' αυτόν το λόγο οι δοκιμές κρυστάλλωσης του ενζύμου αυτού παρουσία των προσθέτων είχαν διερευνητικό χαρακτήρα για την αποτύπωση της συμπεριφοράς αυτών στην κρυστάλλωση του ενζύμου. Συνεπώς, δεν κρίθηκε αναγκαία η χρήση ενός συστήματος βαθμολόγησης των συνθηκών. Οι παρακάτω παρατηρήσεις στο στερεοσκόπιο έγιναν μετά από 6 μέρες, προκειμένου να δοθεί αρκετός χρόνος ώστε να σχηματιστούν ή μη κρύσταλλοι και να χρησιμοποιηθούν αυτά τα αποτελέσματα ως σημείο αναφοράς για περαιτέρω διερεύνηση.

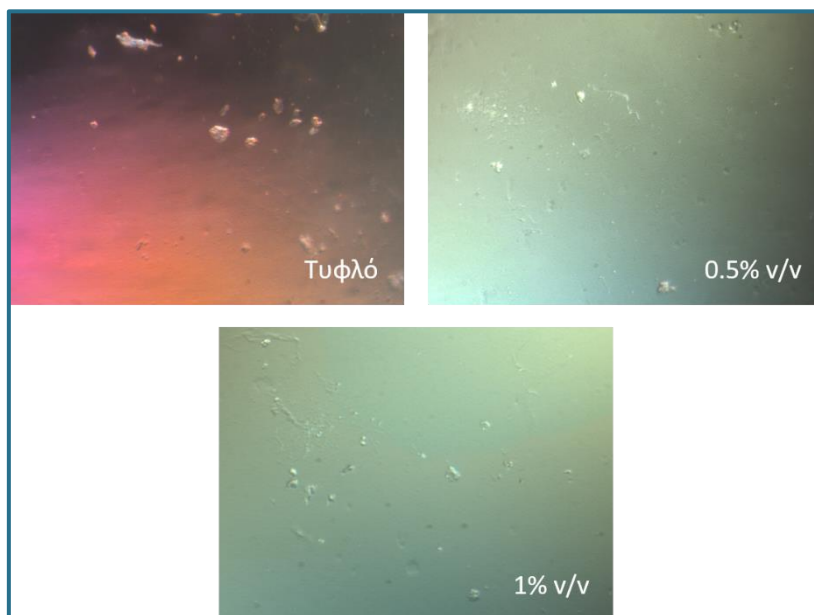
#### 6.3.1 ΙΥ ως πρόσθετο

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μια δοκιμή κρυστάλλωσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου παρουσία ΙΥ ως πρόσθετου. Η πλάκα κρυστάλλωσης καθημένης σταγόνας περιείχε



διαφορετικές συγκεντρώσεις ΙΥ, ενώ δοκιμάστηκε επίσης και η επίδραση του προσθέτου απουσία DTT. Όλες οι συνθήκες παρουσιάστηκαν προηγουμένως στον Πίνακα 5.

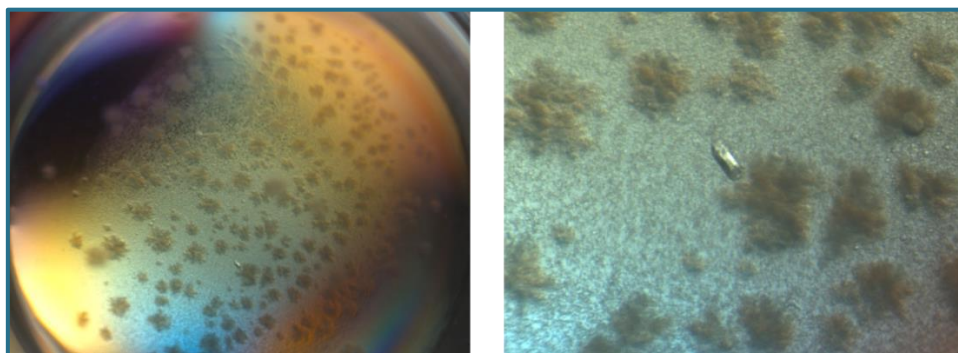
Στη συνθήκη αναφοράς παρουσία DTT, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός μικροκρυστάλλων, χωρίς ωστόσο επαναληψιμότητα σε όλες τις σταγόνες. Όμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και παρουσία 0.1, 0.5 και 1% (v/v) ΙΥ στη σταγόνα κρυστάλλωσης. Στην Εικόνα 37, παρατίθενται τα καλύτερα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν για αυτές τις συνθήκες μετά από 6 μέρες.



Εικόνα 37: Κρύσταλλοι φωσφορυλάσης γλυκογόνου μετά από 6 μέρες για απουσία (τυφλό) και παρουσία 0.5% και 1% (v/v) ΙΥ ως πρόσθετο (Συνθήκες κρυστάλλωσης: 12.4 mg/ml GPb, BES buffer, 3mM DTT, 1Mm IMP).

Όπως προκύπτει από την Εικόνα 37, σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται ο σχηματισμός μικροκρυστάλλων, μη ικανοποιητικής ποιότητας για περαιτέρω επεξεργασία με ακτίνες Χ. Ωστόσο, αυτά τα αποτελέσματα δεν παρουσίασαν επαναληψιμότητα για όλα τις σταγόνες με την ίδια συνθήκη.

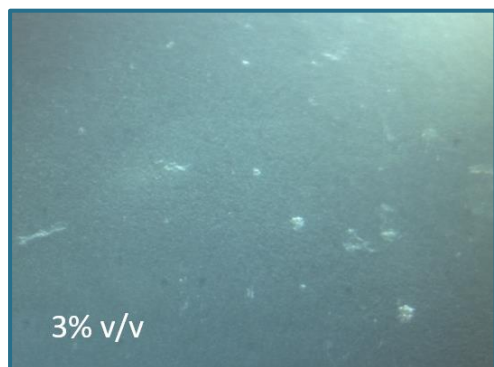
Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ΙΥ που δοκιμάστηκαν είχαν παρόμοια αποτελέσματα με μια μόνο εξαίρεση. Παρουσία 5% (v/v) ΙΥ ως πρόσθετου, σχηματίστηκε ένας κρύσταλλος μεγαλύτερου μεγέθους και καλύτερης ποιότητας σε σχέση με όλες τις προηγούμενες συνθήκες. Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτό δεν παρουσιάζει επαναληψιμότητα στις υπόλοιπες σταγόνες κρυστάλλωσης της ίδιας συνθήκης.



Εικόνα 38: Κρύσταλλοι φωσφορυλάσης του γλυκογόνου παρουσία 12.4 mg/ml GPb, BES buffer, 3mM DTT, 1Mm IMP και 5% (v/v) ΙΥ.



Στη συνέχεια εξετάστηκε και η επίδραση του ΙΥ απουσία DTT. Για συγκέντρωση 3% (v/v) ΙΥ, παρατηρήθηκαν τα βέλτιστα αποτελέσματα σε μια σταγόνα κρυστάλλωσης, όπου σχηματίστηκαν μικροκρύσταλλοι.

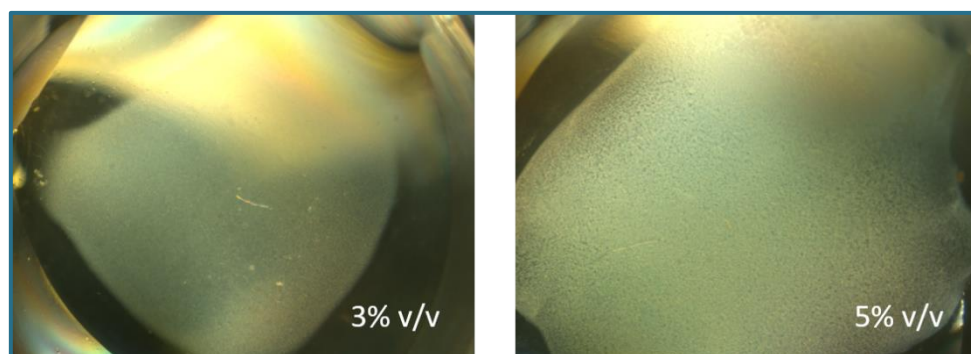


Εικόνα 39: Κρύσταλλοι φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μετά από 6 μέρες, απουσία DTT, με 3% (v/v) ΙΥ ως πρόσθετο (Συνθήκες κρυστάλλωσης: 12.4 mg/ml GPb, BES buffer, 1Mm IMP, 3% (v/v) ΙΥ).

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, η χρήση ΙΥ ως πρόσθετου στην κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου δεν είχε εμφανή αποτελέσματα με μεγάλη επαναληψιμότητα. Ωστόσο, ο σχηματισμός ενός μεγάλου κρυστάλλου παρουσία 5% (v/v) ΙΥ αποτελεί ένα ελπιδοφόρο σημάδι ότι ίσως μεγαλύτερη συγκέντρωση προσθέτου να βοηθήσει ακόμη περισσότερο και να αποδώσει επιθυμητά αποτελέσματα.

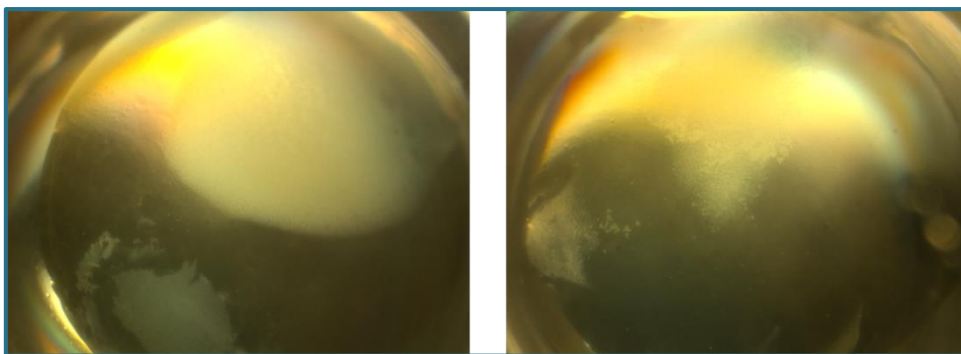
#### 6.3.2 DES ως πρόσθετο

Σε δεύτερη πλάκα κρυστάλλωσης δοκιμάστηκαν οι ίδιες συνθήκες κρυστάλλωσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, αντικαθιστώντας το ΙΥ με DES. Η συνθήκη αναφοράς απέδωσε παρόμοια αποτελέσματα με προηγουμένως. Οι συνθήκες για 0.1, 0.5 και 1% (v/v) DES στην σταγόνα κρυστάλλωσης δεν σχημάτισαν μικροκρυστάλλους. Αντιθέτως, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις DES, 3 και 5% (v/v), παρατηρήθηκε έντονη καθίζηση της πρωτεΐνης.



Εικόνα 40: Αποτελέσματα της κρυστάλλωσης της GPb παρουσία 3% (v/v) (αριστερά) και 5% (v/v) (δεξιά) DES. Παρατηρείται έντονη καθίζηση της πρωτεΐνης και στις 2 συνθήκες.

Στην περίπτωση που εξετάστηκε η επίδραση του DES απουσία DTT, παρατηρήθηκε καθίζηση του ενζύμου για συγκέντρωση 3% (v/v) DES.



Εικόνα 41: Αποτελέσματα της κρυστάλλωσης της GPb παρουσία 3% (v/v) DES και απουσία DTT. Παρατηρείται έντονη καθίζηση της πρωτεΐνης.

## 6.4 Επίδραση προσθέτων στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, μπορεί να εξαχθεί μια πρώτη εκτίμηση ως προς τη δράση των προσθέτων που χρησιμοποιήθηκαν στην κρυστάλλωση των πρωτεϊνών με βάση τη διαθέσιμη βιβλιογραφία.

Η πρώτη παρατήρηση που εξάγεται με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν είναι πως ένα πρόσθετο δεν επηρεάζει όλες τις πρωτεΐνες με τον ίδιο τρόπο. Η κρυστάλλωση της λυσοζύμης παρουσία ΙΥ ως πρόσθετου δεν είχε τα ίδια αποτελέσματα με την κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Ενώ η πρώτη πρωτεΐνη κρυσταλλώθηκε σε όλες τις δοκιμαζόμενες συνθήκες παρουσία ΙΥ, δίνοντας μάλιστα διαφορετικά αποτελέσματα ως προς το μέγεθος, τη μορφολογία, το ρυθμό ανάπτυξης και τον αριθμό των κρυστάλλων, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου οδήγησε στον σχηματισμό ενός μόνο κρυστάλλου παρουσία της μεγαλύτερης συγκέντρωσης ΙΥ που δοκιμάστηκε. Ωστόσο, τα πειράματα που διεξήχθησαν με το δεύτερο ένζυμο χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης γιατί ήδη οι συνθήκες κρυστάλλωσης και η διάταξη που χρησιμοποιήθηκαν διέφεραν από τις «κλασσικές» (μέθοδο batch με χρήση μεγαλύτερων όγκων παρουσία πυρήνων κρυστάλλωσης). Όμοια ήταν και τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν και για τη χρήση του DES ως πρόσθετου.

Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώνει τις επιστημονικές μελέτες που αναφέρουν πως η δράση των προσθέτων στην πρωτεϊνική κρυστάλλωση είναι άμεσα εξαρτώμενη από τις ίδιες τις πρωτεΐνες και τις ιδιότητες αυτών (π.χ. η κατανομή του φορτίου που φέρουν). Συνεπώς, λόγω της ιδιαιτερότητας της κρυστάλλωσης των πρωτεϊνικών μορίων, δεν είναι δυνατό να εξαχθούν συμπεράσματα για έναν ενιαίο τρόπο δράσης των προσθέτων, αφού απαιτούνται ξεχωριστές μελέτες για κάθε πρωτεΐνη σε σχέση με ένα είδος προσθέτου.

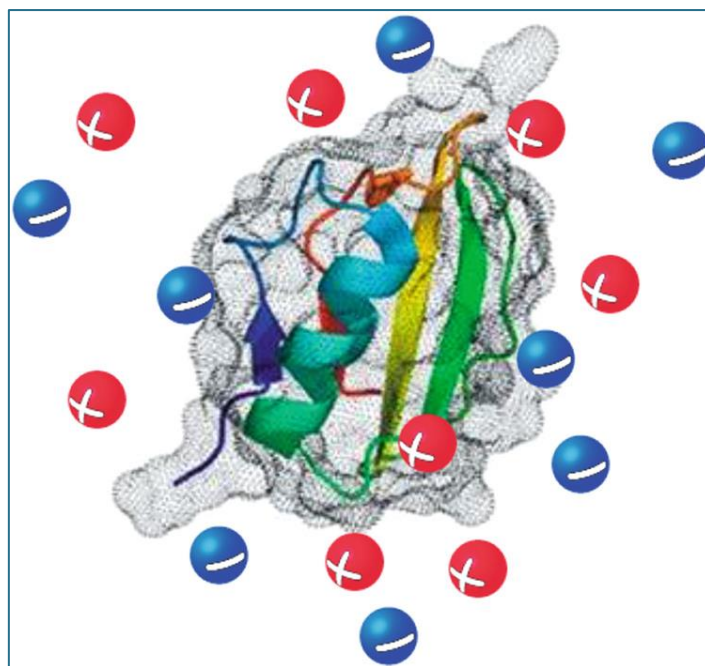
Η μεγαλύτερη επίδραση παρουσιάστηκε κατά τη χρήση του κυκλοεξανοϊκού δις(2-υδροξυ-αιθυλ)αμμωνίου ως πρόσθετο στην κρυστάλλωση των πρωτεϊνών. Τόσο η λυσοζύμη όσο και η φωσφορυλάση του γλυκογόνου παρουσίασαν διαφορετικά αποτελέσματα με τη χρήση ΙΥ ως πρόσθετο σε σχέση με τις συνθήκες αναφοράς απουσία προσθέτου. Πράγματι, τα ιοντικά υγρά έχουν εφαρμοστεί σε αρκετές μελέτες ως πρόσθετα στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών. Ωστόσο, δεν έχουν πραγματοποιηθεί σε βάθος έρευνες με στόχο τον προσδιορισμό του μηχανισμού δράσης αυτών των ενώσεων ώστε να προκύπτουν πιθανές κατευθύνσεις για την επιλογή των κατάλληλων ΙΥ, που θα έχουν ένα επιθυμητό αποτέλεσμα στην κρυστάλλωση των πρωτεϊνών.

Αν και τα ιόντα των ΙΥ δίστανται σε υδατικό διάλυμα, η μεταβολή του pH στην σταγόνα κρυστάλλωσης είναι πολύ μικρή για χαμηλή συγκέντρωση προσθέτου. Επομένως, θεωρείται ότι η πρωτεΐνη κρυσταλλώνεται σε pH που καθορίζεται από το ρυθμιστικό διάλυμα του διαλύματος κρυστάλλωσης. [72]

Σε αρχικές μελέτες επίδρασης των ΙΥ στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών, η αμελητέα τάση ατμών των ΙΥ αναφέρεται ως πιθανή αιτία για το μηχανισμό δράσης τους. Χάρη σε αυτή την ιδιότητα των ΙΥ, ο ρυθμός διάχυσης και μεταφοράς ατμών από την σταγόνα κρυστάλλωσης στο διάλυμα δεξαμενής επιβραδύνεται. Έτσι, η κατάσταση υπερκορεσμού προσεγγίζεται με αργό ρυθμό, επιτρέποντας πιο ελεγχόμενη ανάπτυξη των κρυστάλλων. Αυτή η διαδικασία οδηγεί σε μεγαλύτερους και καλύτερης ποιότητας πρωτεϊνικούς κρυστάλλους. [82] Ωστόσο, αυτή η προσέγγιση δεν φαίνεται να ισχύει. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι η προσθήκη ιωδιούχου 1,3-διμεθυλιμιδαζολίου ([dmim]I) οδηγεί σε μείωση του ρυθμού πυρήνωσης, ενώ η προσθήκη χλωριούχου 1-βουτυλ-3-μεθυλιμιδαζολίου ([C<sub>4</sub>mim]Cl) οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού πυρήνωσης. [87] Πράγματι το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και στην παρούσα εργασία, όπου η προσθήκη του ΙΥ οδήγησε σε αύξηση του ρυθμού πυρήνωσης, αφού στην περίπτωση της παρουσίας 2% (w/v) NaCl (v/v) ΙΥ, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κρυστάλλων μετά από 2 ώρες, σε αντίθεση με τη συνθήκη αναφοράς, όπου κρύσταλλοι σχηματίστηκαν μόλις μετά από 1 εβδομάδα. Συνεπώς, πλέον η επικρατέστερη θεωρία γύρω από τον τρόπο δράσης των ΙΥ στην πρωτεϊνική κρυστάλλωση είναι οι ειδικές διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων στη σταγόνα κρυστάλλωσης.

Το πιο ενδιαφέρον αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης είναι οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στη μορφολογία των κρυστάλλων λυσοζύμης για μικρότερες συγκεντρώσεις παράγοντα κατακρήμνισης NaCl και παρουσία ΙΥ. Η επίδραση των ΙΥ στην μορφολογία των κρυστάλλων λυσοζύμης μπορεί να αποδοθεί στην επιρροή συγκεκριμένων διαμοριακών αλληλεπιδράσεων και στη μακρομοριακή διαμόρφωση της λυσοζύμης στο διάλυμα κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης. Η επίδραση στην πυρήνωση της πρωτεΐνης και μετέπειτα στην ανάπτυξη των κρυστάλλων παίζει καθοριστικό ρόλο στην τελική μορφολογία των κρυστάλλων. [87]

Τα μόρια της λυσοζύμης φορτίζονται θετικά στις υπό εξέταση συνθήκες, αφού το pH ρυθμίζεται στα 4.8, μικρότερο δηλαδή από το pI της πρωτεΐνης που είναι στα 11.35. Επομένως, η παρουσία ΙΥ γύρω από την πρωτεΐνη μπορεί να επηρεάσει την κατανομή του φορτίου στην επιφάνειά της. Στα διαλύματα απουσία ΙΥ, τα ανιόντα χλωρίου Cl<sup>-</sup> είναι τα κύρια ιόντα που δεσμεύονται στην επιφάνεια των μορίων της πρωτεΐνης. Με την προσθήκη ΙΥ στο διάλυμα, εισάγονται νέα ανιόντα που ανταγωνίζονται τα ανιόντα χλωρίου. [86] Συγκεκριμένα, το κυκλοεξανορβοξυλικό ανιόν του υπό εξέταση ΙΥ είναι διαφορετικό από το Cl<sup>-</sup>, καθώς είναι μεγαλύτερο σε όγκο και συνεπώς έχει χαμηλότερη αρνητική πυκνότητα φορτίου. Με αυτόν τον τρόπο, η παρουσία του στο διάλυμα αλλάζει την αρχική κατανομή φορτίου στην επιφάνεια της λυσοζύμης με περισσότερα ανιόντα να συνδέονται με τα πρωτεϊνικά μόρια. Ως αποτέλεσμα, η δέσμευση του ανιόντος στη λυσοζύμη μπορεί να δικαιολογήσει τις μεταβολές στο ρυθμό ανάπτυξης των κρυστάλλων καθώς και στη μορφολογία τους. Πράγματι, για μικρότερη συγκέντρωση NaCl (2 και 3% (w/v)), και συνεπώς ανιόντων χλωρίου, και παρουσία ΙΥ, παρατηρήθηκε αλλαγή στη μορφολογία των κρυστάλλων. Ιδιαίτερα, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ΙΥ, η παρατήρηση αυτή αφορούσε όλους τους κρυστάλλους σε όλες τις σταγόνες με την ίδια συνθήκη.



Σχήμα 18: Γραφική αναπαράσταση της παρουσίας ιόντων σε πρωτεϊνικό διάλυμα. [88]

Επίσης, σε όλες τις συνθήκες με υψηλές συγκεντρώσεις ΙΥ πάνω από 1% (v/v) στη σταγόνα κρυστάλλωσης, παρουσιάστηκε ο σχηματισμός πολλών κρυστάλλων λυσοζύμης μικρού μεγέθους σε πολύ λίγο χρόνο. Το φαινόμενο αυτό μπορεί επίσης να αποδοθεί στην υψηλή συγκέντρωση κυκλοεξανοκαρβοξυλικών ανιόντων, που ανταγωνίζονται τα ανιόντα χλωρίου.

Συνεπώς, η απόκτηση κρυστάλλων διαφορετικής μορφολογίας υποδηλώνει την επίδραση του ΙΥ στη διευθέτηση των μορίων κατά την κρυστάλλωση. Οι πιο πρόσφατες έρευνες γύρω από αυτή τη δράση έδειξαν πως οι κρύσταλλοι διαφορετικής μορφολογίας οφείλονται σε αλλαγές της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, ιοντικά υγρά με διαφορετικό ανιόν μεταβάλλουν το περιεχόμενο σε α-έλικες και β-πτυχωτά φύλλα της λυσοζύμης, προωθώντας διαφορετικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων και συνεπώς διαφορετική μορφή κρυστάλλων. [87]

Ωστόσο, δεν είναι ακόμη βέβαιο αν η βελτίωση των αποτελεσμάτων κρυστάλλωσης που προκαλούνται από την παρουσία ΙΥ οφείλεται στην πραγματικότητα από τη δέσμευσή τους στην πρωτεϊνική επιφάνεια. Προκειμένου να βρεθεί εάν τα πρόσθετα έχουν δεσμευτεί στις πρωτεΐνες πρέπει να γίνει ανάλυση με ακτίνες Χ. Αν δεν έχουν δεσμευτεί, τότε η επίδραση αυτών στη μορφολογία και το μέγεθος των κρυστάλλων πιθανότατα οφείλεται σε μικρές αλλαγές στις συνθήκες του διαλύματος, όπως το pH σε εντοπισμένες περιοχές της πρωτεΐνης (local pH) ή αργή διάχυση των ατμών λόγω της χαμηλής τάσης ατμών των ΙΥ. Ωστόσο, αναλύσεις ακτίνων Χ κρυστάλλων που έχουν αναπτυχθεί παρουσία ΙΥ, έδειξαν ότι πράγματι μπορούν να προσδεθούν στη δομή της λυσοζύμης, επιβεβαιώνοντας τις παραπάνω παρατηρήσεις. [89]

Παρά αυτές τις ενδείξεις, ο μηχανισμός με τον οποίο τα ΙΥ και οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν σε διάλυμα δεν είναι ακόμη αποσαφηνισμένος. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται γύρω από τη συμπεριφορά του διαλύματος και τη φύση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων. Πιθανότατα ωστόσο δεν υπάρχει ένας μηχανισμός που να εξηγεί πως τα ΙΥ επηρεάζουν την πρωτεϊνική κρυστάλλωση, αλλά ένας συνδυασμός διαφορετικών τρόπων δράσης.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις αποτελούν πιθανότατα και την εξήγηση ως προς την αποτυχία του DES να βελτιώσει την κρυστάλλωση των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Η βασική διαφορά του υπό μελέτη βαθέως ευτηκτικού διαλύτη σε σχέση με το ιοντικό υγρό είναι ότι το τελευταίο διίσταται, ως ένα βαθμό, σε υδατικά διαλύματα. Αντιθέτως, το υπό μελέτη DES αποτελείται από χλωρίδιο χολίνης και γλυκερόλη σε μοριακή αναλογία 1:2 και έχει μοριακό, και όχι ιοντικό, χαρακτήρα. Τα συστατικά του DES συνδέονται με ένα πλέγμα δεσμών υδρογόνου το οποίο δεν αποδομείται πλήρως με τη διάλυση στο νερό. Ακόμη και στην μεγάλη αραιώση που χρησιμοποιείται, το δίκτυο δεσμών υδρογόνου παραμένει σε ένα ποσοστό και συμμετέχουν σε αυτό και μόρια νερού (τα αραιά διαλύματα των DES αναφέρονται συνήθως ως «DES in water»). [90]

Με βάση μελέτες που έχουν γίνει, έχει παρατηρηθεί ότι η λυσοζύμη από ασπράδι αυγού όρνιθας διατηρεί τη διαμόρφωση και την τεταρτοταγή δομή της σε υδατικό διάλυμα παρουσία DES χλωριδίου χολίνης – γλυκερόλης. [91] Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία γλυκερόλης στη σταγόνα κρυστάλλωσης, αυξάνει τη διαλυτότητα της λυσοζύμης, απαιτώντας μεγαλύτερη ποσότητα άλατος για το σχηματισμό κρυστάλλων. [92] Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται για τα παραπάνω αποτελέσματα, αφού για μικρότερη συγκέντρωση NaCl (2% (w/v)) και παρουσία 3% (v/v) DES, δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κρυστάλλων. Αντιθέτως, για μικρότερες συγκεντρώσεις DES σε συνδυασμό με μεγαλύτερη συγκέντρωση NaCl (4% (w/v)) σχηματίστηκαν κρύσταλλοι λυσοζύμης. Στα αποθαρρυντικά αποτελέσματα για τη χρήση DES στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών, πιθανότατα οφείλεται και το γεγονός ότι δεν υπάρχουν ακόμα μελέτες στη διαθέσιμη βιβλιογραφία ως προς την επίδρασή τους στις κρυσταλλώσεις πρωτεϊνικών μακρομορίων.

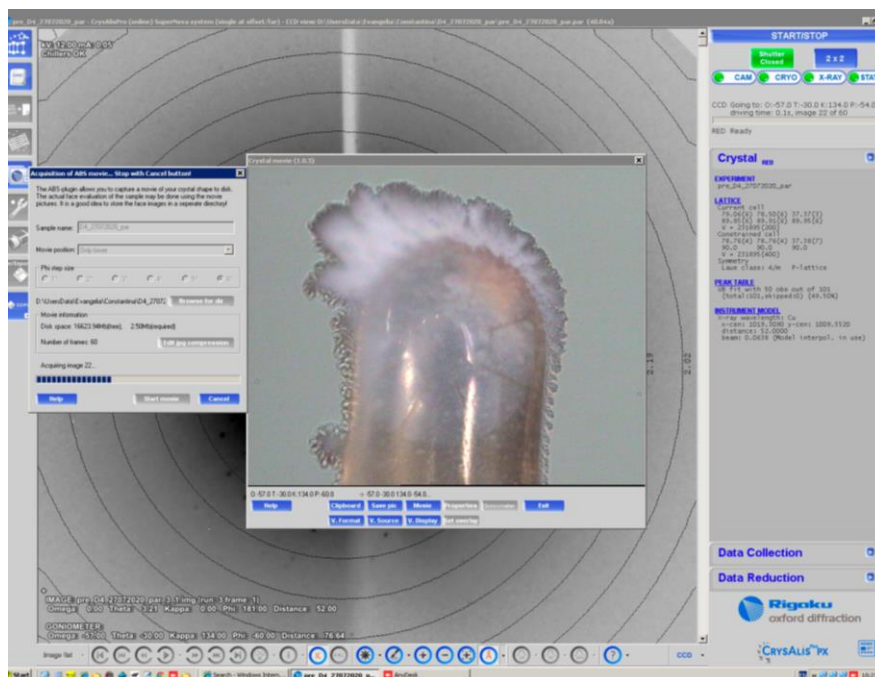
## 6.5 Κρυσταλλοποίηση κρυστάλλων λυσοζύμης

Προκειμένου να καταστεί δυνατή η περίθλαση ακτίνων X των πρωτεϊνικών κρυστάλλων είναι απαραίτητη η εύρεση κατάλληλου κρυσταλλοπροστατευτικού. Σε αυτό το πλαίσιο, δοκιμάστηκαν διάφορα κρυσταλλοπροστατευτικά για κρυστάλλους λυσοζύμης. Προκειμένου να προσδιοριστεί το κατάλληλο κρυσταλλοπροστατευτικό, ο κρύσταλλος εμβαπτίζεται σε αυτό και στη συνέχεια τοποθετείται σε ρεύμα υγρού αζώτου 100K όπου εξετάζεται αρχικά μακροσκοπικά για τον σχηματισμό ή μη πάγου. Οι κρύσταλλοι λυσοζύμης αναπτύχθηκαν σε συνθήκες κρυστάλλωσης 20mg/ml LZ, 4% (w/v) NaCl, 0.1M NaAcetate pH 4.8. Οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν εντοπίστηκαν με βάση τη διαθέσιμη βιβλιογραφία για παρόμοιες συνθήκες κρυστάλλωσης και κοινές πρακτικές που εφαρμόζονται κατά την κρυσταλλοποίηση πρωτεϊνικών κρυστάλλων. [27], [82], [93]

Αρχικά, δοκιμάστηκε η γλυκερόλη, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στην κρυσταλλοποίηση της λυσοζύμης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, χωρίς επιτυχία. Έπειτα, δοκιμάστηκε η μεθανόλη, η οποία σε συγκέντρωση 60% (v/v) δεν πάγωσε αμέσως μετά την τοποθέτηση του κρυστάλλου στο ρεύμα αζώτου αλλά και σε αυτήν τη περίπτωση σχηματίστηκε πάγος. Τόσο η αιθυλενογλυκόλη όσο και η 2-μεθυλο-2,4-πεντανεδιόλη (MPD) που δοκιμάστηκαν στη συνέχεια, οδήγησαν σε σχηματισμό πάγου.

Εκτός από τα οργανικά αυτά διαλύματα, δοκιμάστηκε και η τεχνική απομάκρυνσης του μητρικού υγρού γύρω από τον κρύσταλλο με την εμβάπτιση σε έλαια. Συγκεκριμένα δοκιμάστηκε το Parabar 10312 καθώς και το Silicone oil, χωρίς ωστόσο αποτέλεσμα. Ενδεικτικά στην Εικόνα 42, παρουσιάζεται ο σχηματισμός πάγου μετά την εμβάπτιση του κρυστάλλου στο Parabar 10312 και την τοποθέτησή του σε παροχή υγρού αζώτου 100K.





Εικόνα 42: Δοκιμή Parabar 10312 (Hampton Research) ως κρυοπροστατευτικό σε κρύσταλλο λυσοζύμης (HEWL) που αναπτύχθηκε παρουσία 4% (w/v) NaCl, 0.1M NaAcetate pH 4.8. Ο κρύσταλλος τοποθετήθηκε στο θάλαμο του X-ray υπό συνεχή παροχή αζώτου 100K. Παρατηρείται σχηματισμός πάγου γύρω από τον κρύσταλλο. Η εικόνα τραβήχτηκε με χρήση του λογισμικού Crysalis<sup>Pro</sup>PX της εταιρείας Rigaku®.

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα καθώς και αναλυτικά οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν συνοψίζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα των δοκιμαζόμενων κρυοπροστατευτικών διαλυμάτων. Με κόκκινο σημειώνονται οι συνθήκες που παρατηρήθηκε σχηματισμός πάγου αμέσως μετά την έκθεση σε 100K, με πορτοκαλί αυτές που σχηματίστηκε πάγος μετά από περισσότερη ώρα έκθεσης και με πράσινο αυτές που είχαν το επιθυμητό αποτέλεσμα.

| Κρυοπροστατευτικό                                  | Αποτέλεσμα |
|----------------------------------------------------|------------|
| 25% (v/v) γλυκερόλη                                |            |
| 30% (v/v) γλυκερόλη                                |            |
| 30% (v/v) μεθανόλη                                 |            |
| 40% (v/v) μεθανόλη                                 |            |
| 50% (v/v) μεθανόλη                                 |            |
| 60% (v/v) μεθανόλη                                 |            |
| 30% (v/v) αιθυλενογλυκόλη                          |            |
| 30% (v/v) MPD                                      |            |
| Parabar 10312                                      |            |
| Parabar 10312 (χωρίς ανάμιξη με διάλυμα δεξαμενής) |            |
| Silicone oil                                       |            |
| 20% (w/v) NaCl, 25% (v/v) γλυκερόλη                |            |
| 70% (v/v) silicone oil + 30% (v/v) αιθυλενογλυκόλη |            |
| 51% (v/v) μεθανόλη + 15% (v/v) γλυκερόλη           |            |



Συνεπώς, το κατάλληλο κρυοπροστατευτικό που εντοπίστηκε για τους κρυστάλλους λυσοζύμης που διερευνήθηκαν είναι το διάλυμα 51% (v/v) μεθανόλης και 15% (v/v) γλυκερόλης. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι σε παρόμοιες μελέτες, η χρήση 25% (v/v) γλυκερόλης έχει αποφανθεί ως κατάλληλο κρυοπροστατευτικό. [27], [82] Η δυσκολία που εμφανίστηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία πιθανότατα οφείλεται σε εξωτερικούς παράγοντες που διατάραξαν τα επίπεδα υγρασίας. Η ποιότητα του χρησιμοποιούμενου αζώτου ή η αύξηση της υγρασίας στον χώρο που είναι εγκατεστημένη η συμβατική πηγή της περίθλασης ακτίνων Χ μπορεί να αποτελούν πιθανές αιτίες. Τα πειράματα πρέπει να επαναληφθούν προκειμένου να επιβεβαιωθεί η καταλληλότητα του παραπάνω κρυοπροστατευτικού καθώς και να πραγματοποιηθεί η συλλογή των δεδομένων περίθλασης από κρυστάλλους λυσοζύμης που αναπτύχθηκαν παρουσία των προσθέτων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η κρυστάλλωση πρωτεϊνικών μορίων αποτελεί απαραίτητη τεχνική προκειμένου να βρεθεί η τριδιάστατη δομή του μορίου με τη χρήση της περίθλασης ακτίνων Χ. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερα επίπονη και χρονοβόρα, ενώ δεν εγγυάται την ανάπτυξη κρυστάλλων για όλες τις πρωτεΐνες. Στο πλαίσιο αυτό, οι ερευνητές αξιολογούν την επίδραση ορισμένων ενώσεων ως πρόσθετα στην κρυστάλλωση, προκειμένου να βελτιώσουν τις συνθήκες. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η επίδραση οργανικών ενώσεων, ενός ιοντικού υγρού (ΙΥ), το κυκλοεξανοϊκό δις(2-υδροξυ-αιθυλ)αμμώνιο, και ενός βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (DES), μίγμα χλωριούχου χολίνης και γλυκερόλης σε μοριακή αναλογία 1:2, στην κρυστάλλωση της λυσοζύμης και της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στην Τ διαμόρφωση, με χρήση της τεχνικής διάχυσης ατμών καθήμενης σταγόνας. Οι συνθήκες κρυστάλλωσης επιλέχθηκαν μετά από κατάλληλη διαλογή και βελτιστοποιήθηκαν όπου ήταν δυνατόν.

Κατά την κρυστάλλωση της λυσοζύμης, δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις παράγοντα κατακρήμνισης NaCl σε συνδυασμό με διαφορετικές συγκεντρώσεις ΙΥ. Το βασικό αποτελέσματα σε αυτές τις δοκιμές κρυστάλλωσης είναι ότι παρουσία ΙΥ και για μικρότερες συγκεντρώσεις παράγοντα κατακρήμνισης (2 και 3% (w/v)), παρατηρείται μεταβολή της μορφολογίας των κρυστάλλων της λυσοζύμης, οι οποίοι αναπτύσσονται περισσότερο σε μια κατεύθυνση ως ραβδόμορφοι. Τα καλύτερα αποτελέσματα παρατηρούνται για 4% (w/v) NaCl και χαμηλές συγκεντρώσεις 0.5 και 1% (v/v) ΙΥ στη σταγόνα κρυστάλλωσης, αφού οι κρύσταλλοι που σχηματίζονται έχουν λίγο μεγαλύτερο μέγεθος από τις συνθήκες αναφοράς και είναι καλής ποιότητας για περαιτέρω ανάλυση με ακτίνες Χ. Αυξάνοντας τη συγκέντρωση του ΙΥ παραπάνω, παρατηρείται ραγδαία μείωση του μεγέθους των κρυστάλλων με παράλληλη αύξηση του αριθμού τους. Τέλος, ακόμη μεγαλύτερη αύξηση της συγκέντρωσης του ΙΥ στα 10% (v/v), οδηγεί σε έντονη καθίζηση της πρωτεΐνης. Αντιθέτως, η χρήση του DES ως πρόσθετο δεν παρουσίασε βελτίωση στην κρυστάλλωση της λυσοζύμης, για καμία από τις δοκιμαζόμενες συνθήκες. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του DES φαίνεται πως παρεμποδίζουν την κρυστάλλωση ή οδηγούν ακόμη και στην ανάπτυξη παραμορφωμένων κρυστάλλων.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου δεν παρουσιάζει όμοια συμπεριφορά σε σχέση με την λυσοζύμη παρουσία προσθέτων. Συγκεκριμένα, μόνο παρουσία 5% (v/v) ΙΥ σχηματίστηκε ένας ευμεγέθους κρύσταλλος καλής ποιότητας. Σε όλες τις υπόλοιπες συνθήκες, τόσο για ΙΥ όσο και για DES, δεν παρατηρήθηκε βελτίωση της κρυστάλλωσης σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς.

Είναι εμφανές ότι η χρήση του ΙΥ ως πρόσθετου παρουσίασε τα βέλτιστα αποτελέσματα και για δύο πρωτεΐνες. Η κύρια αιτία επίδρασής του είναι πιθανώς η παρουσία των ιόντων του ΙΥ στο πρωτεϊνικό διάλυμα, τα οποία αλληλοεπιδρούν με τα πρωτεϊνικά μόρια. Σε κάθε περίπτωση όμως, η επίδραση των προσθέτων δεν ακολουθεί την ίδια πορεία και για τις δύο πρωτεΐνες. Τα αποτελέσματα για κάθε πρωτεΐνη είναι διαφορετικά, υποδηλώνοντας πως η δράση των προσθέτων εξαρτάται άμεσα από το πρωτεϊνικό μόριο που κρυσταλλώνεται.

Ομοίως με την διαλογή και τη βελτιστοποίηση των συνθηκών κρυστάλλωσης, απαιτείται και η εύρεση, επιλογή και βελτιστοποίηση ενός κατάλληλου κρυστοπροστατευτικού, το οποίο αποτρέπει το σχηματισμό πάγου γύρω από τον κρύσταλλο κατά την περίθλαση ακτίνων Χ. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει τη μέθοδο της δοκιμής και του σφάλματος διαφόρων κρυστοπροστατευτικών μέχρι την εύρεση του κατάλληλου που όταν ψύχεται σε κρυογονική

θερμοκρασία δεν σχηματίζει πάγο, καταστρέφοντας τον κρύσταλλο. Στην παρούσα μελέτη δοκιμάστηκαν ευρέως χρησιμοποιούμενες ενώσεις ως κρυοπροστατευτικά ενώ εφαρμόστηκαν μέθοδοι αύξησης της συγκέντρωσης του κρυοπροστατευτικού, ανάμιξης πιθανών διαλυμάτων κρυοπροστατευτικών καθώς και η χρήση ελαίων. Αυτές οι μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί σε μια πληθώρα κρυσταλλικών βιολογικών μακρομορίων και πλέον χρησιμοποιούνται ευρέως ως κοινές τεχνικές στην πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία. Τα καλύτερα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν για διάλυμα 51% (v/v) μεθανόλης και 15% (v/v) γλυκερόλης, όπου δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός πάγου όταν οι κρύσταλλοι μεταφέρθηκαν σε ρεύμα αζώτου 100K. Ωστόσο, η δυσκολία εύρεσης κρυοπροστατευτικού ίσως οφείλεται και στη διατάραξη των συνθηκών υγρασίας κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, οι οποίες ενθάρρυναν το σχηματισμό πάγου.

Συνεπώς, με βάση τα παραπάνω συμπεράσματα, η παρούσα μελέτη έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την αξιοποίηση ΙΥ ως προσθέτων στην πρωτεϊνική κρυστάλλωση, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες. Ιδιαίτερα, η χρήση ιοντικών υγρών φαίνεται πως επιδρά θετικά και βελτιώνει τις συνθήκες κρυστάλλωσης πρωτεϊνικών μακρομορίων. Περισσότερες έρευνες γύρω από τη χρήση των οργανικών αυτών ενώσεων ως πρόσθετα απαιτούνται ώστε να αποσαφηνισθεί ο τρόπος και ο μηχανισμός δράσης τους. Όσο αφορά τη λυσοζύμη, νέες δοκιμές κρυστάλλωσης με διαφορετικά ιοντικά υγρά πιθανότατα διαλευκάνουν ακόμη περισσότερο τον τρόπο δράσης τους. Ακόμη, λόγω της φύσης των ΙΥ, η δυνατότητα προσαρμογής ανιόντων και κατιόντων παρέχει την ευκαιρία δοκιμής διαφορετικών ανιόντων στο ίδιο πρωτεϊνικό μόριο, προκειμένου να ελεγχθεί σε βάθος η επίδραση τους στις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-προσθέτου. Αντιθέτως, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου πρέπει να ερευνηθεί εκ νέου με το ΙΥ της παρούσας εργασίας σε διαφορετικές συνθήκες. Αύξηση της συγκέντρωσης του ΙΥ αποτελεί μια πιθανή λύση για την ανάπτυξη κρυστάλλων του συγκεκριμένου πρωτεϊνικού μορίου.

Ωστόσο, όλα τα αποτελέσματα και συμπεράσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας εξάχθηκαν με βάση οπτικές παρατηρήσεις με χρήση στερεοσκοπίου. Ευμεγέθεις κρύσταλλοι μπορεί να φαίνονται «όμορφοι» εξωτερικά, όμως η διευθέτηση των μορίων στο εσωτερικό να είναι τέτοια που δεν επιτρέπει τον προσδιορισμό της δομής τους. Προκειμένου, να επιβεβαιωθεί η ποιότητα των κρυστάλλων που σχηματίστηκαν, απαιτείται ανάλυση με περίθλαση ακτίνων Χ. Η μελέτη των κρυοπροστατευτικών λυσοζύμης που πραγματοποιήθηκε, μπορεί να βοηθήσει αυτές τις μελλοντικές αναλύσεις. Με βάση τα περιθλασιγράμματα που θα ληφθούν για τους κρυστάλλους, μπορούν επίσης να εξαχθούν παρατηρήσεις ως προς την πιθανή πρόσδεση των προσθέτων στο εσωτερικό των κρυστάλλων, βοηθώντας περαιτέρω την μελέτη της επίδρασης τους.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] A. Blanco and G. Blanco, "Proteins," in *Medical Biochemistry*, Academic Press, 2017, pp. 21–71.
- [2] V. Pollock, "Proteins," in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 2007, pp. 1–11.
- [3] R. P. Joosten, "X-Ray structure re-refinement. Combining old data with new methods for better structural bioinformatics," Radboud University Nijmegen, 2010.
- [4] B. Alberts *et al.*, "Protein Structure and Function," in *Essential Cell Biolog*, 3rd ed., Garland Science, 2010, pp. 119–167.
- [5] A. K. Patel, R. R. Singhanian, and A. Pandey, "Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes," in *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*, Academic Press, 2017, pp. 13–41.
- [6] B. Rupp, *Biomolecular Crystallography*. Garland Science, 2010.
- [7] D. Ercan and A. Demirci, "Recent advances for the production and recovery methods of lysozyme," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 1, no. 11, pp. 1078–1088, 2016, doi: 10.3109/07388551.2015.1084263.
- [8] T. Silveti, S. Morandi, M. Hintersteiner, and M. Brasca, "Use of Hen Egg White Lysozyme in the Food Industry," in *Egg Innovations and Strategies for Improvements*, Academic Press, 2017, pp. 233–242.
- [9] C. C. Blake, L. N. Johnson, G. A. Mair, A. C. North, D. C. Phillips, and V. R. Sarma, "Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme.," *Proc. R. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci.*, vol. 167, no. 9, pp. 378–388, 1975, doi: 10.1098/rspb.1967.0035.
- [10] C. C. F. Blake, D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, and V. R. Sarma, "Structure of hen egg-white lysozyme: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution," *Nature*, vol. 22, no. 206, pp. 757–761, 1965, doi: 10.1038/206757a0.
- [11] S. A. Ragland and A. K. Criss, "From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme," *PLoS Pathog.*, vol. 13, no. 9, pp. 1–22, 2017, doi: 10.1371/journal.ppat.1006512.
- [12] N. C. Strynadka and M. N. James, "Lysozyme: a model enzyme in protein crystallography.," *EXS*, pp. 185–222, 1996, doi: 10.1007/978-3-0348-9225-4\_11.
- [13] S. D. Durbin and G. Feher, "Crystal growth studies of lysozyme as a model for protein crystallization," *J. Cryst. Growth*, vol. 76, no. 3, pp. 583–592, 1986, doi: 10.1016/0022-0248(86)90175-2.
- [14] S. E. Zographos *et al.*, "The structure of glycogen phosphorylase b with an alkyl-dihydropyridine-dicarboxylic acid compound, a novel and potent inhibitor," *Structure*, vol. 5, no. 11, pp. 1413–1425, 1997, doi: 10.1016/S0969-2126(97)00292-X.
- [15] J. M. Hayes, "Computer-Aided Discovery of Glycogen Phosphorylase Inhibitors Exploiting Natural Products," in *Discovery and Development of Antidiabetic Agents from Natural Products: Natural Product Drug Discovery*, Elsevier, 2017, pp. 29–62.
- [16] E. D. Chrysina, A. Chajistamatiou, and M. Chegkazi, "From Structure – Based to Knowledge – Based Drug Design Through X-Ray Protein Crystallography: Sketching

- Glycogen Phosphorylase Binding Sites," *Curr. Med. Chem.*, vol. 18, no. 17, pp. 2620–2629, 2011, doi: 10.2174/092986711795933632.
- [17] N. G. Oikonomakos *et al.*, "N-acetyl-β-D-glucopyranosylamine: A potent T-state inhibitor of glycogen phosphorylase. A comparison with α-D-glucose," *Protein Sci.*, vol. 4, no. 12, pp. 2469–2477, 1995, doi: 10.1002/pro.5560041203.
- [18] I. R. Krauss, A. Merlino, A. Vergara, and F. Sica, "An overview of biological macromolecule crystallization," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 6, pp. 11643–11691, 2013, doi: 10.3390/ijms140611643.
- [19] "RCSB Stats." <https://www.rcsb.org/stats> (accessed Feb. 01, 2021).
- [20] N. E. Chayen and E. Saridakis, "Protein crystallization: From purified protein to diffraction-quality crystal," *Nat. Methods*, vol. 5, no. 2, pp. 147–153, 2008, doi: 10.1038/nmeth.f.203.
- [21] A. McPherson, "Crystallization of Macromolecules," in *Introduction to Macromolecular Crystallography*, John Wiley & Sons, Inc., 2009, pp. 19–49.
- [22] G. Rhodes, *Crystallography Made Crystal Clear*, 3rd ed. Elsevier, 2006.
- [23] A. McPherson, C. Nguyen, R. Cudney, and S. B. Larson, "The Role of Small Molecule Additives and Chemical Modification in Protein Crystallization," *Cryst. Growth Des.*, pp. 1469–1474, 2011.
- [24] F. Gorrec and J. Löwe, "Automated protocols for macromolecular crystallization at the MRC laboratory of molecular biology," *J. Vis. Exp.*, vol. 131, 2018, doi: 10.3791/55790.
- [25] A. McPherson and B. Cudney, "Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules," *Acta Crystallogr. Sect. F Structural Biol. Commun.*, vol. 70, pp. 1445–1467, 2014, doi: 10.1107/S2053230X14019670.
- [26] Ν. Γλυκός, *Μία μη μαθηματική εισαγωγή στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών*. Αλεξανδρούπολη: Κάλλιπος, 2015.
- [27] R. A. Judge, S. Takahashi, K. L. Longenecker, E. H. Fry, C. Abad-Zapatero, and M. L. Chiu, "The effect of ionic liquids on protein crystallization and X-ray diffraction resolution," *Cryst. Growth Des.*, vol. 9, no. 8, pp. 3463–3469, 2009, doi: 10.1021/cg900140b.
- [28] Z. Lei, B. Chen, Y. M. Koo, and D. R. Macfarlane, "Introduction: Ionic Liquids," *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 10, pp. 6633–6635, 2017, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00246.
- [29] E. Bodo and V. Migliorati, "Theoretical Description of Ionic Liquids," in *Ionic Liquids - Classes and Properties*, InTech, 2012, pp. 105–150.
- [30] T. Welton, "Ionic liquids in catalysis," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 248, no. 21–24, pp. 2459–2477, 2004, doi: 10.1016/j.ccr.2004.04.015.
- [31] Q. Zhao, H. Chu, B. Zhao, Z. Liang, L. Zhang, and Y. Zhang, "Advances of ionic liquids-based methods for protein analysis," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 108, pp. 239–246, 2018, doi: 10.1016/j.trac.2018.09.008.
- [32] M. J. Earle and K. R. Seddon, "Ionic liquids: Green solvents for the future," *Pure Appl. Chem.*, vol. 72, no. 7, pp. 1391–1398, 2000, doi: 10.1021/bk-2002-0819.ch002.

- [33] T. L. Greaves and C. J. Drummond, "Protic ionic liquids: Properties and applications," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 1, pp. 206–237, 2008, doi: 10.1021/cr068040u.
- [34] D. MacFarlane, M. Kar, and J. Pringle, *Fundamentals of Ionic Liquids Ionic Liquids in Biotransformations and Electrodeposition from Ionic Handbook of Green Chemistry – Green Solvents Electrochemical Aspects of Ionic Liquids*, 2nd edition Nanocatalysis in Ionic Liquids. Wiley VCH, 2017.
- [35] H. Olivier-Bourbigou, L. Magna, and D. Morvan, "Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications," *Appl. Catal. A Gen.*, vol. 373, no. 1–2, pp. 1–56, 2010, doi: 10.1016/j.apcata.2009.10.008.
- [36] A. Kumar, M. Bisht, and P. Venkatesu, *Biocompatibility of ionic liquids towards protein stability: A comprehensive overview on the current understanding and their implications*, vol. 96. Elsevier B.V., 2017.
- [37] A. H. Pakiari, S. Siahrostami, and T. Ziegler, "An insight into microscopic properties of aprotic ionic liquids: A DFT study," *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, vol. 955, no. 1–3, pp. 47–52, 2010, doi: 10.1016/j.theochem.2010.05.029.
- [38] S. K. Singh and A. W. Savoy, "Ionic liquids synthesis and applications: An overview," *J. Mol. Liq.*, vol. 297, p. 112038, 2020, doi: 10.1016/j.molliq.2019.112038.
- [39] A. R. Hajipour and F. Rafiee, "Recent Progress in Ionic Liquids and their Applications in Organic Synthesis," *Org. Prep. Proced. Int.*, vol. 47, no. 4, pp. 1–60, 2015, doi: 10.1080/00304948.2015.1052317.
- [40] J. H. Davis, "Task-specific ionic liquids," *Chem. Lett.*, vol. 33, no. 9, pp. 1072–1077, 2004, doi: 10.1246/cl.2004.1072.
- [41] C. P. Mehnert, "Supported ionic liquid catalysis," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 11, no. 1, pp. 50–56, 2005, doi: 10.1002/chem.200400683.
- [42] Y. Fukaya, Y. Iizuka, K. Sekikawa, and H. Ohno, "Bio ionic liquids: Room temperature ionic liquids composed wholly of biomaterials," *Green Chem.*, vol. 9, no. 11, pp. 1155–1157, 2007, doi: 10.1039/b706571j.
- [43] J. L. McDonald, R. E. Sykora, P. Hixon, A. Mirjafari, and J. H. Davis, "Impact of water on CO<sub>2</sub> capture by amino acid ionic liquids," *Environ. Chem. Lett.*, vol. 12, no. 1, pp. 201–208, 2014, doi: 10.1007/s10311-013-0435-1.
- [44] C. Chiappe, A. Marra, and A. Mele, "Synthesis and Applications of Ionic Liquids Derived from Natural Sugars," in *Carbohydrates in Sustainable Development II*, Springer, 2010, pp. 177–195.
- [45] Z. Yinghuai, K. Tang, and N. S., "Applications of Ionic Liquids in Lignin Chemistry," in *Ionic Liquids - New Aspects for the Future*, InTech, 2013, pp. 315–346.
- [46] J. Ding and D. W. Armstrong, "Chiral ionic liquids: Synthesis and applications," *Chirality*, vol. 17, no. 5, pp. 281–292, 2005, doi: 10.1002/chir.20153.
- [47] D. Mecerreyes, "Polymeric ionic liquids: Broadening the properties and applications of polyelectrolytes," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 36, no. 12, pp. 1629–1648, 2011, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.05.007.
- [48] C. B. Jones, R. Haiges, T. Schroer, and K. O. Christe, "Oxygen-balanced energetic ionic liquid," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 45, no. 30, pp. 4981–4984, 2006, doi: 10.1002/anie.200600735.



- [49] E. Sebastiao, C. Cook, A. Hu, and M. Murugesu, "Recent developments in the field of energetic ionic liquids," *J. Mater. Chem. A*, vol. 2, no. 22, pp. 8153–8170, 2014, doi: 10.1039/c4ta00204k.
- [50] T. L. Greaves and C. J. Drummond, "Protic Ionic Liquids: Evolving Structure-Property Relationships and Expanding Applications," *Chem. Rev.*, vol. 115, no. 20, pp. 11379–11448, 2015, doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00158.
- [51] S. Mallakpour and M. Dinari, "Ionic liquids as green solvents: Progress and prospects," in *Green Solvents II: Properties and Applications of Ionic Liquids*, Springer, 2012, pp. 1–32.
- [52] J. S. Wilkes, "Properties of ionic liquid solvents for catalysis," *J. Mol. Catal. A Chem.*, vol. 214, no. 1, pp. 11–17, 2004, doi: 10.1016/j.molcata.2003.11.029.
- [53] S. Aparicio, M. Atilhan, and F. Karadas, "Thermophysical properties of pure ionic liquids: Review of present situation," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 49, no. 20, pp. 9580–9595, 2010, doi: 10.1021/ie101441s.
- [54] J. D. Holbrey and R. D. Rogers, "Physiochemical Properties of Ionic Liquids: Melting Points and Phase Diagrams," in *Ionic liquids in synthesis*, 2nd ed., vol. 1, Wiley VCH, 2007, pp. 57–174.
- [55] K. R. Seddon, "Ionic Liquids for Clean Technology," *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, vol. 68, no. 4, pp. 351–356, 1997.
- [56] Z. Zhao and Y. Dai, "Ionic Liquids as Green Solvents for Alkylation and Acylation," in *Green Solvents II: Properties and Applications of Ionic Liquids*, Springer, 2012, pp. 33–66.
- [57] N. V. Plechkova and K. R. Seddon, "Applications of ionic liquids in the chemical industry," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 37, no. 1, pp. 123–150, 2008, doi: 10.1039/b006677j.
- [58] D. Zhao, M. Wu, Y. Kou, and E. Min, "Ionic liquids: Applications in catalysis," *Catal. Today*, vol. 74, no. 1–2, pp. 157–189, 2002, doi: 10.1016/S0920-5861(01)00541-7.
- [59] S. Pandey, "Analytical applications of room-temperature ionic liquids: A review of recent efforts," *Anal. Chim. Acta*, vol. 556, no. 1, pp. 38–45, 2006, doi: 10.1016/j.aca.2005.06.038.
- [60] M. Habulin, P. Mateja, and Ž. Knez, "Application of Ionic Liquids in Biocatalysis," in *IONIC LIQUIDS: APPLICATIONS AND PRESPECTIVES*, InTech, 2011, pp. 461–480.
- [61] K. Fujita, D. R. MacFarlane, and M. Forsyth, "Protein solubilising and stabilising ionic liquids," *Chem. Commun.*, vol. 70, no. 38, pp. 4804–4806, 2005, doi: 10.1039/b508238b.
- [62] K. Fujita *et al.*, "Solubility and stability of cytochrome c in hydrated ionic liquids: Effect of oxo acid residues and kosmotropicity," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 7, pp. 2080–2086, 2007, doi: 10.1021/bm070041o.
- [63] H. Zhao *et al.*, "Effect of kosmotropicity of ionic liquids on the enzyme stability in aqueous solutions," *Bioorg. Chem.*, vol. 34, no. 1, pp. 15–25, 2006, doi: 10.1016/j.bioorg.2005.10.004.
- [64] E. Yamamoto, S. Yamaguchi, and T. Nagamune, "Protein refolding by N-alkylpyridinium and n-alkyl-n-methylpyrrolidinium ionic liquids," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 164, no. 6, pp. 957–967, 2011, doi: 10.1007/s12010-011-9187-1.

- [65] F. Van Rantwijk and R. A. Sheldon, "Biocatalysis in Ionic Liquids," *Chem. Rev.*, vol. 107, no. 6, pp. 2757–2785, 2007.
- [66] D. H. Cheng, X. W. Chen, Y. Shu, and J. H. Wang, "Selective extraction/isolation of hemoglobin with ionic liquid 1-butyl-3-trimethylsilylimidazolium hexafluorophosphate (BtmsimPF<sub>6</sub>)," *Talanta*, vol. 75, no. 5, pp. 1270–1278, 2008, doi: 10.1016/j.talanta.2008.01.044.
- [67] Z. Du, Y. L. Yu, and J. H. Wang, "Extraction of proteins from biological fluids by use of an ionic liquid/aqueous two-phase system," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 13, no. 7, pp. 2130–2137, 2007, doi: 10.1002/chem.200601234.
- [68] X. Lin, Y. Wang, Q. Zeng, X. Ding, and J. Chen, "Extraction and separation of proteins by ionic liquid aqueous two-phase system," *Analyst*, vol. 138, no. 21, pp. 6445–6453, 2013, doi: 10.1039/c3an01301d.
- [69] R. Buchfink, A. Tischer, G. Patil, R. Rudolph, and C. Lange, "Ionic liquids as refolding additives: Variation of the anion," *J. Biotechnol.*, vol. 150, no. 1, pp. 64–72, 2010, doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.07.003.
- [70] N. Byrne, L. M. Wang, J. P. Belieres, and C. A. Angell, "Reversible folding-unfolding, aggregation protection, and multi-year stabilization, in high concentration protein solutions, using ionic liquids," *Chem. Commun.*, no. 26, pp. 2714–2716, 2007, doi: 10.1039/b618943a.
- [71] D. F. Kennedy, C. J. Drummond, T. S. Peat, and J. Newman, "Evaluating protic ionic liquids as protein crystallization additives," *Cryst. Growth Des.*, vol. 11, no. 5, pp. 1777–1785, 2011, doi: 10.1021/cg1017104.
- [72] Z. Wang, L. Dang, Y. Han, P. Jiang, and H. Wei, "Crystallization control of thermal stability and morphology of hen egg white lysozyme crystals by ionic liquids," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 9, pp. 5444–5448, 2010, doi: 10.1021/jf1000343.
- [73] A. Paiva, R. Craveiro, I. Aroso, M. Martins, R. L. Reis, and A. R. C. Duarte, "Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century," *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 2, no. 5, pp. 1063–1071, 2014, doi: 10.1021/sc500096j.
- [74] Q. Zhang, K. De Oliveira Vigier, S. Royer, and F. Jérôme, "Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 21, pp. 7108–7146, 2012, doi: 10.1039/c2cs35178a.
- [75] E. L. Smith, A. P. Abbott, and K. S. Ryder, "Deep Eutectic Solvents (DESS) and Their Applications," *Chem. Rev.*, vol. 114, no. 21, pp. 11060–11082, 2014, doi: 10.1021/cr300162p.
- [76] G. García, S. Aparicio, R. Ullah, and M. Atilhan, "Deep eutectic solvents: Physicochemical properties and gas separation applications," *Energy and Fuels*, vol. 29, no. 4, pp. 2616–2644, 2015, doi: 10.1021/ef5028873.
- [77] H. Shekaari, M. T. Zafarani-Moattar, A. Shayanfar, and M. Mokhtarpour, "Effect of choline chloride/ethylene glycol or glycerol as deep eutectic solvents on the solubility and thermodynamic properties of acetaminophen," *J. Mol. Liq.*, vol. 249, pp. 1222–1235, 2018, doi: 10.1016/j.molliq.2017.11.057.
- [78] Y. Dai, J. van Spronsen, G. J. Witkamp, R. Verpoorte, and Y. H. Choi, "Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology," *Anal. Chim. Acta*, vol. 766, pp. 61–68, 2013, doi: 10.1016/j.aca.2012.12.019.

- [79] M. C. Gutiérrez, M. L. Ferrer, C. R. Mateo, and F. Del Monte, "Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: A suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures," *Langmuir*, vol. 25, no. 10, pp. 5509–5515, 2009, doi: 10.1021/la900552b.
- [80] Y. P. Mbous, M. Hayyan, A. Hayyan, W. F. Wong, M. A. Hashim, and C. Y. Looi, "Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges," *Biotechnol. Adv.*, vol. 35, no. 2, pp. 105–134, 2017, doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.006.
- [81] <https://www.mitegen.com/product/24-well-big-sitting-drop-crystallization-plate/> (accessed Dec. 19, 2020).
- [82] X. Chen, Y. Ji, and J. Wang, "Improvement on the crystallization of lysozyme in the presence of hydrophilic ionic liquid," *Analyst*, vol. 135, no. 9, pp. 2241–2248, 2010, doi: 10.1039/c0an00244e.
- [83] X. Li, X. Xu, Y. Dan, J. Feng, L. Ge, and M. Zhang, "The crystallization of lysozyme in the system of ionic liquid [BMIm][BF<sub>4</sub>]-water," *Cryst. Res. Technol.*, vol. 43, no. 10, pp. 1062–1068, 2008, doi: 10.1002/crat.200800040.
- [84] Α. Τζανή, "Σύνθεση και εφαρμογές βιοαποικοδομήσιμων ιοντικών υγρών," Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2017.
- [85] I. Delso, C. Lafuente, J. Muñoz-Embid, and M. Artal, "NMR study of choline chloride-based deep eutectic solvents," *J. Mol. Liq.*, vol. 290, 2019, doi: 10.1016/j.molliq.2019.111236.
- [86] X. Yu *et al.*, "Evaluating the role of ionic liquids (ILs) in the crystallization of lysozyme," *J. Mol. Liq.*, vol. 296, p. 112018, 2019, doi: 10.1016/j.molliq.2019.112018.
- [87] Z. Wang, T. Liu, C. Lu, and L. Dang, "Manipulating crystallization in lysozyme and supramolecular self-arrangement in solution using ionic liquids," *CrystEngComm*, vol. 20, no. 16, pp. 2284–2291, 2018, doi: 10.1039/c8ce00107c.
- [88] K. Fujita, "Ionic Liquids as Stabilization and Refolding Additives and Solvents for Proteins," in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2019.
- [89] M. Kowacz, A. Mukhopadhyay, A. L. Carvalho, J. M. S. S. Esperança, M. J. Romão, and L. P. N. Rebelo, "Hofmeister effects of ionic liquids in protein crystallization: Direct and water-mediated interactions," *CrystEngComm*, 2012, doi: 10.1039/c2ce25129a.
- [90] N. López-Salas *et al.*, "Looking at the 'water-in-Deep-Eutectic-Solvent' System: A Dilution Range for High Performance Eutectics," *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2019, doi: 10.1021/acssuschemeng.9b05096.
- [91] A. Sanchez-Fernandez, K. J. Edler, T. Arnold, D. Alba Venero, and A. J. Jackson, "Protein conformation in pure and hydrated deep eutectic solvents," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, doi: 10.1039/c7cp00459a.
- [92] H. Sedgwick, J. E. Cameron, W. C. K. Poon, and S. U. Egelhaaf, "Protein phase behavior and crystallization: Effect of glycerol," *J. Chem. Phys.*, 2007, doi: 10.1063/1.2771168.
- [93] E. Pellegrini, D. Piano, and M. W. Bowler, "Direct cryocooling of naked crystals: Are cryoprotection agents always necessary?," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 67, no. 10, pp. 902–906, 2011, doi: 10.1107/S0907444911031210.