



Επίδραση της αρχιτεκτονικής και του περιορισμού στην αυτοοργάνωση και στη δυναμική πολυπεπτιδίων.

Antonis Gitsas

► To cite this version:

Antonis Gitsas. Επίδραση της αρχιτεκτονικής και του περιορισμού στην αυτοοργάνωση και στη δυναμική πολυπεπτιδίων.. Soft Condensed Matter [cond-mat.soft]. University of Ioannina, 2008. Greek. <NNT: >. <tel-00663046>

HAL Id: tel-00663046

<https://theses.hal.science/tel-00663046>

Submitted on 26 Jan 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΣΙΚΗΣ

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Φυσικής



**Επίδραση της Αρχιτεκτονικής και του Περιορισμού
στην Αυτοοργάνωση και στη Δυναμική
Πολυπεπτιδίων**

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ
ΤΟΥ

Αντώνη Γίτσα

Ιωάννινα 2008

Copyright © Dr. Antonis Gitsas

www.macromolecules.eu

«Επίδραση της αρχιτεκτονικής και του περιορισμού στην
αυτοοργάνωση και στη δυναμική πολυπεπτιδίων»

Διδακτορική Διατριβή

Αντώνη Γίτσα
Τμήμα Φυσικής
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αυγερόπουλος Απόστολος
Επικ. Καθηγητής,
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών,
Παν/μιο Ιωαννίνων

Ευαγγέλου Σπυρίδων
Καθηγητής, Τμήμα Φυσικής, Παν/μιο Ιωαννίνων

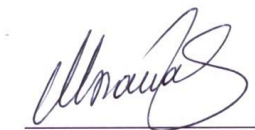
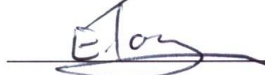
Ιατρού Ερμόλαος
Επικ. Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Κοσμάς Μάριος
Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Παν/μιο Ιωαννίνων

Μπάκας Θωμάς
Καθηγητής, Τμήμα Φυσικής, Παν/μιο Ιωαννίνων

Παπανικολάου Νικόλαος
Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Φυσικής, Παν/μιο Ιωαννίνων

Φλούδας Γεώργιος
Καθηγητής, Τμήμα Φυσικής, Παν/μιο Ιωαννίνων



Περίληψη

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η επίδραση της αρχιτεκτονικής καθώς και του περιορισμού και των επιφανειών στην αυτοοργάνωση και στη δυναμική πολυπεπτιδίων, με σκοπό να απαντηθούν ορισμένα ανοικτά ερωτήματα της βιοφυσικής των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, δεν είναι απολύτως κατανοητός ο τρόπος που η δευτεροταγής δομή επηρεάζεται από την αυτοοργάνωση. Επιπλέον, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για τρόπους με τους οποίους είναι δυνατός ο έλεγχος της δευτεροταγούς δομής. Ο έλεγχος της δευτεροταγούς δομής αποτελεί κεντρικό σημείο στη σύνθεση φαρμάκων εναντίον εκφυλιστικών ασθενειών που σχετίζονται με ελαττωματικές πρωτεΐνες, καθώς και στη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων. Εκτός από τη δομή, η γνώση της δυναμικής τέτοιων συστημάτων έχει επίσης σημασία σε βιολογικές διεργασίες, διότι έχει επίπτωση στη λειτουργικότητα των πολυπεπτιδίων. Ακόμη, ο μηχανισμός της μετατόπισης των πρωτεϊνών στο κύτταρο εγείρει ερωτήματα για τον τρόπο διέλευσής τους διαμέσου στενών διαύλων. Η εργασία αποτελείται από δύο μέρη:

Στο πρώτο μέρος της εργασίας (Κεφάλαια 5-8), μελετήθηκε η επίδραση της αρχιτεκτονικής στις δύο κύριες δευτεροταγείς δομές πολυπεπτιδίων (α -έλικες/ β -φύλλα), καθώς και στη δυναμική τους. Ιδιαίτερα μας απασχόλησε η επίδραση στη σταθερότητα και στο μήκος εμμόνης των δευτεροταγών δομών. Γι' αυτόν το σκοπό μελετήθηκαν (α) πολυπεπτίδια με στατιστική εναλλαγή επαναλαμβανόμενων δομικών μονάδων που παρουσιάζουν και τις δύο δευτεροταγείς δομές, (β) δισυσταδικά συμπολυπεπτίδια, με μία συστάδα η οποία εμφανίζει μόνο α -έλικες και η άλλη και τις δύο δευτεροταγείς δομές, (γ) αστεροειδή συμπολυπεπτίδια, με σκοπό τη μελέτη της τοπολογίας στο νανοφασικό διαχωρισμό και στη δευτεροταγή οργάνωση, και (δ) δενδριμερή πολυφαινυλενίων με προσαρτημένα πεπτίδια, διαφορετικού μεγέθους πυρήνα, πλήθους υποκατεστημένων θέσεων, και βαθμού πολυμερισμού των πεπτιδίων. Χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές εξέτασης της δομής (σκέδαση ακτίνων-X, NMR στερεάς κατάστασης) και της δυναμικής (Διηλεκτρική Φασματοσκοπία, NMR). Βρέθηκε ότι το ισχυρό θερμοδυναμικό πεδίο που αναπτύσσεται μεταξύ των συστάδων κατά το νανοφασικό διαχωρισμό επιδρά στη σταθερότητα και στο μήκος εμμόνης των δευτεροταγών δομών, αφενός βελτιώνοντας τις α -έλικες, και αφετέρου αποσταθεροποιώντας τα β -φύλλα.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας (Κεφάλαιο 9), μελετήθηκε η επίδραση του περιορισμού και των επιφανειών στην αυτοοργάνωση και στη δυναμική πολυπεπτιδίων, κάτι

που παρουσιάζει ενδιαφέρον στη σταθερότητα και στη λειτουργία των πρωτεϊνών κατά τη μεταφορά τους μέσα στο κύτταρο. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε μια σειρά νανοράβδων πολυπεπτιδίου, των οποίων η σύνθεση έγινε στο εσωτερικό πορώδους αλουμίνας. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε τόσο σε ελεύθερες όσο και σε ενσωματωμένες νανοράβδους, με χρήση NMR, σκέδασης ακτίνων-X, και Διηλεκτρικής Φασματοσκοπίας. Βρέθηκε ότι, ενώ ο γεωμετρικός περιορισμός δεν έχει σημαντική επίδραση στη δυναμική, ο συνδυασμός του περιορισμού με διεπιφανειακές αλληλεπιδράσεις σε νανοπόρους μικρής διαμέτρου (25-35 nm) μεταβάλλει σημαντικά τη δυναμική. Λόγω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ της επιφάνειας και του πολυπεπτιδίου, εμφανίζεται ένα διεπιφανειακό στρώμα πολυπεπτιδίου με δυναμική διαφορετική από εκείνη σε μεγαλύτερους νανοπόρους.

Abstract

This Thesis presents an investigation of the effect of architecture as well as of confinement and surfaces on the self-assembly and dynamics of synthetic polypeptides. Conformational studies of model polypeptides are an important step towards understanding protein folding. In particular, the mechanism by which the secondary structure depends on self-assembly is still not well-understood. Moreover, methods of controlling the secondary structure favouring α -helices or β -sheets are of great interest, since loss of such controlled behaviour is a key aspect of many protein degradation diseases. Apart from the structure, the dynamic behaviour of such systems is also important in biological processes because it reflects to the polypeptide functionality. Additionally, self-assembly is recognized as being coupled to the protein translocation mechanism and the migration of proteins through cell nanopores. The present work consists of two parts:

In the first part (Chapters 5-8), the effect of architecture and topology on the two main polypeptide secondary structures (α -helices/ β -sheets), as well as on dynamics, was investigated. The effect on the stability and the persistence length of the secondary structures was studied in the following model systems: (a) copolypeptides with statistical alternation of repeat units that form both secondary structures, to study the effect of different side-groups on the secondary structure, (b) diblock copolypeptides with one block that forms only α -helices and another that forms both secondary structures, aiming at controlling the relative ratio, (c) star copolypeptides, to study the effect of topology on nanophase separation and secondary structure, and (d) peptide-functionalized polyphenylene dendrimers, as a function of the core size (generation), functionality, and peptide length. We employed structural (WAXS, SAXS, site-specific solid-state NMR) as well as dynamic (Dielectric Spectroscopy, NMR) techniques. It was found that the strong thermodynamic field has two consequences: first, to destabilize β -sheets and second, to improve the persistence length of α -helices. The comparison between linear and star copolymers showed that self-assembly provides with a tool of controlling the secondary structure.

In the second part (Chapter 9), we studied the effect of confinement and surfaces on the self-assembly and dynamics of polypeptides. Protein interactions with nanopores and surfaces are important during translocation in the biological cell. We employed a series of polypeptide nanorods, synthesized inside nanoporous anodic aluminum oxide. The self-assembly and the dynamics of both free-standing and embedded nanorods were investigated,

by employing NMR, WAXS, and Dielectric Spectroscopy. It was found that the bulk secondary structure (α -helices) was preserved in all cases. Additionally, confinement has no effect in the free-standing case, but confinement within small nanopores (25-35 nm) together with surface interactions lead to a change of the dynamics. The experimental findings suggest a strong effect of surfaces on the local polypeptide dynamics, due to the formation of hydrogen bonds between the adsorbed polypeptide chains and charged alumina walls, resulting in an interfacial layer with unusual dynamics.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσικής Συμπυκνωμένης Ύλης και Επιστήμης των Υλικών του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στη Φυσική.

Ευχαριστώ τον Καθ. Γ. Φλούδα για την υπόδειξη του θέματος, την συνεχή καθοδήγηση, και την ουσιαστική υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής, βασισμένη στην επιτυχή προπτυχιακή συνεργασία μας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Επίκ. Καθ. Απ. Αυγερόπουλο και Καθ. Μ. Κοσμά για τη βοήθεια και τις συμβουλές τους, όπως και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, Επίκ. Καθ. Ε. Ιατρού, Καθ. Θ. Μπάκα, και Αν. Καθ. Ν. Παπανικολάου για τις χρήσιμες υποδείξεις τους.

Οφείλω ακόμη να ευχαριστήσω τους Χημικούς που έκαναν δυνατή αυτή τη μελέτη, με τη σύνθεση των πρότυπων πολυπεπτιδίων: Τον Επίκ. Καθ. Ε. Ιατρού, τον Δρ. Θ. Αλιφέρη, και τον Καθ. Ν. Χατζηχρηστίδη του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ για τη σύνθεση των συμπολυπεπτιδίων PBLG-*b*-PAla και των αστεριών (GL)₃.

Επίσης τους Dr. M. Dietz (Max Planck Institute for Polymer Research, Prof. G. Wegner), Dr. G. Mihov (MPIP, Prof. K. Müllen), Dr. H. Duran (MPIP, Prof. W. Knoll), και Dr. M. Steinhart (Max Planck Institute of Microstructure Physics) για τη σύνθεση των σύνθεσης των συμπολυπεπτιδίων πολυ(PMLG-co-SLG), των δενδριμερών πολυφαινυλενίων με πεπτίδια, και των νανοράβδων PBLG σε αλουμίνα, αντίστοιχα.

Ακόμη, ευχαριστώ τους Dr. M. Mondeshki, Dr. R. Graf, και Prof. H. W. Spiess για τη δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων διηλεκτρικής φασματοσκοπίας με τεχνικές NMR, καθώς και τον Prof. H.-J. Butt για τη δυνατότητα μετρήσεων ακτίνων-X.

Ευχαριστώ το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και τη Γενική Γραμματεία Έρευνας & Τεχνολογίας για την οικονομική υποστήριξη μέσω του ΠΕΝΕΔ 2003/856.

Επιπλέον, ευχαριστώ τους συναδέλφους μεταπτυχιακούς φοιτητές και ιδιαίτερα τους Διδάκτορες Κ. Μπουκουβάλα, Π. Παπαδόπουλο, και Μ. Μ. Elmadhy για την άψογη συνεργασία στο εργαστήριο, καθώς και τον τεχνικό του εργαστηρίου μας, Γ. Τσουμάνη, για την άρτια τεχνική υποστήριξη.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, στην Isabella, και στους φίλους μου, για την αμέριστη συμπαράσταση και την υπομονή τους.

“Το ουσιώδες διαφεύγει από τα μάτια,
βλέπει κανείς σωστά μόνο με την καρδιά”.

Antoine de Saint-Exupéry

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract	7
Ευχαριστίες	9
Περιεχόμενα	13

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Κύτταρο και πρωτεϊνική δομή	17
1.1 Εισαγωγή.....	17
1.1.1 Το κύτταρο και η μετατόπιση πρωτεϊνών	17
1.1.2 Τρόποι μεταφοράς των πρωτεϊνών.....	18
1.1.2.1 Μεταφορά από και προς τον πυρήνα	19
1.1.2.2 Μεταφορά στα μιτοχόνδρια	20
1.1.3 Η πλασματική μεμβράνη.....	20
1.1.4 Βιομόρια.....	23
1.2 Η σύσταση των πρωτεϊνών	23
1.3 Δομή των πρωτεϊνών.....	25
1.3.1 Ο πεπτιδικός δεσμός.....	25
1.3.2 Χημικοί δεσμοί σε πρωτεΐνες.....	26
1.3.2.1 Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις	26
1.3.2.2 Αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις	26
1.3.2.3 Δεσμοί υδρογόνου.....	27
1.3.2.4 Δυνάμεις Van der Waals	27
1.3.3 Πρωτοταγής δομή	27
1.3.4 Δευτεροταγής δομή	27
1.3.4.1 Η α-έλικα.....	28
1.3.4.2 Η α-έλικα έχει διπολική ροπή	30
1.3.5 Τα β-φύλλα.....	30
1.3.6 Άλλες διαμορφώσεις	31
1.3.7 Υπερδευτεροταγείς δομές	32
1.3.8 Τριτοταγής δομή	32
1.3.9 Τεταρτοταγής δομή	32
1.3.10 Η σχέση μεταξύ πρωτοταγούς και δευτεροταγούς δομής.....	33
1.4.1 Αναδίπλωση πρωτεϊνών και προβλήματα υγείας.....	35
1.4.2 Δυνατότητες τροποποίησης των πρωτεϊνών	36
1.5 Αναφορές.....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 Συνθετικά πολυπεπτίδια.....	39
2.1 Εισαγωγή.....	39
2.2 Βιολογικά μοντέλα βασισμένα σε συνθετικά πεπτίδια	39
2.3 Σύνθεση πολυπεπτιδίων	41
2.4 Εφαρμογές σε μεμβράνες.....	45
2.5 Αντιμικροβιακά πεπτίδια	47
2.6 Συμπολυπεπτίδια “άκαμπτων” μακρομορίων	47
2.7 Γραμμικά βιομιμητικά συμπολυμερή	48
2.8 Αστεροειδή συμπολυπεπτίδια	50
2.9 Δενδριμερή.....	52
2.10 Πολυπεπτίδια σε περιορισμένη γεωμετρία	53
2.11 Συμπεράσματα βιβλιογραφίας	54

2.12 Σκοπός αυτής της διατριβής.....	56
2.13 Αναφορές.....	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Δυναμική πολυπεπτιδίων	63
3.1 Εισαγωγή.....	63
3.2.1 Η μετάβαση υάλου	63
3.2.2 Θεωρίες για την υαλώδη μετάβαση	64
3.2.2.1 Η θεωρία του ελεύθερου όγκου	64
3.2.2.2 Η θεωρία Adam-Gibbs	65
3.2.2.3 Η θεωρία του ενεργειακού τοπίου.....	67
3.3 Μηχανισμοί μοριακής χαλάρωσης.....	68
3.4 Προέλευση του σημείου υάλου στις πρωτεΐνες	69
3.5 Εκτίμηση του μήκους εμμονής των α-ελίκων.....	72
3.6 Αναφορές.....	74

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 Υλικά – Πειραματικές τεχνικές – Μέθοδοι ανάλυσης.....	77
4.1 Υλικά.....	77
4.1.1 Τυχαία συμπολυπεπτίδια γ-μεθυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος και γ-στεαρυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος [πολυ(MLG-co-SLG)]	77
4.1.2 Γραμμικά συμπολυπεπτίδια πολυ(γ-βενζυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος) και πολυαλανίνης (PBLG- <i>b</i> -PAla).....	78
4.1.3 Αστεροειδή συμπολυπεπτίδια πολυ(γ-βενζυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος) και πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνης) (GL ₃).....	78
4.1.4 Δενδριμερή πολυφαινυλενίων με πολυπεπτίδια πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνης) (PZLL).....	80
4.1.5 Νανοράβδοι πολυ(γ-βενζυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος) (PBLG) από νανοπόρους Al ₂ O ₃	81
4.2.1 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (ΔΘΣ)	84
4.2.2 Πειραματική διαδικασία ΔΘΣ	85
4.3 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)	85
4.4 Σκέδαση Ακτίνων-X.....	86
4.4.1 Εισαγωγή.....	86
4.4.2 Σκέδαση από έλικα.....	87
4.4.3 Σκέδαση Ακτίνων-X σε Μικρές Γωνίες (SAXS).....	88
4.4.4 Σκέδαση Ακτίνων-X σε Ευρείες Γωνίες (WAXS).....	88
4.4.5 Πειραματική διαδικασία ακτίνων-X	89
4.5 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR).....	95
4.5.1 Φασματοσκοπία NMR σε πολυπεπτίδια και πρωτεΐνες.....	95
4.5.2 Προσδιορισμός της μικροδομής.....	96
4.5.3 Πυρηνικό σπιν	100
4.5.4 Αλληλεπιδράσεις του πυρηνικού σπιν σε μαγνητικό πεδίο	100
4.5.5 ¹³ C NMR	102
4.5.6 Οι δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές πεπτιδίων και πρωτεϊνών στο ¹³ C NMR	102
4.5.7 NMR στερεάς κατάστασης	104
4.5.7.1 Αποσύζευξη.....	105
4.5.7.2 Ανασύζευξη.....	105
4.5.8 Ετεροπυρηνικές μέθοδοι	105
4.5.9 Πειραματική διαδικασία NMR.....	107

4.6 Διηλεκτρική Φασματοσκοπία (ΔΦ)	109
4.6.1 Εισαγωγή.....	109
4.6.2 Η διηλεκτρική συνάρτηση.....	109
4.6.3 Ηλεκτροστατική	110
4.6.4 Διηλεκτρική χαλάρωση	114
4.6.5 Η κατανομή των χαρακτηριστικών χρόνων χαλάρωσης.....	116
4.6.6 Πειραματική διάταξη	116
4.6.7 Ανάλυση φασμάτων διηλεκτρικής φασματοσκοπίας.....	119
4.7 Αναφορές.....	122

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 Αυτοοργάνωση και μοριακή δυναμική τυχαίων συμπολυπεπτιδίων ...	127
5.1 Εισαγωγή.....	127
5.2 Αποτελέσματα	129
5.2.1 Δευτεροταγής δομή	129
5.2.2 Θερμικές και θερμοδυναμικές ιδιότητες	132
5.2.3 Μοριακή δυναμική	134
5.3.4 Αυτοοργάνωση.....	144
5.3 Συμπεράσματα.....	148
5.4 Αναφορές.....	149
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 Έλεγχος της δευτεροταγούς δομής σε δισυσταδικά συμπολυπεπτίδια	151
6.1 Εισαγωγή.....	151
6.2 Αποτελέσματα	152
6.2.1 Θερμικές ιδιότητες	152
6.2.2 Υπερμοριακή δομή.....	153
6.2.3 Δυναμική του PBLG	156
6.2.4 Δυναμική των συμπολυπεπτιδίων	159
6.3 Συμπεράσματα.....	164
6.4 Αναφορές.....	165
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 Επίδραση της τοπολογίας των αλυσίδων στην αυτοοργάνωση και στη δυναμική αστεροειδών συμπολυπεπτιδίων	167
7.1 Εισαγωγή.....	167
7.2 Αποτελέσματα	168
7.2.1 Υπερμοριακή οργάνωση	168
7.2.2 Μοριακή δυναμική	173
7.3 Συμπεράσματα.....	178
7.4 Αναφορές.....	179
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 Δενδρομερή πολυφαινυλενίων με προσαρτημένα πεπτίδια	181
8.1 Εισαγωγή.....	181
8.2 Αποτελέσματα	182
8.2.1 Θερμικές ιδιότητες	182
8.2.2 Αυτοοργάνωση στο τήγμα	182
8.2.3 Δυναμική στην “υγρή” κατάσταση ($T > T_g$)	188
8.2.4 Δυναμική στην υαλώδη κατάσταση.....	190
8.3 Συμπεράσματα.....	193
8.4 Αναφορές.....	194

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 Επίδραση του περιορισμού σε επιφάνεια στην αυτοοργάνωση και στη δυναμική πολυπεπτιδίων	195
9.1 Εισαγωγή.....	195
9.2 Αποτελέσματα	195
9.3 Συμπεράσματα.....	206
9.4 Αναφορές.....	207
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 Συμπεράσματα	209
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11 Μελλοντικά σχέδια	211
Publications originating from this work	212

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

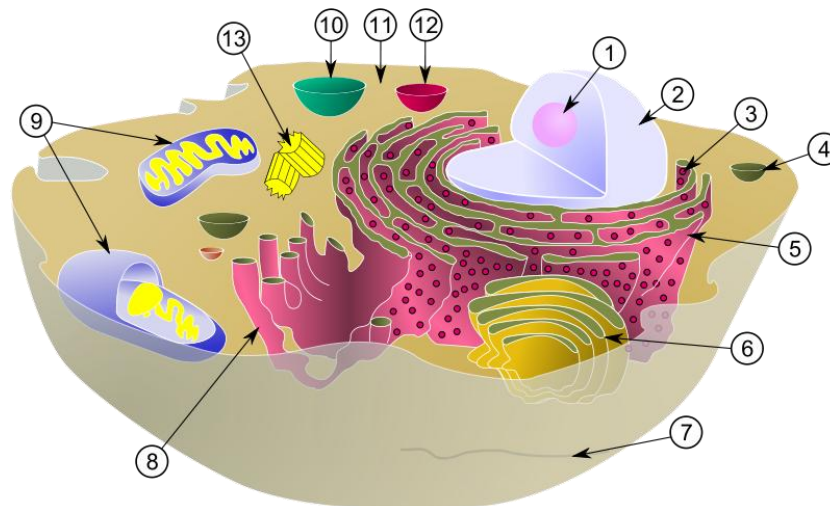
Κύτταρο και πρωτεϊνική δομή

1.1 Εισαγωγή

Η αναδίπλωση και η αυτοοργάνωση των πρωτεϊνών είναι εξαιρετικά πολύπλοκες διαδικασίες. Εκτός από τη μεγάλη σημασία για την ίδια τη λειτουργία των πρωτεϊνών, παίζουν σημαντικό ρόλο και σε μια σειρά διεργασιών που σχετίζονται με την κυτταρική λειτουργία [1]. Οι πρωτεΐνες είναι πολύπλοκα μόρια της έμβιας ύλης και επιτελούν βασικές λειτουργίες σε όλες σχεδόν τις βιολογικές διεργασίες. Λειτουργούν ως καταλύτες, μεταφορείς, χώροι αποθήκευσης άλλων μορίων, παρέχουν μηχανική στήριξη και ανοσοπροστασία, διαβιβάζουν νευρικά σήματα, και ρυθμίζουν την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Ιδιαίτερα η αυτοοργάνωση και η μετακίνησή τους μέσα στο κύτταρο προσελκύει σήμερα το ερευνητικό ενδιαφέρον [2-4]. Στην παρούσα εργασία μελετάμε την επίδραση της αρχιτεκτονικής, του περιορισμού, καθώς και των επιφανειών, στην αυτοοργάνωση και στη δυναμική πολυπεπτιδίων, δηλαδή συστημάτων που προσομοιάζουν τις φυσικές πρωτεΐνες. Γι' αυτό στη συνέχεια θα δούμε τα κύρια γνωρίσματα του κυττάρου και της πρωτεϊνικής δομής.

1.1.1 Το κύτταρο και η μετατόπιση πρωτεϊνών

Το κύτταρο είναι η βασική δομική μονάδα όλων των ζωντανών οργανισμών. Από τους μονοκύτταρους ως τους πολυκύτταρους οργανισμούς, η σύνθετη λειτουργία του εξασφαλίζει την εύρυθμη διαβίωσή τους. Ιδιαίτερα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, εκτελούν εκατομμύρια εντολές το δευτερόλεπτο· υπάρχει συνεχής ροή πληροφοριών ανάμεσα στα διάφορα οργανίδια τους (Εικόνα 1.1). Καθένα απ' αυτά ειδικεύεται σε μία ή περισσότερες λειτουργίες, και γι' αυτό χρειάζεται μια συγκεκριμένη σειρά πρωτεϊνών για να τις επιτελέσει. Η *μετατόπιση πρωτεϊνών* (protein translocation) περιγράφει τη μεταφορά της πρωτεΐνης από τα ριβοσώματα, όπου συντίθεται, στην κατάλληλη κυτταρική θέση [5]. Ο τελικός προορισμός μπορεί να είναι ένα οργανίδιο, μια μεμβράνη, ή ο εξωτερικός χώρος μέσω έκκρισης. Η διαδικασία μεταφοράς είναι πολύ σημαντική, διότι τυχόν λάθη μπορούν να οδηγήσουν σε ασθένειες.



Εικόνα 1.1. Τομή ενός τυπικού ευκαρυωτικού κυττάρου με τα κυριότερα οργανίδια και τις δομές του. 1. πυρηνίσκος 2. πυρήνας 3. ριβόσωμα 4. κυστίδιο 5. αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο 6. σωμάτιο Golgi 7. κυτταρικός σκελετός 8. λείο ενδοπλασματικό δίκτυο 9. μιτοχόνδριο 10. κενωτόπιο 11. κυτταρόπλασμα 12. λυσόσωμα 13. κεντρύλλιο (από τον Messer Woland).

1.1.2 Τρόποι μεταφοράς των πρωτεϊνών

Υπάρχουν δύο περιπτώσεις που οι πρωτεΐνες πρέπει να περάσουν μία-μία μέσα από στενούς διαύλους (η τρίτη είναι η μεταφορά με κυστίδια): Στην πρώτη περίπτωση, η πρωτεΐνη αναδιπλώνεται στην τελική της δομή μόλις συντεθεί και ύστερα να μετακινείται στην τελική της θέση παραμένοντας αναδιπλωμένη (gated transport). Με αυτόν τον τρόπο γίνεται η μεταφορά των πρωτεϊνών από τα ριβοσώματα στον πυρήνα. Στη δεύτερη περίπτωση, μη αναδιπλωμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες διέρχονται μέσα από μία ή περισσότερες μεμβράνες για να φτάσουν στον τελικό τους προορισμό (transmembrane translocation). Με αυτόν τον τρόπο οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από τα ριβοσώματα στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες (στα φυτικά κύτταρα). Οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες μπορεί να χρειαστεί να ξεδιπλωθούν και να αναδιπλωθούν για να περάσουν μέσα από τις μεμβράνες.

Το 1970 ο Günter Blobel (Νόμπελ Ιατρικής 1999) πειραματίστηκε με τη μετατόπιση πρωτεϊνών διαμέσου μεμβρανών. Βρήκε ότι πολλές πρωτεΐνες έχουν ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο (signal peptide), δηλαδή μια σύντομη σειρά αμινοξέων στο ένα άκρο, που λειτουργεί σαν ταχυδρομικός κώδικας για το οργανίδιο-προορισμό. Η μετάφραση του mRNA σε πρωτεΐνη από το ριβόσωμα γίνεται μέσα στο κυτόπλασμα. Η πρωτεΐνη που αρχίζει να συντίθεται στο ριβόσωμα, μπορεί να μεταφερθεί στο κυτόπλασμα με διαφορετικούς τρόπους, ανάλογα με την πρωτεΐνη. Η Εικόνα 1.2 δείχνει την καθοδήγηση μιας πρωτεΐνης από ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο μέσα από ένα διάυλο.

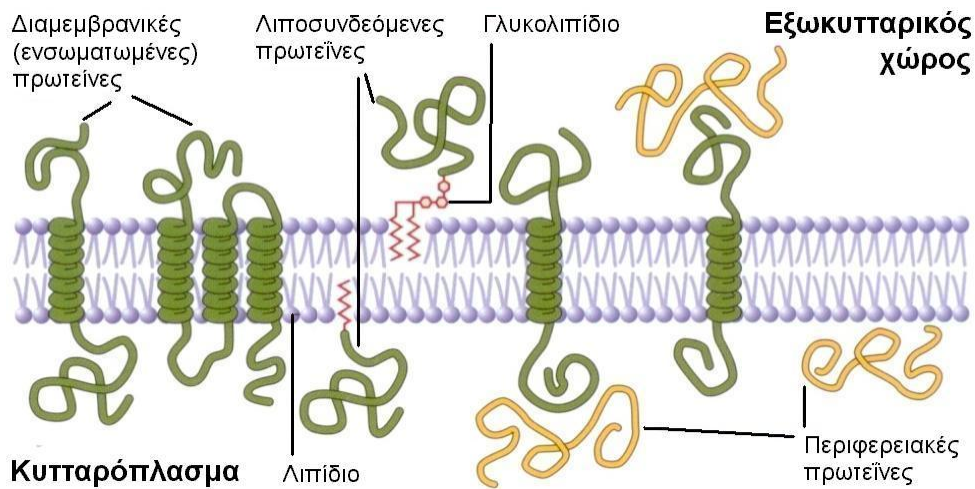
Οι πυρηνικοί πόροι έχουν εσωτερική διάμετρο 70-80 nm και σχηματίζονται κατά τη σύντηξη της εσωτερικής με την εξωτερική μεμβράνη του πυρηνικού φακέλου. Κάθε πυρηνικός πόρος σχηματίζει έναν κύλινδρο, που αποτελείται από περίπου 50-200 πρωτεΐνες, με εξωτερική διάμετρο ~120 nm και πάχος ~50 nm. Μέσω αυτών των στενών διαύλων μετακινούνται μόρια και υπερμοριακά συμπλέγματα ανάμεσα στο πυρηνόπλασμα και στο κυτταρόπλασμα. Πάντως, με τη βοήθεια μικροενέσεων έχει βρεθεί ότι το ανώτατο όριο μεγέθους για τη διέλευση μορίων είναι ~25 nm. Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται κατά μήκος των νανοπόρων μέσω μιας διαδικασίας που απαιτεί κατανάλωση ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη). Η μεταφορά γίνεται με τις πρωτεΐνες είτε πλήρως αναδιπλωμένες, είτε ξεδιπλωμένες προκειμένου να εισαχθούν στο οργανίδιο-στόχο. Ομοίως, η έξοδος των rRNA ριβοσωμικών υπομονάδων και του mRNA από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα γίνεται εκλεκτικά, μέσω υποδοχέων που αναγνωρίζουν τα μόρια RNA.

1.1.2.2 Μεταφορά στα μιτοχόνδρια

Η πλειοψηφία των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών κωδικοποιείται στον πυρήνα. Μετά τη σύνθεσή τους από τα ριβοσώματα μεταφέρονται διαμέσου της μεμβράνης των μιτοχονδρίων ξεδιπλωμένες και κατόπιν αναδιπλώνονται. Επειδή οι διάυλοι είναι πολύ στενοί, μπορεί μια πρωτεΐνη να μην μπορεί να περάσει αν αναδιπλωθεί πολύ νωρίς. Οι διάυλοι χωράνε μόνο ξεδιπλωμένες πρωτεΐνες [6]. Όταν οι πρωτεΐνες μετατοπιστούν, τότε αναδιπλώνονται μέσα στα ριβοσώματα.

1.1.3 Η πλασματική μεμβράνη

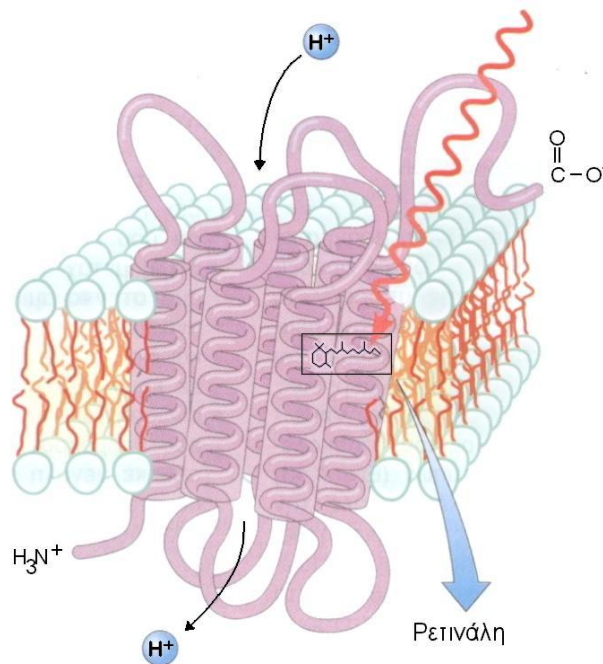
Ειδική αναφορά θα πρέπει να γίνει στην πλασματική μεμβράνη, η οποία έχει βασικό ρόλο στη μεταγωγή μηνυμάτων [7]. Οι μεμβράνες των κυττάρων συγκροτούνται από πρωτεΐνες και λιπίδια. Το μοντέλο που επικρατεί σήμερα είναι των Singer και Nicolson, γνωστό ως μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού. Σύμφωνα με το μοντέλο, το δομικό πλαίσιο είναι η διπλοστοιβάδα των λιπιδίων. Τα λιπίδια βρίσκονται σε μια “ρευστή κατάσταση”, με δυνατότητα περιστροφής και μετακίνησης. Οι πρωτεΐνες είναι σφαιρικές και εισχωρούν σε κάποιο βάθος ή ακόμη και διαπερνούν τη διπλοστοιβάδα (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4. Πρωτεΐνες των κυτταρικών μεμβρανών [8]. Τα τμήματα που βρίσκονται μέσα στο λιπιδικό στρώμα έχουν δομή α-έλικας.

Οι πρωτεΐνες των μεμβρανών, ανάλογα με τον τύπο αλληλεπίδρασής τους με το λιπιδικό στρώμα, διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (integral), που εισχωρούν στο διμοριακό στρώμα των λιπιδίων. Διαπερνούν τη διπλοστοιβάδα – μία ή περισσότερες φορές – και προεξέχουν και από τις δύο πλευρές της μεμβράνης. Το τμήμα των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που βρίσκεται στο διμοριακό στρώμα έχει δομή α-έλικας, και αυτό γιατί οι συνθήκες (απουσία νερού) ευνοούν τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των πεπτιδικών δεσμών (Κεφ 1.3.1). Οι δεσμοί υδρογόνου μεγιστοποιούνται όταν η πολυπεπτιδική αλυσίδα έχει τη δομή α-έλικας. Υπάρχουν μάλιστα και πρωτεΐνες με πολλές περιοχές α-έλικας, που διαπερνούν αρκετές φορές το διμοριακό στρώμα των λιπιδίων σχηματίζοντας υδάτινους πόρους, διαμέσου των οποίων διέρχονται υδατοδιαλυτά μόρια. Σε άλλες περιπτώσεις, τα τμήματα μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης έχουν β-φυλλοειδή δομή, σχηματίζοντας ένα βαρέλι. Χαρακτηριστικές ενσωματωμένες πρωτεΐνες είναι η γλυκοφορίνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων και η βακτηριακή ροδοψίνη (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5. Η διπλή λιποστοιβάδα με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη βακτηριοροδοψίνη, η οποία αποτελείται από επτά α -έλικες. Σχηματίζεται έτσι μια δίοδος με υδρόφιλο εσωτερικό για τη διέλευση ιόντων. Διακρίνεται επίσης η θέση της ρετινάλης [9].

Περιφερειακές πρωτεΐνες, που είναι έξω από το διμοριακό στρώμα των λιπιδίων. Απαντούν και στις δύο πλευρές της μεμβράνης, με τις οποίες είναι συνδεδεμένες με μη ομοιοπολικούς δεσμούς. Καλά μελετημένες περιφερειακές πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής πλευράς των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι η σπεκτρίνη και η αγκυρίνη. Οι πρωτεΐνες αυτές συνιστούν ένα δίκτυο γνωστό ως *κυτταρικός φλοιός* και καθορίζουν τη μορφή του κυττάρου, προσφέρουν μηχανική στήριξη στη μεμβράνη, λειτουργούν ως “αγκυροβόλιο” για τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, και μεταβιβάζουν σήματα στο κύτταρο. Συνήθως το δίκτυο των περιφερειακών πρωτεϊνών συνδέεται με τον κυτταροσκελετό, οπότε γίνονται πιο εύκολες και συντονισμένες διάφορες μεταβολές της μορφής των κυττάρων (π.χ. φαγοκύτταρα) και της κίνησης των διαφόρων κυτταρικών οργανιδίων.

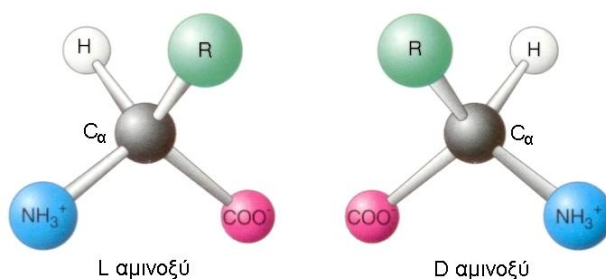
Λιποσυνδεδεμένες πρωτεΐνες. Είναι πρωτεΐνες που βρίσκονται έξω από το διμοριακό στρώμα των λιπιδίων, και είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες με άλλα λιπίδια. Οι λιποσυνδεδεμένες πρωτεΐνες διακρίνονται σε εκείνες που συνδέονται διαμέσου μιας ολιγοσακχαρικής αλυσίδας με τη φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης, και εκείνες που συνδέονται απευθείας με τις υδρογονανθρακικές αλυσίδες των λιπιδίων στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης.

1.1.4 Βιομόρια

Τα βιομόρια των κυττάρων διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα μικρομόρια και τα μακρομόρια. Οι πρωτεΐνες είναι μία από τις τέσσερις κύριες κατηγορίες βιολογικών μακρομορίων: μαζί με τα νουκλεϊκά οξέα, τους πολυσακχαρίτες, και τα λιπίδια είναι υπεύθυνες για τις δομές και τα οργανίδια του κυττάρου. Επίσης, όλες οι λειτουργίες του κυττάρου είναι εκδηλώσεις των αλληλεπιδράσεών τους. Τα τρία πρώτα βιομόρια (πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, πολυσακχαρίτες) χαρακτηρίζονται ως βιοπολυμερή. Κοινό χαρακτηριστικό των βιοπολυμερών είναι η απελευθέρωση ενός μορίου νερού για κάθε δεσμό που δημιουργείται. Αντίθετα, κατά την αποικοδόμησή τους (υδρόλυση), για κάθε δεσμό που σπάει ενσωματώνεται ένα μόριο νερού. Αυτό ισχύει και στον πεπτιδικό δεσμό, που θα εξετάσουμε στη συνέχεια. Η αλληλεπίδραση των πεπτιδίων και των μεγαλύτερων πρωτεϊνών με τις διόδους διέλευσης βασίζεται, όπως είδαμε, σε μεγάλο βαθμό στη διαμόρφωσή τους. Μια σύνοψη των διαφόρων επιπέδων οργάνωσης των πρωτεϊνών θα δούμε στη συνέχεια του κεφαλαίου, ενώ στα μετέπειτα Κεφάλαια θα μας απασχολήσει ο έλεγχος της δομής τους.

1.2 Η σύσταση των πρωτεϊνών

Η λειτουργία μιας πρωτεΐνης εξαρτάται άμεσα από την τρισδιάστατη δομή της, η οποία με τη σειρά της καθορίζεται από την αλληλουχία των δομικών της συστατικών, τα αμινοξέα. Οι πρωτεΐνες* είναι γραμμικά πολυμερή των 20 α-αμινοξέων που συναντώνται στη φύση, και η σύνθεσή τους καθορίζεται από το γενετικό κώδικα. Ένα α-αμινοξύ αποτελείται από ένα κεντρικό άτομο άνθρακα (C_α) συνδεδεμένο με μια αμινική ομάδα (NH_3), μια καρβοξυλική ομάδα ($COOH$), ένα άτομο υδρογόνου, και μια πλευρική ομάδα (R) – εκτός από την προλίνη, η οποία δεν έχει αμινομάδα λόγω κυκλοποίησης της πλευρικής ομάδας. Από τα δύο πιθανά χειρόμορφα ισομερή αμινοξέα, στις πρωτεΐνες συμμετέχουν μόνο L-αμινοξέα (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6. Χειρόμορφα ισομερή α-αμινοξέος, L (αριστερά) και D (δεξιά).

* Η διαφοροποίηση των όρων “πεπτίδιο”, “πολυπεπτίδιο”, και “πρωτεΐνη” έχει να κάνει με το πλήθος των αμινοξέων που τα σχηματίζουν, αλλά δεν υπάρχουν αυστηρά καθορισμένα όρια. Στη συνέχεια ο όρος “πρωτεΐνη” θα χρησιμοποιείται όταν γίνεται αναφορά αποκλειστικά σε φυσικά μόρια με βιολογική δράση.

Πίνακας 1.1. Η χημική δομή των 20 κοινών αμινοξέων.

Τα 20 κοινά αμινοξέα	
Μη πολικά	
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Αλανίνη (Ala, A)	Βαλίνη (Val, V)
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Γλυκίνη (Gly, G)	Ισολευκίνη (Ile, I)
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Μεθειονίνη (Met, M)	Λευκίνη (Leu, L)
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH} \end{array}$
Προλίνη (Pro, P)	Τρυπτοφάνη (Trp, W)
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH} \end{array}$
Μεθειονίνη (Met, M)	Φαινυλαλανίνη (Phe, F)
Πολικά (μη ιονισμένα)	
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Ασπαραγίνη (Asn, N)	Γλουταμίνη (Gln, Q)
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$
Κυστεΐνη (Cys, C)	Σερίνη (Ser, S)
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Κυστεΐνη (Cys, C)	Θρεονίνη (Thr, T)
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Κυστεΐνη (Cys, C)	Τυροσίνη (Tyr, Y)
Όξινα	Βασικά
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Ασπαρτικό οξύ (Asp, D)	Αργινίνη (Arg, R)
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Γλουταμικό οξύ (Glu, E)	Ιστιδίνη (His, H)
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Ασπαρτικό οξύ (Asp, D)	Λυσίνη (Lys, K)

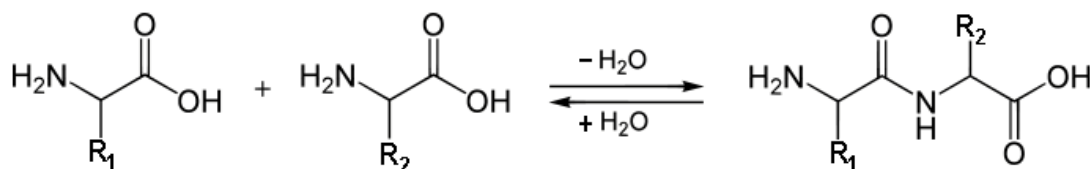
Τα 20 είδη πλευρικών ομάδων (R) διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος, το σχήμα, το φορτίο, την ικανότητα δέσμευσης υδρογόνου, την υδροφοβικότητα, και τη χημική δραστηριότητα, και ουσιαστικά σε αυτές οφείλεται η διαφοροποίηση στην τρισδιάστατη μορφή των πολυπεπτιδίων (Πίνακας 1.1). Ένας τρόπος ταξινόμησης των αμινοξέων, που χρησιμεύει στην πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής, βασίζεται στην πολικότητα των πλευρικών ομάδων. Έτσι μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες: (1) μη πολικά, (2) πολικά αλλά μη ιονισμένα, (3) όξινα, και (4) βασικά αμινοξέα. Άλλος τρόπος ταξινόμησης είναι σε υδρόφιλα, υδρόφοβα, και αμφίφιλα.

1.3 Δομή των πρωτεϊνών

Η πρωτεϊνική δομή αποτελείται από τέσσερα επίπεδα. Η *πρωτοταγής* δομή αναφέρεται στην αλληλουχία των αμινοξέων. Τα αμινοξέα συνήθως είναι συνδεδεμένα γραμμικά, όμως υπάρχουν και διακλαδισμένες μορφές. Η *δευτεροταγής* δομή, στην οποία θα εστιάσουμε περισσότερο σε αυτήν την εργασία, είναι η στερεοδιάταξη τοπικών περιοχών της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η *τριτοταγής* δομή περιγράφει τη συνολική αναδίπλωση του μορίου. *Τεταρτοταγής* δομή, τέλος, ονομάζεται η δομή που προκύπτει από το συνδυασμό δύο ή περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων [10]. Καθώς το ενδιαφέρον μας εστιάζεται στον έλεγχο της πρωτεϊνικής δομής, θα δούμε αυτά τα επίπεδα αναλυτικά στις παρακάτω παραγράφους.

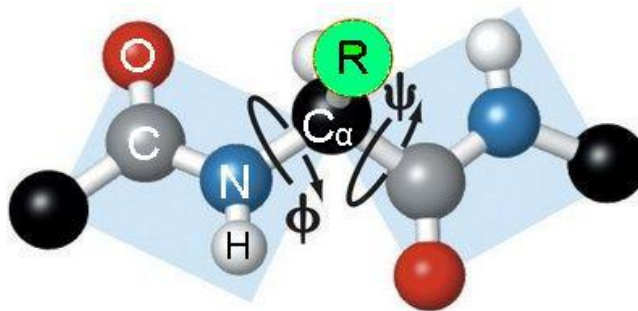
1.3.1 Ο πεπτιδικός δεσμός

Οι πρωτεϊνικές αλυσίδες σχηματίζονται από την ένωση της α-καρβοξυλικής ομάδας ($-\text{COO}^-$) ενός αμινοξέος με την αμινομάδα ($-\text{NH}_3^+$) ενός άλλου μέσω ενός *πεπτιδικού δεσμού*, και την αποβολή ενός μορίου H_2O (Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7. Πεπτιδική σύνθεση. Η αντίδραση είναι αμφίδρομη, αλλά ο πεπτιδικός δεσμός είναι αρκετά σταθερός.

Η εξέταση της γεωμετρίας του πεπτιδικού δεσμού δείχνει ότι είναι επίπεδος. Έτσι, για κάθε ζεύγος αμινοξέων που συνδέονται με πεπτιδικό δεσμό, υπάρχουν έξι άτομα που βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο: το άτομο C_α και η ομάδα $\text{C}=\text{O}$ του πρώτου καθώς και η ομάδα NH και το άτομο C_α του δεύτερου (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8. Τα πεπτιδικά επίπεδα ενώνονται με τετράεδρους δεσμούς του C_{α} . Σημειώνονται οι διεδρες γωνίες περιστροφής Φ και Ψ .

Η εξήγηση αυτής της γεωμετρικής προτίμησης βασίζεται στο χαρακτήρα του πεπτιδικού δεσμού, ο οποίος είναι εν μέρει διπλός (~40%) λόγω των δύο μεσομερών μορφών του αμιδίου, και έτσι αποκλείεται περιστροφή γύρω από τον άξονά του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό στις στερεοδιατάξεις της πεπτιδικής αλυσίδας. Υπάρχουν δύο επιτρεπτές διαμορφώσεις: Στη διαμόρφωση *trans* τα δύο άτομα C_{α} βρίσκονται απέναντι, ενώ στη διαμόρφωση *cis* βρίσκονται στην ίδια πλευρά του πεπτιδικού δεσμού. Λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης μεταξύ των πλευρικών ομάδων που συνδέονται στα άτομα C_{α} , όλοι σχεδόν οι πεπτιδικοί δεσμοί που ευνοούνται στις πρωτεΐνες είναι *trans*.

1.3.2 Χημικοί δεσμοί σε πρωτεΐνες

Όλες οι βιολογικές δομές και διεργασίες οφείλονται σε ομοιοπολικές και μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, εξαιτίας της παρουσίας πολλών ατόμων με μεγάλη διαφορά στην ηλεκτραρνητικότητα. Οι κυριότερες από αυτές είναι:

1.3.2.1 Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων νερού και μη πολικών μορίων είναι πολύ ασθενείς ως ανύπαρκτες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μη πολικών μορίων, και το σχηματισμό υδρόφοβων περιοχών παρουσία νερού. Επειδή οι πλευρικές ομάδες των περισσότερων αμινοξέων είναι υδρόφοβες, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις συνεισφέρουν σημαντικά στην ενδομοριακή δομή.

1.3.2.2 Αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις

Αυτές οι αλληλεπιδράσεις εκδηλώνονται μεταξύ αντίθετα φορτισμένων αμινοξέων, καθώς και μεταξύ των άκρων NH_3^+ και COO^- των πολυπεπτιδικών αλυσίδων.

1.3.2.3 Δεσμοί υδρογόνου

Οι δεσμοί υδρογόνου συνεισφέρουν σημαντικά στη σταθεροποίηση των α -ελίκων και στην παράλληλη ή αντιπαράλληλη σύνδεση των β -φύλλων. Σχηματίζονται κυρίως μεταξύ των ομάδων NH και C=O της κύριας αλυσίδας.

1.3.2.4 Δυνάμεις Van der Waals

Αυτές οι δυνάμεις αναπτύσσονται μεταξύ γειτονικών φορτισμένων και μη δέσμιων ατόμων. Όταν πλησιάζουν μεταξύ τους ουδέτερα μόρια ή άτομα η σφαιρική κατανομή του φορτίου τους παραμορφώνεται. Η παραμόρφωση αυτή προκαλεί την εμφάνιση ηλεκτρικής διπολικής ροπής. Αυτά τα δίπολα αλληλεπιδρούν με συνέπεια την εμφάνιση ελκτικών δυνάμεων. Αν και είναι ασθενείς (~ 0.1 eV), και έχουν μικρή εμβέλεια (φθίνουν με την απόσταση ως r^{-6}), το μεγάλο πλήθος που υπάρχει μέσα σε ένα μόριο τις κάνει σημαντικές για τη διατήρηση της τριτοταγούς δομής.

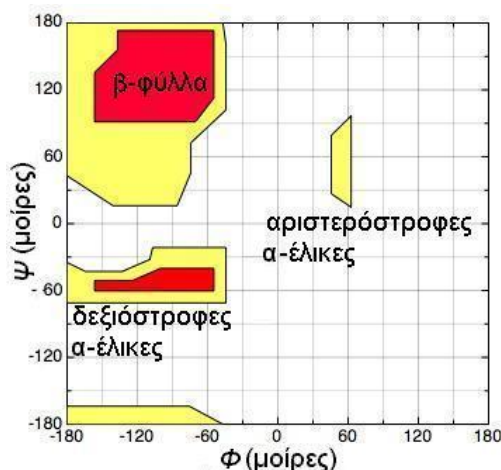
1.3.3 Πρωτοταγής δομή

Μια σειρά αμινοξέων που ενώνονται με πεπτιδικούς δεσμούς δημιουργούν μια πολυπεπτιδική αλυσίδα, η οποία αντιπροσωπεύει την *πρωτοταγή δομή* μιας πρωτεΐνης. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα έχει πολικότητα διότι τα άκρα της (αμινοτελικό και καρβοξυτελικό) δεν είναι ισοδύναμα (βλ. Εικόνα 1.10). Η γνώση της πρωτοταγούς δομής είναι σημαντική για αρκετούς λόγους. Πρώτον, είναι απαραίτητη για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης της (π.χ. στην περίπτωση των ενζύμων). Επίσης, τροποποιώντας την αλληλουχία γνωστών πρωτεϊνών μπορούμε να δημιουργήσουμε πρωτεΐνες με νέες ιδιότητες. Δεύτερον, η αλληλουχία των αμινοξέων καθορίζει την τρισδιάστατη δομή των πρωτεϊνών. Η ανάλυση της σχέσης μεταξύ αυτής της αλληλουχίας και της τρισδιάστατης δομής αποκαλύπτει τους κανόνες που διέπουν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Τρίτον, ανεπιθύμητες μεταβολές στη δευτεροταγή δομή μιας πρωτεΐνης μπορεί να οδηγήσουν σε ανώμαλη δράση της και ασθένειες, όπως π.χ. η δρεπανοκυτταρική αναιμία και η κυστική ίνωση (παράγραφος 1.4.1).

1.3.4 Δευτεροταγής δομή

Σε αντίθεση με τον πεπτιδικό δεσμό, οι δεσμοί που ενώνουν τις αμινικές και τις καρβονυλικές ομάδες με το άτομο C $_{\alpha}$ είναι απλοί. Επομένως, τα δυο γειτονικά πεπτίδια μπορούν να περιστραφούν γύρω από αυτούς τους δεσμούς αποκτώντας διάφορους προσανατολισμούς, και τελικά επιτρέπουν στις πρωτεΐνες να αναδιπλωθούν με διάφορους τρόπους. Οι περιστροφές γύρω από τους δεσμούς προσδιορίζονται από τις διέδρες γωνίες Φ

και Ψ , γύρω από τους δεσμούς $N-C_\alpha$ και $C-C=O$, αντίστοιχα (Εικόνα 1.8). Έτσι οι γωνίες Φ και Ψ καθορίζουν την κατεύθυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Πολλοί συνδυασμοί (τα 3/4) δεν είναι δυνατοί λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης, και οι επιτρεπτές τιμές των γωνιών που δεν οδηγούν σε επικάλυψη των ατομικών τροχιακών μπορούν να απεικονισθούν σε ένα διδιάστατο *διάγραμμα Ramachandran* [11] (Εικόνα 1.9). Οι επιτρεπτές γωνίες καταλαμβάνουν το 7.5% της επιφάνειας, ενώ οι μερικώς επιτρεπτές το 22.5%, πράγμα που δίνει μια ποσοτική ένδειξη των περιορισμών στην ευκαμψία της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.



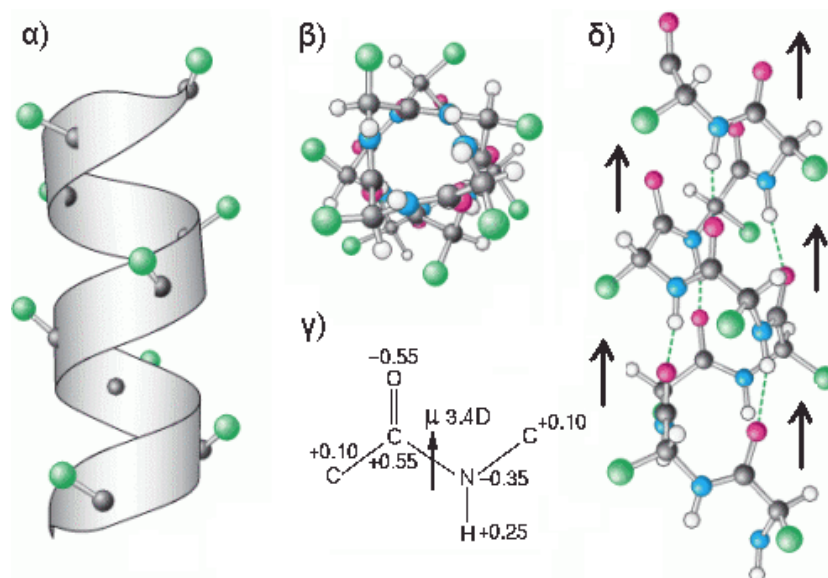
Εικόνα 1.9. Γενικό διάγραμμα Ramachandran των επιτρεπτών διέδρων γωνιών Φ και Ψ [11]. Οι επιτρεπτές τιμές φαίνονται με κόκκινο, ενώ οι οριακές τιμές με κίτρινο. Οι κυριότεροι συνδυασμοί γωνιών που επιτρέπονται είναι οι δεξιόστροφες α-έλικες και τα β-φύλλα. Η αριστερόστροφη α-έλικα δεν είναι ιδιαίτερα ευσταθής.

Τα πολυπεπτίδια έχουν αρκετές καλά καθορισμένες δομές που σχηματίζονται από τις ενδομοριακές και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που αναφέραμε προηγουμένως. Οι σταθερότερες και πιο συχνές δευτεροταγείς δομές είναι η α-έλικα και τα β-φύλλα. Χαρακτηρίζονται από ενδομοριακούς και διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου, αντίστοιχα, μεταξύ των ομάδων NH και $C=O$ της κύριας αλυσίδας. Το τμήμα της αλυσίδας που δεν συμμετέχει σε κάποια δευτεροταγή δομή θεωρείται άμορφο. Τα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής είναι ιδιαίτερα σημαντικά στις πρωτεΐνες, διότι (α) είναι σχετικά άκαμπτα, και (β) μπορούν να προσαρτηθούν σε αυτά άλλες ομάδες, όπως για παράδειγμα κατά τη μεταφορά πρωτεϊνών (παρ. 1.1.2). Ο έλεγχος της σχετικής αναλογίας α-ελίκων και β-φύλλων θα μας απασχολήσει εκτενώς σε αυτήν την εργασία, επομένως αρμόζει μια πιο προσεκτική ματιά στις δύο αυτές δευτεροταγείς δομές.

1.3.4.1 Η α-έλικα

Η α-έλικα είναι μια σπειροειδής δομή ιδιαίτερης σημασίας, που συναντάται πολύ συχνά σε πρωτεΐνες (~30%). Συμμετέχει σε διάφορα μοτίβα δέσμωσης του DNA, όπως το

“φερμουάρ” λευκίνης (*leucine zipper*), μοτίβα έλικας-στροφής-έλικας, και τα “δάκτυλα” ψευδαργύρου (*zinc fingers*), διότι η διάμετρός της (~1.2 nm, ανάλογα με τα αμινοξέα) ταιριάζει με την κύρια αύλακα της διπλής έλικας του DNA. Στην α-έλικα η πολυπεπτιδική αλυσίδα σχηματίζει τον κορμό της έλικας και οι πλευρικές ομάδες εκτείνονται προς τα έξω (Εικόνα 1.10). Οι διέδρες γωνίες Φ και Ψ , οι οποίες μετρώνται με NMR, ακτίνες-X, και φασματοσκοπία Raman και υπερύθρου, είναι περίπου -57° και -47° , αντίστοιχα, αν και οι τιμές μπορεί να είναι λίγο διαφορετικές, μέσα στα πλαίσια όμως της διαπίστωσης ότι $\Phi + \Psi = (104 \pm 10)^\circ$ για τις περισσότερες πρωτεΐνες [12,13]. Αυτή η διάταξη επιτρέπει το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ ατόμων της κύριας αλυσίδας. Εκτός από το αμινοάκρο, κάθε NH του ν-οστού αμινοξέος ενώνεται με δεσμό υδρογόνου με το C=O του (ν+4)-οστού αμινοξέος. Έτσι όλοι οι δεσμοί υδρογόνου είναι παράλληλοι προς τον άξονα της έλικας. Ο αριθμός των αμινοξέων ανά στροφή της έλικας είναι περίπου 3.6, ώστε 5 στροφές να περιέχουν 18 αμινοξέα (έλικα 18/5), ενώ το βήμα της έλικας είναι 0.54 nm. Το διάγραμμα Ramachandran δείχνει ότι επιτρέπονται τόσο δεξιόστροφες όσο και αριστερόστροφες έλικες, όμως οι έλικες που σχηματίζουν τα L-αμινοξέα είναι μόνο δεξιόστροφες διότι είναι πιο ευνοούμενες ενεργειακά.



Εικόνα 1.10. (α) Η απεικόνιση κορδέλας της α-έλικας, όπου διακρίνονται τα άτομα C_α και οι πλευρικές ομάδες. (β) Εγκάρσια τομή, όπου φαίνεται η διάταξη των πλευρικών ομάδων στο εξωτερικό της έλικας. (γ) Η διπολική ροπή ενός πεπτιδίου. Οι τιμές αντιστοιχούν στα φορτία των ατόμων. Λόγω του προσανατολισμού που παρέχουν οι δεσμοί υδρογόνου, οι διπολικές ροπές αθροίζονται κατά τον άξονα της έλικας (δ) και δίνουν μια ισχυρή συνολική διπολική ροπή από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο (εικ. από την αναφ. [14]. Μπλε: άζωτο, μαύρο: άνθρακας, κόκκινο: οξυγόνο, πράσινο: πλευρική ομάδα, λευκό: υδρογόνο).

Ο σχηματισμός και η σταθερότητα της α-έλικας σε ένα πολυπεπτίδιο εξαρτάται από την πρωτοταγή δομή του. Η παρουσία αμινοξέων με φορτισμένες πλευρικές ομάδες μπορεί

να αποσταθεροποιήσει την α-έλικα λόγω ηλεκτροστατικών απώσεων. Επίσης, αμινοξέα με ογκώδεις πλευρικές ομάδες, όπως η ισολευκίνη, προκαλούν στερεοχημικές δυσκολίες στο σχηματισμό της. Τέλος, η ύπαρξη προλίνης ή υδροξυπρολίνης προκαλεί τη διακοπή της έλικας.

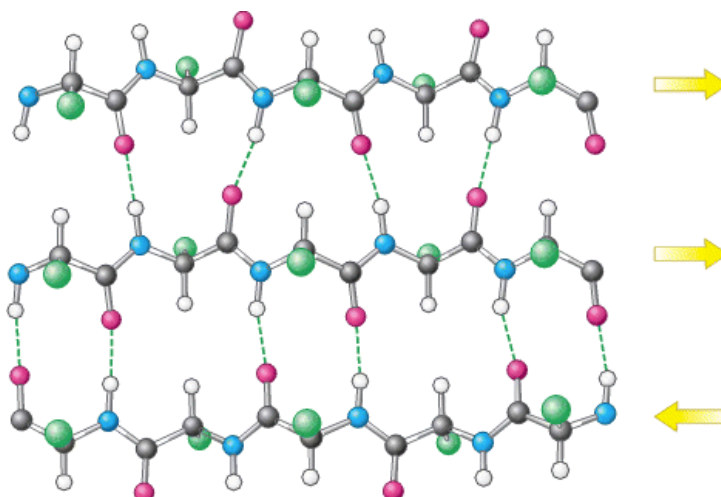
Εκτός από τις α-έλικες είναι δυνατός ο σχηματισμός ελίκων μικρότερης και μεγαλύτερης διαμέτρου. Οι πιο σημαντικές είναι η 3_{10} -έλικα, που έχει 3 αμινοξέα ανά στροφή [15-18], η π-έλικα, με 4.4 αμινοξέα ανά στροφή [12,19], και η σχετικά ασταθής έλικα 7/2 [20]. Αυτές οι έλικες δεν συναντώνται συχνά σε πρωτεΐνες, παρά μόνο ως ακραία τμήματα α-ελίκων.

1.3.4.2 Η α-έλικα έχει διπολική ροπή

Όλοι οι δεσμοί υδρογόνου σε μια α-έλικα έχουν την ίδια κατεύθυνση επειδή οι πεπτιδικές μονάδες είναι προσανατολισμένες κατά τον άξονα της έλικας. Επειδή κάθε αμινοξύ έχει μια διπολική ροπή που προέρχεται από τη διαφορετική πολικότητα των άκρων NH και C=O, αυτές οι διπολικές ροπές συναθροίζονται επίσης κατά τον άξονα της έλικας. Ως αποτέλεσμα, σχηματίζεται μια ισχυρή συνολική διπολική ροπή κατά μήκος της έλικας (3.4 debye/μονομερές, Εικόνα 1.10δ) [21]. Η διαφορετική ηλεκτραρνητικότητα των άκρων παίζει σημαντικό ρόλο στη συνένωση κύριων αλυσίδων πρωτεϊνών όταν δεν συμμετέχουν πλευρικές ομάδες [21]. Η παρουσία ισχυρής διπολικής ροπής κάνει τη διηλεκτρική φασματοσκοπία ιδανική μέθοδο για τη μελέτη τέτοιων συστημάτων (Κεφάλαιο 4.6). Μάλιστα, σε αντίθεση με την κοινή πεποίθηση, οι α-έλικες σε πολυπεπτίδια μεγάλου μήκους δεν είναι απόλυτα τέλειες αλλά περιέχουν “σπασίματα” (ατέλειες) [22].

1.3.5 Τα β-φύλλα

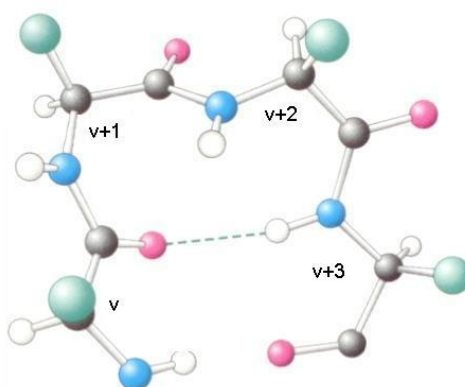
Η β-φυλλοειδής μορφολογία [23] είναι εξίσου σημαντικό συστατικό πολλών πρωτεϊνών. Εδώ, οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες είναι σχεδόν τελείως εκτεταμένες ($\Phi = -135^\circ$, $\Psi = 135^\circ$). Ένα β-φύλλο σχηματίζεται όταν δύο ή περισσότερες β-πτυχώσεις (β-strands) συνδεθούν με δεσμούς υδρογόνου, σε παράλληλη, αντιπαράλληλη, ή ακόμα και μεικτή διάταξη (Εικόνα 1.11). Η απόσταση μεταξύ γειτονικών αμινοξέων στην ίδια αλυσίδα ενός β-φύλλου είναι περίπου 0.35 nm και μεταξύ γειτονικών αλυσίδων ~0.6 nm. Οι πλευρικές ομάδες έχουν αντίθετη κατεύθυνση, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.11. Θα πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι η μετάβαση από το ένα είδος διαμόρφωσης στο άλλο δεν είναι απότομη, αλλά παρεμβάλλονται άμορφα τμήματα και στροφές.



Εικόνα 1.11. Παράλληλα (επάνω) και αντιπαράλληλα (κάτω) διατεταγμένα β-φύλλα. Οι δεσμοί υδρογόνου σημειώνονται με διακεκομμένες γραμμές.

1.3.6 Άλλες διαμορφώσεις

Πολλές πρωτεΐνες έχουν συμπαγές σφαιρικό σχήμα και για τη δημιουργία τους απαιτούνται αναστροφές της πολυπεπτιδικής αλυσίδας [24]. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος που πραγματοποιείται μια αναστροφή είναι μέσω μιας β-στροφής (Εικόνα 1.12). Στη β-στροφή η ομάδα C=O του αμινοξέος n σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την ομάδα NH του αμινοξέος $n+3$ της ίδιας αλυσίδας, και έτσι σταθεροποιείται η απότομη αλλαγή κατεύθυνσης. Άλλες περιπτώσεις αναστροφής της αλυσίδας είναι οι γ-στροφές, οι α-στροφές, και οι π-στροφές, όπου ο δεσμός υδρογόνου σχηματίζεται μεταξύ των αμινοξέων n και $n+2$, n και $n+4$, n και $n+5$, αντίστοιχα. Στα πιο εκτεταμένα ω -loops, δεν υπάρχει απόλυτη περιοδικότητα. Ο ρόλος των στροφών στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών είναι να φέρνουν σε κατάλληλες θέσεις τις α-έλικες και τα β-φύλλα.



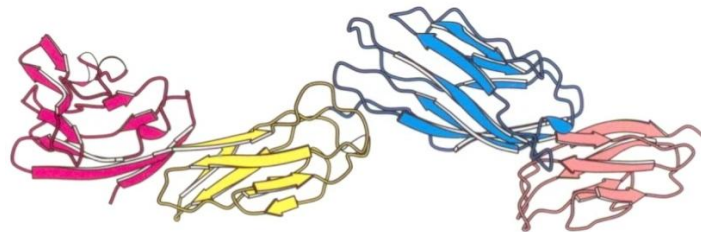
Εικόνα 1.12. Μια πολυπεπτιδική β-στροφή. Ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ πεπτιδίων που απέχουν τρεις θέσεις συγκρατεί την αλυσίδα περιστρεφόμενη.

1.3.7 Υπερδευτεροταγείς δομές

Ορισμένοι σχηματισμοί ενός πλήθους δευτεροταγών δομών μιας πρωτεΐνης θεωρούνται συνοπτικά ως *υπερδευτεροταγείς δομές*. Τέτοιες είναι τα β -ribbons, τα ω -loops, τα helix-loop-helix, τα Greek-keys και άλλα. Εκείνο που έχει ενδιαφέρον, είναι το γεγονός ότι οι αρχιτεκτονικές των περισσότερων πρωτεϊνών βασίζονται στις συσχετίσεις δευτεροταγών δομών, και επομένως οι περισσότερες προσπάθειες επικεντρώνονται στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των α -ελίκων και των β -φύλλων. Η γενική τους αρχιτεκτονική καθορίζεται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Για παράδειγμα, η συμπλοκή (interdigitation) των πλευρικών ομάδων δύο ιδανικών α -ελίκων αναμένεται μόνο όταν οι άξονες των ελίκων διασταυρώνονται σε γωνίες -82° , -60° , ή $+19^\circ$ [25]. Οι έλικες “πακετάρονται” με τα β -φύλλα με τους άξονές τους σχεδόν παράλληλους σε αυτά διότι με αυτόν τον τρόπο η επιφάνεια των φύλλων ταιριάζει στην επιφάνεια των ελίκων [26]. Φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες ακολουθούν αυτήν την προσέγγιση, αλλά παρόλα αυτά, σε πολλές πραγματικές δομές έχουν βρεθεί ουσιώδεις διαφοροποιήσεις.

1.3.8 Τριτοταγής δομή

Η συμπαγής δομή κάθε πολυπεπτιδίου στο χώρο ονομάζεται *τριτοταγής*. Προέρχεται από την οργάνωση της δευτεροταγούς δομής σε πιο σύνθετες τοπολογίες. Ορισμένα πολυπεπίδια ($n > 150$) αναδιπλώνονται σε δύο ή περισσότερες *δομικές περιοχές* (domains), που αποτελούνται από α -έλικες, β -φύλλα, ή συνδυασμούς τους και ενώνονται μεταξύ τους με εύκαμπτα τμήματα πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Για παράδειγμα, το εξωκυτταρικό τμήμα της πρωτεΐνης CD4 (Εικόνα 1.13) αποτελείται από τέσσερις παρόμοιες δομικές περιοχές που περιλαμβάνουν 100 αμινοξέα η καθεμία. Πολλές πρωτεΐνες μπορεί να έχουν κοινές δομικές περιοχές ακόμα και αν η τριτοταγής τους δομή είναι διαφορετική.

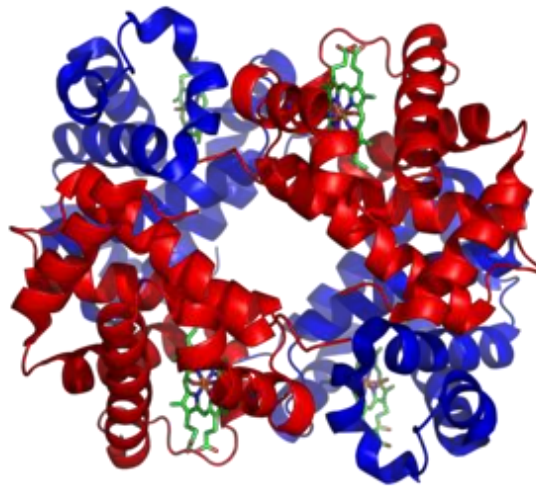


Εικόνα 1.13. Η πρωτεΐνη CD4 αποτελείται από τέσσερις δομικές περιοχές (εικ. από την αναφ. [14]).

1.3.9 Τεταρτοταγής δομή

Οι πρωτεΐνες που αποτελούνται από περισσότερες από μία πολυπεπτιδικές αλυσίδες (υπομονάδες) εμφανίζουν τεταρτοταγή δομή. Αυτή αναφέρεται στη χωρική διάταξη των υπομονάδων και τα είδη των αλληλεπιδράσεων που εμφανίζουν. Οι τεταρτοταγείς δομές

μπορεί να είναι απλές ή σύνθετες, ανάλογα με τον αριθμό των υπομονάδων που περιέχουν. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι υπομονάδες συγκρατούνται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς. Στην Εικόνα 1.14 απεικονίζεται η ανθρώπινη αιμοσφαιρίνη, η οποία αποτελείται από τέσσερις διαφορετικές αλυσίδες (δύο ζεύγη διαφορετικής τριτοταγούς δομής). Η διάταξη των αλυσίδων επιτρέπει τη μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς. Όπως και στην τριτοταγή δομή, η τεταρτοταγής δομή που επιλέγεται τελικά από τις πρωτεΐνες είναι η πιο σταθερή θερμοδυναμικά. Γενικά, η αυτοοργάνωση παρατηρείται ακόμα και στην οργάνωση μεγαλύτερων και πιο πολύπλοκων βιολογικών δομών, όπως τα πολυενζυμικά συμπλέγματα και οι κυτταρικές μεμβράνες. Οι πληροφορίες που απαιτούνται για το σχηματισμό της τελικής πολύπλοκης τρισδιάστατης δομής περιέχονται στην αλληλουχία των αμινοξέων (πρωτοταγής δομή), δηλαδή υπάρχει συσχέτιση μεταξύ δομής και λειτουργίας.



Εικόνα 1.14. Η ανθρώπινη αιμοσφαιρίνη είναι ένα τετραμερές $\alpha_2\beta_2$. Η δομή των υπομονάδων α (κόκκινο) διαφέρει από τη δομή των υπομονάδων β (μπλε). Στο μόριο περιέχονται και τέσσερα μόρια αίμης (πράσινο) (εικ. από την Protein Data Bank (PDB) 1GZX).

1.3.10 Η σχέση μεταξύ πρωτοταγούς και δευτεροταγούς δομής

Η απάντηση στο ερώτημα τι καθορίζει τη στερεοδιάταξη μιας φυσικής πρωτεΐνης, μπορεί να αναζητηθεί σε πρώτη φάση στην πρωτοταγή δομή. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.2, κάθε αμινοξύ έχει διαφορετική συχνότητα εμφάνισης στις κυριότερες δευτεροταγείς δομές. Παρατηρούμε ότι η αλανίνη, το γλουταμικό οξύ, και η λυσίνη, συμπολυπεπτίδια των οποίων που θα μας απασχολήσουν στη συνέχεια, έχουν την τάση να βρίσκονται σε έλικες, ενώ και τα υπόλοιπα αμινοξέα έχουν τις δικές τους προτιμήσεις. Πιο συγκεκριμένα, τόσο ο πολυ(γ-βενζυλεστέρας του L-γλουταμικού οξέος) (PBLG) [22,27], όσο και η πολυαλανίνη [28] και η πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνη) (PZLL) [29] σχηματίζουν α-έλικες σε μεγάλα

μοριακά βάρη. Μελέτες πρωτεϊνών και συνθετικών πολυπεπτιδίων έδειξαν τους λόγους για τους οποίους υπάρχει αυτή η διαφοροποίηση [30-32]. Το κύριο συμπέρασμα ήταν ότι λόγω των διαφορετικών πλευρικών ομάδων και της συνολικής δομής έκαστου αμινοξέος, η δυνατότητα προσαρμογής στη μία ή στην άλλη δομή είναι διαφορετική.

Από την άλλη πλευρά, οι προσπάθειες για την πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής, δεδομένης της πρωτοταγούς και της τάσης των αμινοξέων για συγκεκριμένες δομές, είναι ακριβείς μόλις κατά 60-70%. Θα πρέπει να παρατηρήσουμε ότι στον Πίνακα 1.2 φαίνεται ότι τα αμινοξέα μπορεί να συμμετέχουν και σε άλλες δομές πλην της πιο συνηθισμένης. Έχει βρεθεί, μάλιστα, ότι ορισμένες αλληλουχίες ολιγοπεπτιδίων ($n \sim 5$) έχουν εντελώς διαφορετικές δευτεροταγείς δομές σε διαφορετικές πρωτεΐνες. Επομένως, οι αλληλουχίες των αμινοξέων δεν καθορίζουν απόλυτα τη δευτεροταγή δομή, αλλά το τελικό αποτέλεσμα εξαρτάται από το τοπικό περιβάλλον και τη διάταξή τους στο χώρο. Τέτοιους περιορισμούς και αλληλεπιδράσεις θα μελετήσουμε στο πειραματικό μέρος της εργασίας αυτής. Οι τελευταίες εξελίξεις στην ανάπτυξη συνθετικών πολυπεπτιδίων επιτρέπουν την παρασκευή βιοσύνθετων πολυμερών φτιαγμένων αποκλειστικά από αμινοξέα, όπως θα δούμε στο Κεφάλαιο 2. Η τάση συγκεκριμένων πεπτιδίων να ευνοούν κάποιες δευτεροταγείς δομές, οδηγούν σε νέες και ιδιαίτερα χρήσιμες ιδιότητες αυτοοργάνωσης.

Πίνακας 1.2. Σχετικές συχνότητες εμφάνισης αμινοξέων σε δευτεροταγείς δομές [33].

Αμινοξύ	α -έλικα	β -φύλλα	στροφή
Ala	1.29	0.90	0.78
Cys	1.11	0.74	0.80
Leu	1.30	1.02	0.59
Met	1.47	0.97	0.39
Glu	1.44	0.75	1.00
Gln	1.27	0.80	0.97
His	1.22	1.08	0.69
Lys	1.23	0.77	0.96
Val	0.91	1.49	0.47
Ile	0.97	1.45	0.51
Phe	1.07	1.32	0.58
Tyr	0.72	1.25	1.05
Trp	0.99	1.14	0.75
Thr	0.82	1.21	1.03
Gly	0.56	0.92	1.64
Ser	0.82	0.95	1.33
Asp	1.04	0.72	1.41
Asn	0.90	0.76	1.28
Pro	0.52	0.64	1.91
Arg	0.96	0.99	0.88

Απώτερος στόχος της μοριακής βιολογίας είναι η σύνθεση μιας αλληλουχίας αμινοξέων που θα αναδιπλωθεί σε μια πρωτεΐνη με προκαθορισμένη δομή και λειτουργία [34]. Παραδόξως, αυτό ίσως είναι ευκολότερο από το αντίθετο, δηλαδή την εύρεση της αλληλουχίας που αναδιπλώνεται σε μια δεδομένη πρωτεΐνη. Επειδή, όμως, ο μηχανισμός αναδίπλωσης δεν είναι ακόμη απολύτως κατανοητός, αυτό είναι ένα δύσκολο έργο. Το 1997 η ομάδα του L. Regan κέρδισε το διαγωνισμό “Paracelsus Challenge” μετατρέποντας τη διαμόρφωση μιας πρωτεΐνης από β-φυλλοειδή σε α-ελικοειδή αλλάζοντας το 50% των αμινοξέων της αλληλουχίας της [35]. Αυτό και άλλα αποτελέσματα έδειξαν ότι είναι δυνατή η κατά βούληση μετατροπή της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών αλλάζοντας τη δομική αλληλουχία.

1.4.1 Αναδίπλωση πρωτεϊνών και προβλήματα υγείας

Η λανθασμένη αναδίπλωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών και ο σχηματισμός συσσωματωμάτων μπορεί να προκαλέσει εκφυλιστικές ασθένειες. Παραδείγματα τέτοιων ασθενειών παρατίθενται στον Πίνακα 1.3. Όλες αυτές είναι αποτέλεσμα αλλαγής της δομής μιας πρωτεΐνης ώστε, για παράδειγμα, να σχηματίζει β-φύλλα αντί για α-έλικες. Ο έλεγχος της δευτεροταγούς δομής για την πρόληψη ασθενειών είναι ένας ακόμα ερευνητικός στόχος της βιοφυσικής των πρωτεϊνών. Όπως θα δούμε στην παρούσα εργασία, ο έλεγχος της δευτεροταγούς δομής πολυπεπτιδίων είναι εφικτός με τη χρήση πρότυπων συστημάτων.

Πίνακας 1.3. Ασθένειες που οφείλονται σε προβληματική δευτεροταγή δομή [36].

Ασθένεια	Πρωτεΐνη που εμπλέκεται
Κυστική ίνωση	CFTR
Πρωτογενής συστημική αμυλοείδωση	Ολιγοπεπτιδίο ανοσοσφαιρίνης
Μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς	Καλσιτονίνη
Ατελής οστεογένεση	Προκολλαγόνο I
Καρκίνος των πνευμόνων, του ορθού, και άλλες μορφές καρκίνου	Μεταγραφικός παράγοντας p53
Ουρική νόσος σιροπιού σφενδάμου	Σύμπλεγμα α-κετοξέος της αφυδρογονάσης
Αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση	Διςμουτάση του υπεροξειδίου
Ασθένεια των Creutzfeldt-Jakob, vCJD, τρομώδης νόσος των αιγοπροβάτων, θανατηφόρος οικογενής αιμωσία	Μολυσματική πρωτεΐνη (prion)
Ασθένεια του Alzheimer	β-αμυλοειδής πρωτεΐνη
Καταρράκτης	Κρυσταλλίνες
Κολπική αμυλοείδωση	Κολπικός νατριουρητικός παράγοντας
Γεροντική συστημική αμυλοείδωση, οικογενής αμυλοείδωση	Τρανσθυρετίνη
Ασθένεια Tay-Sachs	β-εξωσαμινιδάση
Κληρονομικό εμφύσημα	α-αντιτρυψίνη
Μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια	Ροδοψίνη
Κληρονομική μη νευροπαθητική συστημική αμυλοείδωση	Λυσοζύμη
Μεταδοτική σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια	Μολυσματική πρωτεΐνη (prion)
Χορεία του Huntington	Χαντιγκτίνη
Οικογενής υπερχοληστερολαιμία	Υποδοχέας LDL

1.4.2 Δυνατότητες τροποποίησης των πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες επιτελούν πολυάριθμες λειτουργίες, βασισμένες αποκλειστικά στα 20 φυσικά αμινοξέα. Παρόλα αυτά, για να εμπλουτιστεί η ποικιλία της δράσης τους, πολλές πρωτεΐνες είναι δυνατόν να τροποποιηθούν με την προσθήκη άλλων ομάδων [37,38]. Ιδιαίτερη μνεία αξίζει να γίνει στις “χημικές πρωτεΐνες”: Η σταθερότητα των πρωτεϊνών ενισχύεται με την εισαγωγή μη φυσικών αμινοξέων που μειώνουν τους εντροπικούς περιορισμούς κατά την αναδίπλωση [21] ή συνδυασμούς βιολογικών και μη πολυμερών σε διάφορες αρχιτεκτονικές [39]. Για παράδειγμα, η εισαγωγή αμινοϊσοβουτυρικού οξέος στις πρωτεΐνες περιορίζει τοπικά τις διέδρες γωνίες Φ και Ψ σε τιμές ευνοϊκές για το σχηματισμό α-έλικας [40]. Επίσης, ακετυλικές ομάδες προστίθενται στο αμινοτελικό άκρο πρωτεϊνών, αυξάνοντας την ανθεκτικότητά τους στην αποικοδόμηση [41]. Άλλα παραδείγματα περιλαμβάνουν τον έλεγχο των πλευρικών ομάδων, την αλλαγή της πρωτοταγούς δομής, και το συνδυασμό πρωτεϊνών με άλλα βιοπολυμερή όπως πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) [42,43]. Η προσθήκη υδροξυλικών ομάδων στις προλίνες του νεοσυντιθέμενου κολλαγόνου σταθεροποιεί τις ίνες της πρωτεΐνης στο συνδετικό ιστό και τα οστά. Οι αυξητικοί παράγοντες, όπως η ινσουλίνη, ενεργοποιούν τη φωσφορυλίωση των υδροξυλικών ομάδων αμινοξέων τυροσίνης σχηματίζοντας φωσφοτυροσίνη. Τέτοιες προσθήκες ευθύνονται για την ιδιαίτερη ευελιξία της δράσης των πρωτεϊνών. Κάποια από τα πολυπεπίδια που θα μελετηθούν στη συνέχεια έχουν τέτοιες τροποποιήσεις, όπως το PBLG και η PZLL.

1.5 Αναφορές

- (1) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. “*Molecular Biology of the Cell*” Garland Science, New York, 2002.
- (2) Dekker, C. *Nature Nanotechnology* **2007**, 2, 209.
- (3) Storm, A. J.; Storm, C.; Chen, J.; Zandbergen, H.; Joanny, J.-F.; Dekker, C. *Nano Lett.* **2005**, 5, 1193.
- (4) Kasianowicz, J. J.; Brandin, E.; Branton, D.; Deamer, D. W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93, 13770.
- (5) Bolsover, S. R.; Hyams, J. S.; Shephard, E. A.; White, H. A.; Wiedemann, C. G. “*Cell Biology*” chapter 10, John Wiley & Sons, New Jersey, 2004.
- (6) Wickner, W.; Schekman, R. *Science* **2005**, 310, 1452.
- (7) Matlack, K. E. S.; Mother, W.; Rapoport, T. A. *Cell* **1998**, 92, 381.
- (8) Μαρμάρας, Β.; Λαμπροπούλου-Μαρμάρα, Μ. “*Βιολογία Κυττάρου*”, Typorama, Πάτρα, 2005.

- (9) Γαλανόπουλος, Β. Κ.; Κεραμάρης, Κ. Ε.; Μαρίνος, Ε. Σ.; Παπασιδέρη, Ι. Σ.; Στραβοπόδης, Δ. Ι.; Τρουγκάκος, Ι. Π. “*Βιολογία κυττάρου*”, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα, 2004.
- (10) Chothia, C.; Finkelstein, A. V. *Ann. Rev. Biochem.* **1990**, 59, 1007.
- (11) Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. *J. Mol. Biol.* **1963**, 7, 95.
- (12) Barlow, D. J.; Thornton, J. M. *J. Mol. Biol.* **1988**, 201, 601.
- (13) Harper, E. T.; Rose, G. D. *Biochemistry* **1993**, 32, 7605.
- (14) Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemistry*, W. H. Freeman and Co., New York, 2002.
- (15) Toniolo, C.; Benedetti, E. *Trends Biochem. Sci.* **1991**, 16, 350.
- (16) Karpen, M. G.; De Haseth, P. L.; Neet, K. E. *Protein Sci.* **1992**, 1, 1333.
- (17) Fiori, W. R.; Miick, S. M.; Millhauser, G. L. *Biochemistry* **1993**, 32, 11957.
- (18) Smythe, M. L.; Huston, S. E.; Marshall, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 11594.
- (19) Rajashankar, K. R.; Ramakumar, S. *Protein Sci.* **1996**, 5, 932.
- (20) Watanabe, J.; Uematsu, I. *Polymer* **1984**, 25, 1711.
- (21) Hol, W. G. J.; van Duijnen, P. T.; Berendsen, H. J. C. *Nature* **1978**, 273, 443.
- (22) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Klok, H.-A.; Schnell, I.; Pakula, T. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 81.
- (23) Zhang, C.; Kim, S. H. *J. Mol. Biol.* **2000**, 299, 1075.
- (24) Leszczynski, J. F.; Rose, G. D. *Science* **1986**, 234, 849.
- (25) Rao, S. T.; Rossmann, M. G. *J. Mol. Biol.* **1973**, 76, 241.
- (26) Chothia, C.; Finkelstein, A. V. *Ann. Rev. Biochem.* **1990**, 59, 1007.
- (27) Block, H. in “*Poly(γ -benzyl-L-glutamate) and other glutamic acid containing polymers*” Gordon and Breach Science Publishers, New York, 1983.
- (28) Saludjian, P.; Luzzati, V. in “*Poly- α -Amino Acids*”, Fasman, G. D. (ed.) chapter 4, Dekker, New York, 1967.
- (29) Gitsas, A.; Floudas, G.; Mondeshki, M.; Butt, H.-J.; Spiess, H. W.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *Biomacromolecules* **2008**, 9, 1959.
- (30) Anfinsen, C. B. *Science* **1973**, 181, 223.
- (31) Baldwin, R. L.; Rose, G. D. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, 24, 26; **1999**, 24, 77.
- (32) Neira, J. L.; Fersht, A. R. *J. Mol. Biol.* **1999**, 285, 1309.
- (33) Creighton, T. E. *Proteins: “Structures and Molecular Properties”*, W. H. Freeman and Co., 1992, pp. 256.
- (34) Tuchscherer, G.; Scheibler, L.; Dumy, P.; Mutter, M. *Biopolymers* **1998**, 47, 63

- (35) Dalal, S.; Balasubramanian, S.; Regan, L. *Nature Struct. Biol.* **1997**, 4, 548.
- (36) Whitford, D. “*Proteins, Structure and Function*”, Wiley, Barcelona, 2005.
- (37) Krishna, R. G.; Wold, F. *Adv. Enzymol. Relat. Ar. Mol. Biol.* **1993**, 67, 265.
- (38) Glazer, A. N.; Delange, R. J.; Sigman, D. S. “*Chemical Modification of Proteins*”, North-Holland, Amsterdam, 1975.
- (39) Karatzas, A.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N.; Inoue, K.; Sugiyama, K.; Hirao, A. *Biomacromolecules* **2008**, 9, 2072.
- (40) Marshall, G. R.; Hodgkin, E. E.; Langs, D. A.; Smith, G. D.; Zabrocki, J.; Leplawy, M. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 487.
- (41) Oommachen, S.; Ren, J.; McCallum, C. M. *J. Phys. Chem B* **2008**, 112, 5702.
- (42) Gauthier, M.A.; Klok, H.-A. *Chem. Commun.* **2008**, 23, 2591.
- (43) Vandermeulen, G. W. M.; Klok, H.-A. *Macromol. Biosci.* **2004**, 4, 383.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Συνθετικά πολυπεπτίδια

2.1 Εισαγωγή

Τα βιολογικά συστήματα παράγουν πρωτεΐνες οι οποίες έχουν την ικανότητα να αυτοοργανώνονται σε σύνθετες, πολύ καλά οργανωμένες δομές [1]. Οι πρωτεΐνες είναι συμπολυμερή πολυπεπτιδίων, που οφείλουν τις ιδιότητές τους στις καλά καθορισμένες αλληλουχίες των αμινοξέων που τα αποτελούν. Τελευταία υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη συνθετικών μεθόδων για την παρασκευή τεχνητών πολυπεπτιδίων που να προσομοιάζουν τις φυσικές πρωτεΐνες. Τέτοια πολυπεπτίδια μπορούν να βρουν – και ήδη βρίσκουν – εφαρμογή στην κατασκευή τεχνητών ιστών, στη σύνθεση και στη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων [2]. Τα συνθετικά πολυπεπτίδια προσφέρουν σπουδαία πλεονεκτήματα, όπως η δυνατότητα παρασκευής τους από απλούστερα δομικά υλικά, ενσωματώνοντας τα θετικά τους χαρακτηριστικά, αλλά παρουσιάζουν και ορισμένες δυσκολίες. Οι παράπλευρες χημικές αντιδράσεις συχνά οδηγούν σε ανεπιθύμητα παραπροϊόντα, και δεν επιτρέπουν το σχηματισμό της απαιτούμενης πολυσύνθετης δομής.

2.2 Βιολογικά μοντέλα βασισμένα σε συνθετικά πεπτίδια

Μια συνήθης προσέγγιση στη μελέτη της πρωτεϊνικής δομής και λειτουργικότητας είναι η χρήση κατάλληλων πρότυπων συνθετικών πολυπεπτιδίων. Τα πολυπεπτίδια μπορούν να προσομοιάσουν την πρωτοταγή, τη δευτεροταγή, και την τριτοταγή πρωτεϊνική δομή, και χρησιμοποιούνται στη μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών με άλλες πρωτεΐνες, μεμβράνες, και επιφάνειες. Εκτός από τα 20 κοινά αμινοξέα, χρησιμοποιούνται και τροποποιημένα πεπτίδια, όπως φωσφολυιωμένα, γλυκοζιωμένα, υδροξυλιωμένα, και θειούχα [3]. Στο επίπεδο της πρωτοταγούς δομής, τα πεπτίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοντέλα πρωτεϊνών για τη μελέτη της βιολογικής λειτουργίας. Για παράδειγμα, συνθετικά πεπτίδια που περιέχουν Tyr(PO₃H₂) χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της κινητικής της αποφωσφορυλίωσης από διάφορες φωσφατάσες της τυροσίνης [4].

Όπως είδαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο, τα πιο συνηθισμένα στοιχεία της δευτεροταγούς διαμόρφωσης είναι οι α-έλικες και τα β-φύλλα. Η α-έλικα ουσιαστικά αποτελείται από μια σειρά β-στροφών τύπου I. Από αυτήν την άποψη, και οι έλικες και οι στροφές είναι τοπικές διαμορφώσεις. Καθώς τα β-φύλλα αντιπροσωπεύουν μη τοπικές δομικές αλληλεπιδράσεις, είναι πιθανότερο ότι οι μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες και πεπτίδια

θα έχουν μεγαλύτερη τάση να σχηματίζουν πιο τοπικές διαμορφώσεις, όπως έλικες, οι οποίες σχηματίζονται πιο γρήγορα [5] από τα β-φύλλα [6]. Τα περισσότερα γραμμικά πεπίδια – μελετημένα σε υδατικά διαλύματα – αν και εμφανίζουν κάποιες στροφές [7] ή τάση για έλικες [8], έχουν κυρίως τυχαίες δομές [9].

Η τάση για σχηματισμό α-ελίκων έχει μελετηθεί σε πολλά πρότυπα συστήματα διαφορετικών αμινοξέων [10-12]. Οι Chakrabartty *et al.* [13] έδειξαν ότι στα 273 K η Ala σχηματίζει αποκλειστικά έλικες, η Leu και η Arg έχουν ουδέτερη τάση για έλικες, ενώ όλα τα άλλα αμινοξέα καταστρέφουν τις έλικες, το καθένα σε διαφορετικό βαθμό. Συμπεράναν ότι τα περισσότερα αμινοξέα αντιτίθενται στο σχηματισμό ελίκων, και οι έλικες των πρωτεϊνών σταθεροποιούνται χάρη στις επιπλέον ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Οι Marqusee *et al.* [14] βρήκαν έναν ασυνήθιστα σταθερό σχηματισμό α-ελίκων από μικρά πεπίδια βασισμένα σε Ala ($n=16$) σε υδατικό διάλυμα. Αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε αντίθεση με την κλασική άποψη ότι οι α-έλικες είναι οριακά σταθερές σε νερό, ειδικά σε μικρά πεπίδια.

Οι Krstenansky *et al.* [15] συνδύασαν όλες τις παραμέτρους που ευνοούν τη σταθεροποίηση α-ελίκων σε πρότυπα πεπίδια βασισμένα στο πολυπεπίδιο Glu-Leu-Leu-Glu-Lys-Leu-Leu-Glu-Lys-Leu-Leu-Lys. Τα φάσματα κυκλικού διχροϊσμού (CD) έδειξαν την παρουσία μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε α-έλικες από οποιοδήποτε άλλο μικρό πολυπεπίδιο με λιγότερα από 18 αμινοξέα. Επιπλέον, η τάση σχηματισμού α-ελίκων δεν απαιτούσε την παρουσία διαλύτη ή χαμηλών θερμοκρασιών. Για παράδειγμα, ένα πολυπεπίδιο με $n=17$ είχε 100% και 80% περιεκτικότητα σε α-έλικες, σε συγκεντρώσεις 1.7×10^{-4} M και 1.7×10^{-5} M, αντίστοιχα. Ένα άλλο πολυπεπίδιο με $n=10$ είχε 51% α-έλικες σε 1.7×10^{-4} M σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων σε θερμοκρασία δωματίου.

Οι Wu *et al.* [16] μελέτησαν ένα πεπτιδικό μοντέλο αναδίπλωσης της πρώιμης κυτοσίνης, αποτελούμενο από δύο τμήματα με συνολικά 104 μονομερή. Βρέθηκε ότι τα απομονωμένα πεπίδια έχουν γενικά άμορφη δομή, ενώ όταν συνδυαστούν σχηματίζουν μια ελικοειδή δομή.

Αυτά τα αποτελέσματα τονίζουν τη σημασία των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πολυπεπτιδίων που η δευτεροταγή τους δομή είναι ασταθής και αμφίσημη. Πεπίδια που ευνοούν τις α-έλικες και είναι υδρόφιλα είναι η αργινίνη, η λυσίνη, το γλουταμικό οξύ, και η γλουταμίνη, επειδή επιτρέπουν την προσαρμογή θετικών και αρνητικών ιόντων ώστε να αυξάνεται η διαλυτότητα. Υδρόφοβα πεπίδια που ευνοούν α-έλικες είναι η αλανίνη, η λευκίνη, και η μεθιονίνη. Πεπίδια που πρέπει να αποφεύγονται στο σχεδιασμό σταθερών ελίκων είναι η Pro, η Gly, η Val, και η Thr. Από την άλλη πλευρά, ο συνδυασμός πεπτιδίων

που ευνοούν τα β-φύλλα μεγαλώνει αυτήν την τάση [17]. Αυτό κάνει δύσκολο το σχεδιασμό β-φύλλων που να είναι ταυτόχρονα σταθερά και ευδιάλυτα.

2.3 Σύνθεση πολυπεπτιδίων

Οι πρώτες προσπάθειες χρήσης συνθετικών πολυπεπτιδίων για βιολογικές εφαρμογές ξεκίνησαν με απλά ομοπολυπεπτίδια, όπως η πολυ-L-λυσίνη και το πολυ(L-ασπαρτικό οξύ) [18]. Αυτά τα πολυμερή είναι τα πιο προσιτά υδατοδιαλυτά συστήματα προσομοίωσης των πρωτεϊνών, αλλά έχουν περιορισμένη λειτουργικότητα και η πολυηλεκτρολυτική τους φύση τα καθιστά προβληματικά, λόγω καταβύθισης με άλλα φορτισμένα μακρομόρια των σωματικών υγρών [19]. Για να γίνουν πιο σταθερά για τη μεταφορά φαρμάκων, τα πολυπεπτίδια βελτιώθηκαν με ομοιοπολική σύζευξη με υδρόφοβους παράγοντες (π.χ. πολυαιθυλενογλυκόλη, PEG) [18]. Με αυτόν τον τρόπο βελτιώθηκε τόσο η λειτουργικότητα, όσο και η πολυδιασπορά τους. Η δυνατότητα ελέγχου του μεγέθους των συστημάτων είναι εξίσου σημαντική όσο και η ακριβής σειρά των αμινοξέων στην αλληλουχία. Ο λόγος είναι ότι η μονοδιάσπαρτη κατανομή διευκολύνει την αυτοοργάνωση.

Η σύνθεση πολυπεπτιδίων με βαθμό πολυμερισμού (n) $n > 30$, κάτι που είναι χρήσιμο για την εξασφάλιση ισχυρών διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, είναι αρκετά δύσκολη. Η μέθοδος του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των α-αμινοξυ-N-καρβοξυανυδριτών (NCA) είναι η πρώτη τεχνική που χρησιμοποιήθηκε. Τα κυριότερα μειονεκτήματά της είναι η μικρή δυνατότητα ελέγχου της πολυδιασποράς και της αλληλουχίας των αμινοξέων (σε συμπολυπεπτίδια) [20]. Σήμερα, η σύνθεση συστημάτων με καλά καθορισμένη σύσταση και δομή είναι δυνατή μέσω του ζωντανού πολυμερισμού των NCA [21,22].

Η δυνατότητα χρήσης μιας μεγάλης γκάμας αμινοξέων, συνθετικών και φυσικών, διευκολύνει σημαντικά το σχεδιασμό μορίων με περίπλοκη αρχιτεκτονική. Η ομάδα του T. J. Deming έχει χρησιμοποιήσει αυτήν την τεχνική σύνθεσης για την παρασκευή πολυπεπτιδίων με πολυδιασπορά $I < 1.20$ και μοριακά βάρη $500 < M_n < 500000$ [23]. Η επίτευξη χαμηλής πολυδιασποράς περιορίζεται και από ανεπιθύμητες αποκοπές ακραίων ομάδων, και αποπροστασία των μορίων στα ενδιάμεσα στάδια πολυμερισμού [23]. Οι M. Tirrell *et al.* χρησιμοποίησαν μια συνθετική μέθοδο πολυπεπτιδίων που βασίζεται σε βακτήρια, με αποτέλεσμα μονοδιάσπαρτα μακρομόρια. Με τον τρόπο αυτό ανέπτυξαν τεχνητές πρωτεΐνες Glu(OBzl)Asp(OBzl)[Glu(OBzl)₁₇Asp(OBzl)]_x-Glu(OBzl)Glu(OBzl) (PBLG-X, X=3-6), που είναι μονοδιάσπαρτα ανάλογα του πολυ(γ-βενζυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος) (PBLG) [24,25], ενός πολύ ενδιαφέροντος πρότυπου πολυπεπτιδίου που χρησιμοποιούμε σε πολλά συστήματα στη συνέχεια αυτής της εργασίας. Σε αντίθεση με παρόμοια συστήματα με

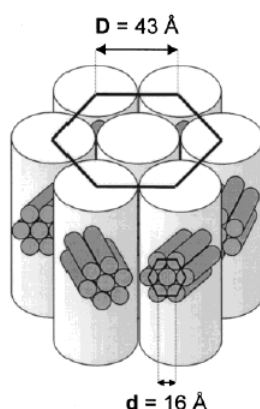
μεγάλη πολυδιασπορά, τα μονοδιάσπαρτα είχαν πολύ καλύτερη υγροκρυσταλλική οργάνωση. Το συμπέρασμα των τελευταίων μελετών ήταν ότι η μονοδιασπορά παίζει σημαντικό ρόλο στη θερμοτροπική συμπεριφορά τέτοιων συστημάτων.

Η ακρίβεια στη σύνθεση είναι σημαντική για τη δημιουργία συνθετικών συμπολυπεπτιδίων με πιο περίπλοκες δομές και μεγαλύτερη λειτουργικότητα. Το μήκος των αλυσίδων, η σύσταση, και η προσάρτηση λειτουργικών ομάδων μπορεί να ελεγχθεί εύκολα, και επιπλέον το τελικό προϊόν δεν έχει προσμίξεις και υπολείμματα διαλυτών. Οι Deming *et al.* παρασκεύασαν συστήματα υδρογέλης (hydrogels) που έχουν μεγάλο βαθμό αντοχής, είναι πολύ πορώδη, πολύ σταθερά, μη τοξικά, και επιτρέπουν την περαιτέρω επεξεργασία τους [26]. Άλλα συστήματα υδρογέλης αποτελούμενα από πρωτεΐνες και πεπίδια που σχηματίζουν α-έλικες ή β-φύλλα μπορούν να αυτοοργανωθούν ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος, όπως έδειξαν οι McLeich *et al.* [27].

Μια σημαντική εξέλιξη στο σχεδιασμό ιεραρχικά ταξινομημένων βιοενεργών δομών ήταν οι πρόσφατες εργασίες της ομάδας του ΕΚΠΑ (Ν. Χατζηχρηστίδης, Ε. Ιατρού) σχετικά με τη σύνθεση συμπολυμερών κατά συστάδες βασισμένων αποκλειστικά σε πολυπεπίδια. Χρησιμοποιήθηκαν οργανονικελικοί εκκινητές αντί για αμίνες, για να αποφευχθούν παράπλευρες αντιδράσεις του NCA οι οποίες είχαν παρακωλύσει τη σύνθεση καλά σχηματισμένων συμπολυπεπτιδίων για πολλά χρόνια [28]. Αυτή η προσέγγιση οδήγησε σε διάφορα συμπολυμερή βασισμένα σε πεπίδια, συμπεριλαμβανομένων δισυσταδικών, τρισυσταδικών, και τετρασυσταδικών συμπολυμερών με πολύ μικρή πολυδιασπορά [29,30]. Οι παράπλευρες αντιδράσεις αποφεύχθηκαν χρησιμοποιώντας τεχνικές υψηλού κενού, ώστε να διασφαλιστούν οι απαραίτητες συνθήκες για το ζωντανό πολυμερισμό των NCA [22c]. Μια σειρά μονοδιάσπαρτων δισυσταδικών συμπολυμερών πολυ(γ-βενζυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος)-b-πολυγλυκίνης (PBLG-b-PGly) συντέθηκαν με την τελευταία μέθοδο [31]. Οι δύο συστάδες διαφέρουν όχι μόνο στη δευτεροταγή τους δομή, αλλά και στη δυνατότητα συναρμογής και στην τμηματική τους δυναμική. Η μελέτη της αυτοοργάνωσης έδειξε ότι ο θερμοδυναμικός περιορισμός των συστάδων στις μικροφάσεις και η διαφορά στην ικανότητα συναρμογής προκαλούν πολλαπλές αναδιπλώσεις των αλυσίδων της PGly, η οποία σταθεροποιεί μια στρωματική μορφολογία για μεγάλα κλάσματα όγκου του PBLG [31]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν και εργασίες των Schlaad *et al.* [22b,32,33], όπου με ελεγχόμενο πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου των NCA αποφεύχθηκε ο πολυμερισμός παραπροϊόντων [32]. Ειδικότερα, με τη χρήση οργανονικελικών συστημάτων bipyNi(COD) και άλλων συμπλόκων μεταβατικών μετάλλων ο πολυμερισμός των NCA οδηγεί σε καλά καθορισμένα πολυπεπίδια με πολυδιασπορά $I < 1.2$ [33].

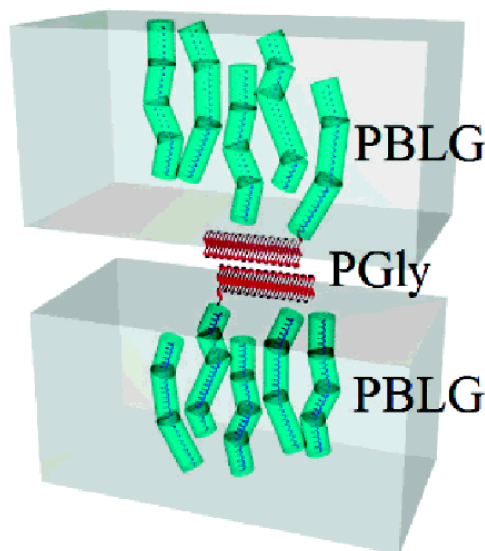
Τα μη γραμμικά συμπολυπεπίδια έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον για τη μελέτη της επίδρασης της αρχιτεκτονικής στις ιδιότητές τους. Κατά αυξανόμενο βαθμό πολυπλοκότητας, αυτά περιλαμβάνουν δισυσταδικά, εμβολιασμένα, αστεροειδή, αστεροειδή με μεικτούς κλάδους, κυκλικά, και άλλα [29,30,34-37]. Οι παράμετροι που μπορούν να ελεγχθούν είναι το μοριακό βάρος, η μακρομοριακή αρχιτεκτονική, η χημική δομή, η ακριβής θέση των μονομερών στην πολυμερική αλυσίδα, καθώς και οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Το ενδιαφέρον στο αντικείμενο προκύπτει από το γεγονός ότι όλες οι παραπάνω ιδιότητες δεν είναι εύκολο να ελεγχθούν ταυτόχρονα και με ακρίβεια.

Ο θερμικός πολυμερισμός έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τη σύνθεση διακλαδωμένων δενδριμερών πολυ-L-λυσίνης, με πολύ μικρή πολυδιασπορά και πολύ καλά καθορισμένη δομή, είτε ως ομοπολυπεπίδιο [38] είτε ως συμπολυμερές με πολυστυρένιο [39]. Στη δεύτερη περίπτωση βρέθηκε ότι η μεταβολή του μοριακού βάρους μπορεί να αλλάξει τη συνολική δομή από ράβδους σε σφαίρες. Σε μια άλλη περίπτωση [40] αναπτύχθηκαν δισυσταδικά ολιγομερή PBLG-*b*-PS από ολιγομερή PBLG ($n=10-20$) και στυρενίου ($n=10$). Η μελέτη με σκέδαση ακτίνων-X σε μικρές γωνίες (SAXS) και φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR) έδειξε ότι η αυτοοργάνωση σε αυτά τα συστήματα εξαρτάται τόσο από το μήκος των συστάδων, όσο και από τη δευτεροταγή δομή του πεπτιδίου. Η φασματοσκοπία υπερύθρου έδειξε ότι στα συμπολυμερή οι α-έλικες σταθεροποιήθηκαν περισσότερο σε σύγκριση με το ολιγοπεπίδιο PBLG. Λόγω όμως του άμορφου στυρενίου, αυτές οι έλικες δεν μπορούν να οργανωθούν σε ιδιαίτερα κανονική δομή. Αυξάνοντας το n του PBLG από 10 σε 20 ενισχύεται ο σχηματισμός α-ελίκων και επιπλέον το σύστημα αποκτά μια “διπλή εξαγωνική” δομή (Εικόνα 2.1). Παραπλήσια αποτελέσματα βρέθηκαν και με όμοια συστήματα ολιγομερών PS-*b*-PZLL [41].



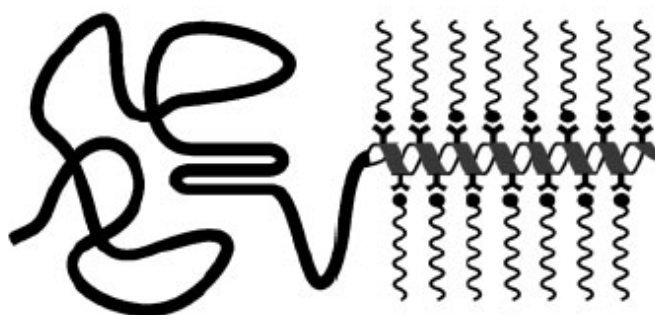
Εικόνα 2.1. Μοντέλο της αυτοοργάνωσης δισυσταδικού ολιγομερούς PBLG₂₀-*b*-PS₂₀. Οι μικρές ράβδοι αναπαριστούν τις εξαγωνικά διατεταγμένες α-έλικες της συστάδας του PBLG. Το ολιγοστυρένιο γεμίζει τα κενά ανάμεσα στις – επίσης εξαγωνικά οργανωμένες αλλά εγκάρσια στο μεγάλο τους άξονα – δεσμίδες του PBLG (εικ. από την αναφ. [40]).

Η αυτοοργάνωση σε συστήματα συμπολυμερών με συμμετοχή πολυπεπτιδίων έχει εξεταστεί και σε άλλες περιπτώσεις, όπως τα δισυσταδικά PBLG-*b*-PGly [31] και PEO-*b*-PGA [42], και τα τρισυσταδικά PBLG-*b*-PEG-*b*-PBLG [43] και PBLG-*b*-PDMS-*b*-PBLG [44]. Στο σύστημα PBLG-*b*-PGly [31], ο θερμοδυναμικός περιορισμός των συστάδων και η διαφορετική ικανότητα συναρμογής οδηγεί σε αναδίπλωση των β-φύλλων της PGly ώστε να σταθεροποιηθεί μια φυλλοειδής μορφολογία (Εικόνα 2.2). Από την άλλη πλευρά, οι έλικες του PBLG άρχιζαν να “σπάζουν” όσο μεγαλύτερο ήταν το μήκος του PBLG.



Εικόνα 2.2. Σχηματική αναπαράσταση συμπολυπεπτιδίων PBLG-*b*-PGly με $f_{\text{PBLG}} < 0.8$ βάση αποτελεσμάτων NMR, SAXS, WAXS, και ΔΦ. Οι έλικες του PBLG έχουν ατέλειες, ενώ η PGly αναδιπλώνεται πολλές φορές (εικ. από την αναφ. [31]).

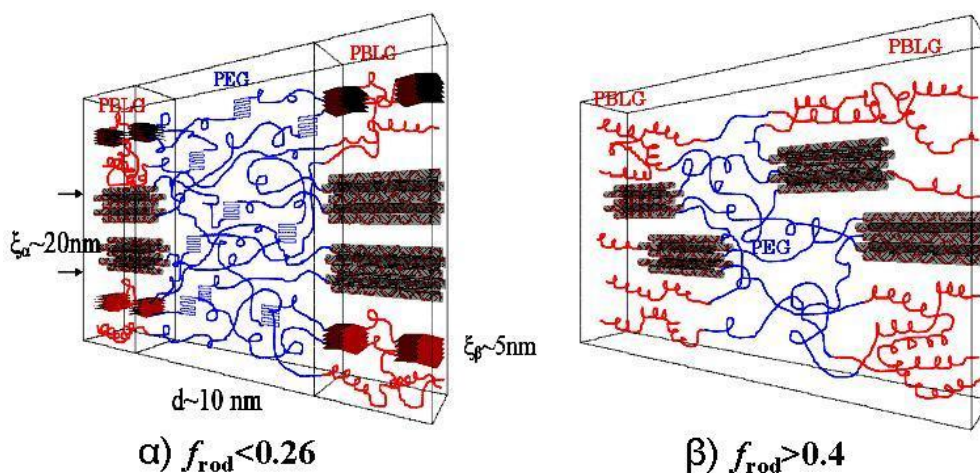
Το σύστημα PEO-*b*-PGA [42] εμφανίζει αυτοοργάνωση σε πολλές κλίμακες: κρυστάλλωση του PEO, οι οργάνωση των ελίκων του PGA, και ο διαχωρισμός των συστάδων σε μεγαλύτερη κλίμακα μήκους (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση συστημάτων PEO-PGA που παρουσιάζουν πολλαπλά επίπεδα αυτοοργάνωσης (εικ. από την αναφ. [42]).

Όσον αφορά τα τρισυσταδικά συστήματα, βρέθηκε ότι οι περιορισμοί που επιβάλλονται στην οργάνωση από τις νανοφάσεις, προκαλούν επίσης πολλαπλά επίπεδα οργάνωσης. Στο σύστημα PBLG-*b*-PEG-*b*-PBLG [43], ανάλογα με το ποσοστό του

πεπτιδίου, είτε υπήρχε διαχωρισμός φάσεων με παρόντα και β-φύλλα και α-έλικες (μικρό f_{PBLG}) είτε εμφανιζόταν μερική ανάμιξη των φάσεων και ελάττωση του πλήθους των β-φύλλων (μεγάλο f_{PBLG}) (Εικόνα 2.4). Η σταθερότητα της λιγότερο συνεκτικής δομής (β-φύλλα) μπορεί έτσι να ελεγχθεί μέσω της ενδοεπιφανειακής ανάμιξης. Τέλος, στην περίπτωση του PBLG-*b*-PDMS-*b*-PBLG [44] παρατηρήθηκε ξανά διαχωρισμός φάσεων, ενώ το μήκος εμμονής των α-ελίκων του PBLG ήταν ανάλογο του βαθμού διαχωρισμού.

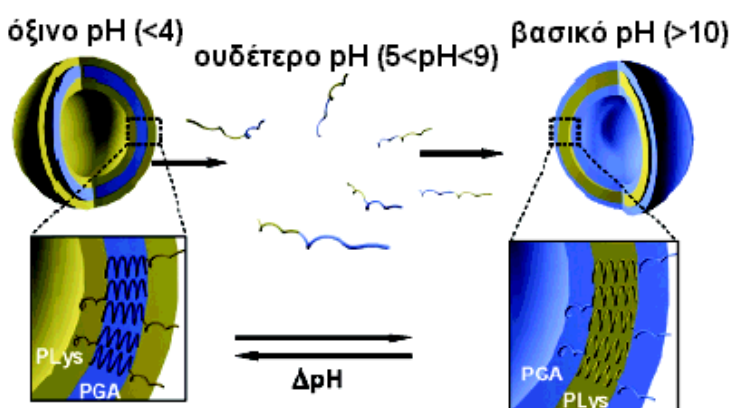


Εικόνα 2.4. Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης τρισυσταδικών συμπολυπεπτιδίων PBLG-*b*-PEG-*b*-PBLG: α) για μικρό κλάσμα όγκου PBLG β) για μεγάλο κλάσμα όγκου PBLG. Στη δεύτερη περίπτωση υπάρχει ανάμιξη των φάσεων και περιορισμός της εμφάνισης β-φύλλων (εικ. από την αναφ. [43]).

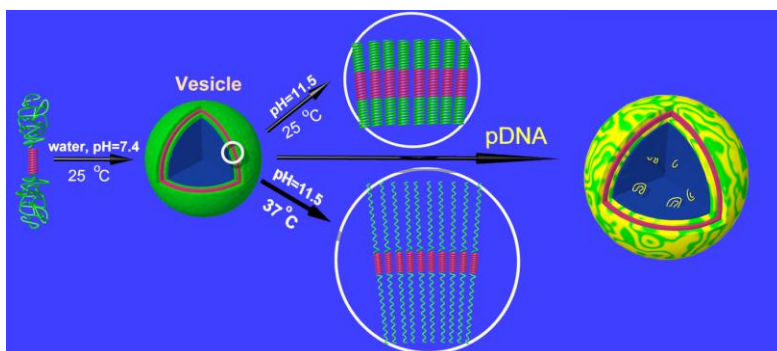
2.4 Εφαρμογές σε μεμβράνες

Όπως είδαμε στην εισαγωγή, μια εξαιρετικά σημαντική ενδοκυτταρική διαδικασία είναι η διέλευση πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες. Για τη μεταφορά κυστιδίων μέσα από μεμβράνες, έχουν προταθεί συστήματα δισυσταδικών συμπολυπεπτιδίων. Για παράδειγμα, χρησιμοποιούνται συστήματα με αντίθετα φορτισμένες συστάδες, που η οργάνωσή τους εξαρτάται από το pH. Η ομάδα του S. Lecommandoux έχει πετύχει την αυτοοργάνωση δισυσταδικών ολιγοπεπτιδίων πολυ(L-γλουταμικού οξέος)-*b*-πολυ(L-λυσίνης) (Εικόνα 2.5) [45]. Αυτό το πολυμερές έχει την ιδιότητα να είναι ευδιάλυτο σε υδατικά διαλύματα με ουδέτερο pH ($5 < \text{pH} < 9$), ενώ σε μεγαλύτερες ή μικρότερες τιμές pH η μία συστάδα αυτοοργανώνεται και οι αλυσίδες σχηματίζουν μικρά κυστίδια. Η ευδιαλυτότητα στο νερό είναι αξιοσημείωτη, καθώς είναι γνωστό ότι συστήματα πολυ(L-γλουταμικού οξέος) και πολυ-L-λυσίνης δεν είναι υδατοδιαλυτά [19]. Η ομάδα του T. J. Deming ανέφερε τη σύνθεση δισυσταδικών αμφίφιλων ολιγοπεπτιδίων πολυ(L-λυσίνης)-*b*-πολυ(L-λευκίνης) [46] και πολυ(L-αργινίνης)-*b*-πολυ(L-λευκίνης) [47], κάνοντας χρήση της δομής που σχηματίζεται λόγω της παρουσίας α-ελίκων μόνο στο υδρόφοβο τμήμα. Μια άλλη προσέγγιση χρησιμοποιεί τρισυσταδικά συμπολυμερή πολυ(υδροχλωρικής L-λυσίνης) και πολυ(γ-

βενζυλεστέρα-d7 του L-γλουταμικού οξέος) (PLL-*b*-PBLG-d7-*b*-PLL) [48] για το σχηματισμό κυστιδίων με σκοπό τη μεταφορά πλασμιδικού DNA (pDNA). Λόγω της μακρομοριακής αρχιτεκτονικής του συμπολυπεπτιδίου και της άκαμπτης φύσης της μεσαίας συστάδας (PBLG), ευνοείται η σύσταση ενός μονοστρώματος (monolayer), του οποίου το πάχος εξαρτάται από το pH (Εικόνα 2.6).



Εικόνα 2.5. Αυτοοργάνωση δισυσταδικού συμπολυπεπτιδίου $\text{PGA}_{15}\text{-b-PLys}_{15}$ σε κυστίδια. Ανάλογα με το pH, τα κυστίδια μπορούν να αντιστρέψουν την εσωτερική με την εξωτερική στοιβάδα (εικ. από την αναφ. [45]).



Εικόνα 2.6. Η λειτουργία συνθετικών κυστιδίων από πολυ(υδροχλωρική L-λυσίνη) και πολυ(γ-βενζυλεστέρα-d7 του L-γλουταμικού οξέος), μέσα στα οποία μπορεί να μεταφερθεί pDNA. Χάρη στην αρχιτεκτονική του συμπολυπεπτιδίου και στην ακαμψία της κεντρικής συστάδας, ευνοείται ο σχηματισμός μονοστρωμάτων. Η μεταβολή του pH μπορεί να αλλάξει το πάχος του τοιχώματος, ανάλογα με την επιθυμητή διαμόρφωση (εικ. από την αναφ. [48]).

Επειδή τα βιολογικά μόρια αλληλεπιδρούν με πολύ συγκεκριμένους τρόπους και σε πολύ μικρές κλίμακες μήκους, η σχεδίαση βιομιμητικών συστημάτων είναι αρκετά δύσκολη. Οι προσπάθειες για την επίτευξη των επιθυμητών ιδιοτήτων συμπεριλαμβάνουν την προσέγγιση “bottom-up” (M. Tirrell), με χρήση συμπολυπεπτιδίων που στοχεύουν στην αυτοοργάνωση σε μεγάλη κλίμακα, μέσω των αλληλεπιδράσεων των συστάδων [49-51]. Μελέτες πεπτιδίων αργινίνης-γλυκίνης-ασπαρτικού οξέος (RGDs) συνδεδεμένων με λιπίδια [52] έδειξαν ότι σχηματίζουν αυτοοργανωμένες επιφάνειες, που είναι βιολογικά ενεργές. Επίσης μελετήθηκαν βιοεπιφάνειες με προσαρτημένα βιοσυμβατά πεπτίδια, με κυκλικό

διχροϊσμό και μικροσκοπία ατομικής δύναμης. Βρέθηκε ότι η αυτοοργάνωση μπορεί να οδηγήσει σε σταθερές δομές, που διευκολύνουν τη διέλευση μέσω κυτταρικών μεμβρανών [53].

2.5 Αντιμικροβιακά πεπίδια

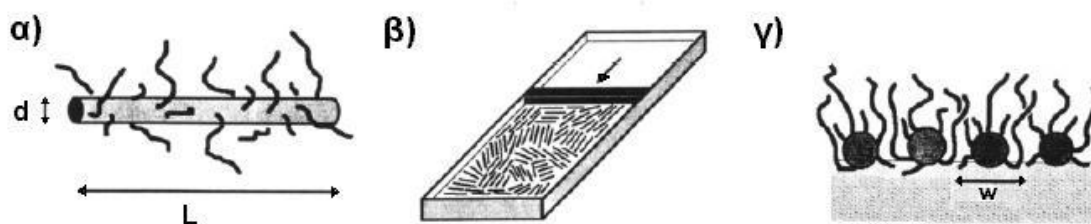
Ένα άλλο πεδίο που απαιτεί την αναζήτηση κατάλληλων βιομιμητικών πεπτιδίων είναι η αντιμικροβιακή δράση. Τα φυσικά αντισώματα έχουν διάφορες δομές και λειτουργίες, αλλά κατά βάση αποτελούνται από μόλις 10-30 αμινοξέα [54]. Το βασικό ερώτημα εδώ είναι η προέλευση της ποικιλίας των διαμορφώσεων και των αλληλουχιών που εμφανίζονται στα αντισώματα. Ορισμένα σχηματίζουν α-έλικες, ενώ άλλα σχηματίζουν β-φύλλα [55]. Το κίνητρο για τη μελέτη και την ανάπτυξη συνθετικών αντισωμάτων είναι ότι μπορεί να αποτελέσουν μια νέα γενιά εύχρηστων αντιβιοτικών. Φάρμακα που κυκλοφορούν στην αγορά, όπως το Mycorgex™ και το Coraxone®, περιέχουν συνθετικά συμπολυπεπίδια. Το Coraxone®, για παράδειγμα, είναι τυχαίο συμπολυμερές τυροσίνης, γλουταμικού οξέος, αλανίνης, και λυσίνης, μοριακού βάρους ~11-14 kDa [56]. Οι Deming *et al.* [57] συνέθεσαν στατιστικά συμπολυμερή λευκίνης, φαινυλαλανίνης, ισολευκίνης, βαλίνης, και αλανίνης. Αυτά τα αμινοξέα επελέγησαν ώστε να βρεθούν οι κατάλληλοι συνδυασμοί των δευτεροταγών δομών που σχηματίζει καθένα από τα παραπάνω πεπίδια. Το σημαντικότερο εύρημα αυτής της μελέτης ήταν ότι σε συμπολυπεπίδια που περιείχαν συστάδες που ευνοούν τα β-φύλλα, το τελικό προϊόν δεν είχε ιδιαίτερα αυξημένο ποσοστό β-φύλλων. Στην παρούσα εργασία, πέρα από την αλληλουχία, θα μελετηθεί διεξοδικά η σημασία της αρχιτεκτονικής στην τελική δευτεροταγή διαμόρφωση.

2.6 Συμπολυπεπίδια “άκαμπτων” μακρομορίων

Πρόσφατες μελέτες “άκαμπτων” μακρομορίων όπως ραβδόμορφα πολυμερή με πλευρικές ομάδες [58] και συνθετικών πολυπεπτιδίων με α-έλικες έδειξαν παρόμοια δυναμικά χαρακτηριστικά [59]. Για παράδειγμα, και στα δυο αυτά συστήματα βρέθηκε μια δυναμική διεργασία (α-μηχανισμός) που παγώνει στη θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης (T_g) – όπως και σε άμορφα πολυμερή ή γενικά συστήματα που σχηματίζουν ύαλο – και τουλάχιστον ένας μηχανισμός τύπου Arrhenius στην υαλώδη κατάσταση. Η προέλευση του α-μηχανισμού σε α-ελικοειδή πολυπεπίδια μελετήθηκε πρόσφατα [60,61] με Διηλεκτρική Φασματοσκοπία (ΔΦ) με μεταβλητή θερμοκρασία και πίεση. Και σε αυτήν την περίπτωση,

βρέθηκε ότι η ενδομοριακή δυναμική των άμορφων τμημάτων της κύριας αλυσίδας είναι υπεύθυνη για το “πάγωμα” της δυναμικής στο αντίστοιχο T_g .

Η επίδραση των πλευρικών ομάδων στην οργάνωση των πολυπεπτιδίων θα μας απασχολήσει στο Κεφάλαιο 5. Μία προηγούμενη μελέτη, ασχολήθηκε με τις διαμορφώσεις δύσκαμπτων πολυπεπτιδίων με εύκαμπτες πλευρικές ομάδες σε υμένια Langmuir-Blodgett, με χρήση ακτίνων-Χ και σκέδασης νετρονίων [62]. Αυτά τα συστήματα είναι χρήσιμα σε τέτοιες εφαρμογές, χάρη στη λυοτροπική και θερμοτροπική τους συμπεριφορά. Βρέθηκε ότι οι κύριες αλυσίδες σχηματίζουν μια υγροκρυσταλλική φάση ως ράβδοι, ενώ οι πλευρικές ομάδες εξασφαλίζουν τη σταθερότητα της δομής και την πλήρη κάλυψη του ενδιαμέσου χώρου (Εικόνα 2.7). Η παραδοχή που έγινε εδώ ήταν ότι οι ράβδοι είναι τέλειες και διατάσσονται εντελώς παράλληλα. Στο Κεφάλαιο 5 θα εξετάσουμε πώς ακριβώς το μήκος των πλευρικών ομάδων επηρεάζει τη δευτεροταγή δομή, και συνεπώς την οργάνωση των κύριων αλυσίδων.



Εικόνα 2.7. Διάχυση και οργάνωση άκαμπτων πολυπεπτιδίων PMLG και PSLG με αλειφατικές πλευρικές ομάδες, πάνω σε υμένια Langmuir-Blodgett. α) Η γεωμετρία των μορίων. Η κύρια αλυσίδα θεωρείται ως άκαμπτη ράβδος. β) Τα πολυμερή συμπιέζονται πάνω στο υμένιο και σχηματίζουν μια υγροκρυσταλλική φάση. γ) Οι ράβδοι διατάσσονται εντελώς παράλληλα μεταξύ τους, ενώ οι αλειφατικές πλευρικές ομάδες στέκονται μακριά από την επιφάνεια. (εικ. από την ανάφ. [62]).

2.7 Γραμμικά βιομιμητικά συμπολυμερή

Όπως είδαμε στο Κεφάλαιο 1, η φύση χρησιμοποιεί απλές και κομψές μοριακές μηχανές για να συνθέσει μαλακούς και σκληρούς ιστούς με μοναδικές ιδιότητες και λειτουργίες. Μεγάλη σημασία στη μοριακή μηχανική έχει ο συνδυασμός δομικών μονάδων με ελεγχόμενη αυτοοργάνωση από τη νανοσκοπική μέχρι τη μακροσκοπική κλίμακα. Σε αυτή τη διαδικασία, οι πρωτεΐνες και τα πολυπεπίδια χρησιμοποιούνται ως οι κύριες δομικές ομάδες, που συνδυάζουν την ικανότητα αφενός να αυτοοργανώνονται με μοριακούς τρόπους ελέγχου και αφετέρου να μεταφέρουν γενετικές πληροφορίες [36].

Τα πολυπεπίδια σχηματίζουν ιεραρχικά οργανωμένες δομές, κυρίως από α-έλικες και β-φύλλα. Πιστεύεται ότι η κατανόηση της δυναμικής του σχηματισμού ελίκων μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερη αντίληψη του προβλήματος της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Σε μια τέλεια α-έλικα, οι διπολικές ροπές των πεπτιδίων προσανατολίζονται παράλληλα προς τον

άξονα της έλικας δημιουργώντας ένα μακροδίπολο από το C-άκρο στο N-άκρο [63]. Ο σχεδιασμός “χμαιορικών” πρωτεϊνών [64] μπορεί να αυξήσει περαιτέρω την ελικότητα. Για παράδειγμα, αν τοποθετηθεί κυστεΐνη στο N-άκρο πολυπεπτιδίων αλανίνης αυξάνεται η συνολική ελικότητα και μάλιστα οι έλικες που προκύπτουν αντέχουν σε θερμοκρασίες πάνω από τη θερμοκρασία μετουσίωσης [65]. Από πλευράς σύνθεσης, το πιο γνωστό παράδειγμα συνθετικού α-ελικοειδούς πολυπεπτιδίου είναι ο πολυ(γ-βενζυλεστερας του L-γλουταμικού οξέος) (PBLG), το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο άκαμπτο ραβδόμορφο πολυμερές [66,67]. Πρόσφατες εξελίξεις, κυρίως μέσω της διηλεκτρικής φασματοσκοπίας, έδειξαν ότι η κύρια αλυσίδα του πολυπεπτιδίου περιέχει αρκετά άμορφα τμήματα (ατέλειες), τα οποία μειώνουν σημαντικά το μήκος εμμονής των ελίκων [43,60]. Αυτές οι ατέλειες ευθύνονται για το “πάγωμα” της δυναμικής κατά τη μετάβαση υάλου, ένα φαινόμενο ανεξάρτητο της πολυπεπτιδικής δευτεροταγούς δομής και της παρουσίας ή απουσίας πλευρικών ομάδων [59].

Ειδικότερα, τα πεπίδια που βασίζονται σε πολυαλανίνη έχουν προταθεί ως πρότυπα διαλυτά συστήματα για αυτοσυνδυαζόμενα συστήματα β-φύλλων [68]. Η πολυαλανίνη (PAla) παίζει επίσης σημαντικό ρόλο σε πρωτεΐνες του μεταξιού, δηλαδή πρωτεΐνες που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες ακολουθίες που περιέχουν μικρότερα τμήματα πολυαλανίνης. Ένα παράδειγμα τέτοιας πρωτεΐνης είναι ο ιστός της αράχνης, που είναι γνωστός για τις εξαιρετικές του μηχανικές ιδιότητες. Αυτό το ινίδιο αποτελείται από δύο διαφορετικές πρωτεΐνες, γνωστές ως *major ampullate spidroins 1* και *2* (MaSp1 και MaSp2), που απαρτίζονται από β-φύλλα πλούσια σε πολυαλανίνη, ενσωματωμένα σε περιοχές με περίσσεια γλυκίνης [69]. Τα παραπάνω παραδείγματα δείχνουν ότι η PAla μπορεί να πάρει μέρος και στις δύο δευτεροταγείς δομές.

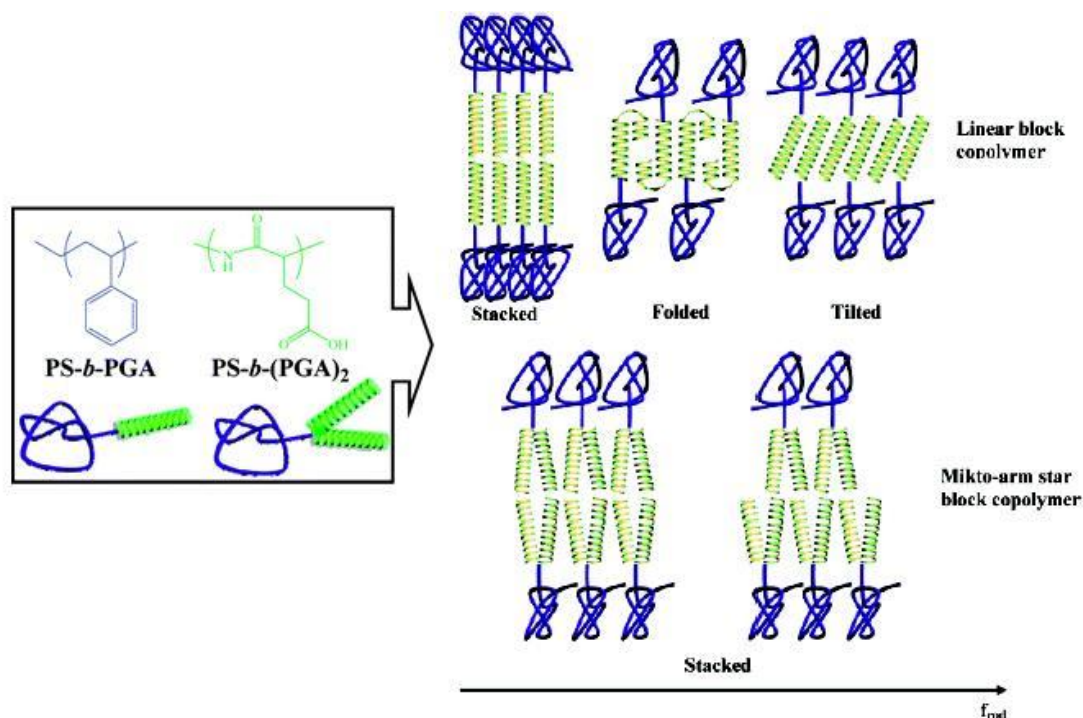
Προηγούμενες μελέτες με ακτίνες-X ινών PAla που είχαν υποστεί εφέλκυσμό [70,71] έδειξαν μια πολύ καλά προσανατολισμένη και κρυσταλλική α-ελικοειδή δομή, και ένα μικρότερο ποσοστό επίσης καλά προσανατολισμένων και κρυσταλλικής β-φυλλοειδούς δομής. Οι ανακλάσεις από την α-ελικοειδή δομή αντιστοιχήθηκαν σε μοναδιαία κυψελίδα με παραμέτρους $a=b=0.855$, $c=7.0$ nm, και $\gamma=120^\circ$. Η μοναδιαία κυψελίδα περιείχε 47 μονομερή αλανίνης και η περιοδικότητα κατά τον άξονα c αντιστοιχούσε σε 13 στροφές, δηλαδή επρόκειτο για μια έλικα 47/13 (βήμα 0.54 nm, αξονική μετατόπιση 0.149 nm/μονομερές). Μελετήθηκαν τόσο αριστερόστροφες όσο και δεξιόστροφες έλικες. Μεταγενέστερα λεπτομερή πειράματα [72], πρότειναν μια μοναδιαία κυψελίδα αποτελούμενη από “πάνω” και “κάτω” έλικες, με σχετική μετατόπιση ως προς τους άξονές τους. Από την άλλη πλευρά, οι ανακλάσεις από την κρυσταλλική β-δομή μπορούσαν να ερμηνευτούν με μια ορθογωνική κυψελίδα με $a=0.48$ nm, $b=1.07$ nm, και $c=0.69$ nm. Στην παρούσα εργασία θα μελετήσουμε

πρότυπα συμπολυμερή που περιέχουν PAla, με σκοπό την επιλεκτική εμφάνιση της μιας ή της άλλης δευτεροταγούς δομής (α-ελίκων ή β-φύλλων).

2.8 Αστεροειδή συμπολυπεπίδια

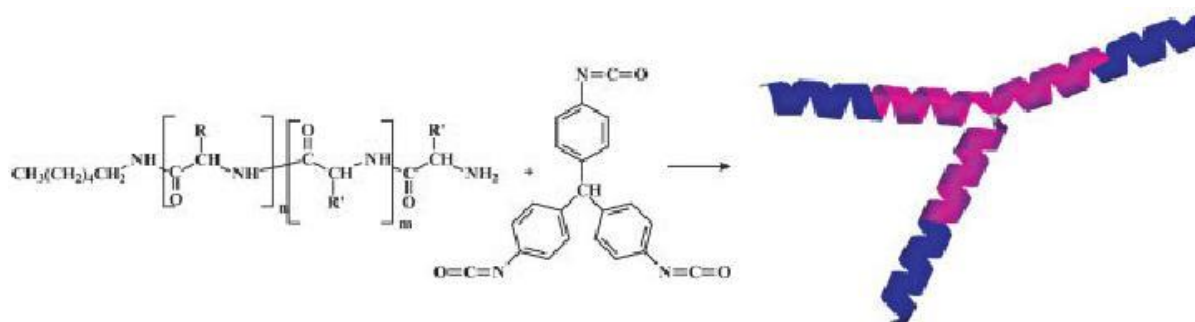
Τα πολυπεπίδια αποτελούν σημαντικό τμήμα των μορίων που σχεδιάζονται για στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων, και έτσι βρίσκονται σε εξέλιξη εκτεταμένες έρευνες στο αντικείμενο [2,36,37,71]. Η φύση χρησιμοποιεί τόσο γραμμικές όσο και διακλαδωμένες αρχιτεκτονικές πολυπεπτιδίων για το σχηματισμό τέτοιων δομών. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η εξωκυτταρική πρωτεΐνη Tenascin-C, που είναι αστέρι έξι κλάδων και έχει διάφορες θέσεις δέσμησης για άλλες εξωκυτταρικές πρωτεΐνες, καθώς και για υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης [73].

Μια ενδιαφέρουσα περίπτωση μη γραμμικών συμπολυμερών (αστεροειδών) μεικτού κλάδου (AB₂) βασίστηκε σε πολυστυρένιο (PS) και πολυ(γλουταμικό οξύ) (PGA) [74]. Με ριζικό πολυμερισμό μεταφοράς ατόμου (ATRP) συντέθηκαν οι κλάδοι PS-*b*-PGA, και το αντίστοιχο αστέρι PS-*b*-(PGA)₂. Η μελέτη με FTIR, σκέδαση ακτίνων-X σε μικρές και ευρείες γωνίες, και η μικροσκοπία ατομικής δύναμης έδειξε ότι η συστάδα του PGA σχημάτιζε α-έλικες, ακόμα και για *n* μόλις 18. Η πολύ μεγάλη ασυμβατότητα μεταξύ των συστάδων PS και PGA είχε ως αποτέλεσμα (i) το νανοφασικό διαχωρισμό τους, και (ii) την οργάνωσή τους σε εξαγωνική δομή μέσα στις νανοφάσεις, ανεξαρτήτως της αρχιτεκτονικής. Η αρχιτεκτονική διαφοροποιεί μόνο τη στοίχιση των ελίκων του PGA, οι οποίες “πακετάρονταν” καλύτερα στα δυσσταδικά συμπολυμερή (Εικόνα 2.8). Ένα παρόμοιο σύστημα θα μελετηθεί στο Κεφάλαιο 7 αυτής της εργασίας, όπου και πάλι παρατηρείται νανοφασικός διαχωρισμός, αλλά στην περίπτωση των αστεριών υπάρχει μερική ανάμιξη των φάσεων.



Εικόνα 2.8. (Αριστερά) Τα δομικά συστατικά γραμμικών συμπολυμερών και αστεριών μικτού κλάδου. (Δεξιά) Σχηματική αναπαράσταση της συναρμογής της συστάδας PGA ως συνάρτηση της περιεκτικότητας σε PGA σε συμπολυμερή PS-*b*-PGA και PS-*b*-(PGA)₂ (εικ. από την αναφ. [74]).

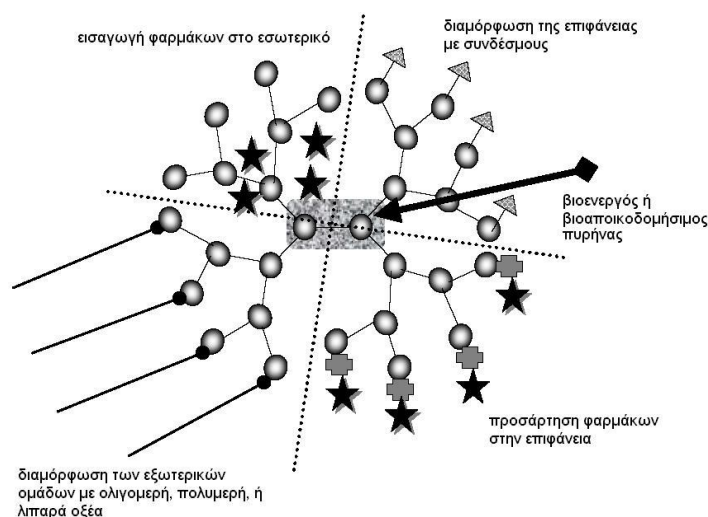
Ένα γενικότερο πρόβλημα με αρκετές προηγούμενες μελέτες πολυπεπτιδίων και συμπολυπεπτιδίων είναι η θεώρηση ότι οι έλικες είναι τέλειες, δηλαδή το μήκος εμμονής τους είναι το μέγιστο δυνατό. Όπως θα δούμε πιο κάτω, αυτή η θεώρηση είναι λανθασμένη. Σε μια προσπάθεια σύνθεσης για τη σταδιακή μελέτη της αρχιτεκτονικής [35], ένα δυσσταδικό συμπολυπεπίδιο αποτέλεσε τους κλάδους ενός τριάκτινου αστεριού. Με αυτόν τον τρόπο, οι καλές δομικές ιδιότητες των δυσσταδικών συμπολυπεπτιδίων εφαρμόζονται σε μια πιο περίπλοκη τοπολογία. Ας σημειωθεί ότι όλες οι συστάδες αυτού του συστήματος αποτελούνται αποκλειστικά από βιοσυμβατά πεπτίδια. Στο Κεφάλαιο 7 θα μελετήσουμε διεξοδικά τη δομή και τη δυναμική αυτού του συστήματος, από το ομοπολυμερές μέχρι το αστέρι.



Εικόνα 2.9. Η σύνθεση του αστεροειδούς συμπολυπεπτιδίου (PBLG-*b*-PZLL)₃. Στο Κεφάλαιο 7, πιο κάτω, θα μελετηθεί αναλυτικά μια εκδοχή αυτού του μορίου, καθώς και η συμπεριφορά των κλάδων του ξεχωριστά (εικ. από την ανάφ. [35]).

2.9 Δενδριμερή

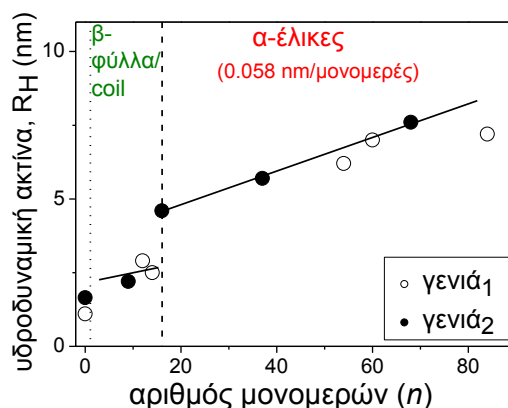
Η πρόοδος στη χημεία των πολυμερών παρέχει τις προϋποθέσεις για τη σχεδίαση πρωτότυπων συστημάτων στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων σε νανομετρική κλίμακα [2,72,75-78]. Η χημεία δενδριμερών θεωρείται πρωτοποριακό εργαλείο για τέτοιες εφαρμογές διότι προσφέρει ιδανικές διαστάσεις, μονοδιασπορά, καλή διαλυτότητα, βιοσυμβατότητα, και μεγάλη λειτουργικότητα με την προσαρμογή μονάδων στα δενδριμερή [79-83]. Στην Εικόνα 2.10 φαίνονται μερικοί τρόποι με τους οποίους μπορούν να ενσωματωθούν οι φαρμακευτικές ουσίες στα δενδριμερή. Πρόσφατα, αναφέρθηκε η σύνθεση και η διαμόρφωση δενδριτικών πολυμερών βασισμένων σε κύρια αλυσίδα πολυ-L-λυσίνης [84] καθώς και η σύνθεση δενδριτικού πολυστυρενίου με L-λυσίνη [40]. Ιδιαίτερη αναφορά μπορεί να γίνει στα multiple antigen peptides (MAP) [76,77], στα οποία χρησιμοποιούνται δενδριμερή με διακλαδισμένη αρχιτεκτονική ως βάσεις για την προσάρτηση μονόκλωνων και πολύκλωνων αντισωμάτων. Άλλες φαρμακευτικές ουσίες σε χρήση που βασίζονται σε δενδριμερή είναι το Vivagel™, το Starburst™ (περιέχει πολυαμιδοαμίνη), το Astramol® (περιέχει πολυπροπυλενοαμίνη), το ONCASPAR® ενάντια στη λευχαιμία, το Pegasys® που περιέχει PEG ενάντια στην ηπατίτιδα Γ, αντικαρκινικά σκευάσματα όπως τα PolyFect®, SuperFect®, Xyotax™ (περιέχει γλουταμικό οξύ), Doxil®, Glivec®, και άλλα που βρίσκονται σε διάφορα στάδια κλινικών δοκιμών [2,75,83].



Εικόνα 2.11. Διάφορες προσεγγίσεις στο σχεδιασμό και στη χρήση δενδριμερών που προορίζονται για φαρμακευτική δράση. Μπορεί να τροποποιηθεί και να χρησιμοποιηθεί είτε το εσωτερικό του μορίου είτε η εξωτερική του επιφάνεια (εικ. από την αναφ. [75]).

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πυρήνων εξαρτώνται σημαντικά από την οργάνωση των προσαρμοσμένων πολυπεπτιδίων. Πρόσφατα, μελετήθηκε η εξάρτηση της υδροδυναμικής ακτίνας από το n , ενός συστήματος πολυφαινυλενίων με προσαρμοσμένα πεπίδια πολυ-L-

λυσίνη σε διάλυμα [85]. Βρέθηκε ότι, οι διαπυρηνικές αποστάσεις αυξάνονται απότομα πάνω από κάποιο ορισμένο n , λόγω της οργάνωσης των πολυπεπτιδίων σε έλικες (Εικόνα 2.12). Στην παρούσα εργασία (Κεφάλαιο 8) θα μελετήσουμε επιπλέον πώς οι διάφορες περιπτώσεις αυτοοργάνωσης του συγκεκριμένου συστήματος επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή των προσαρτημένων πολυπεπτιδίων.



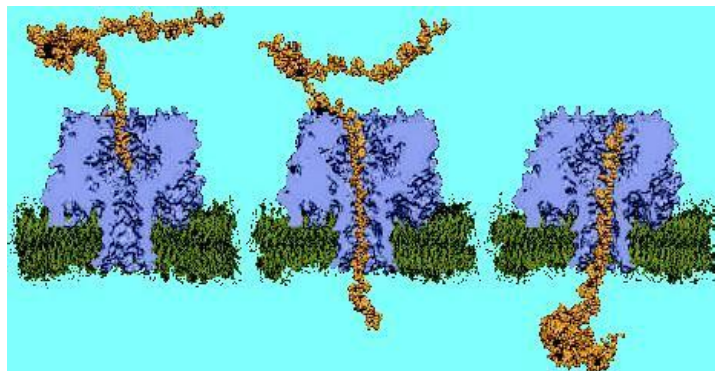
Εικόνα 2.12. Η εξάρτηση της υδροδυναμικής ακτίνας από το βαθμό πολυμερισμού της πολυ-L-λυσίνης προσαρτημένης σε δενδριμερή πολυφαινυλενίου. Οι ανοιχτοί και οι κλειστοί κύκλοι αντιστοιχούν στην πρώτη και στη δεύτερη γενιά πυρήνα, αντίστοιχα. Για $n \sim 16$ παρατηρείται απότομη αύξηση του R_H , που δείχνει την αύξηση των διαπυρηνικών αποστάσεων λόγω της οργάνωσης των α -ελίκων των πολυπεπτιδίων (εικ. από την αναφ. [85]).

2.10 Πολυπεπτιδία σε περιορισμένη γεωμετρία

Όπως είδαμε στο Κεφάλαιο 1.1, το κύτταρο περιέχει διάφορους νανοπόρους που ελέγχουν τη διέλευση των μορίων. Συγκεκριμένα, η διέλευση βιοπολυμερών μέσα από πόρους διαμέτρου μερικών νανομέτρων, (πρωτεϊνική μετατόπιση, παρ. 1.1.1), είναι μια σημαντική βιολογική διεργασία [86]. Υπάρχουν πολλά παραδείγματα μετατόπισης βιοπολυμερών, όπως η μεταφορά του DNA και του RNA διαμέσου της διστρωματικής μεμβράνης λιπιδίων σε πόρους α -αιμολυσίνης (Εικόνα 2.11) [87-90]. Αυτές οι μελέτες [87,88] έχουν δείξει ότι ένας νανοπόρος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση του μήκους του DNA και του RNA, καταγράφοντας την αλληλουχία αμινοξέων των αλυσίδων που διέρχονται μέσα απ' αυτόν. Πρόσφατα [91], άρχισαν να μελετώνται νανοπόροι στερεάς κατάστασης, διότι προσφέρουν μια σειρά πλεονεκτημάτων έναντι των αντίστοιχων βιολογικών, συμπεριλαμβανομένης της σταθερότητας, της δυνατότητας ελέγχου της διαμέτρου, του βάθους, και των ιδιοτήτων της επιφάνειάς τους. Μάλιστα, έχουν προταθεί υβριδικές μεμβράνες που περιέχουν νανοπόρους με προσαρτημένα βιομόρια στα τοιχώματά τους, όπως συνένζυμα [92] ή αντισώματα [93,94] με στόχο την ανίχνευση αντιγόνων [94],

καθώς και νανοπόροι εφοδιασμένοι με DNA [95], οι οποίοι προσφέρουν επιλεκτική διέλευση μορίων.

Τα συνθετικά πολυπεπίδια, από την άλλη πλευρά, προσφέρουν τη δυνατότητα μιας ρεαλιστικής μελέτης της σχέσης μεταξύ της δομής και της δυναμικής των φυσικών πρωτεϊνών. Αναμένεται ότι η παρουσία άκαμπτων επιφανειών σε μήτρες νανοπόρων θα επηρεάσει τις δομικές και δυναμικές τους ιδιότητες. Με αυτό το πρόβλημα θα ασχοληθούμε στο Κεφάλαιο 9.



Εικόνα 2.11. Διαμήκης τομή βιολογικού νανοπόρου α -αιμολυσίνης, κατά τη διέλευση μιας αλυσίδας μονόκλωνου DNA (ssDNA). Η αλυσίδα ξεδιπλώνεται καθώς αρχίζει να περνάει μέσα από τον πόρο και ανακτά την αναδίπλωσή της όταν ολοκληρώσει τη διέλευση (εικ. μοριακής προσομοίωσης από την αναφ. [75]).

2.11 Συμπεράσματα βιβλιογραφίας

Οι πρόσφατες εξελίξεις στη σύνθεση πολυπεπτιδίων επιτρέπουν την ανάπτυξη συστημάτων με δράση σχεδόν παρεμφερή με τα αντίστοιχα φυσικά συστήματα. Η ερευνητική δραστηριότητα κινείται στην κατεύθυνση της αναζήτησης των κανόνων που διέπουν την αυτοοργάνωση και τη λειτουργία πολύπλοκων συστημάτων. Επομένως η σύνθεση και η μελέτη καλά καθορισμένων δομών μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στον προσδιορισμό της σχέσης – κατά σειρά – μεταξύ σύστασης, δομής, και λειτουργίας.

Όμως, οι ακριβείς σχέσεις πρωτοταγούς δομής-αυτοοργάνωσης και πολύ περισσότερο δομής-λειτουργίας, σε βιοσυμβατά πολυμερή δεν είναι ακόμα γνωστές. Έτσι, ενώ έχουν μελετηθεί ορισμένα συστήματα γραμμικών συμπολυμερών με πεπίδια [31,39-44], μόνο ένα από αυτά αποτελείται εξ ολοκλήρου από βιοσυμβατές συστάδες [31]. Επίσης, δεν είναι γνωστή η επίδραση της αρχιτεκτονικής, αφού μόνο σε μία περίπτωση [74] μελετήθηκε η αυτοοργάνωση σε αστεροειδή συμπολυμερή. Αλλά και στην τελευταία περίπτωση, μόνο ένα τμήμα αποτελούνταν από πολυπεπίδιο (PGA). Τέλος, η αυτοοργάνωση και η δυναμική πολυπεπτιδίων σε περιορισμένη γεωμετρία και κοντά σε επιφάνειες, με σημασία στη διέλευση πρωτεϊνών από πόρους (μετατόπιση πρωτεϊνών), δεν έχει μελετηθεί καθόλου.

Ειδικότερα, για τη σχέση πρωτοταγούς δομής-αυτοοργάνωσης, τις περισσότερες φορές γίνονται παραδοχές που αφορούν είτε τη φύση της α-έλικας, είτε τη φύση της δυναμικής. Συγκεκριμένα, α) η α-έλικα στη βιβλιογραφία θεωρείται “ιδανική”, δηλαδή χωρίς “σπασίματα” [35,40,42,62,74]. Αυτό έχει σημαντική επίδραση στα συμπεράσματα που εξάγονται (οδηγεί σε διαφορετικό “πακετάρισμα”) τόσο για τη δομή όσο και για τη δυναμική των συστημάτων. β) Επίσης, η προέλευση των μοριακών κινήσεων σε τέτοια συστήματα δεν είναι απολύτως κατανοητή. Ειδικά σε συμπολυπεπίδια με τελείως διαφορετικά δομικά συστατικά, παραμένει αδιευκρίνιστο το ποσοστό συμμετοχής κάθε συστάδας στο “πάγωμα” της δυναμικής κατά την υαλώδη μετάβαση.

2.12 Σκοπός αυτής της διατριβής

Σκοπός αυτής της διατριβής είναι η συστηματική μελέτη της επίδρασης της αρχιτεκτονικής και της τοπολογίας καθώς και του περιορισμού και των επιφανειών στην αυτοοργάνωση και στη δυναμική πολυπεπτιδίων. Η μελέτη αποτελείται από δύο μέρη:

(I) Στο πρώτο, μελετήθηκε η επίδραση της αρχιτεκτονικής στις δύο δευτεροταγείς δομές πολυπεπτιδίων καθώς και στη δυναμική τους. Μας απασχόλησε ιδιαίτερα η επίδραση στη σταθερότητα και στο μήκος εμμονής των δευτεροταγών δομών. Γι' αυτόν το σκοπό μελετήθηκαν:

(α) Πολυπεπτίδια βασισμένα σε πολυ(γ -*n*-αλκυλεστέρες του L-γλουταμικού οξέος) με στατιστική εναλλαγή επαναλαμβανόμενων μονάδων που παρουσιάζουν και τις δύο βασικές δευτεροταγείς δομές. Τα πολυπεπτίδια αυτά συνδυάζουν τη δομή ράβδου με πλευρικές ομάδες.

(β) Δισυσταδικά συμπολυπεπτίδια πολυ(γ -βενζυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος)-*b*-πολυαλανίνης, όπου το PBLG σχηματίζει μόνο α -έλικες ενώ η PAla εμφανίζει και τις δύο δευτεροταγείς δομές.

(γ) Αστεροειδή συμπολυπεπτίδια, που επιτρέπουν τη μελέτη της επίδρασης της τοπολογίας στο νανοφασικό διαχωρισμό και στη δευτεροταγή οργάνωση.

(δ) Δενδριμερή πολυφαινυλενίων με προσαρτημένα πεπτίδια, με εφαρμογές στη φαρμακολογία. Η μελέτη έγινε σε μια σειρά PPD (functionalized polyphenylene dendrimers) με προσαρτημένα πεπτίδια πολυ-L-λυσίνης συναρτήσεως του μεγέθους του πυρήνα πολυφαινυλενίων, του πλήθους των υποκατεστημένων θέσεων και του βαθμού πολυμερισμού των πεπτιδίων.

(II) Στο δεύτερο μέρος, μελετήθηκε η επίδραση του περιορισμού και των επιφανειών στην αυτοοργάνωση και στη δυναμική πολυπεπτιδίων. Είναι γνωστό ότι αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν τη σταθερότητα και τη λειτουργία των πρωτεϊνών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μια σειρά νανοράβδων PBLG, των οποίων η σύνθεση πραγματοποιήθηκε στο εσωτερικό πορώδους αλουμίνας, με ελεγχόμενες διαστάσεις νανοπόρων από 25 μέχρι 400 nm. Τέτοια πρότυπα συστήματα καθιστούν δυνατή, για πρώτη φορά, την εξέταση πολλών ανοικτών ερωτημάτων: Διατηρείται η ελικοειδής μορφολογία μέσα στους νανοπόρους; Αν διατηρείται, μπορούν οι έλικες να οργανωθούν σε υπερδομές; Ποια είναι η επίδραση του περιορισμού και της επιφάνειας στην τμηματική και στη συνολική δυναμική των πολυπεπτιδίων; Η απάντηση αυτών των ερωτημάτων έχει σημασία για την κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο οι πρωτεΐνες διέρχονται μέσα από νανοπόρους και μεμβράνες στο κύτταρο.

2.13 Αναφορές

- (1) Branden, C.; Tooze, J. *“Introduction to protein structure”*, Garland, New York, 1991.
- (2) Duncan, R. *Nat. Rev. Drug. Disc.* **2003**, 2, 347.
- (3) Fields, G. B.; Tian, Z.; Barany, G. *“Principles and practice of solid-phase peptide synthesis, in Synthetic Peptides: A User's Guide”*, Grant, G. A. (ed.) Freeman, New York, 1992.
- (4) Ottinger, E. A.; Shekels, L. L.; Bernlohr, D. A.; Barany, G. *Biochemistry* **1993**, 32, 4354.
- (5) Gruenewald, B.; Nicola, C. U.; Lusting, A.; Schwarz, G.; Klump, J. *Biophys. Chem.* **1979**, 9, 137.
- (6) Finkelstein, A. V. *Proteins* **1991**, 9, 23.
- (7) Rose, G. D.; Gierasch, L. M.; Smith, J. A. *Adv. Prot. Chem.* **1985**, 19, 1909.
- (8) Burke, C.; Mayo, K. H.; Skubitz, A.; Furcht, L. T. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 19407.
- (9) Dyson, H. J.; Rance, M.; Houghten, R. A.; Lerner, R. A.; Wright, P. E. *J. Mol. Biol.* **1988**, 201, 161.
- (10) Lyu, P. C.; Liff, M. I.; Marky, L. A.; Kallenbach, N. R. *Science* **1990**, 250, 669.
- (11) O'Neill, K. T.; DeGrado, W. F. *Science* **1990**, 250, 646.
- (12) Blaber, M.; Zhang, X.; Matthews, B. W. *Science* **1993**, 260, 1637.
- (13) Chakrabartty, A.; Kortemme, T.; Baldwin, R. L. *Protein Sci.* **1994**, 3, 843.
- (14) Marqusee, S.; Robbins, V. H.; Baldwin, R. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 5286.
- (15) Krstenansky, J. L.; Owen, T. J.; Hagaman, K. A.; McLean, L. R. *FEBS Lett.* **1989**, 242, 409.
- (16) Wu, L.; Laub, P.; Elove, G.; Carey, J.; Roder, H. *Biochemistry* **1993**, 32, 10271.
- (17) Hecht, M. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 8729.
- (18) Pratesi, G.; Savi, G.; Pezzoni, G.; Bellini, O.; Penco, S.; Tinelli, S.; Zunino, F. *Br. J. Cancer* **1985**, 52, 841.
- (19) Sela, M.; Katchalski, E. *Adv. Prot. Chem.* **1959**, 14, 391.
- (20) Kricheldorf, H. R. *“ α -Aminoacid-N-Carboxyanhydrides and Related Materials”*, Springer, New York, 1987.
- (21) Deming, T. J. *Nature* **1997**, 390, 386.
- (22) a) Deming, T. J. *Macromolecules* **1999**, 32, 4500, b) Dimitrov, I.; Schlaad, H. *Chem. Commun.* **2003**, 23, 2944, c) Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N.; *Biomacromolecules* **2004**, 5, 1653.
- (23) Deming, T. J. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **2000**, 38, 3011.
- (24) Yu, S. M.; Tirrell, D. A.; *Biomacromolecules* **2000**, 1, 310.

- (25) Yu, S. M.; Soto, C. M.; Tirrell, D. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6552.
- (26) Deming, T. J. *Soft Matter* **2005**, *1*, 28.
- (27) Aggeli, A.; Bell, M.; Boden, N.; Keen, J. N.; Knowles, P. F.; McLeish T. C. B.; Pitkeathly, M.; Radford, S. E. *Nature* **1997**, *386*, 259.
- (28) Hadjichristidis, N.; Pitsikalis, M.; Pispas, S.; Iatrou, H. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3747.
- (29) Hanski, S.; Houbenov, N.; Ruokolainen, J.; Chondronicola, D.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N.; Ikkala, O. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3379.
- (30) Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. Messman, J.; Mays, J. *Macromol. Symp.* **2006**, *240*, 12.
- (31) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2352.
- (32) Schlaad, H.; Antonietti, M. *Eur. Phys. J. E* **2003**, *10*, 17.
- (33) Schlaad, H.; Smarsly, B.; Losik, M. *Macromolecules* **2004**, *37*, 2210.
- (34) Caillol, S.; Lecommandoux, S.; Mingotaud, A.-F.; Schappacher, M.; Soum, A.; Bryson, N.; Meyrueix, R. *Macromolecules* **2003**, *36*, 1118.
- (35) Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *J. Polym. Sci. A* **2005**, *43*, 4670.
- (36) Kricheldorf, H. R. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5752.
- (37) Klok, H.-A.; Lecommandoux, S. *Adv. Polym. Sci.* **2006**, *202*, 75.
- (38) Scholl, M.; Nguyen, T. Q.; Bruchmann, B.; Klok, H.-A. *Macromolecules* **2007**, *40*, 5726.
- (39) Lübbert, A.; Nguyen, T. Q.; Sun, F.; Sheiko, S. S.; Klok, H.-A. *Macromolecules* **2005**, *38*, 2064.
- (40) Klok, H.-A.; Langenwalter, J. F, Lecommandoux, S. *Macromolecules* **2000**, *33*, 7819.
- (41) Lecommandoux, S.; Achard, M. F.; Langenwalter, J. F.; Klok, H.-A. *Macromolecules* **2001**, *34*, 9100.
- (42) Hammond, M. R.; Klok, H.-A.; Mezzenga, R. *Macrom. Rap. Comm.* **2008**, *29*, 299.
- (43) Floudas, G.; Papadopoulos, P.; Klok, H.-A.; Vandermeulen, G. W. M.; Rodriguez-Hernandez, J. *Macromolecules* **2003**, *36*, 3673.
- (44) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Lieberwirth, I.; Nguyen, T. Q.; Klok, H.-A. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 618.
- (45) Rodríguez-Hernández, J.; Lecommandoux, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2026.
- (46) Holowka, E. P.; Pochan, D. J.; Deming, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12423.
- (47) Holowka, E. P.; Sun, V. Z.; Kamei, D. T.; Deming, T. J. *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 52.
- (48) Iatrou, H.; Frielinghaus, H.; Hanski, S.; Ferderigos, N.; Ruokolainen, J.; Ikkala, O.; Richter, D.; Mays, J.; Hadjichristidis, N. *Biomacromolecules*, **2007**, *8*, 2173.

- (49) Yu, Y. C.; Pakalns, T.; Dori, Y.; McCarthy, J. B.; Tirrell, M.; Fields, G. B. *Meth. Enzym.* **1997**, *289*, 571.
- (50) Yu, Y. C.; Roontga, V.; Daragan, V. A.; Mayo, K. H.; Tirrell, M.; Fields, G. B.; *Biochemistry*, **1999**, *38*, 1659.
- (51) Tu, R. S.; Tirrell, M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 1537.
- (52) Pakalns, T.; Haverstick, K. L.; Fields, G. B.; McCarthy, J. B.; Mooradian, D. L.; Tirrell, M. *Biomaterials* **1999**, *20*, 2265.
- (53) Fields, G. B.; Lauer, J. L.; Dori, Y.; Forns, P.; Yu, Y. C.; Tirrell, M. *Biopolymers* **1998**, *47*, 143.
- (54) Martin, E.; Ganz, T.; Lehrer, R. I. *J. Leukoc. Biol.* **1995**, *58*, 128.
- (55) Hancock, R. E. W. *The Lancet* **1997**, *349*, 418.
- (56) Bornstein, M. B.; Miller, A. I.; Teitelbaum, D.; Aron, R.; Sela, M. *Ann. Neurol.* **1982**, *11*, 317.
- (57) Wyrsta, M. D.; Cogen, A. L.; Deming, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12919.
- (58) Wegner, G. *Macromol. Chem. Phys.* **2003**, *204*, 347.
- (59) Floudas, G. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, *29*, 1143.
- (60) Papadopoulos, P. Floudas, G.; Klok, H.-A.; Schnell, I.; Pakula, T. *Biomacromolecules*, **2004**, *5*, 81.
- (61) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Klok, H.-A.; Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 224906.
- (62) Schmidt, A.; Mathauer, K.; Reiter, G.; Foster, M. D.; Stamm, M.; Knoll, W. *Langmuir* **1994**, *10*, 3820.
- (63) Hol, W. G. J.; van Duijnen, P. T.; Berendsen, H. J. C. *Nature* **1978**, *273*, 443.
- (64) Feng, J. A.; Tessler, L. A.; Marshall, G. R. *Int. J. Peptide Res. Therapeutics* **2007**, *13*, 151.
- (65) Oommachen, S.; Ren, J.; McCallum, C. M. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 5702.
- (66) Walton, A. G.; Blackwell, J. in “*Biopolymers*”, Academic Press, New York, 1973.
- (67) Block, H. in “*Poly(γ -benzyl-L-glutamate) and other glutamic acid containing polymers*”, Gordon and Breach Science Publishers, New York, 1983.
- (68) Blondelle, S. E.; Forood, B.; Houghten, R. A.; Pérez-Payá, E. *Biochemistry* **1997**, *36*, 8393.
- (69) Asakura, T.; Yang, M.; Kawase, T.; Nakazawa, Y. *Macromolecules* **2005**, *38*, 3356.
- (70) Brown, L.; Trotter, I. F. *Trans. Faraday Soc.* **1956**, *52*, 537.
- (71) Arnott, S.; Wonacott, A. J. *J. Mol. Biol.* **1966**, *21*, 371.

- (72) Allen, T. M.; Cullis, P. R. *Science* **2004**, 303, 1818.
- (73) Järvinen, T. A. H.; Kannus, P.; Järvinen, T. L. N.; Jozsa, L.; Kalimo, H.; Järvinen, M. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **2000**, 10, 376.
- (74) Babin, J.; Taton, D.; Brinkmann, M.; Lecommandoux, S. *Macromolecules* **2008**, 41, 1384.
- (75) Duncan, R.; Izzo, L. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, 57, 2215.
- (76) Tam, J. P. *J. Immun. Meth.* **1996**, 196, 17.
- (77) Tam, J. P.; Lu, Y.-A.; Yang, J.-L. *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 923.
- (78) Duncan, R. “Polymer-drug conjugates” in: “Handbook of Anticancer Drug Development” Budman, D.; Calvert, H.; Rowinsky, E. (eds), Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2003.
- (79) Fréchet, J. M. J.; Hawker, C. J. in “Comprehensive Polymer Science”, Aggarwal, S. L.; Russo, S. S. (eds), Pergamon Press, Oxford, 1996.
- (80) Bosman, A. W.; Janssen, H. M.; Meijer, E. W. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 1665.
- (81) Vepřek, P.; Ježek, J. *J. Peptide Sci.* **1999**, 5, 203.
- (82) Stiriba, S.-E.; Frey, H.; Haag, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1329.
- (83) Gillies, E. R.; Fréchet, J. M. J. *Drug Disc. Today* **2005**, 10, 35.
- (84) Lee, C. C.; Fréchet, J. M. J. *Macromolecules* **2006**, 39, 476.
- (85) Koynov, K.; Mihov, G.; Mondeshki, M.; Moon, C.; Spiess, H. W.; Müllen, K.; Butt, H.-J.; Floudas, G. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 1745.
- (86) Dekker, C. *Nature Nanotechnology* **2007**, 2, 209.
- (87) Kasianowicz, J. J.; Brandin, E.; Branton, D.; Deamer, D.W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 13770.
- (88) Akeson, M.; Branton, D.; Kasianowicz, J. J.; Brandin, E.; Deamer, D. W. *Biophysical J.* **1999**, 77, 3227.
- (89) Storm, A. J.; Storm, C.; Chen, J.; Zandbergen, H.; Joanny, J.-F.; Dekker, C. *Nano Lett.* **2005**, 5, 1193.
- (90) Muthukumar, M.; Kong, C.Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 5273.
- (91) Li, J. L.; Stein, D.; McMullan, C.; Branton, D.; Aziz, M. J.; Golovchenko, J. A. *Nature* **2001**, 412, 166.
- (92) Cosgrove, T.; Prestidge, C. A.; Vincent, B. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1990**, 86, 1377.
- (93) Lee, S. B.; Mitchell, D. T.; Trofin, L.; Nevanen, T. K.; Soderlund, H.; Martin C. R. *Science* **2002**, 296, 2198.

(94) Dai, J. H.; Baker, G. L.; Bruening, M. L. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 135.

(95) Kohli, P.; Harrell, C. C.; Cao, Z. H.; Gasparac, R.; Tan, W. H.; Martin, C. R. *Science* **2004**, 305, 984.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Δυναμική πολυπεπτιδίων

3.1 Εισαγωγή

Στο Κεφάλαιο 1 παρουσιάστηκαν τα διάφορα επίπεδα οργάνωσης των πολυπεπτιδίων και των πρωτεϊνών. Η σύνδεση των αμινοξέων με ομοιοπολικό δεσμό εισάγει περιορισμούς στην κίνησή τους, και έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας σειράς μοριακών κινήσεων, οι οποίες προσομοιάζουν με τις κινήσεις σε συνθετικά (μη βιολογικά) πολυμερή. Στο παρόν Κεφάλαιο θα δούμε τις βασικές περιγραφές της δυναμικής συμπεριφοράς των πολυπεπτιδίων.

3.2.1 Η μετάβαση υάλου

Οι μηχανικές ιδιότητες των πολυμερών παρουσιάζουν πολύ έντονη εξάρτηση από τη θερμοκρασία. Σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες είναι σκληρά και συνήθως εύθραυστα, ενώ σε υψηλές τα περισσότερα είναι ρευστά, με ιξώδες που εξαρτάται από το μοριακό βάρος. Υπάρχει μία θερμοκρασία, η θερμοκρασία υάλου, T_g , κάτω από την οποία το μέτρο ελαστικότητας αυξάνεται απότομα κατά περίπου τρεις δεκάδες [1]. Αυτό συμβαίνει διότι κάτω από αυτή τη θερμοκρασία οι τμηματικές (segmental) κινήσεις των πολυμερικών αλυσίδων παγώνουν, και οι μόνες κινήσεις που πραγματοποιούνται είναι τοπικές ταλαντώσεις ή περιστροφές των πλευρικών ομάδων. Μια παρόμοια μετάβαση έχει αναφερθεί και στις πρωτεΐνες.

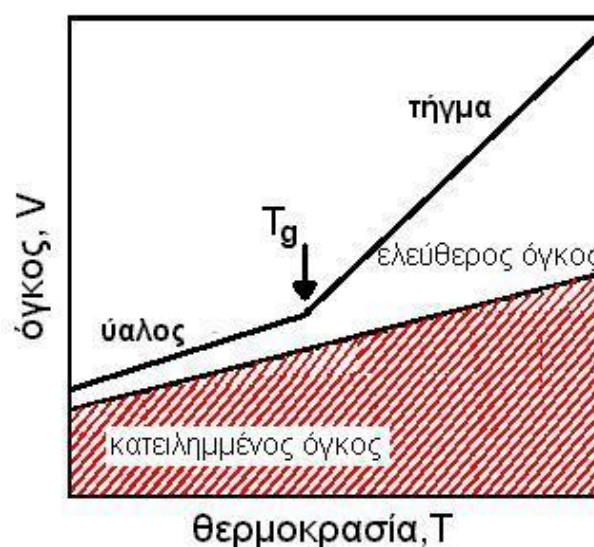
Στη βιβλιογραφία υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός εργασιών σχετικά με τη δυναμική πρωτεϊνών και πολυπεπτιδίων, με αντικρουόμενα, όμως, πολλές φορές αποτελέσματα. Αν και γενικά υπάρχει συμφωνία για την ύπαρξη μιας δυναμικής μετάβασης σε ενυδατωμένες πρωτεΐνες, που προκαλεί μείωση του πλάτους των πεπτιδικών κινήσεων με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η βιολογική δραστηριότητα, ο ρόλος της παρουσίας ή απουσίας νερού ή άλλων μικρών μορίων στη δυναμική μετάβαση αμφισβητείται. Η ασυμφωνία είναι ακόμα πιο μεγάλη σχετικά με την προέλευση αυτής της μετάβασης. Οι πρώτες μελέτες απέδωσαν τη μετάβαση υάλου στις πρωτεΐνες στη σύζευξη της δυναμικής τους με το διαλύτη. Πολλές εργασίες προτείνουν ότι πρόκειται απλώς για την υαλώδη “μετάβαση” των διαλυτών, στην οποία δεν συμμετέχει το μακρομόριο (hydration layer) [2,3], ενώ άλλες προτείνουν ότι η δυναμική του μακρομορίου ακολουθεί αυτή του διαλύτη [4,5]. Πιο πρόσφατες εργασίες αποδεικνύουν ενδείξεις ότι η ύπαρξη αυτής της μετάβασης είναι εγγενές χαρακτηριστικό των βιολογικών μακρομορίων, όπως των αντίστοιχων συνθετικών [6,7].

Γενικά, η υαλώδης μετάβαση δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως θερμοδυναμική μεταβολή καθαρά πρώτης ή δεύτερης τάξης, διότι η θερμοκρασία υάλου δεν είναι σαφώς καθορισμένη, αλλά παρουσιάζει έντονη εξάρτηση από τη χρονική κλίμακα του πειράματος και επιπλέον δεν υπάρχει ασυνέχεια στη μεταβολή του όγκου (Εικόνα 3.1). Για παράδειγμα, αν οι θερμοδυναμικές μετρήσεις γίνουν με πιο γρήγορο ρυθμό θέρμανσης, η αύξηση της θερμοχωρητικότητας θα παρατηρηθεί σε υψηλότερη θερμοκρασία, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με πιο αργό ρυθμό. Επιπλέον, ο χρόνος χαλάρωσης του συστήματος δεν παρουσιάζει ασυνέχεια στο T_g , απλώς σε $T < T_g$ γίνεται υπερβολικά αργός για να μετρηθεί σε ρεαλιστικά χρονικά πλαίσια. Επομένως η μετάβαση υάλου δεν είναι μια πραγματική θερμοδυναμική μετάβαση, αλλά ένα κινητικό φαινόμενο που εξαρτάται έντονα από τη χρονική κλίμακα παρατήρησης.

3.2.2 Θεωρίες για την υαλώδη μετάβαση

3.2.2.1 Η θεωρία του ελεύθερου όγκου

Η προέλευση της υαλώδους μετάβασης βρίσκεται ακόμα υπό μελέτη [8], και υπάρχουν τρεις κυρίαρχες θεωρίες που προσπαθούν να ερμηνεύσουν το φαινόμενο. Σύμφωνα με τη θεωρία του ελεύθερου όγκου [9-12], η επιβράδυνση των χρόνων χαλάρωσης οφείλεται στην έλλειψη ικανού διαθέσιμου όγκου που είναι απαραίτητος για τις κινήσεις. Ως ελεύθερος όγκος, V_f , ορίζεται η διαφορά μεταξύ του ειδικού όγκου V και του κατειλημμένου όγκου V_{oc} , που μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι ο όγκος του αντίστοιχου κρυστάλλου στην ίδια θερμοκρασία (Εικόνα 3.1).

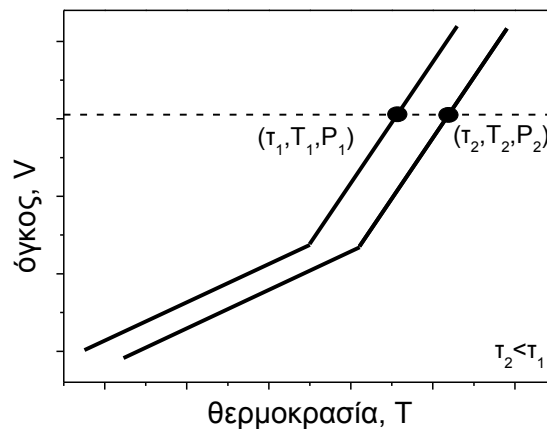


Εικόνα 3.1. Σχηματική αναπαράσταση του όγκου συναρτήσει της θερμοκρασίας κατά τη μετάβαση υάλου. Καθώς μειώνεται η θερμοκρασία και πλησιάζει το T_g , παρατηρείται ελάττωση του ελεύθερου όγκου (στο T_g είναι $V_f/V \sim 2.5\%$). Αξίζει να σημειωθεί ότι η αύξηση της πίεσης μπορεί επίσης να μειώσει τον ελεύθερο όγκο και να οδηγήσει σε αύξηση της θερμοκρασίας υαλώδους μετάβασης.

Σύμφωνα με το μοντέλο, οι χρόνοι χαλάρωσης, $\tau(T)$, είναι συνάρτηση μόνο του κλασματικού ελεύθερου όγκου $f = V_f/V_{oc}$ και προκύπτει από παραλλαγή της εξίσωσης Doolittle για το ιξώδες [13]:

$$\eta = \eta_0 \exp(b/f) \quad (3.1)$$

όπου η_0 και b είναι σταθερές. Τα πλεονεκτήματα του μοντέλου είναι ότι προβλέπει αρκετά καλά την πειραματικά παρατηρούμενη εξάρτηση των χρόνων από τη θερμοκρασία και μερικώς από την πίεση. Μια βασική αδυναμία της θεωρίας του ελεύθερου όγκου είναι η εξής: Πρόσφατα πειράματα χαλάρωσης [14,15] συναρτήσεως της πίεσης και της θερμοκρασίας, $\tau(T,P)$, έδειξαν ότι αν επιλεγούν δύο ζεύγη τιμών (T,P) τέτοια που να αντιστοιχούν σε ίσο όγκο V , οι χρόνοι χαλάρωσης που προκύπτουν δεν είναι ίσοι (Εικόνα 3.2), όπως θα προέβλεπε η θεωρία του ελεύθερου όγκου, αλλά μειώνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας [16,17]. Ακόμη βρέθηκε ότι υπάρχει μια ενέργεια ενεργοποίησης υπό συνθήκες σταθερού όγκου, $E_V^* = R(\partial \ln \tau / \partial (1/T))_V$, η οποία σύμφωνα με τη θεωρία του ελεύθερου όγκου θα έπρεπε να είναι ίση με μηδέν [15].

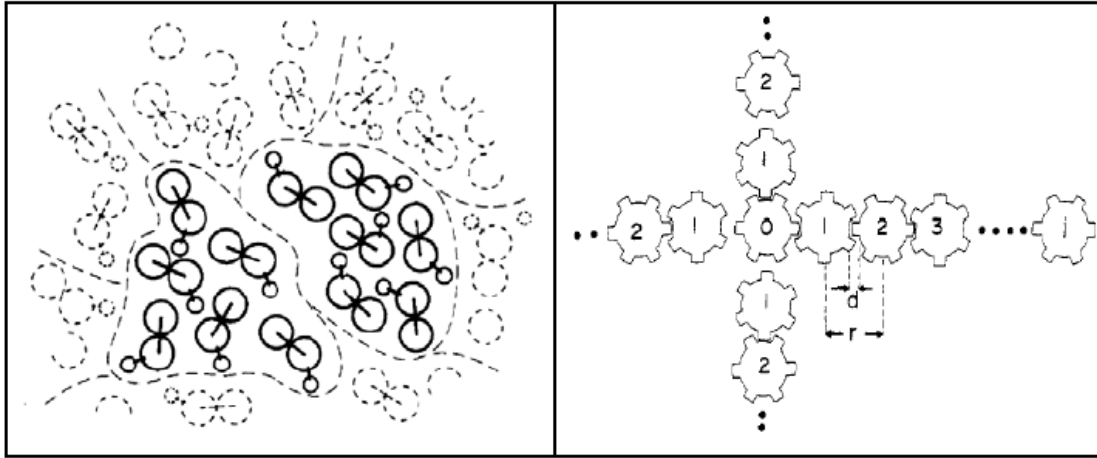


Εικόνα 3.2. Σχηματική αναπαράσταση της μεταβολής του όγκου ενός συστήματος για δύο διαφορετικά ζεύγη θερμοκρασίας, T , και πίεσης, P , που αντιστοιχούν σε ίδιο όγκο, V . Οι χρόνοι τ_1 και τ_2 είναι διαφορετικοί μεταξύ τους ($\tau_2 < \tau_1$), αντίθετα με ό,τι θα προέβλεπε η θεωρία του ελεύθερου όγκου, η οποία αντιστοιχίζει ένα και μοναδικό χρόνο χαλάρωσης σε συγκεκριμένο όγκο.

3.2.2.2 Η θεωρία Adam-Gibbs

Το μοντέλο συνεργατικότητας των Adam και Gibbs [18] περιγράφει το σημείο υάλου ως μια θερμοδυναμική μεταβολή. Βασική υπόθεση της θεωρίας αυτής είναι η ύπαρξη μιας κλίμακας μήκους που αυξάνει ισχυρά με τη θερμοκρασία, καθώς προσεγγίζουμε το T_g . Η μάζα του άμορφου υλικού χωρίζεται σε περιοχές που χαλαρώνουν ανεξάρτητα η μία από την

άλλη. Το μέγεθος των περιοχών εξαρτάται ισχυρά από τη θερμοκρασία, καθώς το ενεργειακό φράγμα είναι συνάρτηση του πλήθους των μορίων που περιέχουν (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3. (Αριστερά): Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου της συνεργατικότητας. Οι διακεκομμένες γραμμές εσωκλείουν τις συνεργατικές περιοχές επαναδιάταξης (CRR) που αντιστοιχούν στις μικρότερες περιοχές που απαιτούνται για τη χαλάρωση (εικ. από την αναφορά [19]). Με τη μείωση της θερμοκρασίας ο όγκος των CRR αυξάνεται μέχρι να γίνει ίσος με τον όγκο ολόκληρου του υλικού στη θερμοκρασία Vogel. (Δεξιά): Το μοντέλο της συνεργατικότητας μέσω της αναπαράστασης των οδοντωτών τροχών. Η κίνηση του τροχού 0, συμπαράσχει του γειτονικούς τροχούς, 1,2,3, κ.τ.λ.. Σε υψηλές θερμοκρασίες οι οδοντωτοί τροχοί δεν εφάπτονται και κινούνται ανεξάρτητα μεταξύ τους (“ασυγχρόνιστα”). Αντίθετα, σε χαμηλές θερμοκρασίες, οι τροχοί εφάπτονται και κινούνται “συγχρονισμένα” (εικ. από την αναφ. [20]).

Η θεωρία Adam-Gibbs είναι μια εντροπική θεωρία. Θεωρείται ότι στο σύστημα υπάρχουν δύο δυνατές διαμορφώσεις με διαφορά ενέργειας $\Delta\epsilon = \epsilon_2 - \epsilon_1$, όπου ϵ_2 και ϵ_1 είναι η υψηλή και η χαμηλή ενέργεια διαμορφώσεων, αντίστοιχα. Κατά την ψύξη υπό σταθερή πίεση το πλήθος των δυνατών διαμορφώσεων ελαττώνεται, μέχρι μια θερμοκρασία $T = T_2$ στην οποία η εντροπία των διαμορφώσεων, $S_C = \int_{T_K}^T (\Delta C_P / T) dT$ όπου $\Delta C_P = C_P^{\text{υγρού}} - C_P^{\text{υάλου}}$ και το C_P αντιστοιχεί στη θερμοχωρητικότητα υπό σταθερή πίεση, μηδενίζεται ($S_C = 0$). Καθώς το σύστημα τείνει να γίνει ύαλος στη θερμοκρασία T_2 , ο χρόνος χαλάρωσης αυξάνεται με το μέγεθος των περιοχών. Ο χρόνος χαλάρωσης συνδέεται με την εντροπία με την εξίσωση

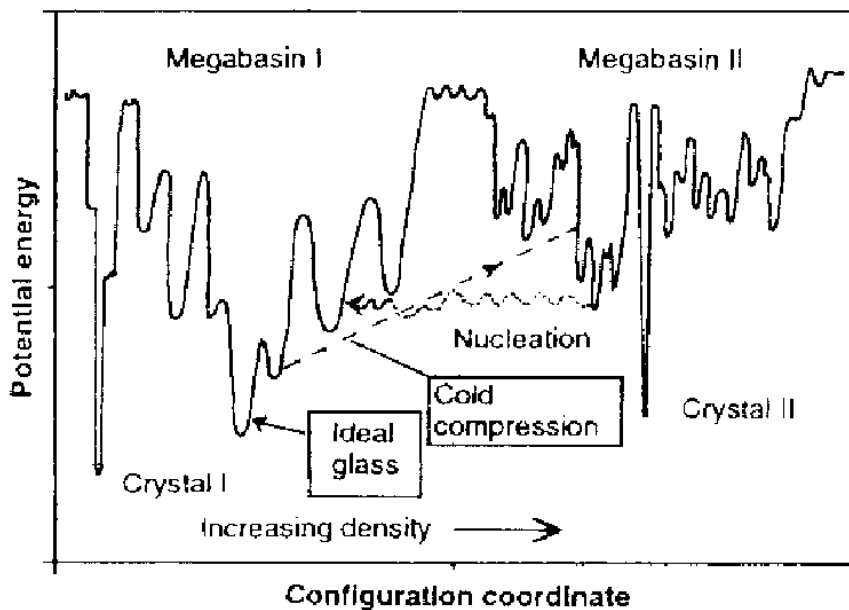
$$\tau = \tau_{AG} \exp\left(\frac{C\Delta\mu}{TS_C}\right) \quad (3.2)$$

όπου τ_{AG} είναι ο χρόνος χαλάρωσης σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες, το C είναι μια σταθερά, $\Delta\mu$ είναι το ενεργειακό φράγμα ανά μόριο, και S_C είναι η εντροπία λόγω διαμορφώσεων, που μπορεί να υπολογιστεί θερμιδομετρικά. Η τελευταία μπορεί να υπολογιστεί μόνο πάνω από το T_g , όμως η προέκτασή της μηδενίζεται σε κάποια θερμοκρασία κάτω από το T_g [21]. Αυτό υπονοεί ότι αν και η παρατηρούμενη μετάβαση υάλου δεν είναι πραγματική θερμοδυναμική μεταβολή, υπάρχει μια μεταβολή δεύτερης τάξεως “κρυμμένη” σε αυτή, η οποία, όμως, είναι

απρόσιτη πειραματικά λόγω του εξαιρετικά μεγάλου χρόνου που χρειάζεται το σύστημα για να φτάσει σε ισορροπία σε τέτοιες χαμηλές θερμοκρασίες.

3.2.2.3 Η θεωρία του ενεργειακού τοπίου

Από την άλλη πλευρά, σύμφωνα με τη θεωρία του “ενεργειακού τοπίου” [22,23], ο σχηματισμός υάλου οφείλεται στο ότι η τμηματική κίνηση των πολυμερικών αλυσίδων είναι παγιδευμένη σε ένα ενεργειακό φράγμα το οποίο δεν μπορεί να υπερπηδήσει λόγω έλλειψης επαρκούς θερμικής ενέργειας. Το τοπίο περιλαμβάνει πολλά τοπικά ελάχιστα που χωρίζονται από αρκετά υψηλά ενεργειακά φράγματα (Εικόνα 3.4). Ενώ σε υψηλές θερμοκρασίες η θερμική ενέργεια, $k_B T$, επιτρέπει την υπερπήδηση των φραγμάτων και την “εξερεύνηση” του τοπίου, με τη μείωση της θερμοκρασίας το σύστημα παγιδεύεται σε ένα από τα ελάχιστα με αποτέλεσμα να μην μπορεί να αλλάξει διαμόρφωση και να φτάσει στην ισορροπία, και έτσι γίνεται ύαλος. Η θεωρία αυτή δεν απαιτεί μείωση του όγκου για την υαλώδη μετάβαση. Αντίθετα, η αλλαγή του συντελεστή διαστολής κατά τη μετάβαση αποδίδεται στην αδυναμία αλλαγής διαμόρφωσης, δηλαδή τη μείωση των βαθμών ελευθερίας.

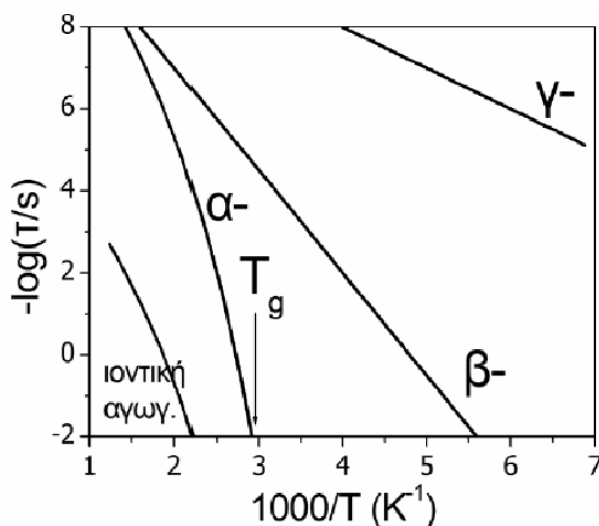


Εικόνα 3.4. Ενεργειακό “τοπίο” μακρομορίου – ενέργεια ως συνάρτηση της διαμόρφωσης. Στην πραγματικότητα είναι πολυδιάστατο, λόγω των πολλών ανεξάρτητων μεταβλητών (απλών δεσμών γύρω από τους οποίους γίνονται περιστροφές), αλλά εδώ έχει απλοποιηθεί σε μονοδιάστατο. Περιλαμβάνει πολλά μέγιστα και ελάχιστα σε μικρή και μεγάλη κλίμακα (τα τελευταία σημειώνονται ως “megabasin”). Σε υψηλές θερμοκρασίες η θερμική ενέργεια, $k_B T$, είναι αρκετά μεγάλη και το μακρομόριο “εξερευνά” το τοπίο ξεπερνώντας τα ενεργειακά φράγματα μέχρι να βρει τη διαμόρφωση με την ελάχιστη ενέργεια, ενώ σε χαμηλότερες μπορεί να παγιδευτεί σε ένα από τα ελάχιστα και να μη φτάσει ποτέ στην κατάσταση ισορροπίας. Το μοντέλο δεν απαιτεί μείωση του όγκου κατά τη μετάβαση υάλου, αλλά ούτε και συνεργατικότητα, ερμηνεύοντας τη μετάβαση υάλου και σε μεμονωμένα μακρομόρια [23].

Οι παραπάνω θεωρήσεις είναι ακραία σενάρια όπου στη μία περίπτωση η κυρίαρχη παράμετρος είναι η πυκνότητα, ενώ στην άλλη η θερμοκρασία. Για να βρεθεί η σχετική συνεισφορά των δύο παραμέτρων σε ένα σύστημα δεν επαρκούν μόνο πειράματα συναρτήσεως της θερμοκρασίας, καθώς μεταβολή στη θερμοκρασία επηρεάζει τόσο τη θερμική ενέργεια όσο και την πυκνότητα. Γι' αυτό εκτελούνται πειράματα με εφαρμογή πίεσης υπό ισόθερμες συνθήκες ώστε να απομονωθεί η επίδραση της πίεσης μόνο στην πυκνότητα [15,24-25]. Η μετάβαση υάλου που παρατηρείται ακόμα και σε μεμονωμένα μακρομόρια, όπως π.χ. διαλύματα πρωτεϊνών, μπορεί να ερμηνευτεί μέσω του ενεργειακού τοπίου, κάτι που δεν είναι δυνατό να συμβεί με βάση το μοντέλο της συνεργατικότητας. Προηγούμενες έρευνες σε πολυπεπίδια [14] έχουν δείξει ότι η σχετική συνεισφορά της θερμικής ενέργειας είναι κυρίαρχη λόγω της ύπαρξης δεσμών υδρογόνου.

3.3 Μηχανισμοί μοριακής χαλάρωσης

Η μελέτη της δυναμικής άμορφων συστημάτων έχει δείξει ότι δεν υπάρχει ένας και μοναδικός μηχανισμός χαλάρωσης. Εκτός από το μηχανισμό τμηματικής χαλάρωσης (segmental), που σχετίζεται με το T_g , παρατηρούνται και άλλοι, πιο αργοί ή πιο γρήγοροι μηχανισμοί. Κατά σύμβαση, ο κύριος μηχανισμός ονομάζεται α-μηχανισμός και οι υπόλοιποι β-, γ- κ.ο.κ. κατά φθίνουσα θερμοκρασία (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5. Σχηματικό διάγραμμα Arrhenius (χρόνοι συναρτήσεως του αντιστρόφου της θερμοκρασίας) των μηχανισμών χαλάρωσης άμορφου συστήματος. Ο α-μηχανισμός σχετίζεται με τη μετάβαση υάλου και έχει θερμοκρασιακή εξάρτηση τύπου VFT, ενώ οι β- και γ- αντικατοπτρίζουν τοπικές κινήσεις και έχουν εξάρτηση τύπου Arrhenius. Σε υψηλές θερμοκρασίες αρχίζει να εμφανίζεται η κίνηση των ιόντων ("αργός" μηχανισμός).

Όπως είδαμε ο α-μηχανισμός (ή μηχανισμός τμηματικής χαλάρωσης) σχετίζεται με τη χαλάρωση τμημάτων των αλυσίδων. Κατά σύμβαση, ως θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης

ορίζεται εκείνη στην οποία ο χρόνος χαλάρωσης του α-μηχανισμού αντιστοιχεί σε 100 s. Οι δευτερεύοντες μηχανισμοί με μοριακή προέλευση σχετίζονται με περιστροφές και ταλαντώσεις μικρότερων ομάδων του μορίου (συνήθως πλευρικών), που για να γίνουν χρειάζονται μικρότερο όγκο (στη θεωρία του ελεύθερου όγκου) και έχουν μικρότερο ενεργειακό φράγμα (στη θεωρία του ενεργειακού τοπίου). Μια χαρακτηριστική διαφορά του α-μηχανισμού από τους μηχανισμούς σε θερμοκρασία $T < T_g$ είναι ότι οι χρόνοι χαλάρωσης έχουν διαφορετική θερμοκρασιακή εξάρτηση. Οι τοπικοί μηχανισμοί έχουν εξάρτηση τύπου Arrhenius, δηλαδή μια μοναδική ενέργεια ενεργοποίησης, και περιγράφονται από την εξίσωση

$$\tau_{\max} = \tau_0 \exp \frac{E_{act}}{RT} \quad (3.3)$$

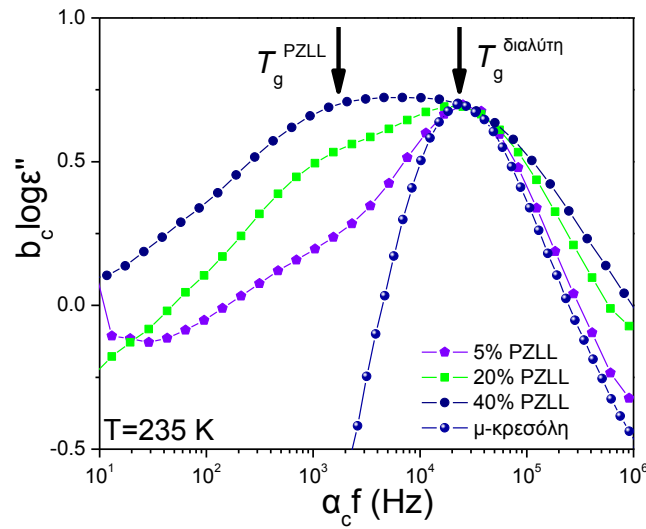
όπου τ_0 είναι το όριο του χρόνου χαλάρωσης για πολύ υψηλές θερμοκρασίες και E_{act} η ενέργεια ενεργοποίησης. Από την άλλη πλευρά, ο α-μηχανισμός έχει εξάρτηση τύπου Vogel-Fulcher-Tammann (VFT) [26]

$$\tau_{\max} = \tau_0 \exp \frac{D_T T_0}{T - T_0} \quad (3.4)$$

όπου τ_0 είναι το όριο των χρόνων χαλάρωσης σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες, T_0 το “ιδανικό” σημείο υάλου, και D_T μια αδιάστατη παράμετρος. Επειδή στις πρωτεΐνες και στα πολυπεπίδια συνήθως παρατηρείται μεγάλος αριθμός μηχανισμών χαλάρωσης, απαιτείται προσεκτική ανάλυση σε μεγάλο εύρος συχνοτήτων και θερμοκρασιών ώστε να γίνει σωστή αντιστοίχιση των μηχανισμών με τις μοριακές διεργασίες από τις οποίες δημιουργούνται.

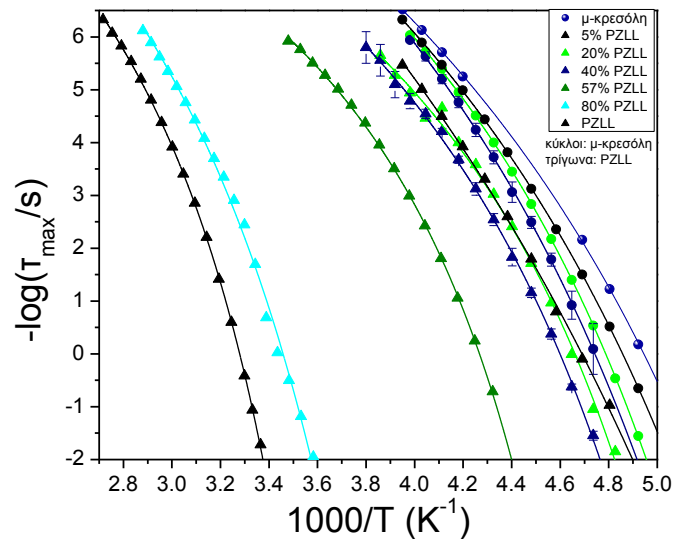
3.4 Προέλευση του σημείου υάλου στις πρωτεΐνες

Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει [7] ότι η μετάβαση υάλου είναι ένα ενδογενές χαρακτηριστικό των πεπτιδίων, αφού παρατηρείται ακόμα και απουσία διαλύτη, και σε συστήματα με διαφορετικές δευτεροταγείς δομές και πλευρικούς υποκαταστάτες. Επιπλέον, η δυναμική των πρωτεϊνών φαίνεται να μην είναι συζευγμένη με εκείνη του διαλύτη, στην περίπτωση των διαλυμάτων [7]. Για παράδειγμα, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκαν διαλύματα πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνης) (PZLL) σε μ-κρεσόλη, που ευνοεί το σχηματισμό α-έλικας [27]. Σε συγκεντρώσεις έως ~ 50 % w/w παρατηρούνται δύο α-μηχανισμοί, που αντιστοιχούν στους μηχανισμούς τμηματικής χαλάρωσης τόσο της PZLL όσο και του διαλύτη, όπως δείχνει η Εικόνα 3.6.



Εικόνα 3.6. Υπεριτιθεμένα διηλεκτρικά φάσματα της μ-κρεσόλης και των διαλυμάτων με PZLL, όπου φαίνονται οι τμηματικές δυναμικές του πεπτιδίου και του διαλύτη ταυτόχρονα. Ο πιο γρήγορος μηχανισμός αντιστοιχεί στην μ-κρεσόλη, ενώ σε χαμηλότερες συχνότητες εμφανίζεται ο α-μηχανισμός της PZLL, του οποίου η ένταση εξαρτάται από τη συγκέντρωση σε PZLL.

Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρείται μόνο ο α-μηχανισμός του καθαρού PZLL και δεν εμφανίζεται πλέον ο α-μηχανισμός της μ-κρεσόλης, δείχνοντας ότι ο α-μηχανισμός του πολυπεπτιδίου παρουσιάζεται ανεξάρτητα από εκείνον του διαλύτη. Τα αποτελέσματα για τους χρόνους χαλάρωσης των α-μηχανισμών φαίνονται στην Εικόνα 3.7.

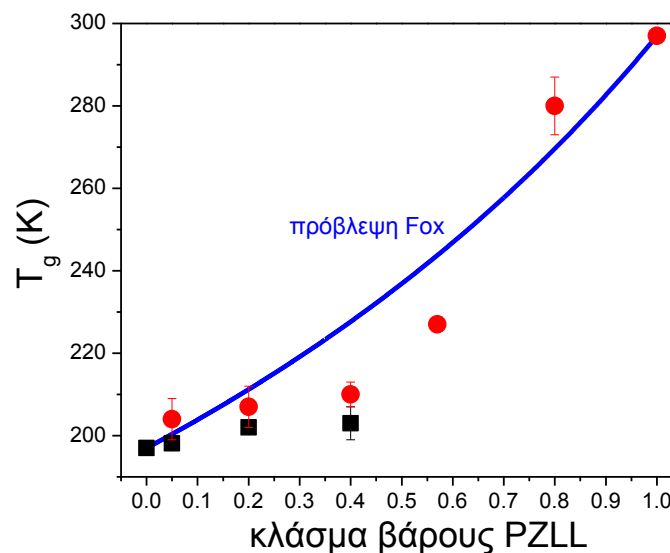


Εικόνα 3.7. Χρόνοι χαλάρωσης του α-μηχανισμού της PZLL (τρίγωνα) και του διαλύτη μ-κρεσόλη (κύκλοι) για τα καθαρά συστατικά και διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων. Οι γραμμές είναι προσαρμογή της εξίσωσης VFT στα πειραματικά δεδομένα.

Τα σημεία υάλου του διαλύτη και του πεπτιδίου υπολογίζονται από τους αντίστοιχους α-μηχανισμούς (σε $\tau \sim 100$ s) και παριστάνονται γραφικά συναρτήσει της συγκέντρωσης στην Εικόνα 3.8 Η εμπειρική εξίσωση Fox

$$\frac{1}{T_{mix}} = \frac{w_{PZLL}}{T_g^{PZLL}} + \frac{1-w_{PZLL}}{T_g^{m-cresol}} \quad (3.5)$$

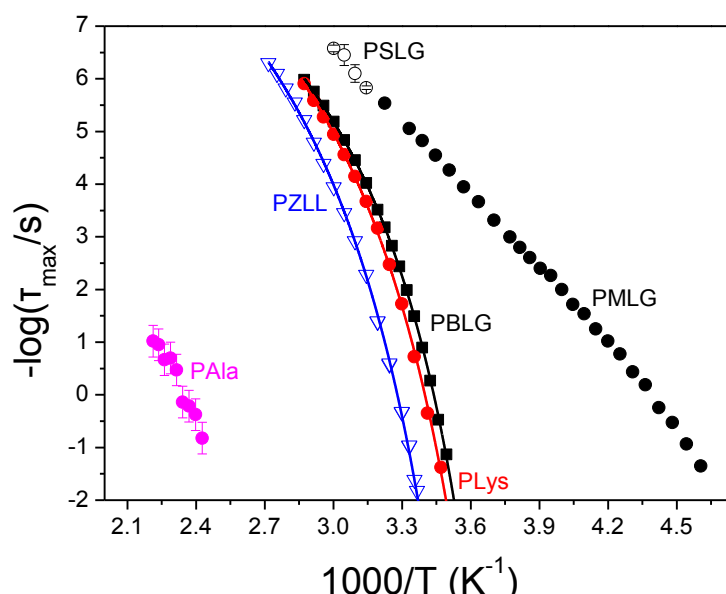
όπου w_{PZLL} είναι το κλάσμα βάρους της PZLL, δεν μπορεί να περιγράψει ικανοποιητικά τα πειραματικά σημεία, επειδή η συμπεριφορά αλλάζει απότομα για $w > 50\%$ κ.β. Επίσης βλέπουμε ότι για $w_{PZLL} \leq 0.4$ τα δυο σημεία υάλου (του διαλύτη και του πολυπεπτιδίου) διαφέρουν κατά 5-10 K, που αντιστοιχεί όμως σε 1 ως 2 δεκάδες χρόνων χαλάρωσης. Αυτό αποδεικνύει ότι οι θεωρητικές μελέτες (π.χ. Karplus [28]) που αποδίδουν το T_g των πρωτεϊνών αποκλειστικά στο πάγωμα των βαθμών ελευθερίας κίνησης του διαλύτη (νερό) που τις περιβάλλει, υπερεκτιμούν το ρόλο του διαλύτη.



Εικόνα 3.8. Η θερμοκρασία υάλου της PZLL (κύκλοι) και της μ-κρεσόλης (τετράγωνα) συναρτήσει της συγκέντρωσης της PZLL. Στο διάλυμα παρατηρείται η υαλώδης μετάβαση τόσο του πεπτιδίου όσο και του διαλύτη. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, το T_g της PZLL είναι μικρότερο από την πρόβλεψη της εξίσωσης Fox.

Συμπερασματικά, η παρούσα αλλά και μια προηγούμενη [7] μελέτη διαλυμάτων πολυπεπτιδίων έδειξαν ότι το πεπτιδίο διατηρεί ξεχωριστή δυναμική από το διαλύτη, ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Καθώς λοιπόν η θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης μπορεί να χαρακτηρίσει μια πρωτεΐνη ή ένα πολυπεπτιδίο, είναι πρακτικό να αναζητείται η υαλώδης μετάβαση ως ένα είδος “υπογραφής” του ίδιου του πεπτιδίου. Ακόμη, η μελέτη του σημείου υάλου σε συμπολυπεπτιδία έχει σημασία μιας και η σύγκριση της θερμοκρασίας της

μετάβασης με τα καθαρά συστατικά μπορεί να οδηγήσει σε χρήσιμα συμπεράσματα για την ανάμιξη σε τοπικό επίπεδο, το εύρος της διεπιφάνειας, κ.λ.π.. Από τη σύγκριση της μετάβασης μέσα σε συμπολυπεπτιδία με τη μετάβαση όπως συμβαίνει στα καθαρά συστατικά, μπορούν να εξαχθούν χρήσιμες πληροφορίες για την ανάμιξη, τη δομή, και τη δυναμική των φάσεων. Στην Εικόνα 3.9 φαίνονται οι α -μηχανισμοί όλων των καθαρών συστατικών των πολυπεπτιδίων που μελετούνται στην παρούσα εργασία.



Εικόνα 3.9. Διάγραμμα Arrhenius των τμηματικών μηχανισμών χαλάρωσης (α -μηχανισμοί) όλων των καθαρών συστατικών που εξετάζονται στην παρούσα εργασία. PBLG (τετράγωνα), PAla (ροζ κύκλοι), PZLL (κάτω τρίγωνα), PLys (κόκκινοι κύκλοι), PMLG (μαύροι κύκλοι), PSLG (λευκοί κύκλοι). Σε ορισμένα πολυπεπτιδία έχει γίνει προσαρμογή με την εξίσωση VFT. Λεπτομέρειες για τη συμπεριφορά των μηχανισμών αυτών βρίσκονται στα Κεφάλαια των αποτελεσμάτων.

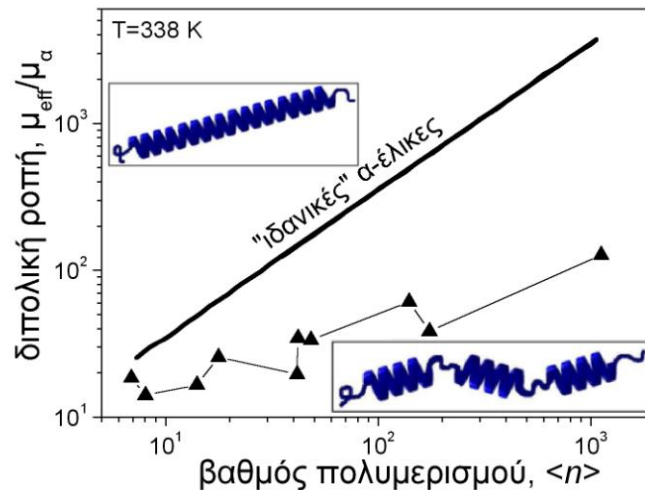
3.5 Εκτίμηση του μήκους εμμονής των α -ελίκων

Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι η διηλεκτρική φασματοσκοπία είναι μια πολύ ευαίσθητη τεχνική τόσο για την τοπική (τμηματική) όσο και για τη συνολική δυναμική [29]. Ειδικά στα πολυπεπτιδία, πρόσφατες μελέτες στο Εργαστήριο Φυσικής Συμπυκνωμένης Ύλης και Επιστήμης των Υλικών του Τμ. Φυσικής του Παν. Ιωαννίνων έδειξαν ότι η τμηματική δυναμική σχετίζεται με τη χαλάρωση άμορφων τμημάτων που δημιουργούνται λόγω σπασμένων δεσμών υδρογόνου [30], ενώ η συνολική δυναμική οφείλεται στη χαλάρωση της δευτεροταγούς δομής (α -έλικες) [30-34]. Η ένταση του “αργού” μηχανισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να βρεθεί η ενεργός διπολική ροπή που σχετίζεται με το μήκος εμμονής, ξ , των ελικοειδών τμημάτων. Έτσι, ένα τυπικό μήκος εμμονής της τάξης των 2 nm βρέθηκε στον πολυ(γ -βενζυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος) [35].

Η ενεργός διπολική ροπή που σχετίζεται με τη χαλάρωση αυτή μπορεί να εκτιμηθεί με την εξίσωση του Buckingham (προσαρμοσμένη από τους Applequist και Mahr), κατάλληλη για ραβδόμορφα μακρομόρια [36]

$$\frac{Nfg\mu^2}{3\varepsilon_0 k_B T} = \frac{(2\varepsilon_s + 1)(\varepsilon_s - n^2)}{2\varepsilon_s + n^2} - \frac{(2\varepsilon_\infty + 1)(\varepsilon_\infty - n^2)}{2\varepsilon_\infty + n^2} \quad (3.6)$$

όπου N είναι η αριθμητική πυκνότητα διπόλων, μ η διπολική ροπή, τα f και g είναι συντελεστές που σχετίζονται με τη γεωμετρία του μορίου ($f \rightarrow 2/3$ και $g \rightarrow 1$ για άπειρα εκτεταμένη ράβδο), ε_s είναι η στατική διαπερατότητα, και n ο δείκτης διάθλασης. Η ενεργός διπολική ροπή $\mu_{\text{eff}} = (g^* \mu^2)^{1/2}$, όπου g^* είναι ο παράγοντας συσχέτισης Kirkwood-Fröhlich γειτονικών διπόλων, απεικονίζεται στην Εικόνα 3.10 συναρτήσει του βαθμού πολυμερισμού για “ιδανικές” έλικες PBLG και για το καθαρό PBLG (τετράγωνο).



Εικόνα 3.10. Σχηματική αναπαράσταση της ελικοειδούς δομής του PBLG βάση πειραμάτων $\Delta\Phi$. Το “πραγματικό” PBLG (τρίγωνο) αποτελείται από έλικες με σπασίματα, σε αντίθεση με τις θεωρητικές τέλειες έλικες (συνεχής γραμμή).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.10, και αντίθετα με την πρότερη αντίληψη, οι έλικες δεν είναι ιδανικές, αλλά περιέχουν ατέλειες, οι οποίες διαχέονται κατά μήκος της αλυσίδας. Ως αποτέλεσμα, η συνολική διπολική ροπή που ανιχνεύεται με τη μέθοδο της $\Delta\Phi$ είναι μικρότερη από τη θεωρητικά αναμενόμενη. Όπως θα δούμε στην παρούσα εργασία, οι έλικες μπορούν να βελτιωθούν σε κατάλληλα δισυσταδικά συμπολυπεπτιδία με τη χρήση ισχυρού θερμοδυναμικού πεδίου. Αντίθετα, στην περίπτωση των αστεροειδών συμπολυπεπτιδίων οι ατέλειες πολλαπλασιάζονται, λόγω των πρόσθετων περιορισμών της τοπολογίας.

3.6 Αναφορές

- (1) Donth, E. *“The Glass Transition”*, Springer, Heidelberg, 2001.
- (2) Teeter, M. M.; Yamano, A.; Stec, B.; Mohanty, U. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 11242.
- (3) Lubchenko, V.; Wolynes, P. G.; Frauenfelder, H. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 7488.
- (4) Cordone, L.; Ferrand, M.; Vitrano, E.; Zaccai, G. *Biophys. J.* **1999**, 76, 1043.
- (5) Caliskan, G.; Mechtani, D.; Roh, J. H.; Kisliuk, A.; Sokolov, A. P.; Azzam, S.; Cicerone, M. T.; Lin-Gibson, S.; Peral, I. *J. Chem. Phys.* **2004**, 121, 1978.
- (6) Kurkal, V.; Daniel, R. M.; Finney, J. L.; Tehei, M.; Dunn, R. V.; Smith, J. C. *Biophys. J.* **2005**, 89, 1282.
- (7) Π. Παπαδόπουλος, Διδακτορική διατριβή, Ιωάννινα, 2005.
- (8) McKenna, G. *Nat. Phys.* **2008**, 4, 673.
- (9) Prigogine, I.; Defay, R. in *“Thermodynamique Chimique”*, Desoer, Liège, 1950.
- (10) Doolittle, A. K.; Doolittle, D. B. *J Applied Phys* **1957**, 28, 901.
- (11) Turnbull, D.; Cohen, M. H. *J. Chem. Phys.* **1961**, 34, 120.
- (12) Cohen, M. H.; Grest, G. S. *Phys. Rev. B* **1979**, 20, 1077.
- (13) Doolittle, A. K. *J. Appl. Phys.* **1951**, 22, 1471.
- (14) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Klok, H.-A.; Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *J. Chem. Phys.* **2005**, 122, 224906.
- (15) Floudas, G.; Mpoukouvalas, K.; Papadopoulos, P. *J. Chem. Phys.* **2006**, 124, 074905.
- (16) Ferrer, M.-L.; Lawrence, C.; Demirjian, B. G.; Kivelson, D.; Alba-Simionesco, C.; Tarjus, G. *J. Chem. Phys.* **1998**, 109, 8010.
- (17) Papadopoulos, P.; Peristeraki, D.; Floudas, G.; Koutalas, G.; Hadjichristidis, N. *Macromolecules* **2007**, 37, 8116.
- (18) Adam, G.; Gibbs, J. H. *J. Chem. Phys.* **1965**, 43, 139.
- (19) Matsuoka, S.; Quan, X. *Macromolecules* **1991**, 24, 2770.
- (20) Adachi, K. *Macromolecules* **1990**, 23, 1816.
- (21) Richert, R.; Angell, C. A. *J. Chem. Phys.* **1998**, 108, 9016.
- (22) Stillinger, F. H. *Science* **1995**, 267, 1935.
- (23) Angell, C. A. *Science* **1995**, 267, 1924.
- (24) Ferrer, M.-L.; Lawrence, C.; Demirjian, B. G.; Kivelson, D.; Alba-Simionesco, C.; Tarjus, G. *J. Chem. Phys.* **1998**, 109, 8010.
- (25) Tölle, A.; Schober, H.; Wuttke, J.; Randl, O. G.; Fujara, F. *Phys. Rev. Lett.* **1998**, 80, 2374.

- (26) a) Vogel, H. *Phys. Z.* **192**, 22, 645, b) Fulcher, G. S. *J. Am. Ceram. Soc.* **1923**, 8, 339, c) Tammann, G.; Hesse, W. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1926**, 156, 245.
- (27) Block, H. in “*Poly(γ -benzyl-L-glutamate) and other glutamic acid containing polymers*”, Gordon and Breach Science Publishers, New York, 1983.
- (28) Smith, J.; Kuczera, K.; Karplus, M. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 1601.
- (29) Floudas, G. in “*Broadband Dielectric Spectroscopy*” chapter 8, Kremer, F.; Schönhals, A. (eds), Springer, Berlin, 2002.
- (30) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Klok, H.-A.; Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *J. Chem. Phys.* **2005**, 122, 224906.
- (31) Floudas, G.; Papadopoulos, P.; Klok, H.-A.; Vandermeulen, G. W. M.; Rodriguez-Hernandez, J. *Macromolecules* **2003**, 36, 3673.
- (32) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Klok, H.-A.; Schnell, I.; Pakula, T. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 81.
- (33) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Lieberwirth, I.; Nguyen, T. Q.; Klok, H.-A. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 618.
- (34) Gitsas, A.; Floudas, G.; Dietz, M.; Mondeshki, M.; Spiess, H. W.; Wegner, G. *Macromolecules*, **2007**, 40, 8311.
- (35) Papadopoulos, P.; Floudas, G. *Dielectr. Newsl.* **2005**, Issue Nov.
- (36) Buckingham, A. D. *Australian J. Chem.* **1953**, 6, 323.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Υλικά – Πειραματικές τεχνικές – Μέθοδοι ανάλυσης

4.1 Υλικά

4.1.1 Τυχαία συμπολυπεπτίδια γ-μεθυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος και γ-στεαρυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος [πολυ(MLG-co-SLG)] (Κεφάλαιο 5)

Η σύνθεση έγινε από τον Dr. M. Dietz στο Max Planck Institute for Polymer Research. Τα πολυμερή που φαίνονται στον Πίνακα 4.1 συντέθηκαν με πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου των αντίστοιχων αμινοξέων *N*-καρβοξυανυδρίτη (NCA).

Πίνακας 4.1. Μοριακά χαρακτηριστικά των πολυπεπτιδίων.

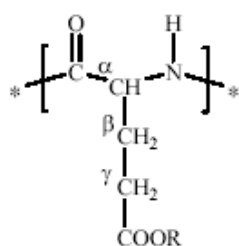
δείγμα	στεαρύλιο ^α (%)	$M_n^β$ (g/mol)	$M_η^γ$ (g/mol)	$n^δ$
PMLG	0	8700	8900	60
MS10	10	10000	10400	60
MS18	18	11000	11600	60
MS30	30.5	13000	13400	60
MS47	47	15000	15900	60
PSLG	100	23000	23700	60

^α Ποσοστό του μονομερούς SLG στο πολυμερές (%).

^β Μοριακό βάρος κατά αριθμό.

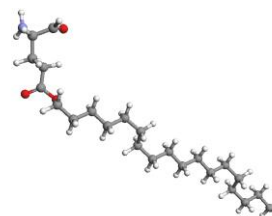
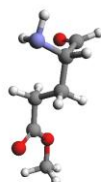
^γ Μοριακό βάρος από ιξωδομετρία.

^δ Βαθμός πολυμερισμού.



$R_{PMLG} = -CH_3$

$R_{PSLG} = -C_{18}H_{37}$



Εικόνα 4.1. Ο συντακτικός τύπος (αριστερά), και εικόνες των μονομερών PMLG (μέσον) και PSLG (δεξιά).

4.1.2 Γραμμικά συμπολυπεπτίδια πολυ(γ -βενζυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος) και πολυαλανίνης (PBLG-*b*-PAla) (Κεφάλαιο 6)

Η σύνθεση έγινε από τους Δρ. Θ. Αλιφέρη και Επίκ. Καθ. Ε. Ιατρού στο Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας (Παν. Αθηνών) του Καθ. Ν. Χατζηχηρηστίδη με “ζωντανό” πολυμερισμό των NCA σε υψηλό κενό. Οι τιμές που βρέθηκαν συγκεντρώνονται στον Πίνακα 4.2, μαζί με τις αντίστοιχες στοιχειομετρικές. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι τιμές αυτές συμφωνούν μεταξύ τους, υποδεικνύοντας υψηλό βαθμό μοριακής ομογένειας.

Πίνακας 4.2. Μοριακά χαρακτηριστικά των πολυπεπτιδίων.

δείγμα	πολυαλανίνη (%) ^α	M_w^{total} (g/mol)	M_w^{PBLG} (g/mol) ^β	n^{PBLG}_γ	M_w^{PAla} (g/mol) ^δ	n^{PAla}_γ	I^b
PBLG ₉₁	0	-	19900*	91	-	-	1.06
PBLG ₁₀₄ - <i>b</i> -PAla ₂₄	8.4	24700	22700	104	2000	24	1.08
PBLG ₁₁₅ - <i>b</i> -PAla ₄₈	16	29400	25100	115	4300	48	1.09
PBLG ₁₀₅ - <i>b</i> -PAla ₇₉	21	30000	23000	105	7000	79	1.08
PAla ₁₀₇	100	-	-	-	9500	107	-

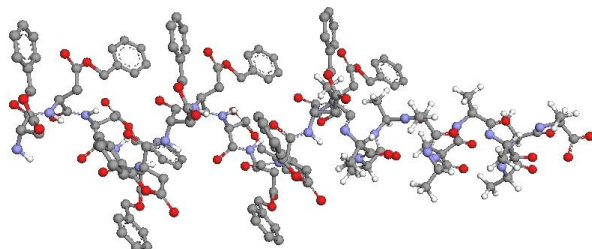
^α: Μετρημένα με Θερμοβαρυμετρική Ανάλυση (TGA).

^β: Μετρημένα με Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους (SEC) σε DMF/0.1 N LiBr στα 333 K.

*: Μετρημένα με two-angle laser light scattering SEC (SEC-TALLS).

^γ: Βαθμός πολυμερισμού.

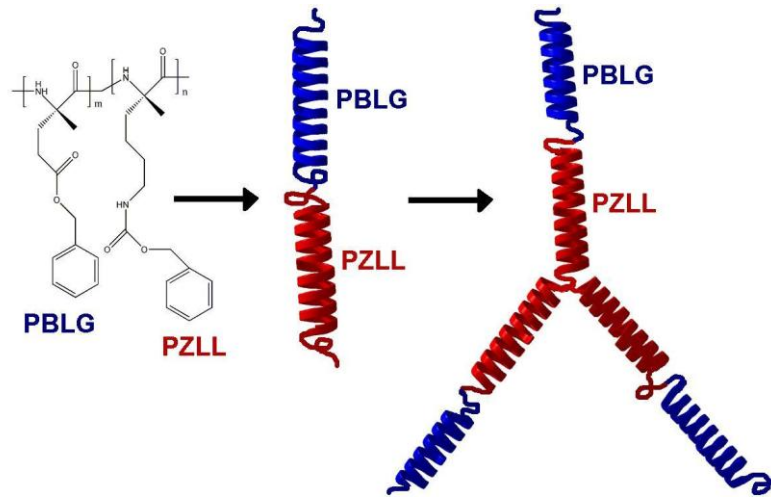
^δ: Στοιχειομετρικά μοριακά βάρη.



Εικόνα 4.2. Σχήμα ενός δισυστατικού συμπολυμερούς PBLG₁₂-*b*-PAla₁₂ με (ιδανική) τέλεια εκτεταμένη ελικοειδή διαμόρφωση (κόκκινο: O, μπλε: N, γκρι: C).

4.1.3 Αστεροειδή συμπολυπεπτίδια πολυ(γ -βενζυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος) και πολυ(ϵ -καρβοβενζοξυ-L-λυσίνης) (GL₃) (Κεφάλαιο 7)

Η σύνθεση έγινε από τον Επίκ. Καθ. Ε. Ιατρού στο Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας (Παν. Αθηνών) του Καθ. Ν. Χατζηχηρηστίδη με τη μέθοδο του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου. Λεπτομέρειες για τη σύνθεση των τριάκτινων αστεροειδών συμπολυπεπτιδίων δίνονται στην αναφορά [1].



Εικόνα 4.3. Πορεία σύνθεσης των αστεριών από δισυσταδικά συμπολυπεπτίδια PBLG και PZLL. Οι έλικες παρουσιάζονται ως “τέλειες”. Θα δούμε στη συνέχεια ότι η εικόνα δεν είναι ακριβώς ιδανική.

Τα μοριακά χαρακτηριστικά των δειγμάτων παρατίθενται στον Πίνακα 4.3. Η χαμηλή πολυδιασπορά μαζί με την πολύ καλή συμφωνία μεταξύ των στοιχειομετρικών και των πειραματικά προσδιορισμένων μοριακών βαρών υποδεικνύει μεγάλη ομογένεια κατά τη σύνθεση. Οι τρεις σειρές των μοριακών βαρών σημειώνονται ως L (=μικρό), M (=ενδιάμεσο), και H (=υψηλό). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στη συνέχεια ανήκουν στην πιο αντιπροσωπευτική σειρά, αλλά ισχύουν και για τις υπόλοιπες, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά.

Πίνακας 4.3. Μοριακά χαρακτηριστικά των γραμμικών και αστεροειδών συμπολυπεπτιδίων.

δείγμα	όνομα	$\bar{M}_n^a$ (g/mol)	I^b	$\bar{M}_n^c$ (g/mol)	f_{PBLG}^d
PBLG	PBLG _L	19100	1.06		1
G-b-L	Diblock _L	26100	1.06		0.73
(GL) ₃	Star _L	76900	1.03	78000	0.73
PBLG	PBLG _M	39500	1.02		1
G-b-L	Diblock _M	62100	1.03		0.64
(GL) ₃	Star _M	176000	1.04	180000	0.64
PBLG	PBLG _H	35500	1.01		1
G-b-L	Diblock _H	58800	1.08		0.60
(GL) ₃	Star _H	178500	1.08	180000	0.60

^a M_n από ωσμομετρία μεμβράνης, εκτός από τη σειρά L που υπολογίστηκε με SEC-TALLS.

^b Δείκτης πολυδιασποράς μετρημένος με SEC.

^c Στοιχειομετρικό μοριακό βάρος.

$$^d f_{PBLG} = \frac{N_{n,PBLG}^*}{N_{n,total}^*} \text{ είναι το κλάσμα όγκου του PBLG, όπου } N_{n,PBLG}^* = N_{n,PBLG} \sqrt{\frac{\rho_{PZLL}^*}{\rho_{PBLG}^*}}, \rho_{PBLG}=1.28$$

$$\text{g/cm}^3, \rho_{PZLL}=1.208 \text{ g/cm}^3,$$

$$\rho_{PBLG}^* = \frac{\rho_{PBLG}}{M_{BLG}} = \frac{1.28}{219} \text{ mol/cm}^3, \rho_{PZLL}^* = \frac{\rho_{PZLL}}{M_{ZLL}} = \frac{1.208}{146} \text{ mol/cm}^3.$$

4.1.4 Δενδριμερή πολυφαινυλενίων με πολυπεπτίδια πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνης) (PZLL) (Κεφάλαιο 8)

Η αναλυτική πορεία σύνθεσης του πολυμερικού συστήματος, που έγινε από τον Dr. G. Mihon στο MPIP, περιγράφεται στην αναφορά [4]. Οι αλυσίδες πολυ-L-λυσίνης συνδεδήθηκαν απ' ευθείας στην επιφάνεια πρώτης και δεύτερης γενιάς PPD, τα οποία αποτελούνται από μονάδες πενταφαινυλοβενζολίου και έναν άκαμπτο πυρήνα περιλενιοδιιμιδίου. Τα συστήματα πολυπεπτιδίου-PPD που προκύπτουν έχουν διαφορετικό αριθμό αλυσίδων πολυ-L-λυσίνης μεταβλητού μήκους, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.4 και στην Εικόνα 4.4.

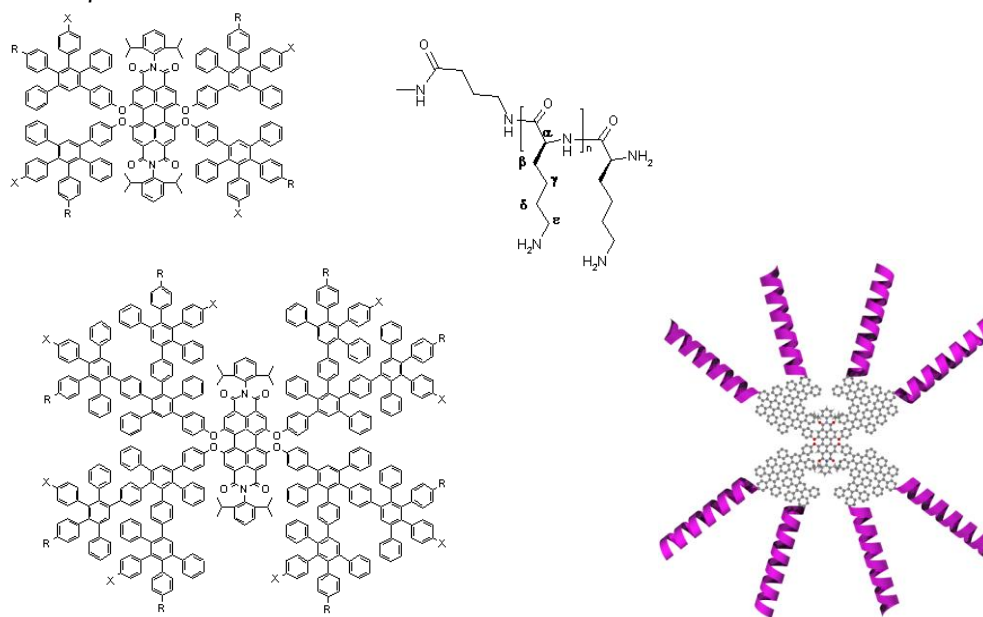
Πίνακας 4.4. Μοριακά χαρακτηριστικά των PPD με πολυ-L-λυσίνες.

δείγμα	γενιά	X	$n_{\text{Lys, UV}}^a$	$n_{\text{Lys, GPC}}^b$	M_w/M_n^c
G ₁ F ₄ N ₁₄	1	H	9	14	1.11
G ₁ F ₄ N ₅₄	1	H	50	54	1.16
G ₁ F ₄ N ₈₄	1	H	85	84	1.15
G ₁ F ₈ N ₁₂	1	R	9	12	1.09
G ₁ F ₈ N ₆₀	1	R	68	60	1.08
G ₁ F ₈ N ₇₄	1	R	76	74	1.10
G ₂ F ₈ N ₉	2	H	6	9	1.17
G ₂ F ₈ N ₂₂	2	H	28	22	1.42
G ₂ F ₈ N ₃₇	2	H	41	37	1.27
G ₂ F ₁₆ N ₁₆	2	R	14	16	1.26
G ₂ F ₁₆ N ₅₈	2	R	41	58	1.50
G ₂ F ₁₆ N ₆₈	2	R	89	68	1.42

^a: Αριθμός μονομερών ανά αλυσίδα, μετρημένος με φασματοσκοπία υπεριώδους (UV).

^b: Αριθμός μονομερών ανά αλυσίδα, μετρημένος με SEC.

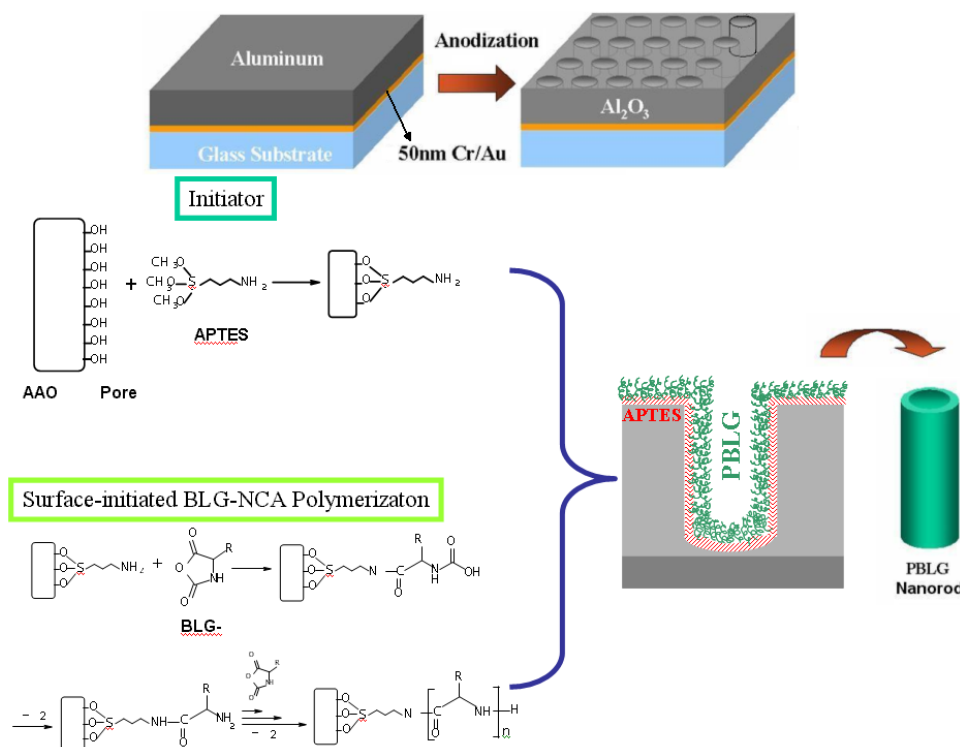
^c: Πολυδιασπορά υπολογισμένη με SEC, με χρήση διμεθυλοφορμαμιδίου (DMF) και πρότυπα πολυστυρενίου.



Εικόνα 4.4. Δενδριμερή πολυφαινυλενίων πρώτης (επάνω) και δεύτερης (κάτω) γενιάς. Το X είναι είτε άτομο υδρογόνου είτε ο υποκαταστάτης R. Το μονομερές της λυσίνης, R, παρουσιάζεται μαζί με την ονομασία των διάφορων ατόμων άνθρακα του μορίου. Δεξιά, ένα σχήμα με τον πυρήνα και τα πεπτίδια σε ιδανική ελικοειδή μορφή.

4.1.5 Νανοράβδοι πολυ(γ-βενζυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος) (PBLG) σε νανοπόρους Al_2O_3 (Κεφάλαιο 9)

Η πορεία παρασκευής των νανοράβδων PBLG (Dr. H. Duran (MPIP), Dr. M. Steinhart (MPG)) απεικονίζεται στην Εικόνα 4.5, και τα μοριακά χαρακτηριστικά τους συγκεντρώνονται στον Πίνακα 4.5. Αρχικά, σχηματίστηκαν πόροι διαμέτρου 20-400 nm με οξείδωση της επιφάνειας φύλλου αλουμινίου. Η αυτοοργάνωση των πόρων είναι αποτέλεσμα των δυνάμεων που ασκούνται κατά την αύξηση του όγκου του υλικού κατά τη μετατροπή από αλουμίνιο σε αλουμίνα (anodic aluminum oxide, AAO). Με χρήση διαφορετικών διαλυτών, όπως θειικό, φωσφορικό, και οξαλικό οξύ, και την κατάλληλη θερμοκρασία και ηλεκτρική τάση, μπορούν να αναπτυχθούν πόροι σε μια σειρά διαφόρων διαστάσεων ~5-600 nm [5], όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.6. Κατόπιν, η εσωτερική επιφάνεια των πόρων καλύφθηκε με μόρια εκκινητή APTES (3-αμινοπροπυλοτριαιθυλοσιλάνιο), που προσκολλώνται στις ομάδες υδροξυλίου του τοιχώματος με ομοιοπολικό δεσμό (Εικόνα 4.5). Ας σημειωθεί εδώ, ότι από πειράματα NMR είναι γνωστό πως ορισμένες υδροξυλομάδες δεν καλύπτονται από το APTES, πράγμα που πιθανώς οδηγεί στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ αυτών και του PBLG, και προκαλούν τη δυναμική συμπεριφορά που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 9. Από τα άκρα των APTES ξεκίνησε ο πολυμερισμός του PBLG, είτε παρουσία διαλύτη (τετραϋδροφουράνιο, THF, ή διμεθυλοφορμαμίδιο, DMF) είτε σε κατάσταση τήγματος. Ειδικά σε νανοπόρους μικρής διαμέτρου (25-35 nm) ο πολυμερισμός διευκολύνεται από την παρουσία διαλύτη, καθώς λόγω μικρότερου ιξώδους επιτυγχάνεται καλύτερη κάλυψη των επιφανειών. Οι διαλύτες απομακρύνθηκαν στο τέλος του πολυμερισμού με θέρμανση στα 373 K υπό κενό για τρεις μέρες. Τελικά, ολόκληρος ο όγκος των πόρων καλύφθηκε με PBLG. Για τη λήψη ελεύθερων νανοράβδων PBLG, το επάνω μέρος της αλουμίνας απομακρύνθηκε επιλεκτικά με χάραξη με υδροφθορικό οξύ, αφήνοντας εκτεθειμένες τις νανοράβδους, οι οποίες έχουν τις ίδιες ακριβώς διαστάσεις με τους νανοπόρους.

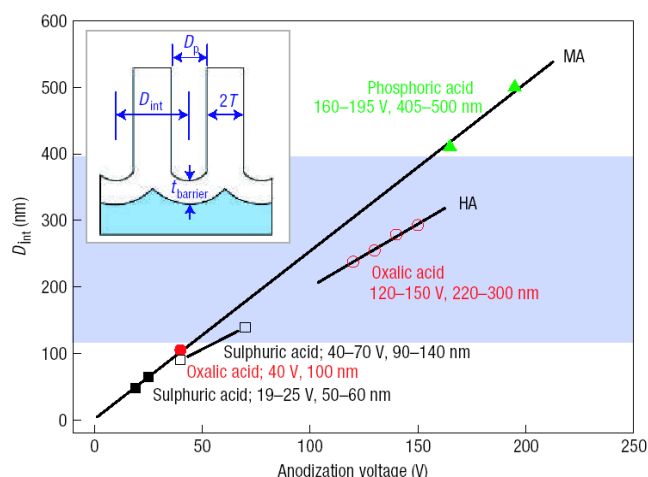


Εικόνα 4.5. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου παρασκευής των νανοπόρων σε μήτρα αλουμίνιας (επάνω) και της σύνθεσης των νανοράβδων PBLG (κάτω). Κάθε μόριο εκκινητή APTES προσκολλάται σε τρεις υδροξυλομάδες και ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου προχωράει μέχρι να γεμίσουν πλήρως οι πόροι. Με την απομάκρυνση της αλουμίνιας, λαμβάνονται ελεύθερες νανοράβδοι πολυπεπτιδίων (βλ. και Κεφάλαιο 9).

Πίνακας 4.5. Μοριακά χαρακτηριστικά νανοράβδων PBLG.

δείγμα	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	PDI	$n_{M_n}^a$
65 nm, από τήγμα	28500	113700	4.0	130
25 nm, NCA σε THF	26300	108500	4.1	120
35 nm, NCA σε THF	34800	105600	3.0	159
65 nm, NCA σε THF	97000	284700	2.9	443
200 nm, NCA σε THF	136000	534700	3.9	621
400 nm, NCA σε THF	60300	321800	5.3	275
25 nm, NCA σε DMF	29500	70300	2.4	135
65 nm, NCA σε DMF	78200	312000	4.0	357

^a $M_{\text{PBLG}}=219$ g/mol.



Εικόνα 4.6. Διάγραμμα των δυνατών αποστάσεων μεταξύ πόρων που μπορούν να επιτευχθούν με χρήση διαφορετικών διαλυτών, θερμοκρασίας, και δυναμικού οξείδωσης. Η μαύρη συνεχής γραμμή είναι γραμμική προσαρμογή στα δεδομένα, με κλίση 2.5 nmV^{-1} . Η δε γραμμή στη σκιασμένη περιοχή, με σημεία από οξαλικό οξύ, έχει κλίση 2.0 nmV^{-1} . Στην ένθετη εικόνα φαίνεται ένα σχεδιάγραμμα μιας τομής της δομής των πόρων, με τα χαρακτηριστικά μεγέθη τους (εικ. από την αναφ. [5]).

Για τον υπολογισμό της επιφανειακής πυκνότητας των ελίκων (grafting density) ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Θεωρήθηκε ότι έχουμε τέλειες έλικες, με μήκος $n \cdot 1.5 \text{ Å}$ /μονομερές, οι οποίες κινούνται μεταπτωτικά μέσα σε κώνο [6], και καταλαμβάνουν τον όγκο ενός κυλίνδρου με το ίδιο ύψος [7]. Με φασματοσκοπία υπερύθρου (Dr. H. Duran) βρέθηκε η γωνία που σχηματίζουν οι έλικες με την κατακόρυφο. Κατόπιν, ο όγκος του κυλίνδρου εξισώθηκε με τον όγκο που καταλαμβάνει ένα μόριο, που προσδιορίζεται βάση της πυκνότητας $\rho = 1.26 \text{ g/cm}^3$ [2] και έτσι βρίσκεται η επιφάνεια που αντιστοιχεί σε μία έλικα. Το αντίστροφο αυτού του αριθμού δίνει την επιφανειακή πυκνότητα ελίκων. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 4.6.

Πίνακας 4.6. Υπολογισμός της επιφανειακής πυκνότητας ελίκων στις νανοράβδους.

δείγμα	n_{M_n}	μήκος έλικας (nm)	όγκος μορίου ($\times 10^4 \text{ Å}^3$)	γωνία έλικας με την κατακόρυφο (μοίρες)	επιφάνεια/έλικα (nm^2)	έλικες/ 10 nm^2
400 nm, από τήγμα	172	29	4.9	42.5	2.49	4.4
25 nm, NCA σε THF	120	20	3.4	33.6	3.08	4.9
35 nm, NCA σε THF	159	27	4.5	32.0	3.15	5.1
25 nm, NCA σε DMF	135	23	3.8	34.5	2.94	4.9
65 nm, NCA σε DMF	357	61	10.0	35.5	2.87	4.9
200 nm, NCA σε DMF	189	32	5.4	33.0	3.09	5.0
400 nm, NCA σε DMF	205	35	5.8	56.0	2.01	3.4

4.2.1 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (ΔΘΣ)

Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης είναι μια τεχνική ανάλυσης των θερμικών χαρακτηριστικών [8], στην οποία μετράται η διαφορά θερμότητας H που απαιτείται για να αυξηθεί/μειωθεί η θερμοκρασία του δείγματος υπό μελέτη σε σχέση με ένα δείγμα αναφοράς. Η ενεργειακή ισορροπία ορίζει ότι ο ρυθμός θερμότητας είναι

$$dH / dt = mc_p dT / dt \quad (4.1)$$

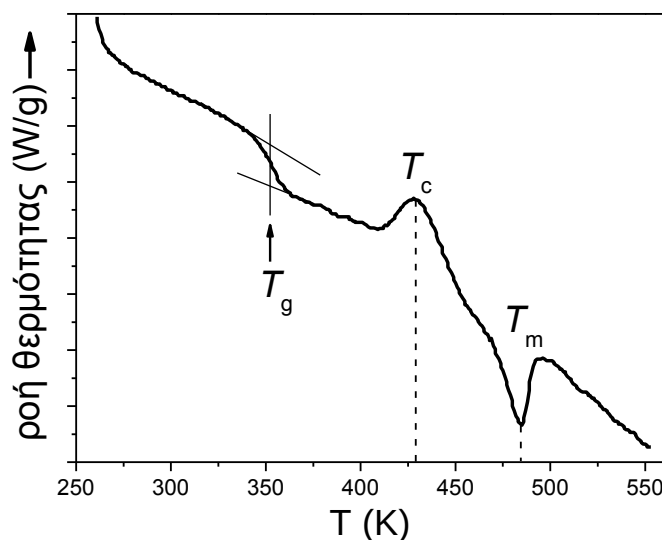
όπου m είναι η μάζα του δείγματος (~ 10 mg), c_p είναι η ειδική θερμότητα, και dT/dt είναι ο ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας.

Το “ξεπάγωμα” των βαθμών ελευθερίας του συστήματος σε $T > T_g$ (μια θερμοκρασία γνωστή ως “σημείο υάλου” (T_g)) οδηγεί σε μεταβολή της ειδικής θερμοχωρητικότητας

$c_p = \frac{1}{m} \left(\frac{dQ}{dT} \right)_p$, και έτσι η ενθαλπία του συστήματος, $\Delta H = \int C_p dT$, δεν παρουσιάζει

ασυνέχεια στο T_g , αλλά μόνο αλλαγή της εξάρτησης από τη θερμοκρασία.

Με αυτήν την τεχνική είναι δυνατό να παρατηρηθούν οι θερμοκρασίες τήξης (T_m) και κρυστάλλωσης (T_c), καθώς και η θερμοκρασία υάλου (T_g). Η τήξη και η κρυστάλλωση αντιστοιχούν σε ενδόθερμες και εξώθερμες κορυφές, αντίστοιχα, ενώ η υαλώδης μετάβαση απεικονίζεται ως “σκαλοπάτι” στο θερμογράφημα, λόγω της μεταβολής της θερμοχωρητικότητας (Εικόνα 4.7).



Εικόνα 4.7. Θερμογράφημα ΔΘΣ που δείχνει τις θερμικές μεταβολές ενός δείγματος PPSO₃: Υαλώδης μετάβαση (T_g), κρυστάλλωση (T_c), τήξη (T_m) [9].

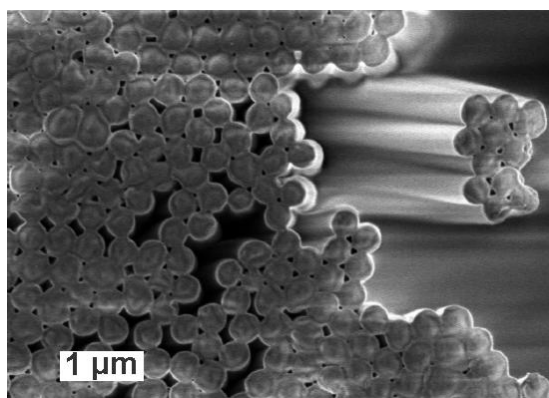
4.2.2 Πειραματική διαδικασία ΔΘΣ

Για τη θερμική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ένα θερμιδόμετρο Mettler Toledo Star. Αρχικά τα συστήματα θερμάνθηκαν με ρυθμό 10 K/min στα 423 K (543 K στο Κεφάλαιο 6) και κατόπιν ψύχθηκαν στα 123 K με 10 K/min. Μια δεύτερη θέρμανση, με τον ίδιο ρυθμό, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας υάλου, T_g , και το εύρος της μετάβασης, ΔT_g .

Η θερμοβαρυμετρική ανάλυση του Κεφαλαίου 9 έγινε με ένα TGA 851 (Mettler-Toledo της Greifensee), με ρυθμό θέρμανσης 10 K/min. Περίπου 10 mg πολυπεπτιδίων σφραγίστηκαν ερμητικά σε κάψες αλουμινίου, και τοποθετήθηκαν σε ροή αζώτου $30 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Οι θερμοκρασίες θερμικής αποσύνθεσης που βρέθηκαν ήταν $\sim 580 \text{ K}$.

4.3 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)

Στην ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) η επιφάνεια του δείγματος σαρώνεται με μια ακτίνα ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας και τα ανακλώμενα ηλεκτρόνια συλλέγονται από έναν ανιχνευτή. Η εικόνα που λαμβάνεται απεικονίζει το ανάγλυφο της επιφάνειας, τη σύσταση και άλλες ιδιότητες, όπως η ηλεκτρική αγωγιμότητα. Η τεχνική αυτή δίνει εικόνες μεγάλου βάθους πεδίου, δίνοντας μια χαρακτηριστική “τρισδιάστατη” εμφάνιση, χρήσιμη για την κατανόηση της επιφανειακής δομής. Η ανάλυση φτάνει τα $\sim 1\text{-}5 \text{ nm}$. Τα πειράματα SEM του Κεφαλαίου 9, έγιναν με ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο LEO Gemini 1530 με ανάλυση 3.5 nm (MPIP), όπου η τάση επιτάχυνσης των ηλεκτρονίων ήταν 6 kV. Ένα παράδειγμα φωτογραφίας αυτών των συστημάτων από SEM φαίνεται στην Εικόνα 4.8.



Εικόνα 4.8. Εικόνα SEM νανοράβδων PBLG διαμέτρου 400 nm.

4.4 Σκέδαση Ακτίνων-X

Το πρόβλημα του προσδιορισμού της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών είναι θεμελιώδες, διότι η δομή συνδέεται άμεσα με τη λειτουργία σε μοριακό επίπεδο, δεδομένου ότι η εξειδίκευση των ενεργών θέσεων και των θέσεων σύζευξης εξαρτάται από τις μεταξύ τους αποστάσεις στο χώρο. Για τον προσδιορισμό της δευτεροταγούς και της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών, απαιτείται λεπτομερής γνώση της διάταξης των ατόμων και οι συνηθέστερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό είναι η σκέδαση ακτίνων-X και ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) [10,11].

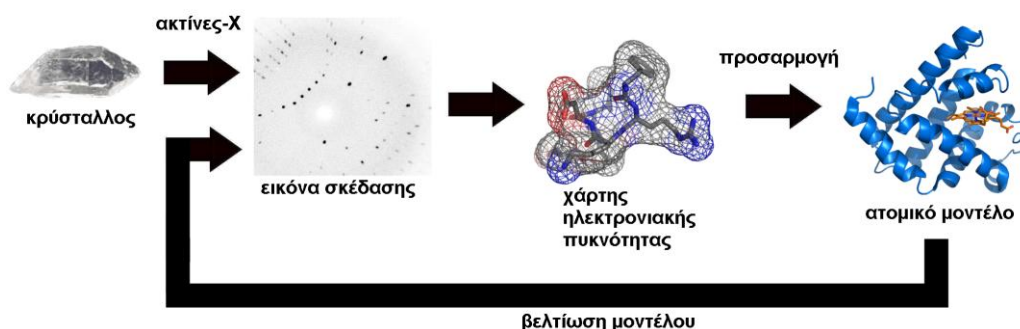
4.4.1 Εισαγωγή

Η αλληλεπίδραση των ακτίνων-X με τα ηλεκτρόνια σε μόρια διατεταγμένα σε κρυσταλλικό πλέγμα επιτρέπει, μέσω μετασχηματισμού Fourier, την κατασκευή του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Από αυτήν μπορούν να υπολογιστούν οι μέσες ατομικές αποστάσεις, και οι χημικοί τους δεσμοί. Τελικά, σχηματίζεται μια τρισδιάστατη εικόνα του μορίου (Εικόνα 4.9). Γενικά, η πρωτοταγής δομή είναι γνωστή πριν τον προσδιορισμό της δομής, και χρησιμοποιείται επικουρικά στη διαδικασία. Η σκέδαση ακτίνων-X είναι ένα χρήσιμο εργαλείο στη μελέτη μακρομορίων, διότι η εικόνα σκέδασης εξαρτάται ευθέως από την ατομική διάταξη, και επομένως τη δομή του συστήματος υπό μελέτη. Έχει συνεισφέρει σημαντικά στη μελέτη μακρομορίων βιοχημικής και ιατρικής σημασίας [12].

Η πληροφορία που λαμβάνεται από τη σκέδαση ακτίνων-X είναι, βεβαίως, στατικής φύσεως: Η ένταση σκέδασης ισούται με

$$I = I_0 \exp\left(-\frac{1}{3}\langle u^2 \rangle G^2\right) \quad (4.2)$$

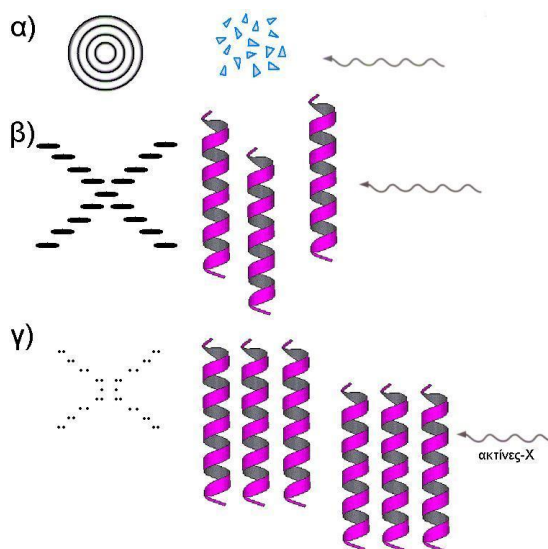
όπου I_0 είναι η σκεδαζόμενη ένταση από το στερεό πλέγμα, και ο εκθετικός όρος είναι ο συντελεστής Debye-Waller, που περιέχει τη μέση τιμή του τετραγώνου της μετατόπισης ενός ατόμου, u , και G το άνυσμα του αντίστροφου πλέγματος. Παρά το γεγονός ότι δεν μπορεί να διακριθεί η προέλευση των κινήσεων, καθώς πρόκειται για μια στατική μέτρηση ($I = \int_0^\infty I(\omega) d\omega$), η σκέδαση ακτίνων-X μπορεί να δώσει πολύ χρήσιμες πληροφορίες, καθώς η δομή σχετίζεται στενά και επηρεάζει τη δυναμική των πολυπεπτιδίων, όπως θα δούμε στη συνέχεια της εργασίας.



Εικόνα 4.9. Πορεία εύρεσης της δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ. Η δομή της μυογλοβίνης, που περιγράφεται στην εικόνα, ήταν η πρώτη που βρέθηκε με σκέδαση ακτίνων-Χ [13].

4.4.2 Σκέδαση από έλικα

Η σκέδαση από έλικα προσδιορίστηκε αρχικά από τους Cochran *et al.* [14]. Τα πολυπεπίδια που σχηματίζουν έλικες δίνουν μια εικόνα της μορφής “X” στη σκέδαση ακτίνων-Χ. Οι αποστάσεις που υπολογίζονται από τις ισημερινές ανακλάσεις δείχνουν το είδος της μοναδιαίας κυψελίδας και τη σχετική απόσταση των ελίκων στη μοναδιαία κυψελίδα. Καθώς ο βαθμός οργάνωσης μειώνεται, τα ίχνη σκέδασης διευρύνονται. Για μια τελείως ακανόνιστη διάταξη, το διάγραμμα σκέδασης είναι όπως εκείνο από ένα μόνο μόριο, με κυκλική συμμετρία και ισότροπη ένταση προς όλες τις κατευθύνσεις (Εικόνα 4.10α). Πολλά βιολογικά μακρομόρια δεν κρυσταλλώνονται, όμως οι εκτεταμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες μέσα σε μια ίνα δείγματος από εφελκυσμό τείνουν να προσανατολίζονται παράλληλα μεταξύ τους. Πρέπει να τονιστεί ότι η οργάνωση προϋπάρχει· ο εφελκυσμός απλώς βελτιώνει το αποτέλεσμα της σκέδασης. Ο βαθμός οργάνωσης της δομής καθορίζει αν οι ανακλάσεις που λαμβάνονται είναι λιγότερο ή περισσότερο οξείες (Εικόνα 4.10β, γ) [15].



Εικόνα 4.10. Εικόνες σκέδασης από συστήματα με διαφορετικό βαθμό οργάνωσης: (α) Σκεδαστές με τυχαίες σχετικές θέσεις. (β) Ασθενώς οργανωμένες έλικες δίνουν ένα σχετικά διάχυτο φάσμα. Οι έλικες είναι παράλληλες μεταξύ τους, και γι’ αυτό οι ανακλάσεις εμφανίζουν οργάνωση. (γ) Σκέδαση από ίνα που περιέχει καλά οργανωμένους κρυσταλλίτες. Οι έλικες σε κάθε κρυσταλλίτη είναι παράλληλες, και έχουν σταθερές μεταξύ τους αποστάσεις.

4.4.3 Σκέδαση Ακτίνων-X σε Μικρές Γωνίες (SAXS)

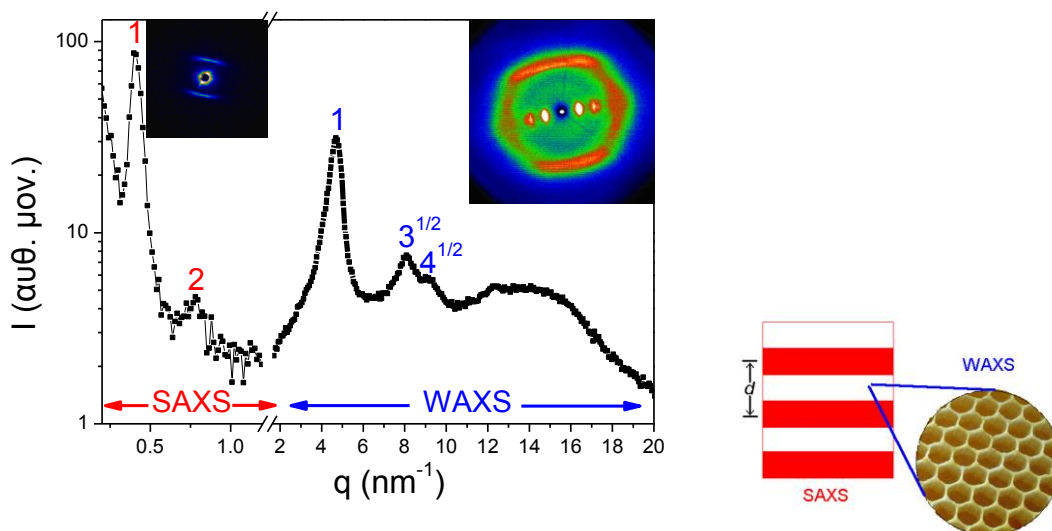
Η σκέδαση ακτίνων-X σε μικρές γωνίες (small-angle X-ray scattering, SAXS) περιγράφει την ελαστική σκέδαση ακτίνων-X από δείγμα στο οποίο προσπίπτει υπό μικρή γωνία (0.1° - 10°). Αυτή η ζώνη γωνιών παρέχει πληροφορίες σχετικά με χαρακτηριστικές αποστάσεις σε συστήματα που εμφανίζουν διαχωρισμό φάσεων, της τάξης των 5-100 nm. Το πλεονέκτημα της SAXS έναντι της συνήθους κρυσταλλογραφίας είναι ότι το δείγμα δεν απαιτείται να είναι κρυσταλλικό, γεγονός χρήσιμο στην περίπτωση των βιολογικών μακρομορίων, αρκεί να υπάρχει αρκετή ηλεκτρονική αντίθεση μεταξύ των φάσεων.

4.4.4 Σκέδαση Ακτίνων-X σε Ευρείες Γωνίες (WAXS)

Η σκέδαση ακτίνων-X σε ευρείες γωνίες (wide-angle X-ray scattering, WAXS) χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής πολυμερών. Βασίζεται στην ανάλυση ανακλάσεων Bragg οι οποίες προέρχονται από δομές νανομετρικής κλίμακας (0.3-4 nm). Η σκέδαση WAXS μοιάζει με τη σκέδαση SAXS, με τη διαφορά ότι η απόσταση δείγματος-ανιχνευτή είναι μικρότερη και έτσι παρατηρούνται ανακλάσεις σε μεγαλύτερες γωνίες. Ιδιαίτερα η διδιάστατη σκέδαση WAXS είναι εξαιρετικά χρήσιμη, διότι επιτρέπει την ταυτόχρονη μελέτη της διάταξης σε δύο κατευθύνσεις. Στην περίπτωση προσανατολισμένης ίνας πολυπεπτιδίων, η διδιάστατη σκέδαση WAXS παρέχει πληροφορίες τόσο για τη συναρμογή των κύριων αλυσίδων όσο και για την οργάνωση των πλευρικών ομάδων. Η Εικόνα 4.11 δείχνει μία ένωση εικόνων SAXS και WAXS, μαζί με τις διαστάσεις που προσδιορίζονται με κάθε τεχνική, όπου I είναι η σκεδαζόμενη ένταση σε γωνία 2θ , και κυματάνυσμα σκέδασης

$$q = \left(\frac{4\pi}{\lambda} \right) \sin \left(\frac{2\theta}{2} \right) \quad (4.3)$$

όπου λ το μήκος κύματος των ακτίνων-X.



Εικόνα 4.11. Συνδυασμένα φάσματα SAXS και WAXS δισυσταδικού συμπολυμερούς PBLG-b-PZLL (Κεφάλαιο 7), μαζί με τις αντίστοιχες διδιάστατες εικόνες. Η σχετική ένταση έχει διορθωθεί ώστε να συμφωνεί μεταξύ SAXS και WAXS. Στις μικρές γωνίες τα μέγιστα βρίσκονται σε σχετικές θέσεις 1:2 (φυλλοειδής μορφολογία), ενώ στις μεγάλες βρίσκονται σε θέσεις $1:3^{1/2}:4^{1/2}$ (εξαγωνικά διατεταγμένες έλικες). Στο γράφημα στα δεξιά φαίνεται ότι οι δύο τεχνικές λειτουργούν συμπληρωματικά. Ο νανοφασικός διαχωρισμός ανιχνεύεται από τη σκέδαση SAXS ενώ η κρυσταλλική δομή από τη σκέδαση WAXS.

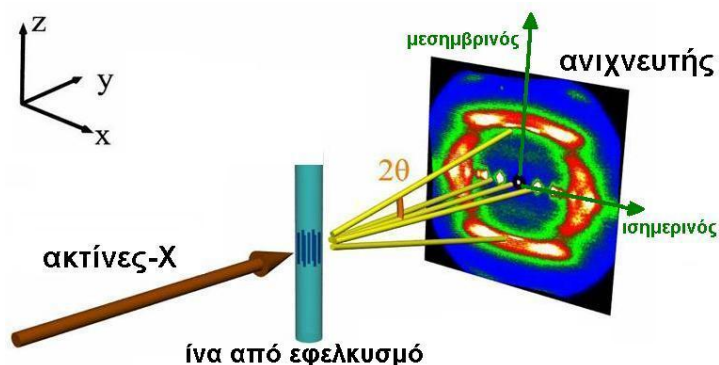
4.4.5 Πειραματική διαδικασία ακτίνων-X

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας πραγματοποιήθηκαν πειράματα σκέδασης ακτίνων-X τόσο σε ευρείες (WAXS) όσο και σε μικρές (SAXS) γωνίες. Οι παράμετροι και οι συνθήκες μέτρησης όλων των δειγμάτων παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 4.7. Τα πειράματα των Κεφαλαίων 5-9 έγιναν σε μακροσκοπικά προσανατολισμένες ίνες διαμέτρου 0.7 mm. Ο μακροσκοπικός προσανατολισμός είναι αποτέλεσμα του προσανατολισμού της κύριας αλυσίδας παράλληλα με τον άξονα της ίνας, και βοηθάει σημαντικά στο χαρακτηρισμό της δομής [16]. Χρησιμοποιήθηκε μια πηγή ακτίνων-X Rigaku περιστρεφόμενης ανόδου 18 kW, με κατευθυντήρα οπής και διδιάστατο ανιχνευτή Bruker ανάλυσης 1024×1024 εικονοστοιχείων, ενώ ένας διπλός μονοχρωμάτορας γραφίτη για την ακτινοβολία Cu K α ($\lambda=0.154$ nm) τοποθετήθηκε μπροστά στο δείγμα. Οι καταγεγραμμένες διδιάστατες εντάσεις μελετήθηκαν κατά την αζιμουθιακή γωνία και παρουσιάζονται συναρτήσει του κυματανύσματος σκέδασης q . Οι μετρήσεις ήταν διάρκειας μίας ώρας, με σταθεροποίηση θερμοκρασίας ± 0.2 K.

Για το Κεφάλαιο 8 έγιναν και πειράματα σκέδασης WAXS σε γεωμετρία θ - θ με ένα περιθλασίμετρο Siemens D500T σε γεωμετρία ανάκλασης. Χρησιμοποιήθηκε η ακτινοβολία Cu K α μιας γεννήτριας Siemens Kristalloflex 710H που λειτουργεί στα 35 kV και 30 mA, ενώ ένας μονοχρωμάτορας γραφίτη τοποθετήθηκε μπροστά από τον ανιχνευτή ($\lambda=0.154$ nm). Τα

πειράματα SAXS για τα συστήματα του Κεφαλαίου 8 έγιναν στη γραμμή X27C ($\lambda=0.1371$ nm) του BNL από τον Δρ. Π. Παπαδόπουλο.

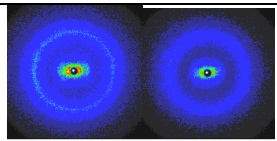
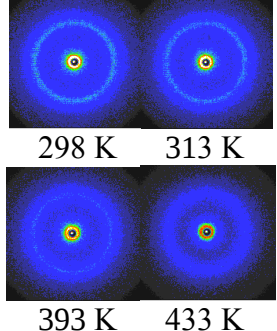
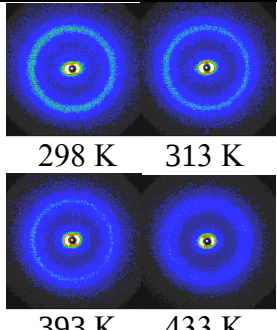
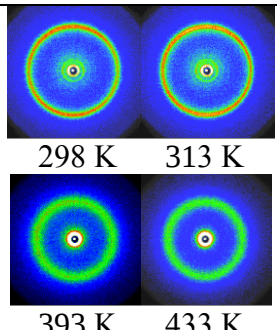
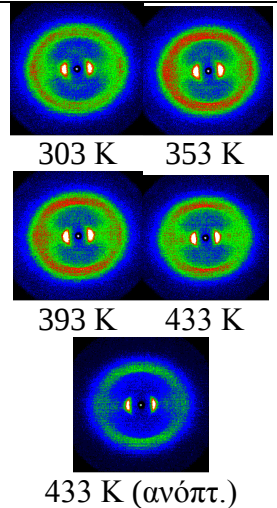
Η πειραματική διάταξη σκέδασης από μία ίνα από εφελκυσμό φαίνεται στην Εικόνα 4.12. Η δέσμη ακτίνων-X προσπίπτει κάθετα στην ίνα και πίσω της σχηματίζεται η διδιάστατη εικόνα σκέδασης. Επειδή η ίνα είναι τοποθετημένη κάθετα στην προσπίπτουσα δέσμη, οι μεσημβρινές ανακλάσεις προέρχονται από ενδομοριακή οργάνωση, ενώ οι ισημερινές ανακλάσεις από διαμοριακή.

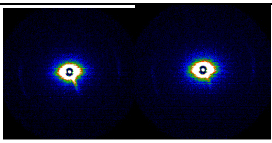
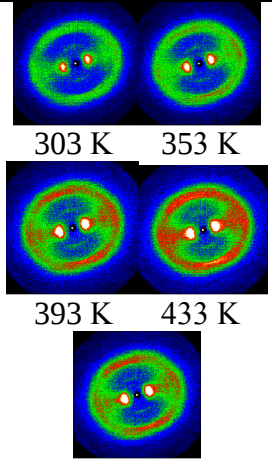
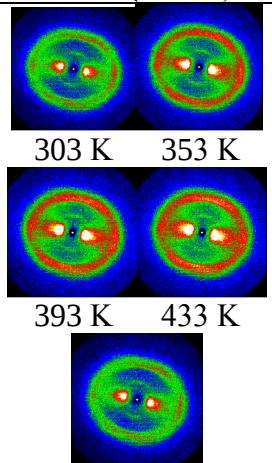
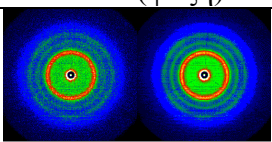
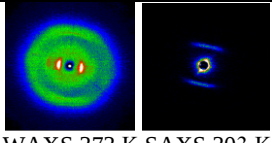


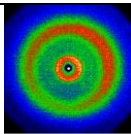
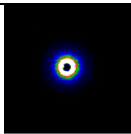
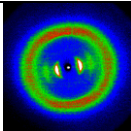
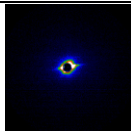
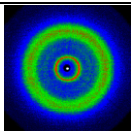
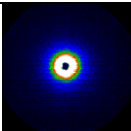
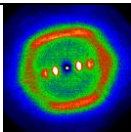
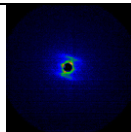
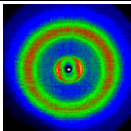
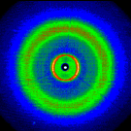
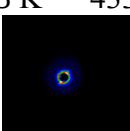
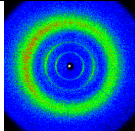
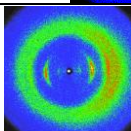
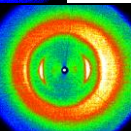
Εικόνα 4.12. Διάταξη διδιάστατων μετρήσεων ακτίνων-X (WAXS) από προσανατολισμένες ίνες PBLG [17]. Η ίνα τοποθετείται κάθετα στη δέσμη ακτίνων X και παράλληλα προς τον ανιχνευτή (βλ. και Εικ. 5.11 για την περιγραφή της εικόνας σκέδασης).

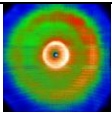
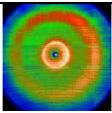
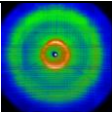
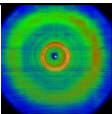
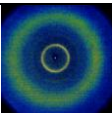
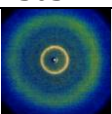
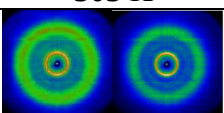
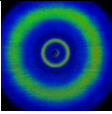
Πίνακας 4.7. Πειραματικές συνθήκες σκέδασης ακτίνων-X.

δείγμα	μέθοδος	T_{ext} (K)	T_{meas} (K)	ανόπτηση	απόσταση δείγματος- ανιχνευτή (m)	διδιάστατες εικόνες
Κεφάλαιο 5						
PMLG	WAXS WAXS	343 343	298 433	όχι όχι	0.072	 298 K 433 K
MS10	WAXS WAXS WAXS	343 343 343	303 393 433	όχι όχι όχι	0.072	 303 K 393 K 433 K
MS18	WAXS WAXS	343 343	298 313	όχι όχι	0.072	 298 K 313 K

δείγμα	μέθοδος	T_{ext} (K)	T_{meas} (K)	ανόπτηση	απόσταση δείγματος-ανιχνευτή (m)	διδιάστατες εικόνες
MS18	WAXS WAXS	343 343	393 433	όχι όχι	0.072	 393 K 433 K
MS30	WAXS WAXS WAXS WAXS	348 348 348 348	298 313 393 433	όχι όχι όχι όχι	0.072	 298 K 313 K 393 K 433 K
MS47	WAXS WAXS WAXS WAXS	343 343 343 343	298 313 393 433	όχι όχι όχι όχι	0.072	 298 K 313 K 393 K 433 K
PSLG	WAXS WAXS WAXS WAXS	308 308 308 308	298 313 393 433	όχι όχι όχι όχι	0.072	 298 K 313 K 393 K 433 K
Κεφάλαιο 6						
PBLG ₁₀₄ - <i>b</i> -PAla ₂₄	WAXS WAXS WAXS WAXS WAXS	353 353 353 353 353	303 353 393 433 433	όχι όχι όχι όχι ναι (16 h @ 393 K)	0.0705	 303 K 353 K 393 K 433 K 433 K (ανόπτ.)

δείγμα	μέθοδος	T_{ext} (K)	T_{meas} (K)	ανόπτηση	απόσταση δείγματος-ανιχνευτή (m)	διδιάστατες εικόνες
PBLG ₁₀₄ - <i>b</i> -PAla ₂₄	SAXS SAXS	353 353	303 353	όχι όχι	1.8	 303 K 353 K
PBLG ₁₁₅ - <i>b</i> -PAla ₄₈	WAXS WAXS WAXS WAXS WAXS	413 413 413 413 413	303 353 393 433 433	όχι όχι όχι όχι ναι (10 h @ 433 K)	0.0705	 303 K 353 K 393 K 433 K 433 K (ανόπτ.)
PBLG ₁₀₅ - <i>b</i> -PAla ₇₉	WAXS WAXS WAXS WAXS WAXS	463 463 463 463 463	303 353 393 433 303	όχι όχι όχι όχι όχι (ψύξη)	0.0705	 303 K 353 K 393 K 433 K 303 K (ψύξη)
PAla ₁₀₇	WAXS WAXS	σκόνη σκόνη	303 433	όχι όχι	0.0705	 303 K 433 K
Κεφάλαιο 7						
Diblock _L	WAXS SAXS	313 313	373 303	όχι όχι (ψύξη)	0.07 1.8	 WAXS 373 K SAXS 303 K

δείγμα	μέθοδος	T_{ext} (K)	T_{meas} (K)	ανόπτηση	απόσταση δείγματος-ανιχνευτή (m)	διδιάστατες εικόνες
Star _L	WAXS	313	373	όχι	0.07	  WAXS 373 K SAXS 303 K
	SAXS	313	303	όχι (ψύξη)	1.8	
Diblock _M	WAXS	353	373	όχι	0.07	  WAXS 373 K SAXS 303 K
	SAXS	353	303	όχι (ψύξη)	1.8	
Star _M	WAXS	313	373	όχι	0.07	  WAXS 373 K SAXS 303 K
	SAXS	313	303	όχι (ψύξη)	1.8	
Diblock _H	WAXS	328	373	όχι	0.07	  WAXS 373 K SAXS 303 K
	SAXS	328	303	όχι (ψύξη)	1.8	
Star _H	WAXS	328	373	όχι	0.07	  373 K 433 K  303 K
	WAXS	328	433	όχι	0.07	
	SAXS	328	303	όχι (ψύξη)	1.8	
Κεφάλαιο 8						
G ₁ F ₈ N ₇₄	WAXS	423	303	όχι	0.072	
G ₂ F ₁₆ N ₆₈	WAXS WAXS	423	303 393	όχι όχι	0.072	  303 K 393 K
G ₁ F ₄ N ₁₄ G ₁ F ₄ N ₅₄ G ₁ F ₄ N ₈₄ G ₁ F ₈ N ₁₂ G ₁ F ₈ N ₆₀ G ₁ F ₈ N ₇₄ G ₂ F ₈ N ₉ G ₂ F ₈ N ₂₂ G ₂ F ₈ N ₃₇ G ₂ F ₁₆ N ₁₆ G ₂ F ₁₆ N ₅₈ G ₂ F ₁₆ N ₆₈	(σε όλα τα δείγματα) θ - θ WAXS και SAXS	- - -	393 373 333 313 303 393 363 333 303	όχι όχι	0.072 2.173	

δείγμα	μέθοδος	T_{ext} (K)	T_{meas} (K)	ανόπτηση	απόσταση δείγματος-ανιχνευτή (m)	διδιάστατες εικόνες
Κεφάλαιο 9						
400 nm NCA- DMF ενσωματ.	WAXS	-	303 353 393 433	όχι όχι όχι ναι (12 h)	0.0705	 303 K
200 nm NCA- DMF ενσωματ.	WAXS	-	303 353 393 433	όχι όχι όχι ναι (12 h)	0.0705	 303 K
65 nm NCA- DMF ενσωματ.	WAXS	-	303 353 393 433	όχι όχι όχι ναι (12 h)	0.0705	 303 K
25 nm NCA- DMF ενσωματ.	WAXS	-	303 353 393 433	όχι όχι όχι ναι (12 h)	0.0705	 303 K
400 nm NCA- THF ενσωματ.	WAXS	-	303 353 393 433	όχι όχι όχι ναι (12 h)	0.0705	 303 K
200 nm NCA- THF ενσωματ.	WAXS	-	303 353 393 433	όχι όχι όχι ναι (12 h)	0.0705	 303 K
65 nm NCA- THF ενσωματ.	WAXS	-	303 333 363 393 423 303	όχι όχι όχι όχι ναι (12 h) όχι (ψύξη)	0.0705	 303 K 423 K
25 nm NCA- THF ενσωματ.	WAXS	-	303 353 393 433	όχι όχι όχι ναι (12 h)	0.0705	 303 K

4.5 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

4.5.1 Φασματοσκοπία NMR σε πολυπεπτίδια και πρωτεΐνες

Η φασματοσκοπία NMR έχει βρει εφαρμογή στο πεδίο των πρωτεϊνών, όπου έχει γίνει ένα σημαντικό εργαλείο της δομικής βιολογίας. Στόχος είναι η εύρεση της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών, όπως και στην περίπτωση της χρήσης κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X. Στο NMR, οι ιδιότητες του μαγνητικού σπιν των ατομικών πυρήνων χρησιμοποιούνται για να βρεθούν οι αποστάσεις μεταξύ ατόμων στο μόριο, μέσω των οποίων προσδιορίζεται η τρισδιάστατη δομή του πολυπεπτιδίου. Οι χημικές μετατοπίσεις που παρατηρούνται πειραματικά είναι αποτέλεσμα της πυρηνικής θωράκισης, η οποία επιδρά στην κατανομή των φορτίων, στους δεσμούς, και στις διαμορφώσεις των μακρομορίων. Οι συσχετίσεις μεταξύ των δομικών αμινοξέων επιτρέπουν την απόδοση των χημικών μετατοπίσεων στον ακριβή τύπο και κατάσταση των ατόμων επάνω στην πολυπεπτιδική αλυσίδα. Για παράδειγμα, στα φάσματα NMR ενός πολυπεπτιδίου με διαμόρφωση α-έλικας παρουσιάζονται δύο πρωτόνια που υποδεικνύουν τη διαμόρφωση: το N-H και το C α -H. Επίσης, το μήκος και η ισχύς των δεσμών υδρογόνου σε πρωτεΐνες μπορούν να μετρηθούν με μεθόδους NMR [18,19]. Πειράματα NMR στερεάς κατάστασης σε κρυστάλλους αμινοξέων και άλλων καρβοξυλικών οξέων έδωσαν μια συσχέτιση μεταξύ της χημικής μετατόπισης των ^1H και του μήκους των δεσμών υδρογόνου [20]. Το δε NMR δύο διαστάσεων, επιτρέπει το χαρακτηρισμό της δομής περισσότερο σύνθετων πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνών [21].

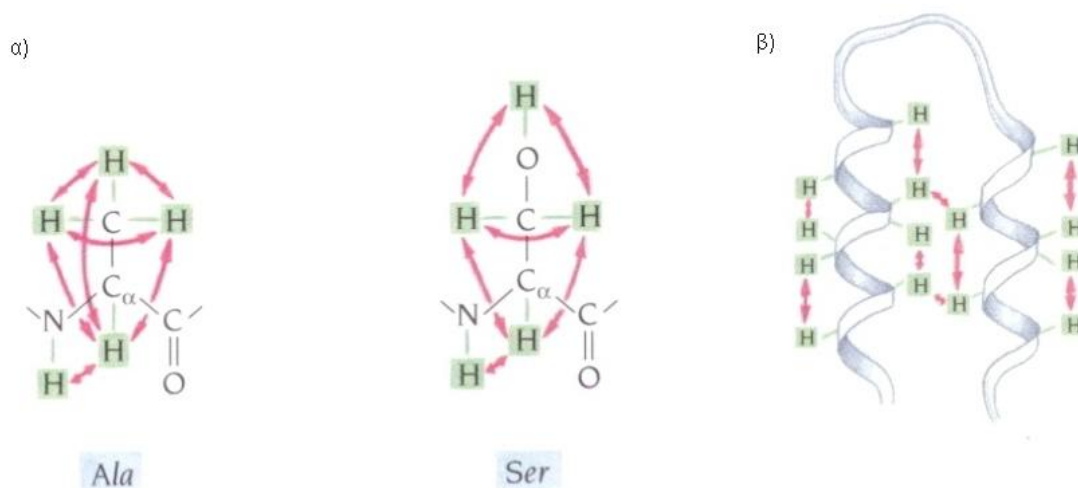
Ο προσδιορισμός της διαμόρφωσης με χρήση ^{13}C NMR είναι εφικτός επειδή η χημική μετατόπιση κάθε NH πρωτονίου σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα δεν εξαρτάται από την παρουσία και μόνο ενός αμινοξέος, αλλά και από τη σχετική δευτεροταγή διαμόρφωση της αλυσίδας. Αντίθετα, τα φάσματα ^{13}C NMR ενός πολυπεπτιδίου εξαρτώνται από την ευκινησία των ατόμων άνθρακα. Σε ένα ημικρυσταλλικό πολυμερές, λόγω χάρη, μπορούν να παρατηρηθούν οι συντονισμοί των ατόμων άνθρακα που οφείλονται στο κρυσταλλικό και στο άμορφο τμήμα. Αυτός ο διαχωρισμός είναι εφικτός λόγω της διαφορετικής ευκινησίας του πολυμερούς σε κάθε φάση. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των πειραμάτων CP-MAS NMR (cross-polarization magic angle spinning NMR, NMR διασταυρούμενης πόλωσης - περιστροφής υπό μαγική γωνία) είναι η υψηλή τους διακριτική ικανότητα, η οποία επιτρέπει τη συλλογή πληροφοριών για κάθε συντονισμό ^{13}C ξεχωριστά. Έτσι είναι δυνατό να ανιχνευθούν κινήσεις που λαμβάνουν χώρα είτε στην κύρια αλυσίδα είτε στις πλευρικές ομάδες. Τα φάσματα NMR των συμπολυμερών κατά συστάδες (*block*) ή εμβολιασμένα (*graft*) μοιάζουν πολύ με εκείνα των καθαρών συστατικών, με τη διαφορά ότι από τις σχετικές εντάσεις – σε ορισμένες περιπτώσεις – μπορεί να υπολογιστεί το μέσο μήκος των

συστάδων στο συμπολυμερές. Αντίθετα, στα τυχαία συμπολυπεπτίδια, το παρατηρούμενο NMR μπορεί να διαφέρει σημαντικά σε σχέση με τα καθαρά συστατικά, καθώς η εκάστοτε αλληλουχία μπορεί να τροποποιήσει την τοπική μικροδομή, όπως θα δούμε στη συνέχεια της εργασίας (Κεφάλαιο 5).

4.5.2 Προσδιορισμός της μικροδομής

Ορισμένοι ατομικοί πυρήνες, όπως οι ^1H , ^{13}C , ^{15}N , και ^{31}P , έχουν μαγνητική διπολική ροπή (σπιν). Από το χημικό περιβάλλον κάθε πυρήνα μπορεί να εξαχθεί πληροφορία για τις αποστάσεις μεταξύ των ατόμων σε ένα μόριο. Αυτές οι αποστάσεις μπορούν κατόπιν να χρησιμοποιηθούν για να δημιουργηθεί ένα τρισδιάστατο μοντέλο του μορίου. Οι περισσότεροι χαρακτηρισμοί της δομής των πρωτεϊνών χρησιμοποιούν το σπιν του ^1H , μια και τα άτομα υδρογόνου είναι άφθονα στις πρωτεΐνες. Οι συγκεντρώσεις των ισοτόπων στη φύση είναι 99.980%, 1.108%, 0.37%, και 100.00% για τα ^1H , ^{13}C , ^{15}N , και ^{31}P , αντίστοιχα. Για την ακριβέστερη ανάλυση μεγαλύτερων πρωτεϊνών είναι απαραίτητη η μελέτη με ^{13}C και ^{15}N .

Όταν μόρια πολυπεπτιδίων τοποθετούνται σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο, το σπιν των ατόμων υδρογόνου προσανατολίζεται κατά μήκος του πεδίου. Αυτή η ισορροπία μπορεί να διαταραχθεί προς μια διεγερμένη κατάσταση με εφαρμογή ραδιοκυμάτων. Καθώς οι πυρήνες των μορίων επανέρχονται στην κατάσταση ισορροπίας, εκπέμπουν ραδιοκύματα τα οποία μπορούν να ανιχνευτούν. Η ακριβής συχνότητα της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας από κάθε πυρήνα εξαρτάται από το μοριακό περιβάλλον και είναι διαφορετική για κάθε άτομο. Αυτές οι διαφορετικές συχνότητες λαμβάνονται ως προς μια συχνότητα αναφοράς, και ονομάζονται *χημικές μετατοπίσεις* (*chemical shifts*). Για την ανίχνευση χημικά ισοδύναμων πρωτονίων εφαρμόζονται δύο τεχνικές: Η φασματοσκοπία συσχέτισης (COSY, *correlation spectroscopy*) και η NOE (*nuclear Overhauser effect*). Η πρώτη, δίνει χημικές μετατοπίσεις μεταξύ ατόμων υδρογόνου που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα μέσω ενός ή δύο άλλων ατόμων, για παράδειγμα τα άτομα υδρογόνου που είναι προσαρτημένα στα άτομα N και C_α εντός του ίδιου αμινοξέος (Εικόνα 4.13α). Η δεύτερη, δίνει χημικές μετατοπίσεις μεταξύ ζευγών ατόμων υδρογόνου που βρίσκονται πλησιέστερα στο χώρο, ακόμα κι αν δεν ανήκουν στο ίδιο αμινοξύ (Εικόνα 4.13β) [22]. Τα διδιάστατα φάσματα NOE μπορούν να καθορίσουν την τρισδιάστατη δομή των πρωτεϊνών, προσδιορίζοντας ποιες ομάδες ατόμων βρίσκονται κοντά στο χώρο.



Εικόνα 4.13. Αλληλεπιδράσεις (κόκκινα βέλη) μεταξύ (α) πρωτονίων εντός των αμινοξέων Ala και Ser (COSY NMR), και (β) πρωτονίων που βρίσκονται κοντά στο χώρο αλλά δεν ανήκουν απαραίτητα στο ίδιο αμινοξύ (NOE NMR). Η δευτεροταγής και η τριτοταγής δομή μικρών πρωτεϊνών μπορούν να προσδιοριστούν από σύνολα τέτοιων σημάτων, μέσω των διατομικών αποστάσεων (εικ. από την αναφ. [22]).

Πίνακας 4.8. Τυπικές χημικές μετατοπίσεις ^1H πολυπεπτιδίων [23].

δ (ppm)	πρωτόνιο συντονισμού
0.9-1.4	CH_3 των A, I, L, T, V
2.1	ϵCH_3 της M
1.2-2.3	CH_2 και CH χωρίς γειτονικές ηλεκτραρνητικές ή αρωματικές ομάδες (βCH_2 · βCH των E, I, K, L, M, P, Q, R, V· γCH_2 · γCH των I, K, L, P, R· δCH της K)
2.3-3.7	CH_2 με γειτονικές αρωματικές ή καρβονυλικές ομάδες, ή άτομα αζώτου ή θείου (βCH_2 των C, D, F, H, N, W, Y· γCH_2 των E, M, Q· δCH_2 των P, R· $\epsilon_1\text{CH}_2$ της K)
3.9-4.2	βCH της T· βCH_2 της S
3.9-4.8	αCH , αCH_2
6.8-7.7	Αρωματικά CH εκτός από το ϵCH της H
7.7-8.6	$\epsilon_1\text{CH}$ της H
6.6-7.6	NH σε πλευρικές ομάδες των K, N, Q, R
8.1-8.8	NH κύριας αλυσίδας
10.2	Αρωματικό NH της W

Πίνακας 4.9. Η χημική μετατόπιση ^1H για αμινοξέα τυχαίας εκτεταμένης αλυσίδας [24].

αμινοξύ	NH	αH	βH	άλλα	
Gly	8.39	3.97			
Ala	8.25	4.35	1.39		
Val	8.44	4.18	2.13	γCH_3	0.97, 0.94
Ile	8.19	4.23	1.90	γCH_2	1.48, 1.19
				γCH_3	0.95
				δCH_3	0.89
Leu	8.42	4.38	1.65, 1.65	γH	1.64
				δCH_3	0.94, 0.90
Pro ^a		4.44	2.28, 2.02	γCH_2	2.03, 2.03
				δCH_2	3.68, 3.65
Ser	8.38	4.50	3.88, 3.88		
Thr	8.24	4.35	4.22	γCH_3	1.23
Asp	8.41	4.76	1.84, 1.75		
Glu	8.37	4.29	2.09, 1.97	γCH_2	2.31, 2.28
Lys	8.41	4.36	1.85, 1.76	γCH_2	1.45, 1.45
				δCH_2	1.70, 1.70
				ϵCH_2	3.02, 3.02
				ϵNH_3^+	7.52
Arg	8.27	4.38	1.89, 1.79	γCH_2	1.70, 1.70
				δCH_2	3.32, 3.32
				NH	7.17, 6.62
Asn	8.75	4.75	2.83, 2.75	γNH_2	7.59, 6.91
Gln	8.41	4.37	2.13, 2.01	γCH_2	2.38, 2.38
				δNH_2	6.87, 7.59
Met	8.42	4.52	2.15, 2.01	γCH_2	2.64, 2.64
				ϵCH_3	2.13
Cys	8.31	4.69	3.28, 2.96		
Trp	8.09	4.70	3.32, 3.19	2H	7.24
				4H	7.65
				5H	7.17
				6H	7.24
				7H	7.50
				NH	10.22
Phe	8.23	4.66	3.22, 2.99	2,6H	7.30
				3,5H	7.39
				4H	7.34
Tyr	8.18	4.60	3.13, 2.92	2,6H	7.15
				3,5H	6.86
His	8.41	4.63	3.26, 3.20	2H	8.12
				4H	7.14

^a Δεδομένα για *trans*-Pro.

Πίνακας 4.10. Η χημική μετατόπιση ^{13}C για αμινοξέα τυχαίας εκτεταμένης αλυσίδας [24].

αμινοξύ	C=O	C _α	C _β	C _γ	C _δ	C _ε	C _ζ
Gly ^α	172.7	43.5					
Ala ^β	175.8	50.8	17.7				
Val ^α	174.9	60.7	30.8	19.3			
				18.5			
Ile ^α	174.8	59.6	36.9	25.4	11.3		
				15.7			
Leu ^α	175.9	53.6	40.5	25.2	23.1		
					21.6		
Ser ^β	172.6	56.6	62.3				
Thr ^β	172.7	60.2	68.3	20.0			
Pro ^β	175.2	61.6	30.6	25.5	48.2		
		61.3	33.1	23.2	48.8		
Asp ^β	174.2	52.7	39.8	178.4			
Glu ^β	174.8	54.9	28.9	34.6	182.8		
Lys ^β	174.7	54.4	27.5	23.1	31.8	40.5	
Arg ^α	175.0	54.6	28.8	25.7	41.7		157.6
Asn ^β	173.1	51.5	37.7	175.6			
Gln ^β	174.0	54.1	28.1	32.2	179.0		
Met ^α	175.0	53.9	31.0	30.7		15.0	
Cys	175.7	57.9	26.0	Άνθρακες δακτυλίου			
				C2	123.0		
				C5	122.9		
				C3	108.4		
				C4	120.3		
				C6	119.3		
				C7	112.8		
				C8	137.3		
				C9	127.5		
Phe	176.0	57.4	37.0	C1	136.2		
				C2,6	130.3		
				C3,5	130.3		
				C4	128.6		
Tyr	176.0	57.4	37.0	C1	(128.0)		
				C2,6	130.0		
				C3,5	117.0		
				C4	156.0		
His ^β	172.6	53.7	28.0	C2	135.2		
				C4	118.7		
				C5	130.3		

^α Οι θέσεις των δ δίνονται ως προς το TMS (τετραμεθυλοσιλάνιο). Από το βιβλίο: Wüthrich, K. “NMR of proteins and nucleic acids”, John Wiley, 1986, μετρημένα σε γραμμικά πενταπεπτίδια H-Gly-Gly-X-Gly-Gly-OH. Για τη μετατροπή σε κλίμακα TMS χρησιμοποιήθηκε δ(CS₂)=193.7 ppm.

^β Μετρημένα σε προστατευμένα γραμμικά τετραπεπτίδια TFA-Gly-Gly-X-L-Ala-OCH₃. Για τη μετατροπή σε κλίμακα TMS χρησιμοποιήθηκε δ(εσωτερικής διοξάνης)=67.8 ppm.

4.5.3 Πυρηνικό σπιν

Τα στοιχειώδη σωμάτια που συγκροτούν τους ατομικούς πυρήνες – νετρόνια και πρωτόνια – έχουν την ενδογενή κβαντομηχανική ιδιότητα του σπιν. Το ολικό σπιν του πυρήνα προσδιορίζεται από τον κβαντικό αριθμό σπιν I . Ένα μη μηδενικό σπιν σχετίζεται με μια μη μηδενική μαγνητική ροπή μ ως εξής:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad (4.4)$$

όπου ο συντελεστής αναλογίας γ είναι ο γυρομαγνητικός λόγος. Η συνιστώσα z του ανύσματος στροφορμής είναι $I_z = m\hbar$, όπου $\hbar$ είναι η ανηγμένη σταθερά του Planck και η συνιστώσα z της μαγνητικής ροπής είναι

$$\mu_z = \gamma I_z = m\gamma\hbar \quad (4.5)$$

4.5.4 Αλληλεπιδράσεις του πυρηνικού σπιν σε μαγνητικό πεδίο.

α) Χημική προστασία πυρήνα

Σε έναν πυρήνα με σπιν $1/2$, όπως το ^1H και ο ^{13}C , ο πυρήνας έχει δύο δυνατές καταστάσεις σπιν: $m=+1/2$ ή $m=-1/2$. Οι ενέργειες αυτών των καταστάσεων είναι εκφυλισμένες. Επομένως οι πληθυσμοί των δύο καταστάσεων θα είναι περίπου ίσοι στη θερμική ισορροπία. Όταν όμως ένας πυρήνας τεθεί σε μαγνητικό πεδίο, η αλληλεπίδραση μεταξύ της πυρηνικής μαγνητικής ροπής και του εξωτερικού πεδίου θα προσδώσει επιπλέον ενέργεια

$$E = -\vec{B}_0 \cdot \vec{\mu} = -\mu_z B_0 = -m\hbar\gamma B_0 \quad (4.6)$$

όπου το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο έχει προσανατολισμό κατά τον άξονα z . Ως αποτέλεσμα οι διαφορετικές καταστάσεις σπιν έχουν διαφορετικές ενέργειες σε μη μηδενικό μαγνητικό πεδίο. Η διαφορά στην ενέργεια είναι

$$\Delta E = \hbar\gamma B_0 \quad (4.7)$$

Όταν εφαρμοστεί στο σύστημα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία κατάλληλης συχνότητας, υπάρχει απορρόφηση σε συντονισμό. Σύμφωνα με το νόμο του Planck η συχνότητα απορρόφησης θα είναι

$$\nu = \frac{\Delta E}{h} = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (4.8)$$

Ανάλογα με το ηλεκτρονιακό περιβάλλον κάθε ατόμου, ακόμα και για ίδια άτομα – με το ίδιο γ , ο συντονισμός εμφανίζεται σε διαφορετική συχνότητα. Αυτή η μετατόπιση της συχνότητας του NMR ονομάζεται *χημική μετατόπιση*, δ , και εξηγεί την ικανότητα του NMR να ανιχνεύει τη χημική δομή.

$$\delta = \frac{\Delta\nu}{\nu_0} \times 10^6 \quad (4.9)$$

β) Σύζευξη-J

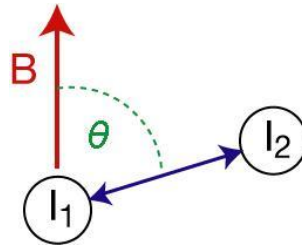
Η σύζευξη-J (J-coupling) είναι η σύζευξη μεταξύ δύο πυρηνικών σπιν λόγω της επίδρασης των δεσμικών ηλεκτρονίων στο μαγνητικό πεδίο μεταξύ των πυρήνων. Η σύζευξη-J προσφέρει πληροφορίες για τις διεδρες γωνίες, οι οποίες μπορούν να εκτιμηθούν μέσω της εξίσωσης Karplus [25].

$$J(\Phi) = A \cos^2 \Phi + B \cos \Phi + C \quad (4.10)$$

όπου Φ είναι η διεδρη γωνία και A , B , και C είναι εμπειρικές παράμετροι.

γ) Διπολική σύζευξη

Το πυρηνικό σπιν έχει διπολική ροπή η οποία αλληλεπιδρά με τη διπολική ροπή άλλων πυρήνων (διπολική σύζευξη). Η ένταση της αλληλεπίδρασης εξαρτάται από το είδος των σπιν, τη διαπυρηνική απόσταση, και τον προσανατολισμό του διανύσματος που ενώνει τους δυο πυρήνες ως προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B (Εικόνα 4.14).



Εικόνα 4.14. Ανύσματα διπολικής σύζευξης NMR στερεάς κατάστασης. Η γωνία θ είναι ως προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο.

Η μέγιστη διπολική σύζευξη δίνεται από τη διπολική σταθερά σύζευξης d

$$d = \frac{\hbar \mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_1 \gamma_2}{r^3} \quad (4.11)$$

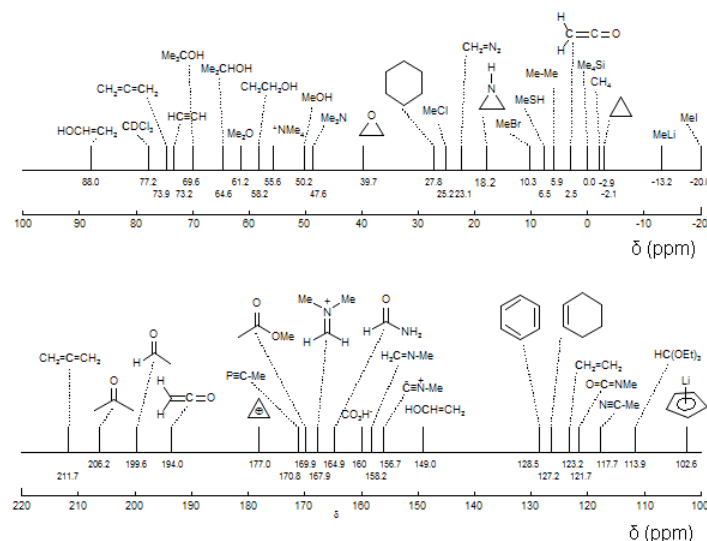
όπου r είναι η διαπυρηνική απόσταση, και γ_1 , γ_2 οι γυρομαγνητικοί λόγοι των πυρήνων. Υπό ισχυρό μαγνητικό πεδίο, η διπολική σύζευξη εξαρτάται από τον προσανατολισμό του διαπυρηνικού διανύσματος ως προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο μέσω της εξίσωσης

$$D = \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) \quad (4.12)$$

όπου D είναι η διπολική σταθερά σύζευξης. Επομένως δύο πυρήνες με διάνυσμα διπολικής σύζευξης με γωνία $\theta_m = 54.7^\circ$ (μαγική γωνία) ως προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο έχουν $D=0$.

4.5.5 ^{13}C NMR

Το ^{13}C NMR είναι η εφαρμογή των αρχών NMR ως προς το ισότοπο ^{13}C . Υπάρχουν, βεβαίως, ορισμένες διαφορές με το ^1H NMR. Το ^{13}C NMR είναι λιγότερο ευαίσθητο, λόγω της περιορισμένης παρουσίας του ισότοπου ^{13}C – μόλις 1.108% στη φύση – και του μικρότερου γυρομαγνητικού λόγου ($6.728284 \cdot 10^7 \text{ rad} \cdot \text{T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) σε σχέση με το ^1H και η συνολική ευαισθησία του ^{13}C είναι περίπου τέσσερις τάξεις μεγέθους χαμηλότερη από εκείνη του ^1H [26]. Σε αντίθεση, όμως, με το ^1H NMR που φανερώνει τις σχετικές θέσεις πρωτονίων, το ^{13}C NMR εμφανίζει μια μοναδική κορυφή για κάθε άτομο άνθρακα με διαφορετικό χημικό περιβάλλον (Εικόνα 4.15). Οι χημικές μετατοπίσεις ακολουθούν τις ίδιες αρχές με το ^1H , μόνο που το εύρος που καλύπτουν είναι μεγαλύτερο κατά παράγοντα περίπου 20. Με ^{13}C NMR έχει μελετηθεί η δυναμική των διαμορφώσεων μικρών και μεσαίου μεγέθους πολυπεπτιδίων [27-31]. Αυτές οι μελέτες παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την τμηματική κίνηση που παρατηρείται κατά μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, καθώς και την περιορισμένη κίνηση των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων.



Εικόνα 4.15. Τυπικές χημικές αποκλίσεις στο ^{13}C NMR (εικ. από την αναφ. [32]).

4.5.6 Οι δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές πεπτιδίων και πρωτεϊνών στο ^{13}C NMR

Οι διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις του ^{13}C ατόμων άνθρακα των ίδιων αμινοξέων που βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις σε ένα πολυπεπτίδιο, είναι χαρακτηριστικοί δείκτες της δευτεροταγούς και της τριτοταγούς αναδίπλωσης. Οι Saito *et al.* μελέτησαν τις μεταβολές στη χημική μετατόπιση με βάση τις διέδρες γωνίες Φ και Ψ (Εικόνα 1.8) [33] και τις χρησιμοποίησαν για να προσδιορίσουν την αντίστοιχη μικροδομή στη στερεά κατάσταση. Για παράδειγμα, τα φάσματα ^{13}C NMR στερεάς κατάστασης της α -έλικας, των β -φύλλων, και των τυχαίων διαμορφώσεων της πολυαλανίνης είναι γνωστά [34,35]. Σε σχέση με τις τυχαίες

διαμορφώσεις για παράδειγμα, οι μετατοπίσεις που οφείλονται στην έλικα είναι -1.3, +0.8, και -0.3 ppm για τα C_α, C_β, και C=O, αντίστοιχα.

Τα μέγιστα των C_α και C=O στην α-έλικα μετατοπίζονται σε υψηλότερες συχνότητες (μεγαλύτερο δ) σε σχέση με τα β-φύλλα, ενώ το αντίθετο ισχύει για την κορυφή του C_β της α-έλικας σε σχέση με εκείνο των β-φύλλων [33]. Οι διαφορές των χημικών μετατοπίσεων Δδ_{αβ} των διαφόρων τμημάτων των αμινοξέων είναι σχετικά σταθερές [33] και χρησιμοποιούνται για την εύρεση των τοπικών διαμορφώσεων καθώς και των δευτεροταγών και τριτοταγών δομών πιο περίπλοκων πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνών. Τέτοιες χημικές μετατοπίσεις συνοψίζονται στον Πίνακα 4.11, για διάφορες δευτεροταγείς δομές.

Πίνακας 4.11. Χημικές μετατοπίσεις και διαφορές μεταξύ α-ελίκων και β-φύλλων αμινοξέων^α [38].

αμινοξύ	C _α			C _β			C=O		
	α-έλικα	β-φύλλα	Δδ	α-έλικα	β-φύλλα	Δδ	α-έλικα	β-φύλλα	Δδ
Ala	52.4	48.2	4.2	14.9	19.9	-5.0	176.4	171.8	4.6
	52.3	48.7	3.6	14.8	20.0	-5.2	176.2	171.6	4.6
	52.8	49.3	3.5	15.5	20.3	-4.8	176.8	172.2	4.6
Leu	55.7	50.5	5.2	39.5	43.3	-3.8	175.7	170.5	5.2
	55.8	51.2	4.6	43.7 ^γ	39.6 ^γ	4.1	175.8	171.3	4.5
Glu(OBzl)	56.4	51.2	5.2	25.6	29.0	-3.4	175.6	171.0	4.6
	56.8	51.1	5.7	25.9	29.7	-3.8	175.4	172.2	3.2
Asp(OBzl)	53.4	49.2	4.2	33.8	38.1	-4.3	174.9	169.8	5.1
	53.6				34.2		174.9		
Val	65.5	58.4	7.1	28.7	32.4	-3.7	174.9	171.8	3.1
		58.2			32.4			171.5	
Ile	63.9	57.8	6.1	34.8	39.4	-4.6	174.9	172.7	2.2
		57.1			33.1			171.0	
Lys ^β	57.4			29.9			176.5		
Lys (Z)	57.6	51.4	6.2	29.3	28.5	-0.8	175.7	170.4	5.3
Arg ^β	57.1			28.9			176.8		
Phe	61.3	53.2	8.1	35.0	39.3	-4.3	175.2	169.0	6.2
Met	57.2	52.2	5.0	30.2	34.8	-4.6	175.1	170.6	4.5
Gly		43.2						168.4	
		44.3						169.2	
							176.6 ^δ	168.5	3.1

^α Ως προς πρότυπο τετραμεθυλοσιλανίου (TMS).

^β Σε ουδέτερο υδατικό διάλυμα.

^γ Η αντιστοιχία εδώ είναι αντίστροφη.

^δ Δεδομένα από γλυκίνη σε πολυπεπτίδια.

Οι μεταβολές των τιμών οφείλονται σε μεταβολές των διέδρων γωνιών και στο σχηματισμό ή την καταστροφή δεσμών υδρογόνου. Στην τελευταία περίπτωση, ειδικά για το C=O, οι μεταβολές είναι ακόμη μεγαλύτερες. Στη μορφή τριπλής έλικας της πολυγλυκίνης, παραδείγματος χάρη, δεν υπάρχουν δεσμοί υδρογόνου ενώ υπάρχουν στην ανάλογη 3₁-έλικα της πολυ(Pro-Gly-Pro) [37]. Η μεταβολή της διαμόρφωσης και ειδικά η αλλαγή του δεσμού υδρογόνου προκαλεί μια μετατόπιση κατά -5.1 έως -4.1 στο σήμα του C=O της πολυ(Pro-

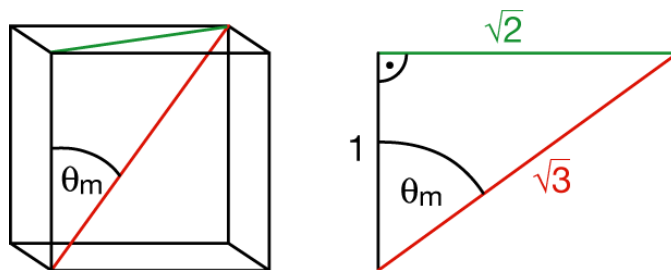
Gly-Pro) [38]. Με μετρήσεις ^{13}C NMR στερεάς κατάστασης του πολυ(γ-στεαρυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος) έχει βρεθεί ότι σχηματίζει δεξιόστροφη α-έλικα σε θερμοκρασίες 300-373 K [35], ενώ οι μακριές πλευρικές ομάδες *n*-αλκυλίων έχουν all-trans διαμορφώσεις σε θερμοκρασία δωματίου και γίνονται περισσότερο ευκίνητες πάνω από τα 308 K [39].

4.5.7 NMR στερεάς κατάστασης

Υπάρχει μια πληθώρα μορίων που δεν μπορούν να μελετηθούν με τις συμβατικές τεχνικές NMR σε διάλυμα, αλλά ούτε με άλλες τεχνικές σκέδασης. Σε δείγματα στη στερεά φάση, όπως κρύσταλλοι, κολλοειδή, ανισότροπα διαλύματα κλπ, η σημαντικότερη συνεισφορά στη συμπεριφορά του πυρηνικού σπιν προέρχεται από τη διπολική σύζευξη και την ανισοτροπία της χημικής μετατόπισης. Στο συμβατικό NMR, αυτά τα χαρακτηριστικά θα οδηγούσαν σε σημαντική διεύρυνση των φασματικών γραμμών.

Δύο σημαντικά γνωρίσματα του NMR στερεάς κατάστασης είναι ο περιορισμός των πιθανών μοριακών προσανατολισμών μέσω προσανατολισμού του δείγματος, και η ελάττωση των ανισότροπων πυρηνικών αλληλεπιδράσεων μέσω περιστροφής του δείγματος. Όσον αφορά το δεύτερο, η ταχεία περιστροφή γύρω από τη μαγική γωνία είναι η κυρίαρχη μέθοδος όταν το σύστημα έχει πυρήνες με σπιν 1/2. Χρησιμοποιείται τότε μια σειρά μεθόδων ως προς το μερικό προσανατολισμό του δείγματος.

Η μαγική γωνία είναι μια καλά καθορισμένη γωνία, η τιμή της οποίας είναι περίπου 54.7° , και είναι ρίζα του δεύτερης τάξης πολωνύμου Legendre $P_2(3\cos^2\theta-1)=0$, ώστε κάθε αλληλεπίδραση που εξαρτάται από αυτό το πολυώνυμο να εξαφανίζεται στη μαγική γωνία. Η μαγική γωνία ορίζεται ως η γωνία μεταξύ της χωρικής διαγωνίου ενός κύβου με οποιαδήποτε από τις γωνίες που ενώνει (βλέπε Εικόνα 4.16), επομένως ισχύει $\theta_m = \arccos \frac{1}{\sqrt{3}} \approx 54.7^\circ$.



Εικόνα 4.16. Η μαγική γωνία.

Βάση της εξίσωσης 4.12, δύο πυρήνες με διαπυρηνικό άνυσμα σε γωνία θ_m ως προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο έχουν μηδενική διπολική σύζευξη, $D(\theta_m)=0$. Βάση αυτής της

διαπίστωσης, η διακριτική ικανότητα βελτιώνεται μέσω της αφαίρεσης τέτοιων διπολικών συζεύξεων.

Για την επίτευξη μεταφοράς μαγνήτισης, οι παλμοί ραδιοκυμάτων που εφαρμόζονται πρέπει να ικανοποιούν τη συνθήκη Hartmann-Hahn [40]. Σε κατάσταση MAS (magic angle spinning), αυτή η συνθήκη ορίζει μια σχέση μεταξύ της τάσης δια μέσω του πηνίου RF και του ρυθμού περιστροφής του δείγματος. Το CP χρησιμοποιείται συχνά σε συνδυασμό με το MAS (CP-MAS) [41].

4.5.7.1 Αποσύζευξη

Οι αλληλεπιδράσεις των πυρηνικών σπιν χρειάζεται να αποσυζευχθούν ώστε να αυξηθεί η διακριτική ικανότητα του NMR και να απομονωθούν οι διάφορες πηγές σπιν. Μια τεχνική που μπορεί να αφαιρέσει την ανισοτροπία των χημικών μετατοπίσεων είναι η *περιστροφή υπό μαγική γωνία*. Η ομοπυρηνική αποσύζευξη (*homonuclear RF decoupling*) αποσυζεύγει τις αλληλεπιδράσεις εκείνες των σπιν που είναι ταυτόσημες. Η ετεροπυρηνική αποσύζευξη (*heteronuclear RF decoupling*) αποσυζεύγει αλληλεπιδράσεις σπιν μεταξύ διαφορετικών πυρήνων.

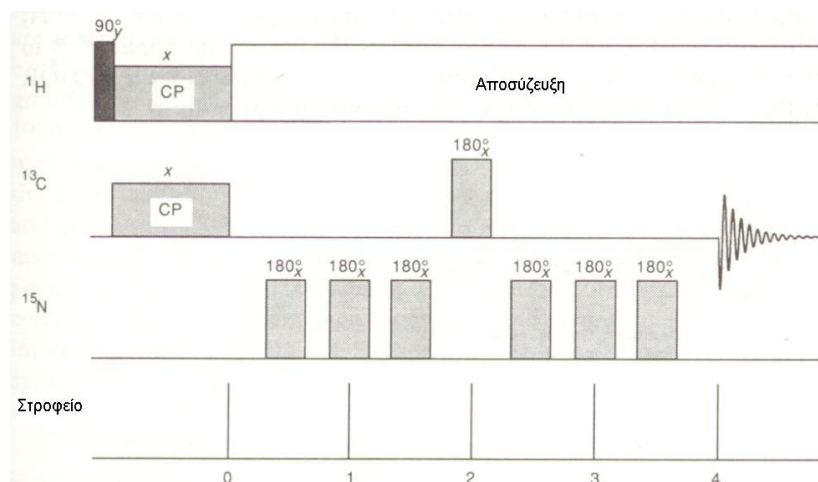
4.5.7.2 Ανασύζευξη

Αν και οι διευρυμένες γραμμές δεν είναι συνήθως επιθυμητές, οι διπολικές συζεύξεις μεταξύ ατόμων στο κρυσταλλικό πλέγμα μπορούν επίσης να δώσουν σημαντικές πληροφορίες, επειδή η διπολική σύζευξη εξαρτάται από τις διαπυρηνικές αποστάσεις. Καθώς οι περισσότερες διπολικές αλληλεπιδράσεις αφαιρούνται με την περιστροφή του δείγματος, τα πειράματα ανασύζευξης χρησιμοποιούνται για την επανεισαγωγή των επιθυμητών διπολικών συζεύξεων. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το πείραμα Rotational Echo Double Resonance (REDOR) [42].

4.5.8 Ετεροπυρηνικές μέθοδοι

Η κύρια ετεροπυρηνική μέθοδος, που έχει προταθεί από τους Schaefer *et al.* [42-44], ονομάζεται *rotor-encoded rotational echo double resonance (REREDOR)*, και βασίζεται στο γεγονός ότι η διπολική αλληλεπίδραση μεταξύ δύο σπιν περιστροφικής ηχούς μπορεί να επηρεαστεί με π -παλμούς. Η μετατόπιση των φάσεων της μαγνήτισης ενός σπιν που συμμετέχει σε διπολική σύζευξη ως προς έναν άλλο πυρήνα παρουσία ή απουσία π -παλμών, και στη συνέχεια επανεστίαση συναρτήσει της συχνότητας περιστροφής υπό μαγική γωνία,

προκαλεί μια διακύμανση των εντάσεων συντονισμού. Αυτή η διακύμανση σχετίζεται με τη σταθερά διπολικής σύζευξης. Η ακολουθία του παλμού συνοψίζεται στην Εικόνα 4.17.



Εικόνα 4.17. Ακολουθίες παλμών του REDOR ^{13}C NMR. Δύο ειδικά διαχωρισμένοι παλμοί 180° ^{15}N ανά στροφέο προκαλούν μετατόπιση των φάσεων της εγκάρσιας μαγνήτισης του άνθρακα που παράγεται από μεταφορά CP από πρωτόνια διπολικά συζευγμένα. Ο παλμός 180° ^{13}C αντικαθιστά τον παλμό ^{15}N στο μέσον της περιόδου μετατόπισης των φάσεων και επανεστιάζει τις διαφορές χημικής μετατόπισης ^{13}C στην αρχή της περιόδου λήψης δεδομένων. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εφαρμόζεται αποσύζευξη ^1H (εικ. από την αναφ. [21]).

Το πρώτο φάσμα λαμβάνεται χρησιμοποιώντας μια συνηθισμένη ακολουθία παλμών με έναν π -παλμό στον υπό παρατήρηση πυρήνα, στο μέσον της περιόδου ανάπτυξης. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, η παρατηρούμενη μαγνήτιση αναπτύσσεται υπό την επήρεια των χημικών μετατοπίσεων και της ετεροπυρηνικής διπολικής αλληλεπίδρασης. Ο παλμός επανεστιάζει και τις δύο αλληλεπιδράσεις, παράγοντας ένα σήμα S κατά τη διάρκεια της περιόδου λήψης. Το δεύτερο φάσμα λαμβάνεται με έναν επιπλέον συρμό π -παλμών στο διπολικά συζευγμένο σπιν του δεύτερου πυρήνα. Αυτοί οι παλμοί επηρεάζουν το παρατηρούμενο σήμα αποτρέποντας την περιστροφική επανεστίαση, και η ένταση του σήματος πέφτει κατά ΔS . Για ασθενή διπολική σύζευξη, η μεταβολή στην ένταση του σήματος συνδέεται με την απόσταση μεταξύ των συζευγμένων σπιν με την εξίσωση

$$\Delta S / S = K D^2 N_c^2 \nu_r^{-2} \quad (4.13)$$

όπου N_c είναι το πλήθος των κύκλων του στροφέου κατά την περίοδο ανάπτυξης, ν_r είναι η ταχύτητα περιστροφής, και K είναι μια αδιάστατη σταθερά ($=1.066$). Επομένως με αυτό το πείραμα υπολογίζεται η διαπυρηνική απόσταση, η οποία, για ένα απομονωμένο ζεύγος σπιν, μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια $\pm 0.1 \text{ \AA}$.

4.5.9 Πειραματική διαδικασία NMR

Τα πειράματα ^{13}C CP NMR των ομοπολυμερών PSLG και PMLG, και των συστημάτων των Κεφαλαίων 7 και 9 έγιναν με ένα φασματόμετρο Bruker Avance με συχνότητα Larmor ^1H ίση με 700.13 MHz και συχνότητα ^{13}C ίση με 176.05 MHz, από τον Dr. M. Mondeshki στο MPIP. Μια συσκευή μέτρησης διπλού συντονισμού Bruker, που υποστηρίζει στροφεΐα εξωτερικής διαμέτρου 2.5 mm σε συχνότητα περιστροφής 30 kHz, χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις μετρήσεις. Σε υψηλές συχνότητες περιστροφής, υπήρχε επιπλέον θέρμανση λόγω τριβής με τον αέρα. Γι' αυτό η ενεργός θερμοκρασία του δείγματος διορθώθηκε ακολουθώντας τη διαδικασία που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία [45]. Όλα τα υπόλοιπα πειράματα έγιναν με ένα φασματόμετρο Bruker Avance με συχνότητα Larmor ^1H ίση με 500.1 MHz και συχνότητα ^{13}C ίση με 125.76 MHz, και συσκευή μέτρησης Bruker με στροφεΐα εξωτερικής διαμέτρου 2.5 mm σε συχνότητα περιστροφής 25 kHz. Σε όλα τα πειράματα ^{13}C CP NMR χρησιμοποιήθηκε ένας αρχικός παλμός 90° με μήκος 2.5 μs και καθυστέρηση ανακύκλισης 2 s. Η διάρκεια του παλμού επαφής (CP) μεταβλητού πλάτους (80-100%) [46] ήταν 1 ms, και η διάταξη ετεροπυρηνικής ανασύζευξης με διαμόρφωση φάσης δύο παλμών ^1H (two-pulse phase-modulation, TPPM) [47] εφαρμόστηκε κατά τη λήψη του σήματος ^{13}C . Υπολογίστηκαν δύο χιλιάδες μεταβάσεις, η γραμμή βάσης των φασμάτων διορθώθηκε, και εφαρμόστηκε διεύρυνση 10 Hz. Όλα τα πειράματα διπολικής ανασύζευξης έγιναν με ίσους χρόνους διέγερσης και αναμετατροπής.

Το REREDOR [47,49] χρησιμοποιήθηκε στο Κεφάλαιο 5 για να διεγείρει ετεροπυρηνικούς συντονισμούς δύο-σπιν υπό συνθήκες ανασύζευξης. Η ανάλυση των καταγεγραμμένων πλευρικών κορυφών έδωσαν ενεργές συζεύξεις διπόλου-διπόλου που εξαρτώνται από τις διαπυρηνικές αποστάσεις και τη μοριακή δυναμική. Για τα περιστρεφόμενα ίχνη πλευρικών κορυφών του ^{13}C - ^1H REREDOR [50], καταγράφηκε μια πλήρης περίοδος στροφέα σε πλάγια διεύθυνση, με βήμα χρόνου 2.0 μs και συχνότητα περιστροφής υπό μαγική γωνία ίση με 25 kHz.

Στο πείραμα ^{13}C - ^1H REREDOR [50] του Κεφαλαίου 8, η αρχική μαγνήτιση των πρωτονίων μεταφέρθηκε σε άτομα άνθρακα ακολουθώντας το πρωτόκολλο CP-MAS. Στη συνέχεια, οι διπολικές συζεύξεις ^{13}C - ^1H ανασυζεύχθηκαν με την εφαρμογή δύο δεσμών π -παλμών, αποτελούμενων από 6 π -παλμούς με απόσταση $\tau_R/2$ ο καθένας, όπου τ_R είναι η περίοδος του στροφέα του MAS. Οι δέσμες ανασύζευξης είχαν χρονική απόσταση t_1 , που αυξανόταν σε 20 βήματα από 0 έως τ_R με σκοπό να παρατηρηθεί το rotor-encoding της διάταξης επενασύζευξης. Με μετασχηματισμό Fourier της διαμορφωμένης έντασης σήματος ^{13}C , ελήφθησαν τα φάσματα των πλευρικών κορυφών, τα οποία αντιστοιχούν σε διπολικές

συζεύξεις $^{13}\text{C}-^1\text{H}$. Η σύζευξη ενός σπιν ^{13}C με περισσότερα από ένα σπιν ^1H περιγράφεται από το γινόμενο:

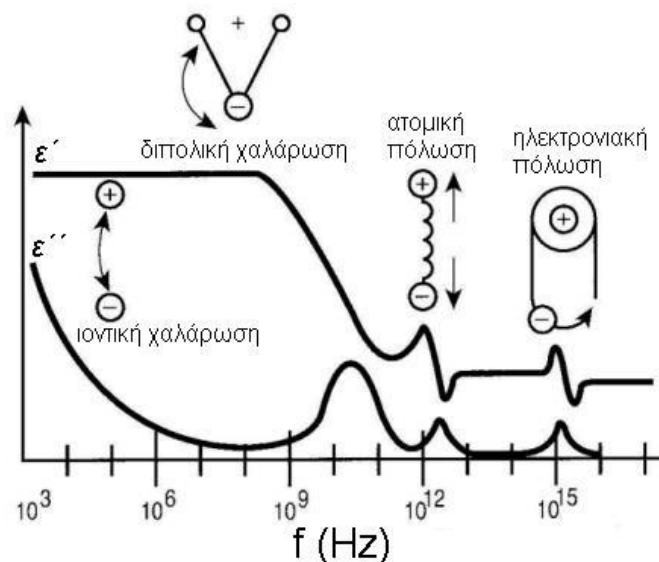
$$S \propto \left\langle \prod_i \cos(N_{exc} \bar{Y}_0^{(i)} - Y^{(i)}(0; t_1) - N_{rec} \bar{Y}_{t_1}^{(i)} + Y^{(i)}(t_1; 2t_1)) \right\rangle \quad (4.14)$$

όπου οι αγκύλες προσδιορίζουν τη μέση τιμή της ισχύος και τα N_{exc} και N_{rec} τον αριθμό περιόδων του στροφέα που χρησιμοποιούνται για διέγερση και αναμετατροπή, αντίστοιχα, ενώ η χρονική εξέλιξη λαμβάνεται ως άθροισμα των φάσεων που προκύπτουν από τη δράση της ακολουθίας REREDOR. Οι δυο όροι $Y^{(i)}(0; t_1)$ και $Y^{(i)}(t_1; 2t_1)$ είναι οι φάσεις που λαμβάνονται λόγω της παραμένουσας διπολικής εξέλιξης κατά τα χρονικά διαστήματα t_1 και $2t_1$. Σε συνθήκες υπερταχείας περιστροφής υπό μαγική γωνία ή ασθενούς σύζευξης διπόλου-διπόλου, αυτοί οι όροι γίνονται μικροί, ή ακόμα και αμελητέοι, σε σύγκριση με τους όρους ανασύζευξης $N_{exc} \bar{Y}_0^{(i)}$ και $N_{rec} \bar{Y}_{t_1}^{(i)}$ στην εξίσωση 4.14. Η ελάττωση της σύζευξης διπόλου-διπόλου επιλεγμένων ζευγών σπιν προσδιορίζεται από τοπικές δυναμικές παραμέτρους, S , που ορίζονται ως ο λόγος των μετρημένων συζεύξεων $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ προς τις υποθετικές τιμές τους για ένα απόλυτα άκαμπτο ζεύγος, δηλαδή $0 \leq S \leq 1$ [51].

4.6 Διηλεκτρική Φασματοσκοπία (ΔΦ)

4.6.1 Εισαγωγή

Η διηλεκτρική φασματοσκοπία καλύπτει ένα ευρύ φάσμα συχνοτήτων, μεταξύ 10^{-6} και 10^{12} Hz [52], αποτελώντας μια πολύ χρήσιμη τεχνική για τη μελέτη της δυναμικής των πολυπεπτιδίων. Γενικά, η διηλεκτρική απόκριση ενός υλικού στην ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία παρουσιάζει διάφορα χαρακτηριστικά ανάλογα με την περιοχή συχνοτήτων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.18, στις οπτικές συχνότητες εμφανίζεται η *ηλεκτρονιακή πολωσιμότητα* (μετατόπιση του ηλεκτρονιακού νέφους ως προς τον πυρήνα), στην περιοχή του υπερύθρου εμφανίζεται η *ατομική πολωσιμότητα* (λόγω σχετικής μετατόπισης ιόντων σε ένα μόριο), σε χαμηλότερες συχνότητες παρατηρείται η *διπολική χαλάρωση* (προσανατολισμός διπόλων ως προς το εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο), και σε πολύ χαμηλές συχνότητες παρατηρείται η *ιοντική χαλάρωση* (λόγω ιοντικής αγωγιμότητας και διεπιφανειακής ή χωρικής πολωσιμότητας). Η ΔΦ εξετάζει την αλληλεπίδραση των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων με τα μόνιμα δίπολα των μορίων. Η παρουσία πολλών πολικών δεσμών στα πολυπεπτίδια (π.χ. πεπτιδικός), και ιδιαίτερα ο σχηματισμός μεγάλης διπολικής ροπής στην περίπτωση της ελικοειδούς δομής, ευνοούν τη μελέτη της δυναμικής με αυτή τη μέθοδο.



Εικόνα 4.18. Διάγραμμα των διηλεκτρικών μηχανισμών χαλάρωσης όπως εμφανίζονται στη διαπερατότητα (ϵ') και τις διηλεκτρικές απώλειες (ϵ'') σε διάφορες συχνότητες. Τα διάφορα είδη πόλωσης (διπολική, ιοντική, ατομική, ηλεκτρονιακή) έχουν τη δική τους συνεισφορά σε κάθε περιοχή. Στην περιοχή που έγιναν οι μετρήσεις αυτής της εργασίας (10^2 - 10^6 Hz) παρατηρούνται οι μηχανισμοί που οφείλονται σε προσανατολισμό διπόλων και σε ιοντική αγωγιμότητα.

4.6.2 Η διηλεκτρική συνάρτηση

Στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε μόνο με γραμμικές διηλεκτρικές ιδιότητες και θα εστιάσουμε στις μοριακές πτυχές της διηλεκτρικής χαλάρωσης. Οι ιδιότητες αυτές

είναι αποτέλεσμα της χημικής σύνθεσης και της δομής σε μοριακό αλλά και μεγαλύτερης τάξης μεγέθους επίπεδο. Μοριακές ταλαντώσεις μέσα σε πεδίο δυναμικού συμβάλλουν σε φαινόμενα χαλάρωσης, ενώ μεταφορικές κινήσεις ευκίνητων ηλεκτρικών φορέων (ηλεκτρόνια, ιόντα) έχουν αγώγιμες συνεισφορές στη διηλεκτρική απόκριση. Γενικά, οι χρονοεξαρτώμενοι μηχανισμοί σε ένα υλικό οδηγούν σε διαφορετική χρονική εξάρτηση μεταξύ του εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου, $\vec{E}(t)$, και της ηλεκτρικής μετατόπισης, $\vec{D}(t)$. Για ένα εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο $\vec{E}(t) = \vec{E}_0 \exp(-i\omega t)$ ($\omega = 2\pi f$ η γωνιακή συχνότητα) η ηλεκτρική συνάρτηση ε^* ορίζεται ως

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon'(\omega) - i\varepsilon''(\omega) \quad (4.15)$$

όπου $\varepsilon'(\omega)$ είναι το πραγματικό μέρος που ονομάζεται *διαπερατότητα* και $\varepsilon''(\omega)$ το φανταστικό μέρος που ονομάζεται *διηλεκτρική απορρόφηση*. Στη στατική περίπτωση η διαφορά στη χρονική εξάρτηση των $\vec{E}(t)$ και $\vec{D}(t)$ είναι απλώς μια διαφορά φάσης. Μέσω των εξισώσεων του Maxwell, σε συχνότητες της τάξης των 10^{15} Hz, η ηλεκτρική διαπερατότητα σχετίζεται με το δείκτη διάθλασης του υλικού, n , ως εξής:

$$\varepsilon^* = (n^*)^2 \quad (4.16)$$

Υπό αυτήν την έννοια, η διηλεκτρική φασματοσκοπία μπορεί να θεωρηθεί σαν επέκταση της οπτικής μικροσκοπίας σε χαμηλότερες συχνότητες.

Η πόλωση, $\vec{P}$, περιγράφει τη μετατόπιση ηλεκτρικού φορτίου που προέρχεται από την απόκριση του υλικού σε ένα εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο και ορίζεται ως

$$\vec{P} = (\varepsilon^* - 1)\varepsilon_0 \vec{E} = \chi^* \varepsilon_0 \vec{E} \quad (4.17)$$

όπου χ^* είναι η ηλεκτρική επιδεκτικότητα του υλικού υπό την επίδραση ενός εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου. Για μεγαλύτερες εντάσεις πεδίου ($>10^6 \text{ Vm}^{-1}$) μπορεί να εμφανιστούν μη γραμμικά φαινόμενα τα οποία δεν θα συζητηθούν εδώ.

4.6.3 Ηλεκτροστατική

Η μακροσκοπική πόλωση [52] $\vec{P}$ είναι δυνατόν να συσχετισθεί με μικροσκοπικές διπολικές ροπές $\vec{p}$ μορίων ή σωματιδίων που περιέχονται σε όγκο V με την εξίσωση

$$\vec{P} = \frac{1}{V} \sum \vec{p}_i \quad (4.18a)$$

όπου ο δείκτης i απαριθμεί όλες τις διπολικές ροπές στο σύστημα. Τα μόρια ή άλλα σωματίδια έχουν διπολική ροπή εάν τα ηλεκτρικά “κέντρα μάζας” των θετικών και αρνητικών φορτίων δεν συμπίπτουν. Η απλούστερη περίπτωση δίνεται από ένα θετικό φορτίο $+q$ και ένα αρνητικό $-q$ ευρισκόμενα σε απόσταση $\vec{d}$ με διπολική ροπή $\vec{p} = q\vec{d}$. Για οποιαδήποτε

συνεχή κατανομή φορτίων $\rho_f(r)$ η διπολική ροπή μπορεί να εκφραστεί από την εξίσωση

$$\vec{p} = \int_V \vec{r} \rho_f(\vec{r}) d^3r.$$

Πολλά μόρια έχουν μια μόνιμη διπολική ροπή, $\vec{\mu}$, που μπορεί να προσανατολιστεί παρουσία ενός εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου. Εάν δεν υπάρχει εξωτερικό πεδίο ο προσανατολισμός των διπόλων είναι τυχαίος. Ένα εξωτερικό πεδίο τείνει να προσανατολίσει αυτά τα δίπολα συνεισφέροντας έτσι μια ενεργό πολωσιμότητα. Έτσι, για ένα σύστημα που περιέχει μόνο ένα είδος διπόλων η εξίσωση (4.18α) γίνεται

$$\vec{P} = \frac{1}{V} \sum \vec{\mu}_i + \vec{P}_\infty = \frac{N}{V} \langle \vec{\mu} \rangle + \vec{P}_\infty \quad (4.18\beta)$$

όπου το N δηλώνει το συνολικό αριθμό διπόλων στο σύστημα, το $\langle \vec{\mu} \rangle$ τη μέση διπολική ροπή, και το $\vec{P}_\infty$ την επαγόμενη ηλεκτρονιακή και ατομική πόλωση.

Η μέση τιμή της διπολικής ροπής καθορίζεται από διάφορους παράγοντες, οι κυριότεροι εκ των οποίων είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ των διπόλων και η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου στην περιοχή του διπόλου. Θεωρώντας επίσης την πιο απλή προσέγγιση κατά την οποία (i) τα δίπολα δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και (ii) το τοπικό ηλεκτρικό πεδίο $\vec{E}_{\text{τοπικό}}$ στην περιοχή ενός διπόλου ισούται με το εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο, η μέση τιμή της διπολικής ροπής καθορίζεται μόνο από την αντιστάθμιση της θερμικής ενέργειας και την ενέργεια αλληλεπίδρασης W του διπόλου με το ηλεκτρικό πεδίο, όπως περιγράφεται από την εξίσωση $W = -\vec{\mu} \cdot \vec{E}$. Σύμφωνα με τη στατιστική του Boltzmann παίρνουμε

$$\langle \vec{\mu} \rangle = \frac{\int_{4\pi} \vec{\mu} \exp\left(\frac{\vec{\mu} \cdot \vec{E}}{k_B T}\right) d\Omega}{\int_{4\pi} \exp\left(\frac{\vec{\mu} \cdot \vec{E}}{k_B T}\right) d\Omega} \quad (4.19\alpha)$$

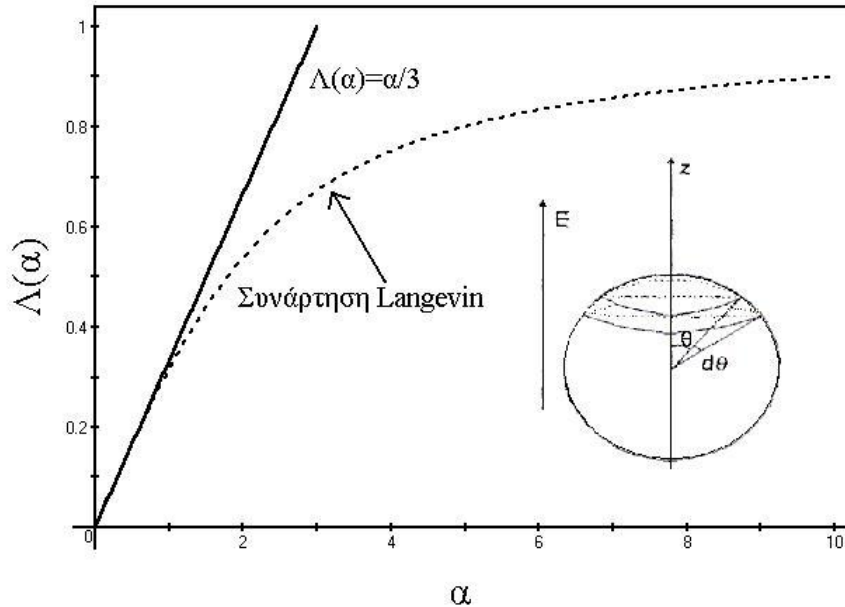
όπου T είναι η θερμοκρασία, k_B η σταθερά του Boltzmann και $d\Omega$ η στοιχειώδης στερεά γωνία. Ο παράγοντας $\exp\left(\frac{\vec{\mu} \cdot \vec{E}}{k_B T}\right) d\Omega$ δίνει την πιθανότητα το διάνυσμα της διπολικής ροπής να έχει προσανατολισμό μεταξύ Ω και $\Omega + d\Omega$. Στην πόλωση συνεισφέρει μόνο η παράλληλη προς το εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο συνιστώσα της διπολικής ροπής, επομένως η ενέργεια αλληλεπίδρασης είναι $W = -|\vec{\mu}| |\vec{E}| \cos\theta$, όπου θ είναι η γωνία μεταξύ της κατεύθυνσης της διπολικής ροπής και εκείνης του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, και η εξίσωση (4.19α) απλοποιείται σε

$$\langle \vec{\mu} \rangle = \frac{\int_0^\pi \mu \cos \theta \exp\left(\frac{|\vec{\mu}| |\vec{E}| \cos \theta}{k_B T}\right) \frac{1}{2} \sin \theta d\theta}{\int_0^\pi \exp\left(\frac{|\vec{\mu}| |\vec{E}| \cos \theta}{k_B T}\right) \frac{1}{2} \sin \theta d\theta} \quad (4.19\beta)$$

Ο όρος $\frac{1}{2}\sin\theta$ αντιστοιχεί στη στερεά γωνία στην κατεύθυνση θ . Αντικαθιστώντας με $x = (|\vec{\mu}| |\vec{E}| \cos \theta / k_B T)$ και $\alpha = (|\vec{\mu}| |\vec{E}| / k_B T)$ η εξίσωση (4.19β) γράφεται

$$\langle \cos \theta \rangle = \frac{1}{\alpha} \frac{\int_{-\alpha}^{\alpha} x \exp(x) dx}{\int_{-\alpha}^{\alpha} \exp(x) dx} = \frac{\exp(\alpha) + \exp(-\alpha)}{\exp(\alpha) - \exp(-\alpha)} - \frac{1}{\alpha} = \Lambda(\alpha) \quad (4.20)$$

σχηματίζοντας τη συνάρτηση Langevin $\Lambda(\alpha)$. Η εξάρτηση της Λ από το α δίνεται στην Εικόνα 4.19.



Εικόνα 4.19. Εξάρτηση της συνάρτησης Langevin $\Lambda(\alpha)$ από το α (διακεκομμένη γραμμή), μαζί με μια γραμμική προσέγγιση για μικρές τιμές του α . Το ένθετο γράφημα δείχνει το γεωμετρικό σχήμα για την απόδειξη της εξίσωσης (4.20) σε σύστημα σφαιρικών συντεταγμένων [52].

Για μικρές τιμές ενέργειας αλληλεπίδρασης ενός διπόλου με το ηλεκτρικό πεδίο

(ένταση πεδίου $|\vec{E}| \leq 10^6 \text{ Vm}^{-1}$, $\alpha = \frac{|\vec{\mu}| |\vec{E}|}{k_B T} < 0.1$) σε σχέση με τη θερμική ενέργεια, ισχύει

$\Lambda(\alpha) \approx \alpha/3$, και η διπολική ροπή έχει γραμμική εξάρτηση από το ηλεκτρικό πεδίο. Στα πειράματα που έγιναν στην παρούσα εργασία το ηλεκτρικό πεδίο ήταν $\sim 10^4 \text{ V/m}$, δηλαδή στη γραμμική περιοχή. Οπότε η εξίσωση (4.19) απλοποιείται σε

$$\langle \vec{\mu} \rangle = \frac{\mu^2}{3k_B T} \vec{E} \quad (4.21\alpha)$$

Εισάγοντας την (4.21α) στην (4.18β) προκύπτει

$$\vec{P} = \frac{\mu^2}{3k_B T} \frac{N}{V} \vec{E} \quad (4.21\beta)$$

και με τη βοήθεια της (4.17) η συνεισφορά της πόλωσης από προσανατολισμό στη διηλεκτρική συνάρτηση μπορεί να υπολογιστεί ως

$$\varepsilon_s - \varepsilon_\infty = \frac{1}{3\varepsilon_0} \frac{\mu^2}{k_B T} \frac{N}{V} \quad (4.22)$$

όπου $\varepsilon_s = \lim_{\omega \rightarrow 0} \varepsilon'(\omega)$ και $\varepsilon_\infty = \lim_{\omega \rightarrow \infty} \varepsilon'(\omega)$ είναι οι οριακές τιμές της διηλεκτρικής σταθεράς σε χαμηλές και υψηλές συχνότητες, αντίστοιχα.

Η εξίσωση (4.22) επιτρέπει να γίνει μια εκτίμηση της μέσης μοριακής διπολικής ροπής $\langle \mu^2 \rangle^{1/2}$ από διηλεκτρικά φάσματα. Παρόλα αυτά θα πρέπει να σημειωθεί πως έγιναν δύο βασικές παραδοχές για τον υπολογισμό της: (i) ότι τα δίπολα δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, κάτι που είναι αληθές μόνο για πολύ αραιά συστήματα και (ii) ότι οι επιδράσεις του τοπικού πεδίου (θωράκιση από το εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο) είναι αμελητέες. Στην πραγματικότητα, ένα μόνιμο δίπολο που περιβάλλεται από άλλα σωμάτια πολώνει το περιβάλλον του αναλόγως της πολωσιμότητας α . Επιπλέον, αν τα γύρω σωμάτια έχουν και εκείνα μόνιμη διπολική ροπή, θα επηρεαστεί και ο προσανατολισμός τους. Η ολική πόλωση που προκύπτει από το ολικό ηλεκτρικό πεδίο είναι $\vec{P} = \frac{N}{V} \alpha \vec{E} = \frac{N}{V} \frac{\varepsilon_s + 2}{3} \vec{E}$, ενώ με τη βοήθεια της εξίσωσης (4.17) παίρνουμε τη σχέση μεταξύ της διαπερατότητας και της πολωσιμότητας για μη πολικά μόρια (εξίσωση Clausius-Mossotti) [53,54]:

$$\frac{\varepsilon_s - 1}{\varepsilon_s + 2} \frac{M}{\rho} = \frac{1}{3} \frac{N_A}{\varepsilon_0} \alpha \quad (4.23\alpha)$$

όπου M είναι το μοριακό βάρος του μορίου, ρ η πυκνότητα του συστήματος και N_A ο αριθμός του Avogadro. Για πολικά μόρια, η επίδραση της πόλωσης από προσανατολισμό διαμορφώνει την προηγούμενη εξίσωση σε

$$\frac{\varepsilon_s - 1}{\varepsilon_s + 2} \frac{M}{\rho} = \frac{1}{3} \frac{N_A}{\varepsilon_0} \left(\alpha + \frac{\mu^2}{3k_B T} \right) \quad (4.23\beta)$$

η οποία είναι γνωστή ως εξίσωση του Debye. Θεωρώντας ότι το δίπολο είναι τοποθετημένο στο κέντρο μιας σφαιρικής κοιλότητας που σχηματίζεται σε διαλύτη, το ολικό πεδίο αλληλεπίδρασης $\vec{E}_{\text{τοπικό}} = \vec{E} + \alpha_{\text{Lorentz}} (\vec{P} / \varepsilon_0)$ είναι παράλληλο στη μόνιμη διπολική ροπή,

οπότε η τελική διπολική ροπή του μορίου είναι $\vec{m} = \vec{\mu} + \alpha \vec{E}_{\text{τοπικό}}$. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο συντελεστής Lorentz α_{Lorentz} ισούται με 1/3. Πιο αναλυτικά ισχύει [55]

$$\varepsilon_s - \varepsilon_\infty = \frac{1}{3\varepsilon_0} Fg \frac{|\vec{\mu}|^2}{k_B T} \frac{N}{V} \quad (4.24\alpha)$$

όπου

$$F = \frac{\varepsilon_s(\varepsilon_\infty + 2)^2}{3(2\varepsilon_s + \varepsilon_\infty)} \quad (4.24\beta)$$

είναι ο λόγος του εσωτερικού προς το εξωτερικό πεδίο (παράγοντας Onsager [55] ή παράγοντας διόρθωσης τοπικού πεδίου) και

$$g = \frac{\left\langle \sum_i \vec{\mu}_i \sum_j \vec{\mu}_j \right\rangle}{N |\vec{\mu}|^2} = 1 + \frac{\left\langle \sum_i \sum_{i < j} \vec{\mu}_i \vec{\mu}_j \right\rangle}{N |\vec{\mu}|^2} \quad (4.24\gamma)$$

είναι ο παράγοντας συσχέτισης Kirkwood-Fröhlich [56-59] ο οποίος εισάγει τη συνεισφορά της πόλωσης από προσανατολισμό στη διαπερατότητα. Ο παράγοντας g μπορεί να είναι μικρότερος ή μεγαλύτερος από τη μονάδα, αναλόγως αν τα N μόρια τείνουν να προσανατολίζονται παράλληλα ή αντιπαράλληλα. Σε μια πρώτη προσέγγιση λαμβάνονται υπόψη μόνο οι πλησιέστεροι γείτονες και ο παράγοντας g υπολογίζεται ως

$$g = 1 + z \langle \cos \psi \rangle \quad (4.25)$$

όπου z είναι ο αριθμός προσανατολισμού και ψ η γωνία μεταξύ δύο γειτονικών διπόλων. Το μέγεθος που μετράται συνήθως αντί του g είναι η ενεργός διπολική ροπή μ_{eff}

$$\mu_{\text{eff}} = (g \mu^2)^{1/2} \quad (4.26)$$

4.6.4 Διηλεκτρική χαλάρωση

Η θεωρία διηλεκτρικής χαλάρωσης [52] για μικρές εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου είναι μια ειδική περίπτωση της θεωρίας γραμμικής απόκρισης (linear response theory) [60]. Εδώ θα αναφερθούμε μόνο σε ισότροπα συστήματα. Με αυτήν την προσέγγιση, η χρονικά εξαρτώμενη απόκριση $y(t)$ ενός συστήματος που ακολουθεί μια προηγηθείσα διέγερση $x(t)$ μπορεί να περιγραφεί από μια γραμμική εξίσωση. Στα διηλεκτρικά, η διέγερση είναι το χρονικά εξαρτώμενο εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο, $x(t)=E(t)$, και η απόκριση του συστήματος είναι η πόλωση $y(t)=P(t)$. Σε αυτήν την περίπτωση η θεωρία γραμμικής απόκρισης δίνει [61]

$$\vec{P}(t) = \vec{P}_\infty + \varepsilon_0 \int_{-\infty}^t \varepsilon(t-t') \frac{d\vec{E}}{dt'} dt' \quad (4.27)$$

όπου $\varepsilon(t)$ είναι η χρονικά εξαρτώμενη διηλεκτρική συνάρτηση. Η εξίσωση (4.27) βασίζεται μόνο στη γραμμικότητα (η απόκριση του συστήματος σε δύο διεγέρσεις είναι το άθροισμα

των δύο διαφορετικών αποκρίσεων) και στην αιτιότητα (μόνο παρελθούσες διεγέρσεις συνεισφέρουν στην απόκριση κατά το χρόνο t). Η $\varepsilon(t)$ μπορεί να μετρηθεί απευθείας ως η χρονικά εξαρτώμενη απόκριση που προκαλείται από μια μεταβολή του εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου ($d\vec{E}(t)/dt = E_0 \delta(t)$, $\varepsilon(t) = (\vec{P}(t) - \vec{P}_\infty) / \vec{E}_0$).

Εάν εφαρμοστεί στο σύστημα μια περιοδική διέγερση με σταθερή περίοδο $\vec{E}(t)(\omega) = E_0 \exp(-i\omega t)$, η εξίσωση (4.27) μετατρέπεται σε

$$\vec{P}(t)(\omega) = \varepsilon_0 (\varepsilon^*(\omega) - 1) \vec{E}(t)(\omega) \quad (4.28)$$

Το πραγματικό μέρος $\varepsilon'(\omega)$ είναι ανάλογο προς την ενέργεια που αποθηκεύεται αντιστρεπτά στο σύστημα ανά περίοδο, ενώ το φανταστικό μέρος $\varepsilon''(\omega)$ είναι ανάλογο προς την ενέργεια που χάνεται ανά περίοδο. Η σχέση μεταξύ του $\varepsilon^*(\omega)$ και της χρονικά εξαρτώμενης διηλεκτρικής συνάρτησης $\varepsilon(t)$ δίνεται από την εξίσωση

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon'(\omega) - i\varepsilon''(\omega) = \varepsilon_\infty - \int_0^\infty \frac{d\varepsilon(t)}{dt} \exp(-i\omega t) dt \quad (4.29)$$

Η εξίσωση (4.29) είναι ένας μετασχηματισμός Fourier της κανονικοποιημένης συνάρτησης

$$\Phi(t) = \frac{\varepsilon(t) - \varepsilon_\infty}{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty} = \frac{\langle \vec{\mu}(t) \cdot \vec{\mu}(0) \rangle}{\langle \vec{\mu}^2 \rangle} \quad (4.30)$$

Το πραγματικό και το φανταστικό μέρος του $\varepsilon^*(\omega)$ συνδέονται μεταξύ τους με τις σχέσεις Kramers-Kroning [52]:

$$\varepsilon'(\omega) - \varepsilon_\infty = \frac{2}{\pi} \int_0^\infty \frac{\xi \varepsilon''(\xi)}{\xi^2 - \omega^2} d\xi \quad \text{και} \quad (4.31)$$

$$\varepsilon''(\omega) = \frac{2}{\pi} \int_0^\infty \frac{\xi (\varepsilon'(\xi) - \varepsilon_\infty)}{\xi^2 - \omega^2} d\xi + \frac{\sigma}{\varepsilon_0 \omega}$$

όπου ε_0 είναι η επιτρεπτότητα του κενού ($= 8.854 \text{ pF/m}$). Από πειραματική άποψη, οι εξισώσεις (2.23) σημαίνουν ότι τόσο το ε' όσο και το ε'' περιέχουν την ίδια πληροφορία, με τη διαφορά ότι στο φανταστικό μέρος μπορεί να συνεισφέρει και ο όρος $\sigma/\varepsilon_0 \omega$ της ιοντικής αγωγιμότητας.

Από τη συνάρτηση συσχετισμού (4.30), η εξάρτηση του ε^* από τη συχνότητα υπολογίζεται ίση με

$$\frac{\varepsilon^*(\omega) - \varepsilon_\infty}{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty} = 1 - i\omega \int_0^\infty \Phi(t) e^{-i\omega t} dt \quad (4.32)$$

ενώ οι εκφράσεις του πραγματικού και φανταστικού μέρους, αντίστοιχα, είναι

$$\frac{\varepsilon'(\omega) - \varepsilon_\infty}{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty} = 1 - \omega \int_0^\infty \Phi(t) \sin(\omega t) dt \quad (4.33)$$

και

$$\frac{\varepsilon''(\omega)}{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty} = \omega \int_0^\infty \Phi(t) \cos(\omega t) dt \quad (4.34)$$

Η διηλεκτρική ένταση, $\Delta\varepsilon$, υπολογίζεται ολοκληρώνοντας το φανταστικό μέρος στην εξίσωση (4.31) για $\omega=0$

$$\varepsilon_s - \varepsilon_\infty = \Delta\varepsilon = \frac{2}{\pi} \int_0^\infty \varepsilon''(\omega) d \ln \omega \quad (4.35)$$

4.6.5 Η κατανομή των χαρακτηριστικών χρόνων χαλάρωσης.

Μετά την απομάκρυνση των εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου το σύστημα επανέρχεται στην κατάσταση ισορροπίας. Αν ο χρόνος χαλάρωσης είναι μοναδικός, τότε ο ρυθμός ελάττωσης της πόλωσης περιγράφεται από τη διαφορική εξίσωση

$$\frac{d\vec{P}(t)}{dt} = -\frac{1}{\tau_D} \vec{P}(t) \quad (4.36)$$

όπου τ_D είναι ο χαρακτηριστικός χρόνος χαλάρωσης. Η λύση της εξίσωσης (4.36) έχει εκθετική μορφή, $\Phi(t)=\exp(-t/\tau_D)$, και η διηλεκτρική συνάρτηση στο χώρο των συχνοτήτων γράφεται (με χρήση της εξίσωσης 4.32)

$$\begin{aligned} \varepsilon^*(\omega) &= \varepsilon_\infty + (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \left[1 - i\omega \int_0^\infty e^{-t/\tau_D} e^{-i\omega t} dt \right] \\ &= \varepsilon_\infty + (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \left(1 - \frac{i\omega\tau_D}{1 + i\omega\tau_D} \right) \\ &= \varepsilon_\infty + (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \frac{1}{1 + i\omega\tau_D} \\ \varepsilon^*(\omega) &= \varepsilon_\infty + \frac{\Delta\varepsilon}{1 + i\omega\tau_D}, \quad \varepsilon'(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\Delta\varepsilon}{1 + \omega^2\tau_D^2}, \quad \varepsilon''(\omega) = \frac{\Delta\varepsilon\omega\tau_D}{1 + \omega^2\tau_D^2} \end{aligned} \quad (4.37)$$

Η περίπτωση αυτή ονομάζεται χαλάρωση Debye, και χαρακτηρίζεται από συμμετρική κατανομή χρόνων γύρω από τη συχνότητα $f_{\max} = \omega_{\max}/2\pi = 1/(2\pi\tau_{\max})$. Σπάνια, όμως, παρατηρείται μια τέτοια συμμετρική κατανομή χρόνων. Αν επιλεγεί ως συνάρτηση $\Phi(t)$ η συνάρτηση Kohlrausch-Williams-Watts [62,63]

$$\Phi(t) = \exp(-(t/\tau)^{\beta_{KWW}}) \quad (4.38)$$

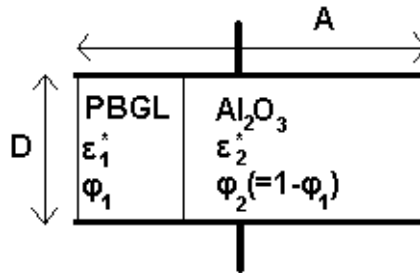
όπου η παράμετρος β_{KWW} παίρνει τιμές μεταξύ 0 και 1, τότε η διηλεκτρική συνάρτηση μπορεί να περιγραφεί από εμπειρικές εξισώσεις που επεκτείνουν τη συνάρτηση Debye για ασύμμετρες και διευρυμένες κατανομές όπως θα δούμε στην παράγραφο 4.6.7.

4.6.6 Πειραματική διάταξη

Οι διηλεκτρικές μετρήσεις έγιναν σε διάφορες θερμοκρασίες στην περιοχή 123 – 473

K, σε ατμοσφαιρική πίεση, σε συχνότητες από 10^{-2} μέχρι 10^6 Hz με ένα σύστημα BDS της Novocontrol, αποτελούμενο από έναν αναλυτή απόκρισης συχνότητας (Solartron Schlumberger FRA1260) και ένα διηλεκτρικό μετατροπέα ευρείας ζώνης. Το δείγμα αποτελούνταν από δύο ηλεκτρόδια διαμέτρου 20 mm και ενδιάμεσα το πολυπεπτίδιο προς μέτρηση, πάχους ~ 55 μm . Η θερμοκρασία ελεγχόταν με ένα σύστημα Novocontrol Quatro Cryosystem συνεχούς ροής αερίου αζώτου, με ακρίβεια ± 0.1 $^{\circ}\text{C}$.

Στο Κεφάλαιο 9, τόσο τα ελεύθερα όσο και τα ενσωματωμένα δείγματα νανοράβδων τοποθετήθηκαν σε κενό στα 423 K για δύο ημέρες πριν μετρηθούν. Το δείγμα αποτελείται από δύο ηλεκτρόδια διαμέτρου 20 mm και το πάχος του δείγματος ήταν ίσο με το βάθος των νανοπόρων (~ 100 μm). Τα μετρούμενα διηλεκτρικά φάσματα (ϵ_M^*) διορθώθηκαν ως εξής [64]: Θεωρήσαμε δυο πυκνωτές συνδεδεμένους παράλληλα (Εικόνα 4.20) που έχουν ϵ_{PBLG}^* και $\epsilon_{\text{Al}_2\text{O}_3}^*$, ποσοστό επιφάνειας PBLG και Al_2O_3 ϕ_1 και ϕ_2 , αντίστοιχα, και των οποίων η ολική μετρούμενη εμπεδήση συνδέεται με τις αντίστοιχες των πυκνωτών ξεχωριστά ως $1/Z^* = 1/Z_{\text{PBLG}}^* + 1/Z_{\text{Al}_2\text{O}_3}^*$.



Εικόνα 4.20. Η ισοδύναμη γεωμετρία παράλληλων πυκνωτών που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των διηλεκτρικών φασμάτων του συστήματος PBLG μέσα σε νανοπόρους αλουμίνιας. Το ϕ των διαφόρων διαστάσεων νανοπόρων όπως υπολογίστηκε από τις εικόνες SEM είναι: 0.30 (25 nm), 0.22 (35 nm), 0.14 (65 nm), και 0.75 (200, 400 nm).

Αυτή η διαδικασία επιτρέπει τον υπολογισμό των διορθωμένων τιμών του πραγματικού και φανταστικού μέρους της ηλεκτρικής διαπερατότητας. Αναλυτικά:

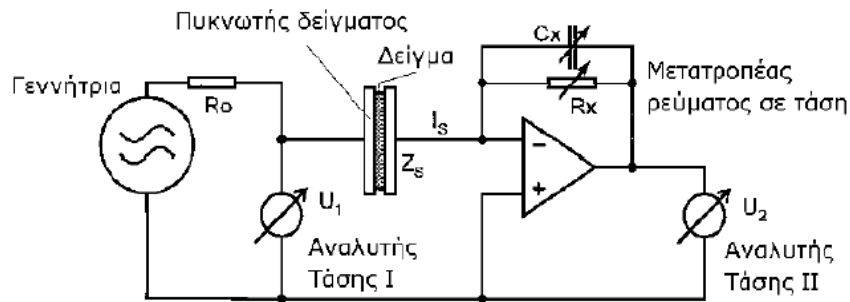
$$\begin{aligned} \frac{1}{Z^*} &= \frac{1}{Z_{\text{PBLG}}^*} + \frac{1}{Z_{\text{Al}_2\text{O}_3}^*} = \frac{1}{Z_1^*} + \frac{1}{Z_2^*} \Rightarrow \\ \Rightarrow \frac{1}{\frac{D}{\epsilon_M^* A}} &= \frac{1}{\frac{D}{\epsilon_1 \phi_1 A}} + \frac{1}{\frac{D}{\epsilon_2 \phi_2 A}} \Rightarrow \frac{\epsilon_M^*}{D} = \frac{\epsilon_1 \phi_1 A}{D} + \frac{\epsilon_2 \phi_2 A}{D} \Rightarrow \\ \Rightarrow \epsilon_M^* &= \epsilon_1^* \phi_1 + \epsilon_2^* \phi_2 \Rightarrow \epsilon_2^* = 2.6^{[65]} \\ \Rightarrow \epsilon_M' - i\epsilon_M'' &= \phi_1 \epsilon_1' - i\phi_2 \epsilon_2'' + \phi_2 \cdot 2.6 \end{aligned}$$

$$\text{πραγματικό μέρος: } \epsilon_M' = \phi_1 \epsilon_1' + \phi_2 \cdot 2.6$$

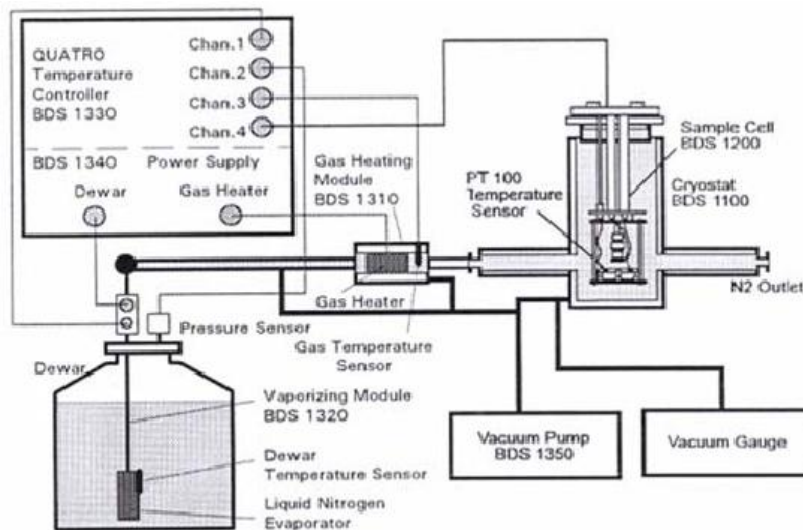
$$\text{φανταστικό μέρος: } -\epsilon_M'' = -\phi_1 \epsilon_1''$$

$$\text{και τελικά } \varepsilon_1' = \frac{\varepsilon_M' - \phi_2 \cdot 2.6}{\phi_1}, \quad \varepsilon_1'' = \frac{\varepsilon_M''}{\phi_1}$$

Στην Εικόνα 4.21 φαίνεται η βασική σύνθεση της μετρητικής διάταξης για τη μέτρηση της σύνθετης αντίστασης ενός πυκνωτή που έχει ως διηλεκτρικό το δείγμα προς μελέτη, και στην Εικόνα 4.22 μια σχηματική αναπαράσταση του συνολικού συστήματος μέτρησης.



Εικόνα 4.21. Το κύκλωμα διηλεκτρικών μετρήσεων. Το δείγμα που μετράται τοποθετείται ανάμεσα στους οπλισμούς του πυκνωτή και καταγράφεται η σύνθετη αντίσταση, ώστε να υπολογιστεί τελικά η διηλεκτρική συνάρτηση.



Εικόνα 4.22. Η πειραματική διάταξη του συστήματος διηλεκτρικής φασματοσκοπίας σε ατμοσφαιρική πίεση, μαζί με το σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας.

Εφαρμόζοντας στους οπλισμούς του πυκνωτή ένα ημιτονοειδές ηλεκτρικό πεδίο $E^*(\omega) = E_0 \exp(i\omega t)$ με γωνιακή συχνότητα ω και με ένταση πεδίου μέσα στα όρια της γραμμικής απόκρισης, η ηλεκτρική διαπερατότητα μπορεί να προκύψει από τη μέτρηση της μιγαδικής εμπέδησης $Z^*(\omega)$

$$Z^* = Z' - iZ'' = \frac{U_1}{I_s} = -\frac{U_1}{U_2} Z_x \quad (4.39)$$

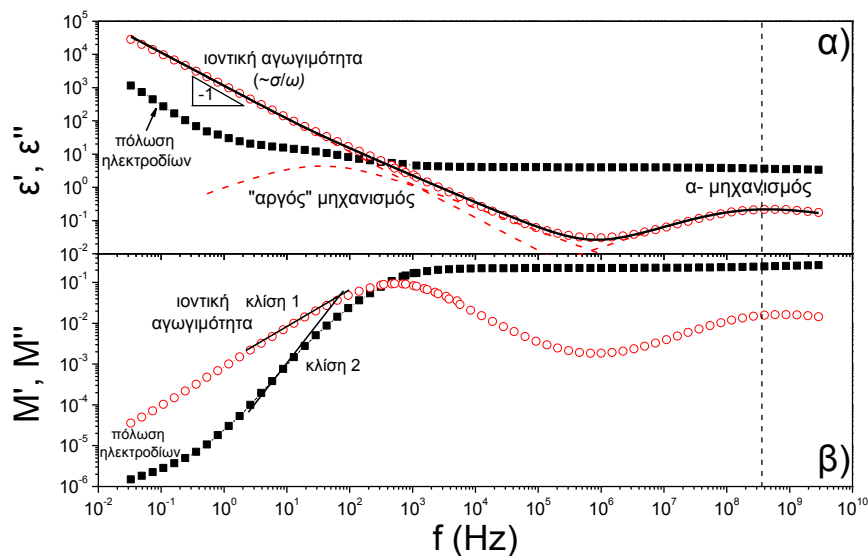
όπου Z_x είναι η σύνθετη αντίσταση των παράλληλα συνδεδεμένων R_x και C_x . Η διηλεκτρική συνάρτηση ε^* υπολογίζεται από την εξίσωση

$$\varepsilon^*(\omega) = \frac{1}{i\omega C_0 Z^*(\omega)} \Rightarrow \varepsilon' = \frac{Z''}{\omega C_0 |Z|^2}, \varepsilon'' = \frac{Z'}{\omega C_0 |Z|^2} \quad (4.40)$$

όπου C_0 είναι η χωρητικότητα του πυκνωτή χωρίς διηλεκτρικό, που υπολογίζεται από τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του. Αν το υλικό είναι ωμικός αγωγός, τότε $Z=R$, $\varepsilon'=0$, και $\varepsilon''=1/\omega RC_0$, δηλαδή η ιοντική αγωγιμότητα εμφανίζεται μόνο στο φανταστικό μέρος.

4.6.7 Ανάλυση φασμάτων διηλεκτρικής φασματοσκοπίας

Οι διηλεκτρικοί μηχανισμοί χαλάρωσης χαρακτηρίζονται από μια κορυφή στο φανταστικό μέρος ε'' και μια μείωση με μορφή βήματος στο πραγματικό μέρος ε' της ηλεκτρικής διαπερατότητας [66]. Αντίθετα, σε χαμηλές συχνότητες / υψηλές θερμοκρασίες, τα φαινόμενα ιοντικής αγωγιμότητας εμφανίζουν αύξηση στο φανταστικό μέρος της ηλεκτρικής διαπερατότητας, και σε ακόμα χαμηλότερες συχνότητες εμφανίζεται η πόλωση λόγω συσσώρευσης φορτίων στα ηλεκτρόδια. Με την προσαρμογή κατάλληλων συναρτήσεων στα φάσματα αναλύεται, διαχωρίζεται, και ποσοτικοποιείται η συνεισφορά κάθε μηχανισμού. Στην Εικόνα 4.23α απεικονίζεται ένα παράδειγμα προσαρμογής σε φάσμα διηλεκτρικών απωλειών του PBLG.



Εικόνα 4.23. (α) Πραγματικό (ε' , ■) και φανταστικό (ε'' , ○) μέρος της διηλεκτρικής διαπερατότητας συναρτήσει της συχνότητας (PBLG). Το φάσμα αποτελεί σύνθεση των θερμοκρασιών 413 και 333 K, με κατάλληλη μετατόπιση ώστε να φαίνονται ταυτόχρονα οι σημαντικότεροι μηχανισμοί. Σε υψηλές συχνότητες εμφανίζεται ο α-μηχανισμός (τμηματική κίνηση), ενώ σε χαμηλές συχνότητες ο “αργός” μηχανισμός, που σχετίζεται με χαλάρωση τμημάτων της α-έλικας (βλ. κείμενο). Η ιοντική αγωγιμότητα εμφανίζεται ως αύξηση του ε'' σε χαμηλές συχνότητες. Η συνεχής γραμμή είναι το άθροισμα προσαρμογής μιας συνάρτησης HN που περιέχει συνεισφορές από τους δύο μηχανισμούς και την αγωγιμότητα (διακεκομμένες γραμμές). (β) Το ίδιο φάσμα στην αναπαράσταση του ηλεκτρικού μέτρου. Η αγωγιμότητα φαίνεται ως κορυφή στο M'' . Λόγω της παρουσίας “αργού” μηχανισμού η τομή των M' και M'' δεν γίνεται ακριβώς στο μέγιστο του M'' .

Όπως προαναφέρθηκε, οι μηχανισμοί χαλάρωσης ακολουθούν συνήθως την κατανομή Kohlrausch-Williams-Watts (KWW) παρά την κατανομή Debye, γι' αυτό έγινε προσαρμογή με την εμπειρική εξίσωση των Havriliak και Negami (HN) που περιγράφει ασύμμετρες κατανομές [67].

$$\frac{\varepsilon^*(T, P, \omega) - \varepsilon_\infty(T, P)}{\Delta\varepsilon(T, P)} = \frac{1}{[1 + (i\omega\tau_{HN})^\alpha]^\gamma} \quad (4.41)$$

όπου $\Delta\varepsilon$ είναι η ένταση του μηχανισμού χαλάρωσης, τ_{HN} είναι ο χρόνος χαλάρωσης Havriliak-Negami, και α και γ είναι παράμετροι. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι γενικά η διηλεκτρική συνάρτηση εξαρτάται από την πίεση, τη θερμοκρασία, και τη συχνότητα [68], όμως εδώ θα αναλυθούν μόνο οι δύο τελευταίες εξαρτήσεις. Οι μέγιστοι χρόνοι χαλάρωσης, τ_{max} , που χρησιμοποιούνται εδώ, συνδέονται με το χρόνο τ_{HN} ως εξής:

$$\tau_{max} = \tau_{HN} \left[\frac{\sin\left(\frac{\pi\alpha}{2(1+\gamma)}\right)}{\sin\left(\frac{\pi\alpha\gamma}{2(1+\gamma)}\right)} \right]^{-1/\alpha} \quad (4.42)$$

Ο χρόνος τ_{max} διαφέρει από τον τ_{HN} κατά 2π για συμμετρικές κατανομές ($\gamma=1$).

Η προσαρμογή έγινε με άθροισμα τόσων συναρτήσεων HN όσοι και οι μηχανισμοί που εμφανίζονται ταυτόχρονα στα φάσματα. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα φάσματα ε'' , εκτός από τις υψηλές θερμοκρασίες, όπου χρησιμοποιήθηκε η παράγωγος του ε' ($\varepsilon'_{der} = -(\pi/2)d\varepsilon'/d\ln\omega$). Εξαιτίας του γεγονότος ότι το ε' δεν επηρεάζεται από την αγωγιμότητα, αυτή η μέθοδος είναι πολύ χρήσιμη στην ανάλυση μηχανισμών που υπερκαλύπτονται από την αγωγιμότητα, όπως για παράδειγμα, ο “αργός” μηχανισμός που θα περιγραφεί στη συνέχεια. Αναλυτικά, οι εξισώσεις που συνδέουν το ε' , το ε'' , και το ε'_{der} με τη συνάρτηση HN είναι:

$$\varepsilon'_{HN} = \Delta\varepsilon \frac{\sin\theta}{[1 + 2(\omega\tau)^\alpha \cos(\alpha\pi/2) + (\omega\tau)^{2\alpha}]^{\gamma/2}} \quad (4.43)$$

$$\varepsilon''_{HN} = \Delta\varepsilon \frac{\cos\theta}{[1 + 2(\omega\tau)^\alpha \cos(\alpha\pi/2) + (\omega\tau)^{2\alpha}]^{\gamma/2}} \quad (4.44)$$

$$\varepsilon'_{der} = -\left(\frac{\pi}{2}\right) \Delta\varepsilon \frac{\alpha\gamma(\omega\tau)^\alpha [\cos(\theta - \alpha\pi/2) + \cos\theta(\omega\tau)^\alpha]}{[1 + 2(\omega\tau)^\alpha \cos(\alpha\pi/2) + (\omega\tau)^{2\alpha}]^{(1+\gamma/2)}} \quad (4.45)$$

$$\text{όπου} \quad \theta = \gamma \arctan\left(\frac{(\omega\tau)^\alpha \sin(\alpha\pi/2)}{1 + (\omega\tau)^\alpha \cos(\alpha\pi/2)}\right) \quad (4.46)$$

Σε μια δεύτερη προσέγγιση, χρησιμοποιήσαμε την αναπαράσταση του ηλεκτρικού μέτρου M^* [52,69]. Αυτή η αναπαράσταση είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην παρουσία αργών μηχανισμών και στο μηχανισμό της ιοντικής αγωγιμότητας. Το ηλεκτρικό μέτρο υπολογίζεται από το ε^* ως

$$M^*(\omega) = M' + iM'' = \frac{1}{\varepsilon^*(\omega)} \Rightarrow M' = \frac{\varepsilon'}{\varepsilon'^2 + \varepsilon''^2}, M'' = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'^2 + \varepsilon''^2} \quad (4.47)$$

Στην κατανομή Debye το ηλεκτρικό μέτρο προκύπτει από τις εξισώσεις 4.47 και 4.37:

$$M^*(\omega) = \frac{1}{\varepsilon^*(\omega)} = \frac{1}{\varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + i\omega\tau_\varepsilon}} = \frac{1}{\varepsilon_\infty} + \frac{\frac{1}{\varepsilon_s} - \frac{1}{\varepsilon_\infty}}{1 + i\omega\frac{\varepsilon_\infty}{\varepsilon_s}\tau_\varepsilon} = M_\infty + \frac{M_s - M_\infty}{1 + i\omega\tau_M} \quad (4.48)$$

όπου $\tau_M = \tau_\varepsilon \cdot (\varepsilon_\infty / \varepsilon_s)$. Τα αντίστοιχα φάσματα M' και M'' της Εικόνας 4.23α φαίνονται στην Εικόνα 4.23β. Οι μηχανισμοί χαλάρωσης εμφανίζονται ξανά ως μέγιστα στο M'' , ελαφρώς μετατοπισμένα. Επιπλέον, σε αυτήν την αναπαράσταση η συνεισφορά της αγωγιμότητας αντιστοιχεί στην τομή των M' και M'' , ενώ η ύπαρξη ασυμμετρίας στο μέγιστο του M'' είναι ένδειξη μοριακού μηχανισμού που υπερκαλύπτεται από την αγωγιμότητα (π.χ. Κεφάλαιο 8). Επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις όπου παρουσιάζει ενδιαφέρον η ιοντική αγωγιμότητα του συστήματος, τα διηλεκτρικά φάσματα αναπαριστώνται και με τη μορφή της μιγαδικής αγωγιμότητας $\sigma^*(\omega)$, η οποία δίνει έμφαση στην κίνηση των φορέων φορτίου σε χαμηλές και υψηλές συχνότητες.

$$\sigma^*(\omega) = \sigma' - i\sigma'' = i\omega\varepsilon_0\varepsilon^*(\omega) \Rightarrow \sigma' = \omega\varepsilon_0\varepsilon'', \sigma'' = \omega\varepsilon_0\varepsilon' \quad (4.49)$$

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.6.5, η κατανομή των χρόνων χαλάρωσης συνήθως περιγράφεται από μη Debye συναρτήσεις. Επιπλέον της HN, στον Πίνακα 4.12 συνοψίζονται οι εκφράσεις της διηλεκτρικής συνάρτησης καθώς και η σχέση μεταξύ των χρόνων ε^* και M^* των συναρτήσεων Kohlrausch-Williams-Watts (KWW), Cole-Cole (CC) [70], και Cole-Davidson (CD) [71,72].

Πίνακας 4.12. Οι διάφορες δυνατότητες περιγραφής της διηλεκτρικής συνάρτησης.

• Debye : $\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + i\omega\tau}$, $\tau_M = \tau_\varepsilon \times \left(\frac{\varepsilon_\infty}{\varepsilon_s} \right)$
• Kohlrausch – Williams – Watts : $\varepsilon(t) = \varepsilon_\infty + (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \times \left[1 - \exp \left[- \left(\frac{t}{\tau} \right)^\beta \right] \right]$, $\tau_M = \tau_\varepsilon \times \left(\frac{\varepsilon_\infty}{\varepsilon_s} \right)^{\frac{1}{\beta}}$
• Cole – Cole : $\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \frac{1}{1 + (i\omega\tau)^\alpha}$, $\tau_M = \tau_\varepsilon \times \left(\frac{\varepsilon_\infty}{\varepsilon_s} \right)^{\frac{1}{\alpha}}$
• Cole – Davidson : $\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \frac{1}{[1 + i\omega\tau]^\gamma}$, $\tau_M = \tau_\varepsilon \times \left(\frac{\varepsilon_\infty}{\varepsilon_s} \right)^{\frac{1}{\gamma}}$
• Havriliak – Negami : $\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \frac{1}{(1 + (i\omega\tau)^\alpha)^\gamma}$, $\tau_M = \tau_\varepsilon \left(1 + \frac{\Delta\varepsilon}{\varepsilon_\infty} \right)^{-1/\beta_{KWW}}$

Σε όλες τις περιπτώσεις ισχύει $0 < \alpha, \gamma \leq 1$. Η CC δίνει καμπύλες απορρόφησης που είναι συμμετρικά πεπλατυσμένες, η CD δίνει μια διαπλάτυνση προς τις μεγαλύτερες συχνότητες, και η HN, που είναι και η πιο εύχρηστη και γι' αυτό χρησιμοποιείται σε αυτήν την εργασία, δίνει μια ενδιάμεση καμπύλη.

4.7 Αναφορές

- (1) Aliferis, T. Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *J. Polym. Sci., Polym. Chem.* **2005**, 43, 4670.
- (2) Watanabe, J.; Uematsu, I. *Polymer* **1984**, 25, 1711.
- (3) Yakel, H. L. *Acta Crystallographica* **1953**, 6, 724.
- (4) Mihov, G.; Gregel-Koehler D.; Lübbert, A.; Vandermeulen G. W. M.; Herrmann, A.; Klok, H.-A.; Müllen, K. *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 283.
- (5) Lee, W.; Ji, R.; Gösele, U.; Nielsch, K. *Nature Materials* **2006**, 5, 741.
- (6) Wang, C. C.; Pecora, R. *J. Chem. Phys.* **1980**, 72, 5333.
- (7) Wieringa, R. H.; Siesling, E. A.; Werkman, P. J.; Angerman, H. J.; Vorenkamp, E. J.; Schouten, A. J. *Langmuir* **2001**, 17, 6485.
- (8) McNaughton, J. L.; Mortimer, C. T. “*Differential Scanning Calorimetry*” *IRS Physical Chemistry Series 2, vol. 10*, Butterworths, London, 1975.
- (9) Gitsas, A.; Floudas, G.; Wegner, G. *Physical Review E* **2004**, 69, 041802.
- (10) Wery, J. P.; Schevitz, R. W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, 1, 365.
- (11) Brunger, A. T. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 862.
- (12) Verlinde, C. L. M. J.; Merritt, E. A., van Den Akker, F.; Kim, H.; Feil, I.; Delboni, L. F.; Mande, S. C.; Sarfaty, S.; Petra, P. H.; Hol, W. G. J. *Protein Sci.* **1994**, 3, 1670.

- (13) Kendrew, J.; Bodo, G.; Dintzis, H.; Parrish, R.; Wyckoff, H.; Phillips, D. *Nature*, **1958**, *181*, 662.
- (14) Cochran, W.; Crick, F. H. C.; Vand, V. *Acta Crystallogr.* **1952**, *5*, 581.
- (15) Branden, C.; Tooze, J. “*Introduction to Protein Structure*”, Garland Publishing, New York, 1999.
- (16) Fischbach, I.; Pakula, T.; Minkin, P.; Fechtenkötter, A.; Müllen, K.; Spiess, H. W.; Saalwächter, K. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 6408.
- (17) Π. Παπαδόπουλος, Διδακτορική διατριβή, Ιωάννινα, 2005.
- (18) Garcia-Viloca, M.; Gelabert, R.; González-Lafont, A.; Moreno, M.; Lluch, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10203.
- (19) Bao, D.; Huskey, W. P.; Kettner, C. A.; Jordan, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4684.
- (20) McDermott, A.; Ridenour, C. F. in “*Encyclopedia of NMR*”, Emsley, J. W. (ed.) pp. 3820-3824, Wiley, Sussex, 1996.
- (21) Wüthrich, K. “*NMR of Proteins and Nucleic Acids*”, Wiley-Interscience, New York, 1986.
- (22) Branden, C.; Tooze, J. “*Introduction to Protein Structure*”, Garland Publishing, New York, 1999.
- (23) Bruch, M. R., Ed., “*NMR spectroscopy techniques*”, Dekker, New York, 1996.
- (24) Evans, J. N. S. “*Biomolecular NMR spectroscopy*”, Oxford University Press, New York, 1995.
- (25) Karplus, M. *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11.
- (26) Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. “*Spectrometric Identification of Organic Compounds*”, Wiley, New York, 1991.
- (27) Komoroski, R. A.; Peat, I. R.; Levy, G. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *65*, 272.
- (28) Belich, H. E.; Cutnell, J. D.; Glasel, J. A. *Biochemistry* **1976**, *15*, 2455.
- (29) Deslauriers, R.; Somorjai, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 1931.
- (30) Deslauriers, R.; Ralston, E.; Somorjai, R. L. *J. Molec. Biol.* **1977**, *113*, 697.
- (31) Deslauriers, R.; Smith, I. C. P.; Levy, G. C.; Orlowski, R.; Walter, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3912.
- (32) <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/Handouts/nmr-c13/cdata.htm>
- (33) Saito, H. *Magn. Res. Chem.* **1986**, *24*, 835.
- (34) Ando, I.; Saito, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T. *Macromolecules* **1984**, *17*, 457.

- (35) Yamanobe, T.; Tsukahara, M.; Komoto, T.; Watanabe, J.; Ando, I.; Uematsu, I.; Deguchi, K.; Fujito, T.; Imanari, M. *Macromolecules* **1988**, *21*, 48.
- (36) Pihlaja, K.; Kleipeter, E. “*Carbon-13 NMR chemical shifts in structural and stereochemical analysis*”, VCH, New York, 1994.
- (37) Saito, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T.; Ando, I.; Miyata, T. *Biopolymers* **1984**, *23*, 2279.
- (38) Saito, H.; Tabeta, R. *Chem. Lett.* **1985**, *1*, 83.
- (39) Yamanobe, T.; Tsukahara, M.; Komoto, T.; Watanabe, J.; Ando, I.; Uematsu, I.; Deguchi, K.; Fujito, T.; Imanari, M. *Macromolecules* **1988**, *21*, 48.
- (40) Hartmann, S. R.; Hahn, E. L. *Phys. Rev.* **1962**, *128*, 2042.
- (41) Schaefer, J.; Stejskal, E. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 1031.
- (42) Gullion, T.; Schaefer, J. *J. Magn. Reson.* **1989**, *81*, 196.
- (43) Guillion, T.; Schaefer, J. *Adv. Magn. Reson.* **1989**, *13*, 57.
- (44) Marshall, G. R.; Beusen, D. D.; Kocielek, K.; Redlinski, S.; Leplawy, M. T.; Pan, Y.; Schaefer, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 963.
- (45) Langer, B.; Schnell, I.; Spiess, H. W.; Grimmer, A.-R. *J. Magn. Reson.* **1999**, *138*, 182.
- (46) Metz, G.; Wu, X.; Smith, S. O. *J. Magn. Reson.* **1994**, *110*, 219.
- (47) Bennett, A. E.; Rienstra, C. M.; Auger, M.; Lakshmi, K. V.; Griffin, R. G. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 6951.
- (48) Saalwächter, K.; Graf, R.; Spiess, H. W. *J. Magn. Reson.* **1999**, *140*, 471.
- (49) Saalwächter, K.; Graf, R.; Spiess, H. W. *J. Magn. Reson.* **2001**, *148*, 398.
- (50) Saalwächter, K.; Graf, R.; Spiess, H. W. *J. Magn. Reson.* **2002**, *22*, 154.
- (51) Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W. “*Multidimensional Solid-state NMR and Polymers*”, Academic Press, New York, 1994, p. 364-366.
- (52) Kremer, F.; Schönhals, A. “*Broadband Dielectric Spectroscopy*”, Springer, Berlin, 2002.
- (53) Clausius, R. “*Die Mechanische Wärmelehre*” vol. II, Braunschweig, 1879.
- (54) Mossotti, P. F. *Bibl. Univ. Modena* **1847**, *6*, 193.
- (55) Onsager, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *58*, 1486.
- (56) Kirkwood, J. G. *J. Chem. Phys.* **1939**, *58*, 911.
- (57) Kirkwood, J. G. *Ann. NY Acad. Sci.* **1940**, *40*, 315.
- (58) Kirkwood, J. G. *Trans. Faraday Soc.* **1946**, *42A*, 7.
- (59) Fröhlich, H. “*Theory of Dielectrics*”, Oxford University Press, London, 1958.
- (60) Landau, L. D.; Lifschitz, E. M. “*Textbook of Theoretical Physics*” vol. V *Statistical Physics*, Akademie-Verlag, Berlin, 1979.

- (61) Böttcher, C. J. F.; Bordewijk, P. “*Theory of Electric Polarization*” vol. II *Dielectrics in time-dependent fields*, Elsevier, New York, 1978.
- (62) Kohlrausch, R. *Ann. Phys.* **1847**, 12, 393.
- (63) Williams, G.; Watts, D. C. *Trans. Faraday Soc.* **1970**, 66, 80.
- (64) Serghei, A.; Kremer, F. *Dielectrics Newsletter* **2006**, Issue Dec.
- (65) Choi, J.; Luo, Y.; Wehrspohn, R. B.; Hillebrand, R.; Schilling J.; Gösele, U. *J. Appl. Phys.* **2003**, 94, 4757.
- (66) McCrum, N. G.; Read, B. E.; Williams, G. “*Anelastic and Dielectric Effects in Polymeric Solids*”, Dover, New York, 1991.
- (67) Havriliak, S.; Negami, S. *Polymer* **1967**, 8, 161.
- (68) Floudas, G. in ref. [52] chapter 8.
- (69) Papadopoulos, P.; Floudas, G. *Dielectrics Newsletter* **2005**, Issue Nov.
- (70) Cole, K. S.; Cole, R. H. *J. Chem. Phys.* **1941**, 9, 341.
- (71) Davidson, D. W.; Cole, R. H. *J. Chem. Phys.* **1950**, 18, 1417.
- (72) Davidson, D. W., Cole, R. H. *J. Chem. Phys.* **1951**, 19, 1484.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Αυτοοργάνωση και μοριακή δυναμική τυχαίων συμπολυπεπτιδίων

5.1 Εισαγωγή

Στο κεφάλαιο αυτό μελετάμε την αυτοοργάνωση και τη δυναμική συμπολυπεπτιδίων με τυχειότητα στην κατανομή των επαναλαμβανόμενων μονάδων. Ακόμη, οι διαφορετικού μήκους πλευρικές ομάδες προσφέρονται για την εξέταση του τρόπου “πακεταρίσματος” πεπτιδίων με διαφορετικό όγκο. Πιο συγκεκριμένα εστιάζουμε τη μελέτη μας στο κατά πόσο μια στατιστική εναλλαγή των επαναλαμβανόμενων μονάδων επηρεάζει τη δευτεροταγή δομή του τελικού πολυπεπτιδίου. Για το σκοπό αυτό έχουν επιλεγεί δυο πολυπεπτίδια που παρουσιάζουν και τις δύο βασικές δευτεροταγείς δομές (α-έλικες και β-φύλλα). Έτσι μελετάμε την επίδραση της τοπολογίας και στις δύο δευτεροταγείς δομές. Επίσης, είναι γνωστό ότι τα πολυπεπτίδια αυτά έχουν διαφορετική δυναμική. Η δυναμική σε συμπολυπεπτίδια με στατιστική/τυχαία κατανομή, αναμένεται να διαφέρει από τα αντίστοιχα ομοπολυπεπτίδια.

Όπως έχουμε αναφέρει στο Κεφάλαιο 2, τα “άκαμπτα” συνθετικά πολυμερή με εύκαμπτες πλευρικές ομάδες [1] και τα πολυπεπτίδια με α-έλικες [2] παρουσιάζουν, όπως και τα άμορφα πολυμερή, μια δυναμική διεργασία που σχετίζεται με την υαλώδη μετάβαση (T_g). Στην περίπτωση των πολυπεπτιδίων, μελετήθηκε πρόσφατα η προέλευση του α-μηχανισμού χαλάρωσης με χρήση διηλεκτρικής φασματοσκοπίας συναρτήσεως της θερμοκρασίας T και της πίεσης P [3]. Διαπιστώθηκε ότι για το “πάγωμα” της δυναμικής στο T_g είναι υπεύθυνη η ενδομοριακή δυναμική των άμορφων τμημάτων της κύριας αλυσίδας.

Τα πολυμερή πολυ(γ-αλκυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος) (PnALG) συνδυάζουν τη δομή ράβδου με πλευρικές ομάδες με την πολυπεπτιδική κύρια αλυσίδα, και μπορούν να θεωρηθούν ως πρότυπα συστήματα για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ της υπερμοριακής οργάνωσης και της μοριακής δυναμικής. Συστηματικές μελέτες των PnALG συναρτήσεως του μήκους των αλκυλίων, n , αποκάλυψαν εύκαμπτες πλευρικές ομάδες για $n < 10$, ενώ για $n \geq 10$ οι πλευρικές ομάδες μπορούσαν να κρυσταλλωθούν φτιάχνοντας παραφινικούς κρυσταλλίτες [4-6]. Ωστόσο, σε πολλές από αυτές τις πρώτες μελέτες έγινε η

συνήθης παραδοχή της τέλει α-ελικοειδούς διαμόρφωσης. Εκτός από τα ομοπολυμερή, μελετήθηκε και η μοριακή δυναμική των πλευρικών ομάδων σε συμπολυμερή πολυ(γ-μεθυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος-co-γ-στεαρυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος) [πολυ(MLG-co-SLG)] με ποσοστό στεαρυλίου από 0 έως 83% με χρήση ^{13}C CP-MAS NMR [7]. Από τις χημικές μετατοπίσεις του άνθρακα C_α και του αμιδίου $\text{C}=\text{O}$ βρέθηκε ότι όλα τα συμπολυμερή σχηματίζουν α-έλικες ανεξάρτητα από το ποσοστό του στεαρυλίου. Επίσης θεωρήθηκε ότι οι έλικες είναι τέλειες. Με αυτήν την παραδοχή, η περιοχή των πλευρικών ομάδων στα συμπολυμερή σε θερμοκρασίες κάτω από το σημείο τήξης (T_m) χωρίστηκε σε τρεις “φάσεις” αποτελούμενες από ημιεύκαμπτες πλευρικές ομάδες του MLG και εσωτερικές πλευρικές ομάδες του SLG προσαρτημένες στην άκαμπτη α-έλικα, άμορφες ομάδες στεαρυλίου, και κρυσταλλικές ομάδες στεαρυλίου.

Μια παλαιότερη μελέτη της δυναμικής [8] σε συμπολυμερές πολυ(MLG-co-SLG) με 30% στεαρύλιο, MS30 (στη συνέχεια χρησιμοποιούμε το συμβολισμό MS_x , όπου x είναι το ποσοστό των ομάδων στεαρυλίου), με διάφορες τεχνικές NMR και ΔΦ έδειξε μια ιεραρχία δυναμικής, από την τοπική κίνηση του διπόλου της πλευρικής ομάδας καρβοξυλίου με θερμοκρασιακή εξάρτηση τύπου Arrhenius και ενέργεια ενεργοποίησης ~ 43 kJ/mol (γ-μηχανισμός), το β-μηχανισμό που αποδόθηκε στην υαλώδη μετάβαση διπόλων άμορφων πλευρικών ομάδων εστέρα, μέχρι τον α-μηχανισμό που συζητήθηκε στα πλαίσια μιας περιορισμένης κίνησης (λίκνιση) ή την κίνηση τύπου “chopstick” μιας άκαμπτης ραβδόμορφης α-έλικας. Η δυναμική της ράβδου στο ίδιο συμπολυμερές προσδιορίστηκε από τη μέτρηση της διεπιφανειακής απόστασης μεταξύ πρωτονιωμένων και δευτεριωμένων στοιβάδων [9].

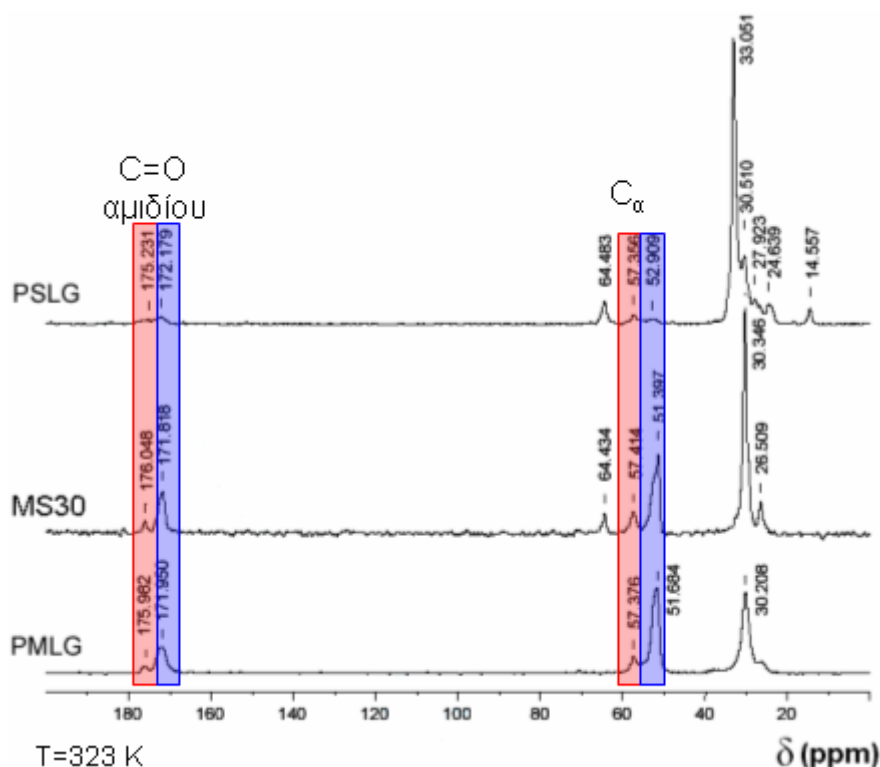
Άλλες μελέτες για τις διαμορφώσεις, τη μοριακή δυναμική, και τις χωρικές ετερογένειες δύσκαμπτων μακρομορίων με εύκαμπτες πλευρικές ομάδες με ακτίνες-X και τοπικές μεθόδους NMR πρότειναν μια στρωματική δομή της κύριας αλυσίδας - ράβδου σε διαχωρισμό φάσης με τις πλευρικές ομάδες υδρογονανθράκων [10-12]. Ακόμη, βρέθηκε ότι οι πλευρικές ομάδες σχηματίζουν κρυσταλλικές ή άμορφες περιοχές ανάλογα με τη φύση της κύριας αλυσίδας και την οργάνωσή τους [12]. Ο διαστρωματικός διαχωρισμός μεταξύ των κύριων αλυσίδων, οι οποίες σχηματίζονται από *para*-υποκατεστημένες αρωματικές ομάδες ενωμένες με ομάδες εστέρα, αμιδίου ή ιμιδίου, ερμηνεύτηκε με βάση τις διαφορετικές διαμορφώσεις και κινητικότητες των αλυσίδων υδρογονάνθρακα. Επιπλέον, σε συμπολυμερή με διαφορετικές πλευρικές ομάδες οι αποστάσεις των στρωμάτων άλλαξαν για να εξασφαλιστεί πλήρης κάλυψη του χώρου από τις πλευρικές αλυσίδες [11].

Τα συμπολυμερή MLG και SLG αποτελούν πρότυπα συστήματα για μοριακά ενισχυμένα υγρά ή νανοσύνθετα υλικά: οι πλευρικές αλυσίδες σχηματίζουν τη ρευστή μήτρα και οι ενσωματωμένες κύριες αλυσίδες - ράβδοι είναι στοιχεία ενίσχυσης που παρέχουν την απαιτούμενη μηχανική σταθερότητα. Επίσης, οπτικές και θερμικές μελέτες έδειξαν την ύπαρξη μικρών απωλειών και υψηλής θερμικής σταθερότητας, αντίστοιχα, σε φιλμ Langmuir-Blodgett (LB) από πολυ(MLG-co-SLG). Η κατανόηση της αυτοοργάνωσης και της δυναμικής είναι απαραίτητη για τη σχεδίαση φιλμ LB και συσκευών που βασίζονται σε τέτοιες υπερμοριακές αρχιτεκτονικές. Παρόλα αυτά, ο λεπτομερής μηχανισμός αυτοοργάνωσης και η δυναμική δεν έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα. Σε αυτό το Κεφάλαιο [13] μελετάμε την αλληλεπίδραση μεταξύ της υπερμοριακής οργάνωσης και της μοριακής δυναμικής σε μια σειρά πολυ(MLG-co-SLG) που καλύπτει μια ευρύτερη έκταση σχετικής σύστασης με σκοπό τη δημιουργία μιας ρεαλιστικής εικόνας της δομής. Γι' αυτόν το λόγο μελετάμε τις θερμοδυναμικές μεταβάσεις με διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (ΔΘΣ), την πεπτιδική δευτεροταγή δομή (α-έλικες/β-φύλλα) και τις διαμορφώσεις των πλευρικών ομάδων (gauche/trans) με ^{13}C CP NMR και σκέδαση ακτίνων-X σε ευρείες γωνίες (WAXS), και τη δυναμική με διηλεκτρική φασματοσκοπία και τοπικές τεχνικές NMR στερεάς κατάστασης [14]. Η ΔΦ και το NMR παρέχουν, αντίστοιχα, τη χρονική κλίμακα και τη γεωμετρία των κινήσεων. Βρέθηκε μια δυναμικά μεταβαλλόμενη δομή που αποτελείται από α-έλικες και β-φύλλα σε μορφή φιάλης, με τις άμορφες ομάδες MLG/SLG να σχηματίζουν το "λαιμό" και τις πιο απομακρυσμένες ομάδες του SLG να σχηματίζουν τη "φιάλη", και μελετήσαμε τις συνέπειες της αυτοοργάνωσης στη δυναμική.

5.2 Αποτελέσματα

5.2.1 Δευτεροταγής δομή. Όπως είδαμε στο Κεφάλαιο 3.2, οι χημικές μετατοπίσεις του ^{13}C είναι ένας ευαίσθητος δείκτης της τοπικής διαμόρφωσης των πεπτιδίων, και ως εκ τούτου το ^{13}C CP-MAS NMR χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό των σημαντικότερων δευτεροταγών δομών των πολυπεπτιδίων (α-έλικες και β-φύλλα) [15,16]. Οι παρατηρούμενες διαφορές στη χημική μετατόπιση για τις διάφορες δευτεροταγείς δομές οφείλονται σε μεταβολές των διέδρων γωνιών (Φ και Ψ) ανάλογα με την τοπική διαμόρφωση των αμινοξέων και συσχετίζεται με τον τύπο του δεσμού υδρογόνου που υπάρχει (ενδο- ή διαμοριακός). Η Εικόνα 5.1 δείχνει τα φάσματα ^{13}C CP-MAS NMR του PSLG (επάνω), του PMLG (κάτω), και του συμπολυμερούς MS30 (μέσον), καταγεγραμμένα στα 323 K. Στο φάσμα του PSLG οι κορυφές με χημική μετατόπιση $\delta=172.3$ και 52.9 ppm προέρχονται από τους άνθρακες αμιδίου $\text{C}=\text{O}$ και C_α , αντίστοιχα, και υποδηλώνουν το σχηματισμό β-φύλλων,

ενώ οι κορυφές στα 175.2 και 57.3 ppm αντιστοιχούν σε σχηματισμό α-έλικας. Η αλληλεπικάλυψη των κορυφών μεταξύ των συντονισμών των ομάδων C=O του αμιδίου και του εστέρα στην περιοχή των 172 ppm δεν επιτρέπει τον υπολογισμό του λόγου α-ελίκων προς β-φύλλα από αυτή τη χημική μετατόπιση. Επιπλέον, η χρήση τεχνικής διασταυρούμενης πόλωσης (cross-polarization) για την ενίσχυση του ασθενούς σήματος οδηγεί μάλλον σε ποιοτική παρά ποσοτική αξιολόγηση του σήματος. Έτσι, μόνο η περιοχή του C_α χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή του λόγου α-ελίκων προς β-φύλλα, και αυτός ο λόγος για το PSLG είναι 60:40.



Εικόνα 5.1. Φάσματα ^{13}C CP NMR των PSLG (επάνω), MS30 (μέσον), και PMLG (κάτω), καταγεγραμμένα σε ταχεία περιστροφή υπό μαγική γωνία, ενεργό θερμοκρασία 323 K, διάρκεια παλμού επαφής 1 ms, και διάταξη ετεροπυρηνικής αποσύζευξης με διαμόρφωση φάσης δύο παλμών ^1H (TPPM). Στο PSLG ο λόγος α-ελίκων/β-φύλλων είναι 60:40, βάσει των συντονισμών του C_α σε δ~57.3 και 52.9 ppm, που αντιστοιχούν σε α-έλικες και β-φύλλα. Στο MS30 και στο PMLG υπάρχουν τόσο α-έλικες (δ~176 και 57.4 ppm) όσο και β-φύλλα (δ~172 και 51.7 ppm), αλλά ο διαχωρισμός τους είναι αδύνατος. Η κορυφή στα 33 ppm, που αποδίδεται σε εκτεταμένες διαμορφώσεις trans των στεαρυλίων στο φάσμα του PSLG, δεν υπάρχει στο φάσμα του MS30 στην ίδια θερμοκρασία λόγω του επιπλέον όγκου που προκύπτει από τις ομάδες MLG.

Οι συντονισμοί των πλευρικών ομάδων του PSLG παρατηρούνται επίσης στην περιοχή από 14.6 ppm, που αντιστοιχεί στην τελική μεθυλομάδα, μέχρι 33.0 ppm, που αντιστοιχεί στο ισχυρότερο σήμα των ομάδων CH₂. Η κορυφή του μεθυλενίου στα 33.0 ppm είναι ενδεικτική των σημαντικά εκτεταμένων πλευρικών αλυσίδων στεαρυλίου, οι οποίες παίρνουν διαμορφώσεις trans, ενώ η κορυφή γύρω στα 30 ppm δείχνει διαμορφώσεις gauche

(παρόμοιες με τις μη κρυσταλλικές περιοχές του πολυαιθυλενίου) [17]. Επιπλέον, οι κυρίαρχες *trans* διαμορφώσεις υποδηλώνουν την ύπαρξη μεγάλων κρυσταλλικών περιοχών σχηματισμένων από τις πλευρικές ομάδες στεαρυλίου, και μικρές μόνο άμορφες περιοχές. Αυτό βρίσκεται σε καλή συμφωνία με τους βαθμούς κρυσταλλικότητας που προσδιορίστηκαν από τη θερμότητα τήξης των αντίστοιχων μεθυλομάδων στα ομο- και συμπολυμερή (βλ. παρακάτω). Όλοι οι συντονισμοί των αλειφατικών ομάδων (με εξαίρεση του άνθρακα CH στην περιοχή 52 – 57 ppm) είναι οξείς με εύρος στο ήμισυ του μεγίστου από 140 έως 215 Hz.

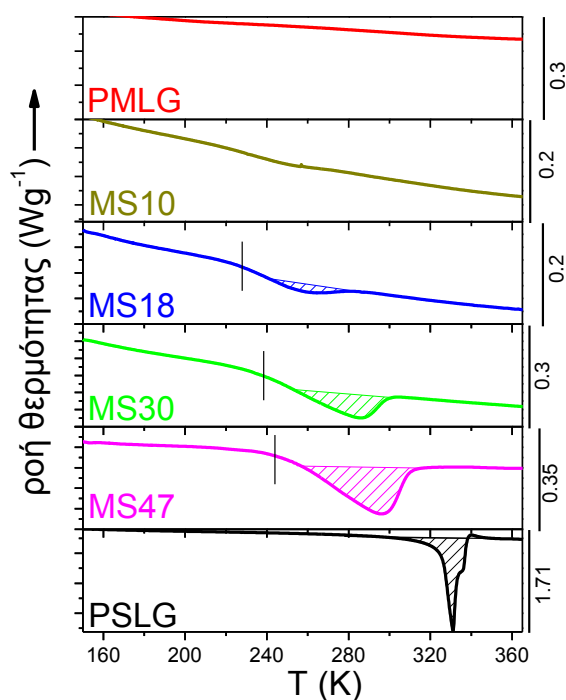
Στο φάσμα ^{13}C CP-MAS του MS30 (βλ. Εικόνα 5.1), ο κυρίαρχος συντονισμός CH_2 βρίσκεται περίπου στα 30 ppm, υποδηλώνοντας αλυσίδες με διαμορφώσεις *gauche*. Η κορυφή στα 33.0 ppm, εγγενής για τη διαμόρφωση *trans* χαμηλής ενέργειας, παρατηρείται ως πολύ ασθενής “ώμος”, που ξεχωρίζει ως αυτόνομη κορυφή μόνο σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η διαφορετική διαμόρφωση των αλειφατικών αλυσίδων του SLG στο MS30, σε σχέση με εκείνες στο ομοπολυμερές PSLG, σχετίζονται με τον επιπλέον διαθέσιμο όγκο που προσφέρεται από τις πολυάριθμες ομάδες MLG στο συμπολυμερές και συμβαίνει για θερμοδυναμικούς λόγους. Όπως έχει περιγραφεί στο παρελθόν [12], οι διαμορφώσεις των πλευρικών ομάδων σχετίζεται με την οργάνωση της κύριας αλυσίδας. Έτσι, η πολύ ασθενής ή ανύπαρκτη κορυφή στα 33.0 ppm υπονοεί το σχηματισμό μάλλον μικρών περιοχών *καθαρού* SLG στο MS30 και πλειονότητα *τυχαίων* ομάδων MLG/SLG.

Από την άλλη πλευρά, στο φάσμα ^{13}C CP-MAS NMR του PMLG (Εικόνα 5.1), οι συνηθισμένοι δείκτες της δευτεροταγούς δομής (συντονισμοί του CH και C=O) δεν μπορούν να δώσουν με σαφήνεια το λόγο μεταξύ των υπαρχόντων δευτεροταγών δομών λόγω αλληλεπικάλυψης των κορυφών τόσο του αμιδίου (με το τμήμα του εστέρα C=O) όσο και του CH (με την ομάδα OCH_3 σε $\delta \sim 51.6$ ppm). Είναι βέβαιο ότι υπάρχουν α-έλικες στη δευτεροταγή οργάνωση του PMLG, όπως υποδεικνύεται από τις κορυφές στα 176.0 και 57.4 ppm. Η πεπτιδική αλυσίδα περιέχει επίσης β-φύλλα, καθώς οι κορυφές στα 172.0 και 51.7 ppm έχουν μεγαλύτερη ένταση συγκριτικά με εκείνες που σχετίζονται με την α-ελικοειδή δευτεροταγή δομή. Να σημειωθεί ότι μια αμιγώς α-ελικοειδής διαμόρφωση θα είχε ως αποτέλεσμα δύο κορυφές με συγκρίσιμες εντάσεις στην περιοχή του C_β σε $\delta \sim 30$ ppm [16], επειδή οι ομάδες CH_2 β και γ έχουν παρόμοια φύση και περιβάλλον, και επομένως παρόμοια απόδοση διασταυρούμενης πόλωσης.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημάνουμε ότι οι συνθήκες καταβύθισης μπορούν να επηρεάσουν τη δευτεροταγή δομή των πεπτιδίων. Για παράδειγμα, η προετοιμασία του PSLG με διαφορετικές συνθήκες καταβύθισης (σε μικρότερο χρόνο), καίτοι με τον ίδιο διαλύτη, είχε ως αποτέλεσμα λιγότερες α-έλικες (λόγος α-ελίκων προς β-φύλλα 40:60) με

συνέπειες στη δυναμική (βλ. παρακάτω). Λόγω της ύπαρξης και των δύο δευτεροταγών δομών στα ομοπολυμερή και της εγγύτητας των χημικών μετατοπίσεων, ο διαχωρισμός των δευτεροταγών δομών στα συμπολυπεπίδα είναι εξαιρετικά δυσχερές. Επομένως, στα συμπολυμερή θεωρούμε ότι υπάρχουν και τα δύο είδη δευτεροταγούς δομής.

5.2.2 Θερμικές και θερμοδυναμικές ιδιότητες. Για να διερευνηθεί η δυνατότητα κρυστάλλωσης της πλευρικής αλυσίδας του PSLG στα συμπολυμερή καθώς επίσης και το “πάγωμα” της δυναμικής της κύριας αλυσίδας στη θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης, έγιναν θερμικές μετρήσεις. Αν και η κρυστάλλωση του SLG σε παρόμοια συμπολυμερή έχει μελετηθεί στο παρελθόν [12,18], η προέλευση του παγώματος της δυναμικής στο T_g σε ομοπολυμερή (PSLG, PMLG) και συμπολυμερή των PMLG και PSLG παραμένει αδιευκρίνιστη. Τα ίχνη $\Delta\Theta\Sigma$ των συστημάτων υπό μελέτη, μετρημένων κατά τη θέρμανση με ρυθμό 10 K/min, παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.2. Φαίνεται μια ενδόθερμη κορυφή με εμβαδόν που είναι συνάρτηση της αναλογίας του PSLG στα συμπολυμερή, υποδηλώνοντας την παρουσία αλληλουχιών μονάδων SLG, τουλάχιστο στα τα δείγματα MS18, MS30, και MS47. Σε θερμοκρασίες κάτω από την ενδόθερμη κορυφή τήξης, φαίνεται μία μοναδική υαλώδης μετάβαση ως μεταβολή βήματος στη θερμική ροή.



Εικόνα 5.2. Ίχνη $\Delta\Theta\Sigma$ κατά τη δεύτερη θέρμανση με ρυθμό 10 K/min, που εμφανίζουν μια ενδόθερμη κορυφή της οποίας η θέση και το εμβαδόν εξαρτώνται από την περιεκτικότητα σε PSLG.

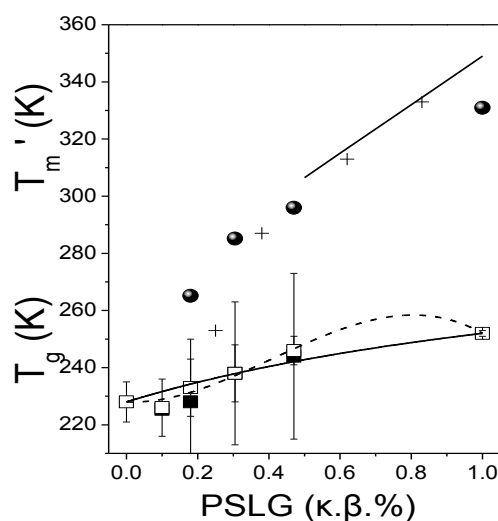
Οι τιμές του T_g που λαμβάνονται με αυτόν τον τρόπο από τα συμπολυμερή και οι (φαινόμενες) θερμοκρασίες τήξης, T_m' , παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.3. Στην ίδια εικόνα συμπεριλαμβάνονται και οι θερμοκρασίες υάλου που μετρήθηκαν με $\Delta\Phi$ (βλ. παρακάτω) για τα συμπολυπεπτίδια και τα ομοπολυπεπτίδια. Το T_g των συμπολυπεπτιδίων περιγράφεται από την εξίσωση Gordon-Taylor [19]

$$T_g = (w_1 T_{g_1} + K w_2 T_{g_2}) / (w_1 + K w_2) \quad (5.1)$$

όπου T_{g_i} και w_i είναι οι θερμοκρασίες υάλου και τα κλάσματα όγκου των ομοπολυμερών, αντίστοιχα, και K είναι μια παράμετρος (θεωρώντας προσθετικότητα του όγκου, $K = \rho_1 \Delta\alpha_2 / \rho_2 \Delta\alpha_1$, όπου ρ και $\Delta\alpha = \alpha_{\text{τήγμα}} - \alpha_{\text{υγρό}}$ είναι η πυκνότητα και η αύξηση του συντελεστή θερμικής διαστολής των αντίστοιχων συστατικών στο T_g). Παρατηρείται μερική απόκλιση από την προσθετικότητα των θερμοκρασιών υάλου, με $K = 1.6 \pm 0.5$. Στην περίπτωση των τυχαίων συμπολυμερών, μια δεύτερη προσέγγιση από τους Schneider *et al.* [20] λαμβάνει υπόψη τις κινητικές παραμέτρους της αντίδρασης συμπολυμερισμού η οποία ελέγχει την κατανομή των αλληλουχιών των μονομερών στο συμπολυμερές (δυάδες και τριάδες) και τις συνεισφορές αυτών των αλληλουχιών στη θερμοκρασία υάλου των συμπολυμερών. Αυτή η προσέγγιση καταλήγει σε μια τροποποιημένη μορφή της εξίσωσης Gordon-Taylor, της μορφής

$$(T_g - T_{g_1}) / (T_{g_2} - T_{g_1}) = (1 + K_1) w_{2c} - (K_1 + K_2) w_{2c}^2 + K_2 w_{2c}^3 \quad (5.2)$$

όπου w_{2c} είναι το διορθωμένο κλάσμα όγκου ($w_{2c} = K w_2 / (w_1 + K w_2)$), και οι νέες παράμετροι K_1 (-1.2 ± 0.6) και K_2 (-5 ± 1) διακρίνουν τις συνεισφορές των δυάδων και των τριάδων, αντίστοιχα, στο T_g . Μια ένδειξη μη τυχαίας κατανομής μονομερών στα συμπολυμερή προκύπτει από το γεγονός ότι το K_1 είναι αρνητικό, που δείχνει αρνητική απόκλιση του T_g από την προσθετικότητα, το οποίο έχει αυξημένη κινητικότητα (λόγω άπωσης ανάμεσα στις δυάδες). Θα επιστρέψουμε στο θέμα αυτό αργότερα, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του NMR (Εικόνα 5.5) και των WAXS (Εικόνα 5.10).



Εικόνα 5.3. Εξάρτηση του T_g ($\Delta\Theta\Sigma$ γεμάτα τετράγωνα, $\Delta\Phi$ ανοικτά τετράγωνα) και του T_m' (γεμάτοι κύκλοι) από τη σύσταση. Οι σταυροί είναι οι τιμές του T_m' από την αναφορά [7] ενώ η συνεχής γραμμή είναι η γραμμική πρόβλεψη από την αναφορά [16]. Η συνεχής γραμμή προσαρμοσμένη στα σημεία του T_g βασίζεται στην εξίσωση Gordon-Taylor, με $K=1.6\pm0.5$. Η προσαρμοσμένη εξίσωση των Schneider et al. (διακεκομμένη γραμμή), προσφέρει καλύτερη περιγραφή της εξάρτησης. Οι κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τη διεύρυνση των θερμοκρασιών υάλου (ΔT_g).

Τα αποτελέσματα $\Delta\Phi$ και $\Delta\Theta\Sigma$ για τα T_g και τις θερμοότητες τήξης (ΔH) παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1. Η εξάρτηση του ΔH από τη σύσταση είναι μη γραμμική. Η σχετικά χαμηλή ενθαλπία τήξης και η επικράτηση εκτεταμένων trans διαμορφώσεων (NMR) φανερώνουν την ύπαρξη αποδιοργανωμένων κρυσταλλικών περιοχών. Πιο κάτω θα συγκρίνουμε αυτά τα θερμοδυναμικά αποτελέσματα με τοπικές μετρήσεις NMR στα ίδια δείγματα, οι οποίες παρέχουν τον τοπικό δυναμικό παράγοντα δομής της κύριας αλυσίδας και των αλειφατικών πλευρικών ομάδων.

Πίνακας 5.1. Θερμικές και θερμοδυναμικές παράμετροι των πολυπεπτιδίων.

δείγμα	$T_g^{\Delta\Theta\Sigma}$ (K)	$T_g^{\Delta\Phi}$ (K) ($\tau=1$ s)	ΔH (J/g)
PMLG		228	0
MS10	225	226	0
MS18	228	233	2
MS30	238	238	12
MS47	244	246	21
PSLG		252	69

5.2.3 Μοριακή δυναμική. Ίσως φανεί παράδοξο ότι μέθοδοι που ανιχνεύουν τη μοριακή δυναμική μπορούν να διευκολύνουν τη μελέτη της αυτοοργάνωσης, που παραδοσιακά εξετάζεται με μεθόδους όπως π.χ. σκέδαση ακτίνων-X. Σε μια πρόσφατη σειρά δημοσιεύσεων [21-25], τεκμηριώθηκε ότι ο συνδυασμός τεχνικών σκέδασης με διηλεκτρική

φασματοσκοπία σε συστήματα που περιέχουν πολυπεπτίδια παρέχει τόσο τη στατική όσο και τη δυναμική δομή, ειδικά σε πολυπεπτίδια με α-ελικοειδή δευτεροταγή δομή όπου σχηματίζεται ένα μακροδίπολο κατά μήκος του άξονα της έλικας. Σε τέτοια συστήματα, μετρήθηκε το μήκος εμμονής των ελίκων με ΔΦ και βρέθηκε, αντίθετα με την καθιερωμένη αντίληψη, ότι οι α-έλικες έχουν μικρό μήκος εμμονής. Ακόμα, η μοριακή δυναμική στα ομοπολυμερή και συμπολυμερή μπορεί να μελετηθεί αποτελεσματικά με συνδυασμό ΔΦ και τοπικών τεχνικών NMR. Η πρώτη (ΔΦ) είναι κατάλληλη για την εύρεση της χρονικής κλίμακας κίνησης των μοριακών μηχανισμών. Όμως ένα μειονέκτημα της ΔΦ είναι ότι δεν είναι σε θέση να δώσει πληροφορίες για τη γεωμετρία της κίνησης, τουλάχιστον χωρίς παραδοχές. Από την άλλη πλευρά, οι τοπικές τεχνικές NMR μπορούν να μετρήσουν τη γεωμετρία της κίνησης και, συνδυαζόμενες με τη ΔΦ, παρέχουν από κοινού τη γεωμετρία και τη χρονική κλίμακα των κινήσεων.

Θα ξεκινήσουμε με την περιγραφή των πειραμάτων δυναμικής με NMR και θα συνεχίσουμε με τα αποτελέσματα από ΔΦ. Το REPT-HDOR NMR ^{13}C - ^1H που έγινε σε ταχεία περιστροφή υπό μαγική γωνία χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί η μοριακή δυναμική του ομοπολυμερούς PSLG και τα συμπολυμερή MS30 και MS47 σε διάφορες θερμοκρασίες. Η μέθοδος βασίζεται στην καταγραφή των περιστρεφόμενων πλευρικών κορυφών, από όπου εξάγονται οι ενεργές σταθερές διπολικής σύζευξης ^{13}C - ^1H , D_{CH} , των διάφορων τμημάτων CH_n του συμπολυμερούς, και χρησιμοποιούνται για την εύρεση του τοπικού δυναμικού παράγοντα δομής, S . Όπως έχουμε περιγράψει αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 4.5, το S έχει τη μορφή πολωνύμου Legendre δεύτερης τάξης [26] και συνήθως παρουσιάζεται ως ο λόγος της πειραματικά προσδιορισμένης (ενεργούς) σταθεράς διπολικής σύζευξης των ομάδων CH_n προς τη διπολική σύζευξη για ένα άκαμπτο ζεύγος C-H.

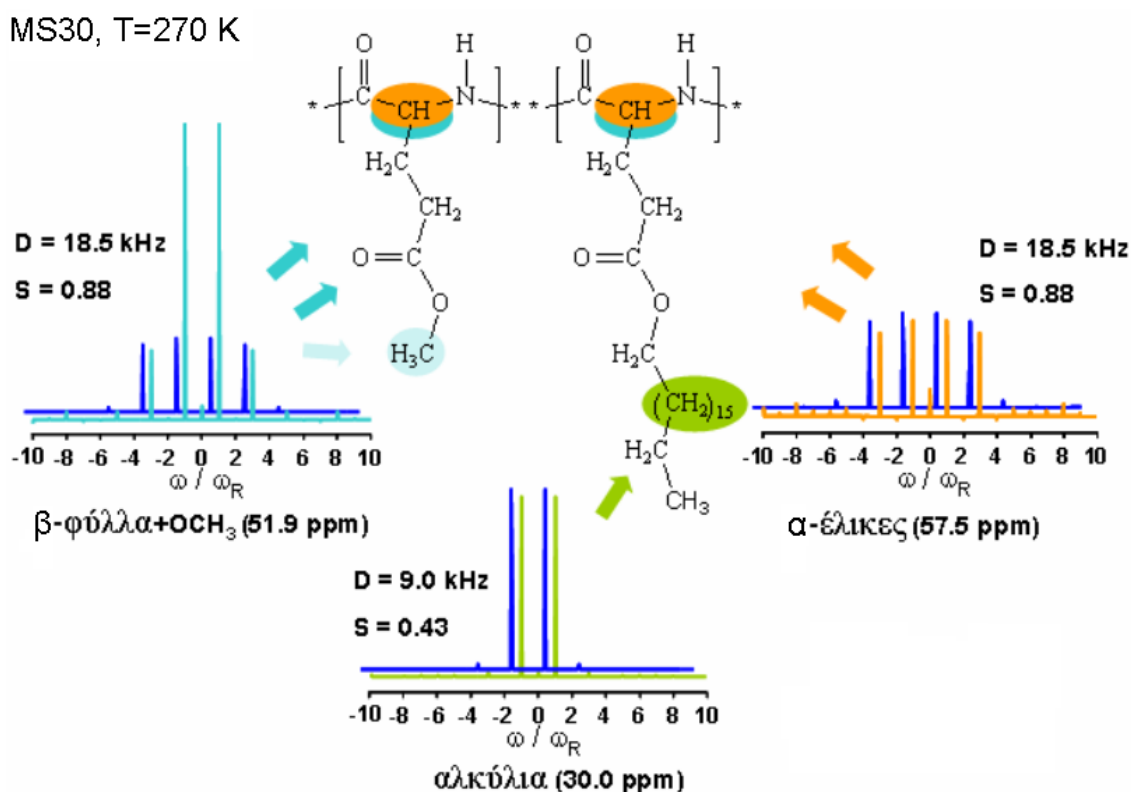
$$S = \frac{D_{\text{CH}}^{\text{eff}}}{D_{\text{CH}}^{\text{rigid}}} \quad (5.3)$$

Έτσι, $S=1$ σημαίνει απολύτως άκαμπτα τμήματα, ενώ $S=0$ προκύπτει από την πλήρη εξισορρόπηση της κινητικής της σταθεράς διπολικής σύζευξης των αντίστοιχων τμημάτων, λόγω γρήγορου αναπροσανατολισμού της τάξης των kHz. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ^{13}C - ^1H REPT-HDOR συνοψίζονται στον Πίνακα 5.2.

Πίνακας 5.2. Σταθερές διπολικής συσχέτισης D_{CH} προσδιορισμένες στις αντίστοιχες θερμοκρασίες μέσω της ανάλυσης των πλευρικών κορυφών, με τους αντίστοιχους τοπικούς δυναμικούς παράγοντες δομής, για τα τμήματα α-έλικας και β-φύλλων των CH της κύριας αλυσίδας καθώς και των μεθυλενίων των πλευρικών ομάδων.

δείγμα	$T_{\text{νεργός}}$ (K)	Σταθερές διπολικής σύζευξης D (kHz), τοπικός δυναμικός παράγοντας δομής S		
		α-έλικα CH	β-φύλλα CH	CH ₂ πλ. ομάδας
		57 ppm	52 ppm	30 ppm
PSLG	270	-	21.0 ~1	11.8 0.56
PMLG	270			-
MS47	274	21.0 ~1	20.0 0.95	9.5 0.45
MS30	270	18.5 0.88	18.5 0.88	9.0 0.43
MS30	363	18.5 0.88	52 ppm	-
			19.0 0.90	

Όπως φαίνεται στον παραπάνω Πίνακα, η κύρια αλυσίδα είναι σχετικά άκαμπτη για τα MS30 και MS47, όπως και για το PSLG στα 270 K και $f \sim 25$ kHz, με τοπικό δυναμικό παράγοντα δομής κοντά στη μονάδα, όπως προέκυψε από τις σταθερές διπολικής σύζευξης $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ στην περιοχή 18.5 – 21.0 kHz. Αυτή η κατάσταση περιγράφεται για το συμπολυμερές MS30 στην Εικόνα 5.4. Οι μετρημένες σταθερές διπολικής σύζευξης $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ των β-φύλλων των ζευγών CH έχουν ίδια ένταση με εκείνες των α-ελικοειδών διαμορφώσεων στα συμπολυμερή MS30 και MS47. Η μικρή ελάττωση του τοπικού δυναμικού παράγοντα δομής του MS30 ($S=0.88$) σε σύγκριση με το $S=0.95 - 1.0$ του MS47 δεν είναι σημαντική, και βρίσκεται στα όρια του πειραματικού σφάλματος. Στην περίπτωση του MS30, οι πλευρικές κορυφές πρώτης τάξης, που δείχνουν την απόκλιση από τη συχνότητα συντονισμού της αντίστοιχης χημικής μετατόπισης, υπερτίθενται στις πλευρικές κορυφές της άκαμπτης κύριας αλυσίδας στα 25 kHz MAS, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.4. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν μια σχετικά άκαμπτη κύρια αλυσίδα στη θερμοκρασία και τη συχνότητα που μελετήθηκε, και τη δυνατότητα μονάχα ταλαντώσεων μικρού εύρους.

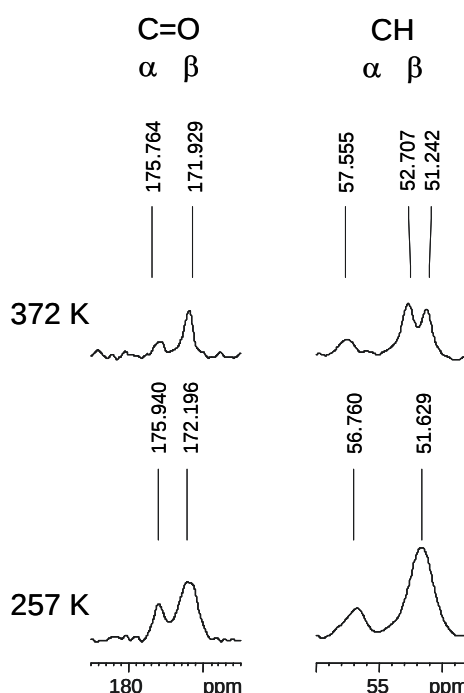


Εικόνα 5.4. Πλευρικές κορυφές REPT-HDOR καταγεγραμμένες στα 25 kHz, με περιστροφής υπό μαγική γωνία, χρόνο ανασύζευξης 80 μ s, και ενεργό θερμοκρασία 270 K του συμπολυμερούς MS30, μαζί με τις σταθερές διπολικής ανασύζευξης ^{13}C - ^1H και τους αντίστοιχους τοπικούς δυναμικούς παράγοντες δομής. Οι αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές πορτοκαλί και μπλε χρώματος στην περιοχή του CH της κύριας αλυσίδας δείχνουν ότι υπάρχουν και α -έλικες και β -φύλλα στο MS30. Η ασθενής διπολική ανασύζευξη ^{13}C - ^1H της μεθοξομάδας στο άκρο της πλευρικής αλυσίδας του PMLG (ανοιχτό μπλε), συνεισφέρει αποκλειστικά στην ένταση της πρώτης τάξης πλευρική κορυφή, που καταγράφεται για τα β -φύλλα του CH (51.9 ppm).

Ως προς τις αλειφατικές αλυσίδες, παρατηρείται μια ευκρινής μείωση του τοπικού δυναμικού παράγοντα δομής από το ομοπολυμερές PSLG ($S=0.56$) στα συμπολυμερή ($S=0.43 - 0.45$). Η παρουσία του PMLG με τις βραχείες πλευρικές αλυσίδες του στα συμπολυμερή οδηγεί σε μεγαλύτερη χωρική ελευθερία των ευκίνητων αλυσίδων στεαρυλίου του PSLG και συνεπακόλουθα σε μειωμένη διπολική σύζευξη ^{13}C - ^1H . Ακόμη, η διαμόρφωση των αλειφατικών αλυσίδων του SLG αλλάζει από trans σε gauche, οδηγώντας σε άμορφες, παρά κρυσταλλικές, πλευρικές ομάδες, και αυξημένη κινητικότητα. Για να προσδιοριστούν οι διπολικές συζεύξεις των τμημάτων μεθυλενίου και στις δύο διαμορφώσεις στο συμπολυμερές MS30 έγινε μία μέτρηση με ^{13}C - ^1H REREDOR NMR στερεάς κατάστασης σε χαμηλή θερμοκρασία (247 K). Όπως αναμενόταν, οι συζεύξεις διπόλου-διπόλου ^{13}C - ^1H για τα trans-μεθυλένια (περίπου 11 kHz) ήταν υψηλότερες από εκείνες που μετρήθηκαν για τα gauche-μεθυλένια (περίπου 8 kHz). Υψηλότερες θερμοκρασίες ευνοούν την κινητικότητα των τμημάτων μεθυλενίου. Αυτό το εύρημα βρίσκεται σε συμφωνία με τα θερμοδυναμικά

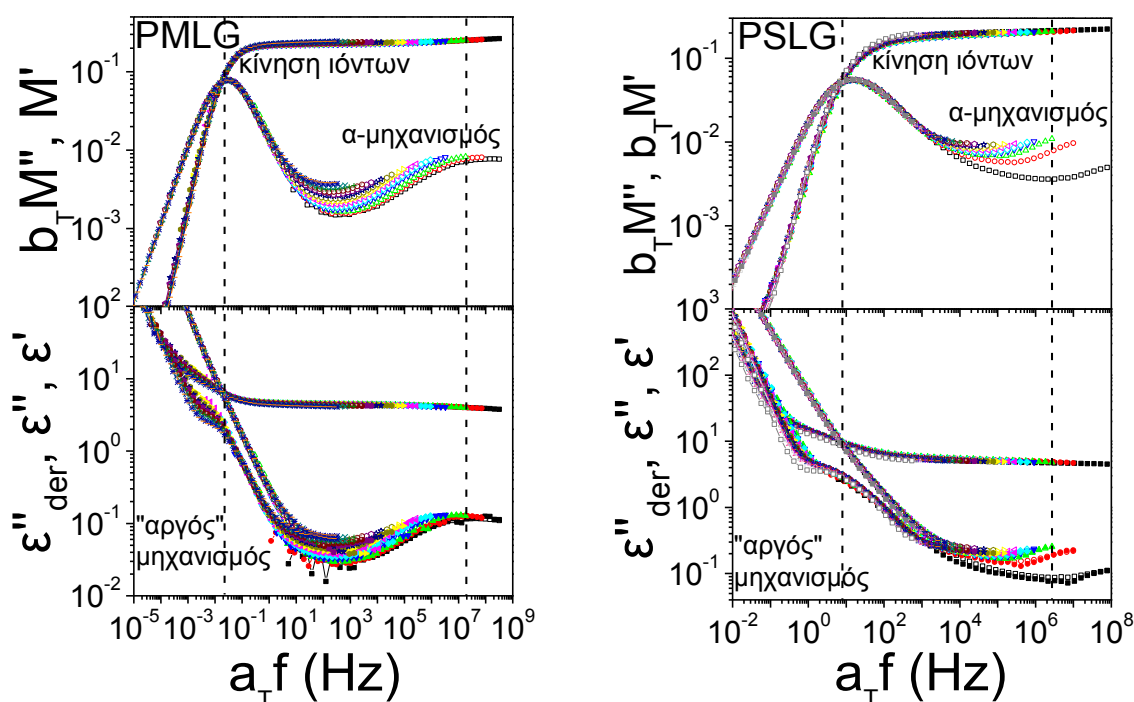
αποτελέσματα που δείχνουν μειωμένο πάχος κρυστάλλου στα συμπολυμερή, σε σύγκριση με το καθαρό PSLG (Πίνακας 5.1). Αύξηση της θερμοκρασίας από τα 270 στα 363 K δεν επηρεάζει σημαντικά την κινητικότητα της κύριας αλυσίδας στο MS30, που μένει σχετικά άκαμπτη ($S \sim 0.88$). Μολαταύτα, η συνολική κινητικότητα της αλυσίδας αυξάνεται, προκαλώντας σημαντική κινητική συγκέντρωση των διπολικών συζεύξεων και σε φάσματα με βελτιωμένη ανάλυση. Έτσι, υψηλότερες θερμοκρασίες επιφέρουν διαχωρισμό της κορυφής της διαμόρφωσης β-φύλλων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.5.

Φαίνεται καθαρά ότι ο συντονισμός του ^{13}C στα 52.7 ppm σχετίζεται με διαμόρφωση β-φύλλων του PSLG, ενώ η κορυφή στα 51.2 ppm αποδίδεται σε δευτερεύουσες διαμορφώσεις που περιλαμβάνουν μονάδες MLG (βλ. επίσης Εικόνα 1 και τα δεδομένα ακτίνων-X πιο κάτω). Αυτός ο διαχωρισμός του σήματος δηλώνει την παρουσία ξεχωριστών αλληλουχιών PSLG και PMLG στην κύρια αλυσίδα, στα συμπολυμερή με $n \geq 30\%$, πράγμα το οποίο συμβαίνει μάλλον για στατιστικούς, παρά για θερμοδυναμικούς λόγους. Αυτή η διαπίστωση υπονοεί την ύπαρξη ολόκληρων αλληλουχιών SLG και MLG στα συμπολυμερή, και θα συζητηθεί στη συνέχεια σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των ακτίνων-X και της Εικόνας 5.11.



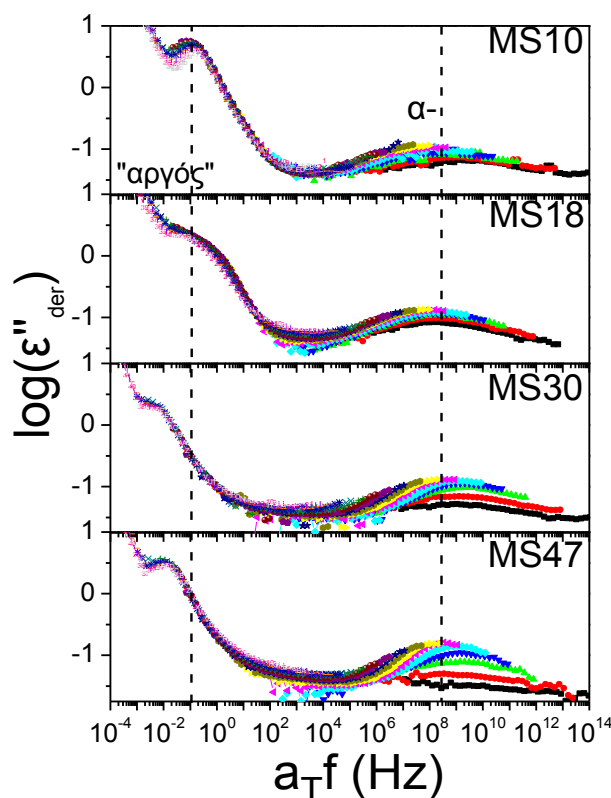
Εικόνα 5.5. Οι περιοχές C=O και CH των φασμάτων ^{13}C CP NMR του MS30, μετρημένα σε συχνότητα περιστροφής υπό μαγική γωνία ίση με 25 kHz, 363 K (επάνω) και 257 K (κάτω). Υπάρχει διαχωρισμός της κορυφής των β-φύλλων του CH στο φάσμα της υψηλής θερμοκρασίας.

Όσον αφορά τη δυναμική, σε αυτό το Κεφάλαιο εστιάζουμε κυρίως σε κινήσεις πάνω από το T_g και επομένως αναλύουμε τον α -μηχανισμό, που σχετίζεται με το “πάγωμα” της δυναμικής στο T_g , και τον πιο αργό μηχανισμό που σχετίζεται με τη χαλάρωση της πεπτιδικής δευτεροταγούς δομής. Στην Εικόνα 5.6, δείχνουμε την υπέρθεση του πραγματικού και του φανταστικού μέρους του ηλεκτρικού μέτρου M^* , της ηλεκτρικής διαπερατότητας ϵ^* , καθώς και την παράγωγο του πραγματικού μέρους της ϵ^* , για τα ομοπολυμερή PMLG και PSLG. Οι δύο αναπαραστάσεις αναδεικνύουν διαφορετικά χαρακτηριστικά των ίδιων μηχανισμών. Το ηλεκτρικό μέτρο παρέχει τον α -μηχανισμό σε υψηλές συχνότητες και την ιοντική αγωγιμότητα από το σημείο τομής του πραγματικού και του φανταστικού μέρους σε χαμηλότερες συχνότητες. Η ηλεκτρική διαπερατότητα δίνει τον α -μηχανισμό καθώς και έναν πιο αργό μηχανισμό (φαίνεται καλύτερα στην παράγωγο του ϵ') που σχετίζεται με τη χαλάρωση της δευτεροταγούς δομής. Ο α -μηχανισμός του PSLG δεν φαίνεται καθαρά στα φάσματα $\Delta\Phi$ λόγω της κρυστάλλωσης της πλευρικής ομάδας που πλαταίνει την κατανομή και ελαττώνει την ένταση του μηχανισμού (τα δίπολα βρίσκονται στην περιοχή των μεθυλενίων που κρυσταλλώνονται). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την καταφανή αποτυχία της υπέρθεσης χρόνου-θερμοκρασίας (time-temperature superposition, tTs) στο PSLG. Η υπέρθεση αποτυγχάνει και στο PMLG αλλά από άλλη αιτία: ο μηχανισμός γίνεται στενότερος με την αύξηση της θερμοκρασίας. Όπως έχουμε αναφέρει, ο α -μηχανισμός στα πολυπεπίδια αντιστοιχεί στη χαλάρωση άμορφων τμημάτων στην κύρια αλυσίδα και στα άκρα της, και έτσι είναι ανεξάρτητος από τη δευτεροταγή δομή, την παρουσία πλευρικών ομάδων, κλπ. Επομένως η υαλώδης μετάβαση είναι ενδογενές χαρακτηριστικό της δυναμικής των πολυπεπτιδίων και σχετίζεται με το σπάσιμο δεσμών υδρογόνου σε συγκεκριμένα σημεία που ονομάζονται “ατέλειες”.



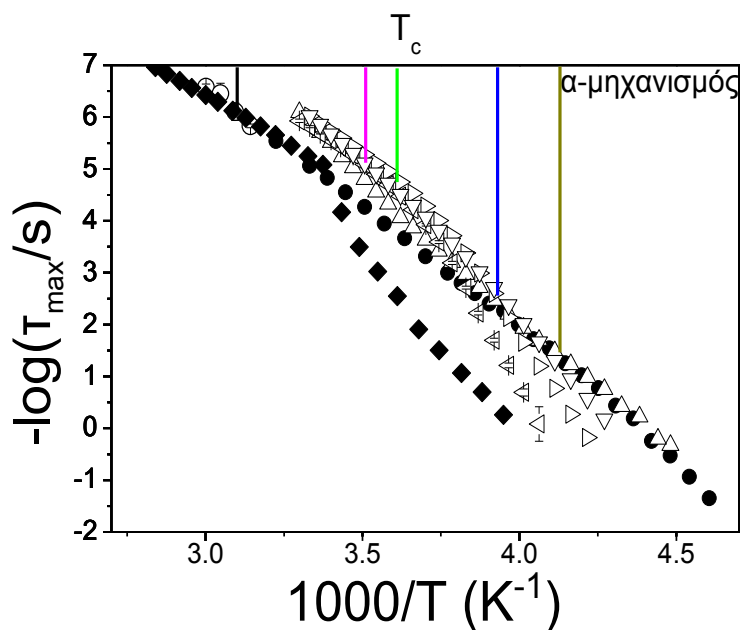
Εικόνα 5.6. Υπερθέσεις φασμάτων του πραγματικού (γεμάτα σύμβολα) και του φανταστικού μέρους (άδεια σύμβολα) του ηλεκτρικού μέτρου M^* και της ηλεκτρικής διαπερατότητας ϵ^* των συμπολυμερών, σε θερμοκρασία αναφοράς 340 K. Τα δεδομένα μετρήθηκαν σε διαστήματα 10 ή 5 K στις περιοχές 240 – 430 K και 323 – 413 K, για το PMLG και το PSLG, αντίστοιχα.

Στην Εικόνα 5.7 συγκρίνουμε τα φάσματα των συμπολυμερών που έχουν προκύψει από την παράγωγο του ϵ' με υπέρθεση στην ίδια θερμοκρασία αναφοράς ($T_{\text{ref}}=343$ K). Υπάρχει ένας μοναδικός α-μηχανισμός στα συμπολυμερή και η επίδραση της κρυστάλλωσης του στεαρυλίου είναι ορατή στη διεύρυνση των φασμάτων με ελάττωση της θερμοκρασίας στα MS47 και MS30. Αφετέρου, το στεαρύλιο στο MS10 δεν κρυσταλλώνεται (Εικόνα 5.2) και αιτία της αποτυχίας της υπέρθεσης είναι ο περιορισμός του πλάτους της κατανομής με αύξηση της θερμοκρασίας. Ο “αργός” μηχανισμός, που σχετίζεται με τη χαλάρωση των τμημάτων της α-έλικας, επιβραδύνεται όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα σε στεαρύλιο. Θα ξανασυζητήσουμε αυτό το σημείο αργότερα, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της Εικόνας 5.9.



Εικόνα 5.7. Φάσματα διηλεκτρικής απορρόφησης των συμπολυμερών από τα οποία έχει αφαιρεθεί η αγωγιμότητα. Η θερμοκρασία αναφοράς είναι 343 K και η περιοχή θερμοκρασιών 240 – 413 K, με βήματα των 10 K. Οι διακεκομμένες γραμμές δίνουν τις θέσεις των μεγίστων του “αργού” και του α-μηχανισμού. Η υπέρθεση αποτυγχάνει στην περιοχή του α-μηχανισμού λόγω της κρυστάλλωσης του PSLG. Ο δε “αργός” μηχανισμός επιβραδύνεται με αύξηση της περιεκτικότητας σε PSLG.

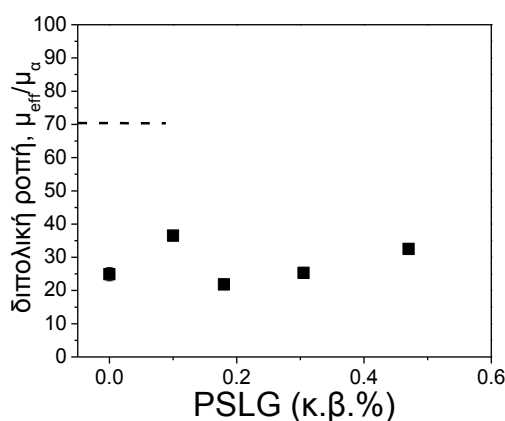
Οι χρόνοι χαλάρωσης που συνδέονται με τον τμηματικό (α-) μηχανισμό των ομοπολυμερών και των συμπολυμερών παρουσιάζονται στην αναπαράσταση Arrhenius της Εικόνας 5.8. Οι χρόνοι χαλάρωσης εμφανίζουν τη γνωστή μη Arrhenius θερμοκρασιακή εξάρτηση που περιγράφεται από την εξίσωση VFT (εξίσωση 3.4). Οι θερμοκρασίες κρυστάλλωσης του PSLG που ελήφθησαν από τη ΔΘΣ συμπεριλαμβάνονται επίσης στην εικόνα. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως στην Εικόνα 5.6, ο α-μηχανισμός του PSLG μπορεί να μελετηθεί καλύτερα στο τήγμα. Για σύγκριση συμπεριλαμβάνουμε στην εικόνα και τους χρόνους χαλάρωσης του πολυ(η-οκταδέκυλο μεθακρυλικό οξύ) (pODMA) [27] που έχει παρεμφερή πλευρική ομάδα όπως το PSLG. Στο πρώτο (pODMA), η δυναμική του α-μηχανισμού επιβραδύνεται με την κρυστάλλωση της πλευρικής ομάδας και σε αυτές τις θερμοκρασίες ο μηχανισμός αντικατοπτρίζει τη δυναμική της περιορισμένης άμορφης φάσης (restricted amorphous phase, RAP).



Εικόνα 5.8. Διάγραμμα Arrhenius του τμηματικού (α-) μηχανισμού, μετρημένου με ψύξη: PMLG (γεμάτοι κύκλοι), MS10 (πάνω τρίγωνα), MS18 (κάτω τρίγωνα), MS30 (δεξιά τρίγωνα), MS47 (αριστερά τρίγωνα), PSLG (ανοικτοί κύκλοι), pODMA (ρόμβοι) [27]. Οι κατακόρυφες γραμμές αντιστοιχούν στη θερμοκρασία κρυστάλλωσης (T_c) από τη $\Delta\Theta\Sigma$.

Όπως αναμένεται, οι τμηματικές δυναμικές του PSLG και του pODMA είναι παρόμοιες, τουλάχιστον στην περιοχή όπου υπάρχουν διαθέσιμα πειραματικά σημεία. Επιπλέον, η θερμοκρασιακή εξάρτηση των χρόνων χαλάρωσης του PSLG παρουσιάζει μια εξάρτηση γνωστή από “σκληρά” (strong) ρευστά με μικρή μόνο καμπυλότητα σε αυτήν την αναπαράσταση. Για τα συμπολυμερή παρατηρούμε ότι ο α-μηχανισμός εξαρτάται ισχυρά από την περιεκτικότητα σε στεαρύλιο. Η δυναμική του άμορφου MS10 είναι σχεδόν ταυτόσημη με εκείνη του PMLG, αλλά από το MS18 κι έπειτα, ο α-μηχανισμός εμφανίζει συστηματική μεταβολή με τη σύσταση. Επομένως η κύρια επίδραση της κρυστάλλωσης των ομάδων του PSLG στη δυναμική των συμπολυμερών είναι η επιβράδυνση του α-μηχανισμού και η αύξηση του ενεργού T_g της RAP (Εικόνα 5.2). Ακόμα, η θερμοκρασιακή εξάρτηση των χρόνων χαλάρωσης στα συμπολυμερή είναι σαφώς διαφορετική από το ομοπολυμερές PMLG, πράγμα που δείχνει αυξημένη “ευθραυστότητα” (fragility) με αύξηση της περιεκτικότητας σε στεαρύλιο. Ο δείκτης “ευθραυστότητας” (fragility index), $m = d(\log \tau) / d(T_g / T)_{T=T_g}$ [28], παίρνει τιμές 23, 21, 32, 37, και 53 για τα PSLG, MS10, MS18, MS30, και MS47, αντίστοιχα, καταδεικνύοντας πως η κρυστάλλωση της πλευρικής ομάδας κάνει τη χαλάρωση της RAP πιο ευαίσθητη σε μεταβολές της θερμοκρασίας κοντά στο T_g .

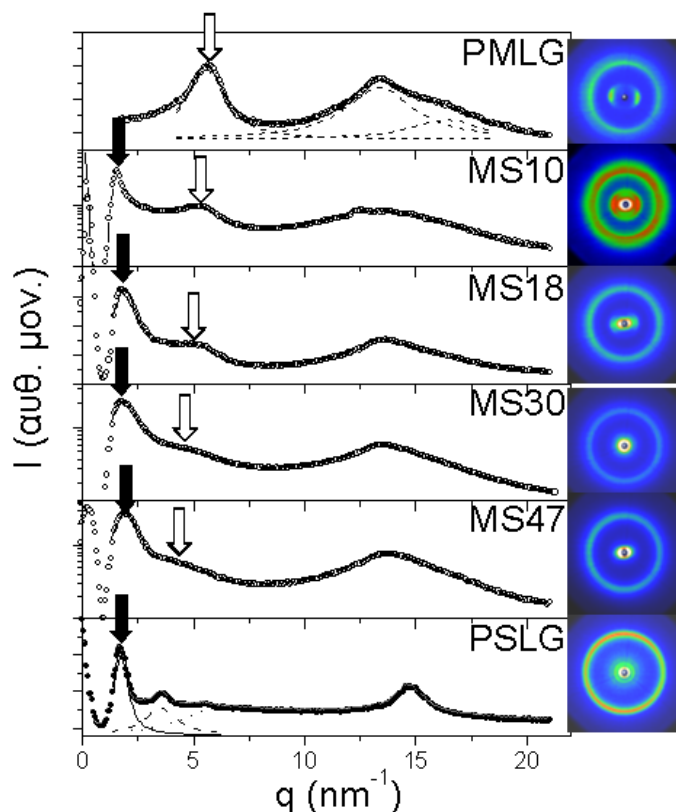
Ο πιο αργός μηχανισμός που παρατηρείται στις διηλεκτρικές μετρήσεις (Εικόνες 5.6 και 5.7) συνδέεται με τη χαλάρωση τμημάτων της α -έλικας, και η ανάλυση της διηλεκτρικής του έντασης ($\Delta\epsilon$) παρέχει μια εκτίμηση του μήκους εμμονής της έλικας στα ομοπολυμερή και στα συμπολυμερή. Τα αποτελέσματα της κανονικοποιημένης ενεργούς διπολικής ροπής φαίνονται στην Εικόνα 5.9. Για τον υπολογισμό χρησιμοποιήθηκαν πυκνότητες μάζας ίσες με 1.31 και 1.05, g/cm^3 για το PMLG [29] και το PSLG [4], αντίστοιχα. Οι τιμές που υπολογίστηκαν – κανονικοποιημένες ως προς τις αντίστοιχες του α -μηχανισμού – συγκρίνονται με τη διπολική ροπή για τέλειο α -ελικοειδές πεπτίδιο PMLG (διακεκομμένη γραμμή) με βαθμό πολυμερισμού 60. (Η διπολική ροπή ανά μονομερές υπολογίστηκε με την εφαρμογή ArgusLab και βρέθηκε ίση με 3.3 D/μονομερές για το PMLG και 3.7 D/μονομερές για το PSLG). Οι μετρηθείσες ενεργές διπολικές ροπές του PMLG και των συμπολυμερών είναι συστηματικά μικρότερες από την αναμενόμενη για τέλεια α -έλικα, που σημαίνει ότι οι έλικες εδώ δεν είναι τέλειες. Κατά συνέπεια, οι έλικες θεωρούνται σπασμένες σε σημεία ατελειών [23,25,30]. Όπως προαναφέρθηκε, ο “αργός” μηχανισμός οφείλεται στη χαλάρωση αυτών των “ατελειών” κατά μήκος της κύριας αλυσίδας. Αυτά τα αποτελέσματα φανερώνουν ότι οι κύριες αλυσίδες του PSLG, του PMLG, και των συμπολυμερών δεν μπορούν να θεωρηθούν τελείως άκαμπτες, και αυτό το δυναμικό χαρακτηριστικό έχει άμεσες συνέπειες στην αυτοοργάνωση. Το τελευταίο δεν αντιτίθεται στα αποτελέσματα του NMR, που επίσης προτείνουν υψηλό τοπικό δυναμικό παράγοντα δομής για την κύρια αλυσίδα ($S=0.88$), καθώς είναι ακόμα δυνατές μικρού πλάτους ταλαντώσεις.



Εικόνα 5.9. Κανονικοποιημένη ενεργός διπολική ροπή του PMLG και των συμπολυμερών, υπολογισμένη από την ένταση του “αργού” μηχανισμού των διηλεκτρικών μετρήσεων. Η γραμμή δείχνει τη διπολική ροπή για τέλεια α -έλικα PMLG με βαθμό πολυμερισμού 60 και 50 % α -έλικες ($\mu_{\alpha\text{PMLG}}=1.41$ D).

Τέλος, η επίδραση των συνθηκών καταβύθισης δεν περιορίζεται μόνο στην αλλαγή του λόγου α-ελίκων/β-φύλλα, αλλά επίσης αλλάζει τη δυναμική του “αργού” μηχανισμού. Για παράδειγμα, με σύνθεση του PSLG με μικρότερο ποσοστό α-ελίκων, ο “αργός” μηχανισμός επιταχύνεται (δεν δείχνεται εδώ). Αυτό είναι απολύτως κατανοητό, αφού αυτός ο μηχανισμός συνδέεται άμεσα με το ποσοστό των α-ελίκων, και οι χρόνοι χαλάρωσής και η διηλεκτρική του ένταση είναι ανάλογα της “ποιότητας” των ελίκων.

5.3.4 Αυτοοργάνωση. Η γνώση του τύπου της δευτεροταγούς δομής (NMR) και του μήκους εμμονής των α-ελίκων ($\Delta\Phi$), σε συνδυασμό με πειράματα σκέδασης ακτίνων-Χ από προσανατολισμένα δείγματα, μπορούν να δώσουν μια ρεαλιστική εικόνα της αυτοοργάνωσης των συμπολυπεπτιδίων. Η Εικόνα 5.10 συγκρίνει τις διδιάστατες εικόνες σκέδασης ακτίνων-Χ και τις αντίστοιχες ισημερινές εντάσεις των συμπολυμερών και των ομοπολυμερών. Το διάγραμμα σκέδασης του PSLG περιέχει μια σειρά έντονων, αν και πλατιών, ισημερινών ανακλάσεων με κυματανύσματα $q=1.71, 3.52$, και $\sim 5.7 \text{ nm}^{-1}$ με δείκτες $h00$ (δηλαδή 100, 200, και 300) και μια ευρεία μεσημβρινή ανάκλαση στα 14.2 nm^{-1} . Αυτές οι ανακλάσεις δείχνουν μια στρωματική δομή για το PSLG σε θερμοκρασία δωματίου, η οποία αποτελείται από τις κύριες αλυσίδες παράλληλα προς τον άξονα της ίνας, δίπλα στις περιοχές n -αλκανίων των πλευρικών ομάδων με τους άξονές τους κάθετα προς τις στρώσεις. Η μέση διαστρωματική απόσταση είναι περίπου 3.6 nm (η πρώτη ισχυρή ισημερινή ανάκλαση) με περίπου επτά μεθυλένια στην παραφινική στρώση. Η στρώση αυτή έχει χαρακτηριστική απόσταση 0.44 nm που αντιστοιχεί στη συνήθη τρικλινή μοναδιαία κυψελίδα κρυστάλλων n -αλκανίων [31]. Σε μια προγενέστερη μελέτη, η απόσταση μεταξύ των γειτονικών κύριων αλυσίδων εκτιμήθηκε σε 1.23 nm , θεωρώντας μήκος τέλειων ελίκων PSLG ίσο με 2.7 nm . Οποσδήποτε ένα τέτοιο μήκος δεν μπορεί να βρεθεί εδώ για δύο λόγους: πρώτον, το PSLG αποτελείται τόσο από α-έλικες όσο και από β-φύλλα (Εικόνα 5.1) και δεύτερον, οι α-έλικες περιέχουν ατέλειες (Εικόνα 5.9).



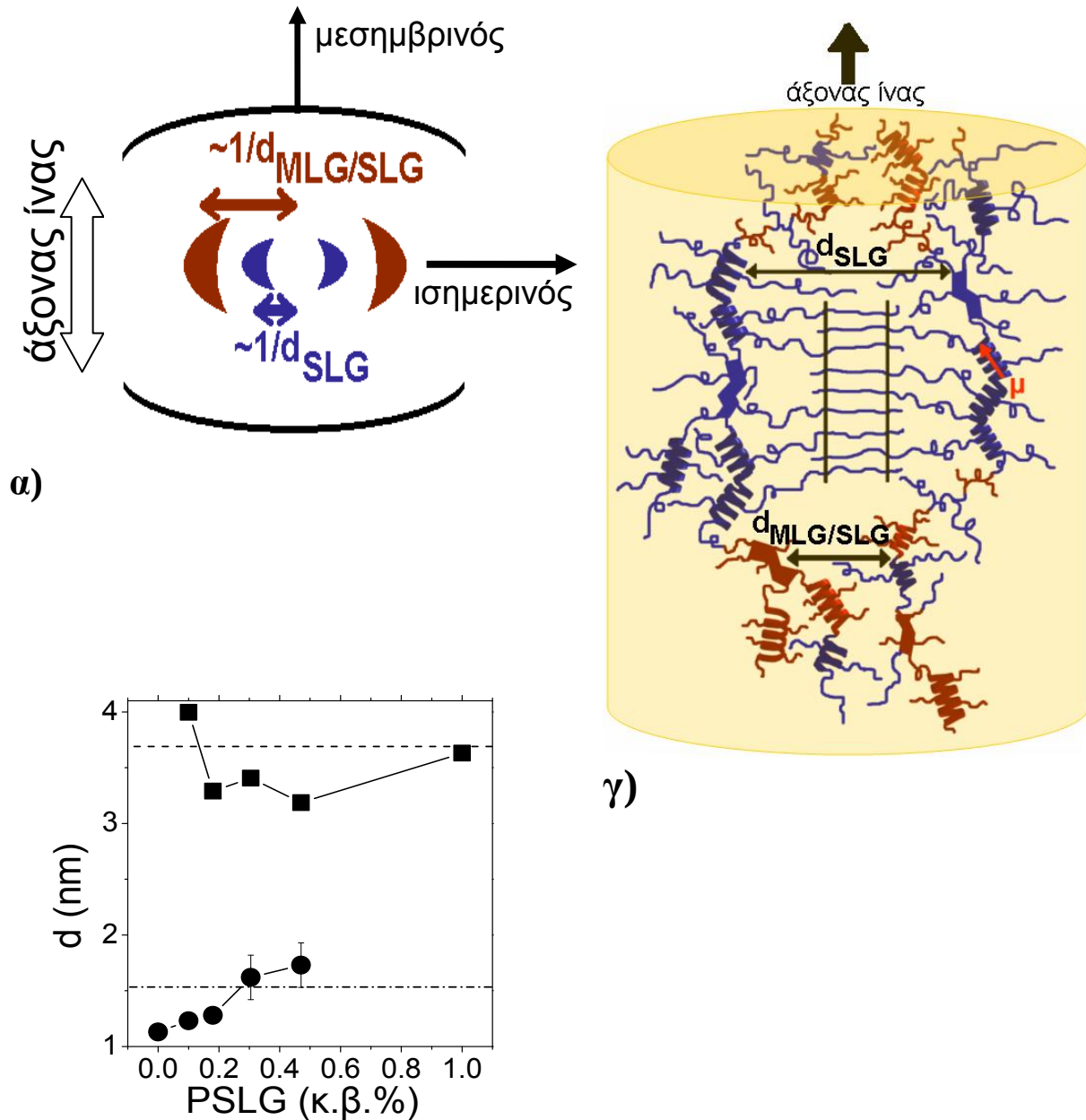
Εικόνα 5.10. Η ισημερινή ένταση WAXS των ομοπολυμερών και των συμπολυμερών από προσανατολισμένες ίνες στα 298 K (αριστερά), μαζί με τις αντίστοιχες διδιάστατες εικόνες (δεξιά). Ο προσανατολισμός της ίνας είναι κατά μήκος της κατακόρυφης διεύθυνσης. Στα συμπολυμερή υπάρχουν και τα δύο είδη ισημερινών ανακλάσεων. Τα άσπρα και τα μαύρα βέλη δείχνουν τις θέσεις των κορυφών με συσχετίσεις μεταξύ SLG και τυχαίων MLG/SLG, αντίστοιχα.

Το αντίστοιχο διάγραμμα του PMLG περιέχει μια ευρεία ισημερινή ανάκλαση σε μεγαλύτερο κυματάνυσμα (στα 5.55 nm^{-1} , με αντίστοιχη απόσταση $\sim 1.13 \text{ nm}$), που δηλώνει ευθυγραμμισμένες κύριες αλυσίδες παράλληλα προς τον άξονα της ίνας, και ασθενέστερες συσχετίσεις λόγω των βραχέων πλευρικών ομάδων. Σημειώνουμε εδώ παρενθετικά, ότι λεπτά υμένα προετοιμασμένα από διάλυμα χλωροφορμίου έδειξαν έντονα κρυσταλλική δομή αποτελούμενη από α-έλικες σε εξαγωνικό πλέγμα με μοναδιαία κυψελίδα διάστασης 1.195 nm [29].

Τα διαγράμματα σκέδασης των συμπολυμερών περιέχουν και τους δύο τύπους ισημερινών κορυφών (Εικόνα 5.10), που σημαίνει την παρουσία αλληλεπιδράσεων μεταξύ αλυσίδων τόσο PSLG όσο και PMLG. Αυτό παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 5.11α. Στην Εικόνα 5.11β, δείχνεται η εξάρτηση των ισημερινών ανακλάσεων από τη σύσταση των συμπολυμερών. Από τα δύο είδη συσχετίσεων, η βραχύτερη (PMLG) δείχνει να επηρεάζεται περισσότερο από την αύξηση της περιεκτικότητας σε PSLG. Αυτό δηλώνει την παρουσία τυχαίων αλληλουχιών MLG/SLG και πιο απομακρυσμένων αλληλουχιών SLG.

Μια ρεαλιστική αναπαράσταση της αυτοοργάνωσης στα συμπολυμερή φαίνεται στην Εικόνα 5.11γ. Αν και πρόκειται για ένα σχετικά απλό σχέδιο, περιέχει τα κύρια πειραματικά αποτελέσματα από τη μελέτη της δομής (NMR, WAXS) και της δυναμικής (ΔΦ, ^{13}C NMR). Οι πολυμερικές αλυσίδες είναι προσανατολισμένες παράλληλα προς τον άξονα της ίνας από εφελκυσμό (προκαλώντας τις ισημερινές ανακλάσεις στο WAXS) και έχουν δομή φιάλης, με τις άμορφες ομάδες MLG/SLG να βρίσκονται πλησιέστερα (“λαιμός”) και τις ομάδες του SLG πιο απομακρυσμένες (“φιάλη”). Παρόμοιες δευτεροταγείς δομές αναμένονται και στα συμπολυμερή όπως και στα ομοπολυμερή (δηλαδή μίγμα α-ελίκων και β-φύλλων), με τις α-ελικοειδείς δομές να είναι σπασμένες σε διάφορα σημεία (ΔΦ). Η κρυστάλλωση συμβαίνει μόνο όταν αρκετές μονάδες στεαρυλίου βρίσκονται κοντά, κάτι που δηλώνει την ύπαρξη μη τυχαίας κατανομής των μονομερών (^{13}C NMR).

Το μοντέλο που φαίνεται στην Εικόνα 5.11γ έχει πολύ λίγες ομοιότητες και πολλές διαφορές από το μοντέλο των τριών “φάσεων” της αναφοράς [16]. Οι ομοιότητες έχουν να κάνουν με την παρουσία άμορφων και κρυσταλλικών ομάδων στεαρυλίου. Οι κύριες διαφορές εντοπίζονται (i) στην παρουσία και των δύο τύπων της δευτεροταγούς δομής και τις σπασμένες α-έλικες (ΔΦ), και (ii) στην ύπαρξη ολόκληρων αλληλουχιών SLG και MLG στα συμπολυμερή (WAXS).



β)

Εικόνα 5.11. (α) Σχηματική αναπαράσταση των διδιάστατων καταγραφών WAXS που δείχνουν διαμοριακές συσχετίσεις SLG και MLG/SLG. (β) Εξάρτηση των ισημερινών ανακλάσεων από τη σύσταση των συμπολυμερών στα 298 K. Δύο χαρακτηριστικές αποστάσεις είναι ταυτόχρονα παρούσες στα συμπολυμερή, προερχόμενες από τις μακρύτερες (SLG, τετράγωνα) και τις βραχύτερες (MLG/SLG, κύκλοι) συσχετίσεις. (γ) Σχηματική εικόνα της τρισδιάστατης οργάνωσης σε μια προσανατολισμένη ίνα. Οι πειραματικά παρατηρημένες αποστάσεις αντιστοιχούν σε διαμοριακές αποστάσεις SLG ($d_{MLG/SLG}$) και MLG/SLG ($d_{MLG/SLG}$).

5.3 Συμπεράσματα

Σε αυτό το Κεφάλαιο μελετήθηκε το πώς η εναλλαγή των επαναλαμβανόμενων μονάδων δύο πεπτιδίων με διαφορετικές δευτεροταγείς δομές επηρεάζει την αυτοοργάνωση και τη δυναμική του τελικού συμπολυπεπτιδίου. Είδαμε ότι η ενδεδειγμένη μελέτη των λεπτομερειών της αυτοοργάνωσης σε αυτήν την κατηγορία των πρότυπων νανοσύνθετων υλικών, από ράβδους ενσωματωμένες σε μήτρα εύκαμπτων πλευρικών ομάδων, απαιτεί τη συνδυασμένη χρήση μεθόδων μελέτης της δομής και της δυναμικής. Έγινε μια συστηματική μελέτη της αυτοοργάνωσης και της δυναμικής σε μια σειρά πολυ(γ-μεθυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος-co-γ-στεαρυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος) με μεθόδους παρατήρησης της δομής (WAXS, NMR), των θερμικών ιδιοτήτων (ΔH), και της δυναμικής (ΔF , NMR), που αποκάλυψε μια πιο σύνθετη αυτοοργάνωση απ' ό,τι είχε θεωρηθεί στο παρελθόν. Τα σημαντικότερα συμπεράσματα συνοψίζονται παρακάτω:

Ως προς τη δομή: (i) Η δευτεροταγής δομή των ομοπολυμερών και των συμπολυμερών αποτελείται τόσο από α -έλικες όσο και από β -φύλλα, των οποίων η αναλογία εξαρτάται από το ποσοστό του PSLG και τη μέθοδο καταβύθισης. (ii) Οι ίνες που έχουν υποστεί εφελκυσμό έχουν πολυμερικές αλυσίδες με α -έλικες/ β -φύλλα προσανατολισμένες παράλληλα προς τον άξονα της ίνας και εικόνα φιάλης, με άμορφες ομάδες MLG/SLG να σχηματίζουν το “λαιμό” και πιο απομακρυσμένες ομάδες SLG να σχηματίζουν τη “φιάλη”. (iii) Η κρυστάλλωση των στεαρυλίων λαμβάνει χώρα στα συμπολυμερή με $w_{\text{PSLG}} \geq 18\%$. Η σχετικά μικρή ενθαλπία τήξης (ΔH) και η κυριαρχία των εκτεταμένων trans διαμορφώσεων (NMR) δείχνουν την ύπαρξη αποδιοργανωμένων κρυσταλλικών περιοχών. Η κρυστάλλωση των αλειφατικών αλυσίδων έχει επίδραση στον τοπικό δυναμικό παράγοντα δομής που προσδιορίζεται από το NMR, με τιμές 0.56 και ~0.44 για το PSLG και τα συμπολυμερή, αντίστοιχα. Το πάχος των κρυστάλλων εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε μονάδες SLG και σχετίζεται ευθέως με τη διαμόρφωση των πλευρικών αλυσίδων των SLG (βλ. παραπάνω). Η ελάττωση της περιεκτικότητας σε SLG στα συμπολυμερή κάνει τον κρύσταλλο λεπτότερο, όπως προκύπτει από τη μη γραμμική ελάττωση των φαινόμενων θερμοκρασιών τήξης.

Ως προς τη δυναμική: (i) Τοπικές τεχνικές NMR έδειξαν μια σχετικά άκαμπτη κύρια αλυσίδα ($S \sim 0.88$) στο PSLG και στα συμπολυμερή, που επιτρέπει μόνο ταλαντώσεις μικρού πλάτους. (ii) Η ΔF έδειξε έναν γρήγορο τοπικό μηχανισμό στην υαλώδη κατάσταση, και δύο μηχανισμούς σε υψηλότερες θερμοκρασίες, που έχουν και οι δύο ισχυρή εξάρτηση από τη θερμοκρασία (τύπου VFT). Αν και τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες ως προς το γρήγορο μηχανισμό, η ερμηνεία που δώσαμε για τους άλλους δύο μηχανισμούς διαφέρει. Ο πρώτος (α -μηχανισμός), συνδέεται με τη μετάβαση υάλου, και

υπονοεί την ύπαρξη άμορφων τμημάτων στα ομοπολυμερή και στα συμπολυμερή. Ο μοναδικός τμηματικός μηχανισμός στα συμπολυμερή και η θερμοκρασιακή του εξάρτηση ελέγχεται από την αναλογία σε SLG. Επιπλέον, η αύξηση της περιεκτικότητας σε SLG επιφέρει μεταβολή σε πιο “εύθραυστη” συμπεριφορά, όπως φαίνεται από τη μεταβολή του δείκτη ευθραυστότητας. Η προέλευση του α-μηχανισμού είναι τοπικές κινήσεις κατά μήκος και στα άκρα της αλυσίδας, όπως διαπιστώνεται από το NMR. Αντίθετα, ο “αργός” μηχανισμός σχετίζεται με τη χαλάρωση της πεπτιδικής δευτεροταγούς δομής (α-ελίκων). Επίσης, σε αντίθεση με παλιότερες μελέτες, οι α-έλικες έχουν μικρό μήκος εμμονής.

5.4 Αναφορές

- (1) Wegner, G. *Macromol. Chem. Phys.* **2003**, 204, 347.
- (2) Floudas, G. *Prog. Pol. Sci.* **2004**, 29, 1143.
- (3) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Klok, H.-A.; Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *J. Chem. Phys.* **2005**, 122, 224906.
- (4) Watanabe, J.; Ono, H.; Uematsu, I.; Abe, A. *Macromolecules* **1985**, 18, 2141.
- (5) Romero Colomer, F. J.; Gómez Ribelles, J. L.; Lloveras Maciá, J.; Muñoz Guerra, S. *Polymer* **1991**, 32, 1642.
- (6) Romero Colomer, F. J.; Gómez Ribelles, J. L.; Barrales-Rienda, J. M. *Macromolecules* **1994**, 27, 5004.
- (7) Yamaguchi, M.; Tsutsumi, A. *Polym. J.* **1990**, 22, 781.
- (8) Schmidt, A.; Lehmann, S.; Georgelin, M.; Katana, G.; Mathauer, K.; Kremer, F.; Schmidt-Rohr, K.; Boeffel, C.; Wegner, G.; Knoll, W. *Macromolecules* **1995**, 28, 5487.
- (9) Schmidt, A.; Mathauer, K.; Reiter, G.; Foster, M. D.; Stamm, M.; Wegner, G.; Knoll, W. *Langmuir* **1994**, 10, 3820.
- (10) Ballauff, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1989**, 101, 261.
- (11) Adam, A.; Spiess, H. W.; *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **1990**, 11, 249.
- (12) Clauss, J.; Schmodt-Rohr, K.; Adam, A.; Boeffel, C.; Spiess, H. W. *Macromolecules* **1992**, 25, 5208.
- (13) Gitsas, A.; Floudas, G.; Dietz, M.; Mondeshki, M.; Spiess, H. W.; Wegner, G. *Macromolecules* **2007**, 40, 8311.
- (14) Spiess, H. W. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2004**, 42, 5031.
- (15) Kricheldorf, H. R.; Müller, D. *Macromolecules* **1983**, 16, 615.
- (16) Shoji, A.; Ozaki, T.; Saito, H.; Tabeta, R.; Ando, I. *Macromolecules* **1984**, 17, 1472.
- (17) Saalwächter, K.; Graf, R.; Spiess, H. W. *J. Magn. Reson.* **2002**, 22, 154.

- (18) a) Tsujita, Y.; Ojika, R.; Tsuzuki, K.; Takizawa, A.; Kinoshita, T. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1987**, 25, 1041. b) Tsujita, Y.; Ojika, R.; Takizawa, A.; Kinoshita, T. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1987**, 25, 1041.
- (19) Gordon, M.; Taylor, J. S. *J. Appl. Chem. USSR* **1952**, 2, 493.
- (20) Schneider, H. A.; Rieger, J.; Penzel, E. *Polymer* **1997**, 38, 1323.
- (21) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Klok, H.-A.; Schnell, I.; Pakula, T. *Biomacromolecules*, **2004**, 5, 81.
- (22) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Klok, H.-A.; Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *J. Chem. Phys.* **2005**, 122, 224906.
- (23) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2352.
- (24) Mondeshki, M.; Mihov, G.; Graf, R.; Spiess, H. W.; Müllen, K.; Papadopoulos, P.; Gitsas, A.; Floudas, G. *Macromolecules* **2006**, 39, 9605.
- (25) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Lieberwirth, I.; Nguyen, T. Q.; Klok, H.-A. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 618.
- (26) Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W.; “*Multidimensional Solid State NMR and Polymers*”, Academic Press, New York, 1994.
- (27) Mierzwa, M.; Floudas, G.; Štěpánek, P.; Wegner, G. *Phys. Rev. B* **2000**, 62, 14012.
- (28) Bohmer, R.; Ngai, K. L.; Angell, C. A.; Plazek, D. J. *J. Chem. Phys.* **1993**, 99, 4201.
- (29) Sasaki, S.; Uematsu, I. *J. Polym. Sci.* **1985**, 23, 263.
- (30) Papadopoulos, P.; Floudas, G. *Dielectr. Newsl.* **2005**, Issue Nov.
- (31) Turner-Jones, A. *J. Polym. Sci.* **1962**, 62, S53.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Έλεγχος της δευτεροταγούς δομής σε δισυσταδικά συμπολυπεπτίδια

6.1 Εισαγωγή

Τα συσταδικά συμπολυπεπτίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα συστήματα [1-14] που ακολουθούν τις μεθόδους της φύσης για την παραγωγή υπερμοριακών βιοενεργών δομών με πιθανές εφαρμογές στη βιομηχανική των ανθρώπινων ιστών και στη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων [15]. Προγενέστερες έρευνες έχουν μελετήσει τη δευτεροταγή δομή σε συστήματα συμπολυπεπτιδίων [16-19]. Μια πρόσφατη μελέτη συσταδικών συμπολυπεπτιδίων [12], αποτελούμενων από ένα α -ελικοειδές πολυπεπτίδιο (PBLG) και ένα πεπτίδιο που φτιάχνει μόνο β -φύλλα (πολυγλυκίνη), αποκάλυψε ότι η διαφορά στη δυνατότητα “πακεταρίσματος” των δύο πεπτιδίων προκαλεί πολλαπλές αναδιπλώσεις των β -φύλλων μέσα στη συστάδα της πολυγλυκίνης. Τα συμπολυπεπτίδια που αποτελούνται ταυτόχρονα από α -έλικες και β -φύλλα έχουν μεγάλο ενδιαφέρον. Σε τέτοια συστήματα, και οι δύο δευτεροταγείς δομές υπόκεινται στο ίδιο θερμοδυναμικό πεδίο, και έτσι είναι δυνατή η μελέτη της σταθερότητας καθεμιάς δευτεροταγούς δομής καθώς και του μήκους εμμονής τους. Από αυτήν την άποψη, η πολυαλανίνη είναι ιδιαίτερα χρήσιμη επειδή λαμβάνει και τις δύο κυριότερες δευτεροταγείς διαμορφώσεις (α -έλικες και β -φύλλα) [20-22].

Η πολυαλανίνη παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στον ιστό της αράχνης, όπως αναφέραμε και στο Κεφάλαιο 2. Οι εξαιρετικές του μηχανικές ιδιότητες αποδίδονται στις επαναλαμβανόμενες μονάδες πολυαλανίνης στην πρωτοταγή του δομή, οι οποίες αυτοοργανώνονται σε κρυσταλλικά β -φύλλα [23]. Οι προσπάθειες για παραγωγή συνθετικού ιστού είναι δυσχερείς λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών των περιοχών [24,25]. Γι’ αυτό υπάρχει ανάγκη καλύτερης κατανόησης της διαδικασίας αυτοοργάνωσης, επειδή σχετίζεται άμεσα με τη συμμετοχή της πολυαλανίνης στον ιστό [26,27].

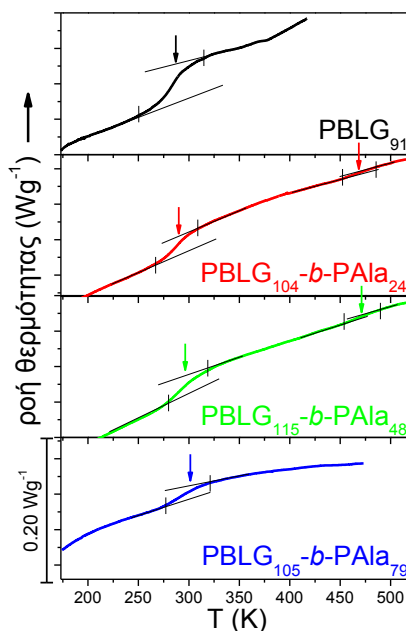
Σε αυτό το Κεφάλαιο [28], μελετάμε την αυτοοργάνωση και τη δυναμική μιας σειράς πρότυπων συμπολυπεπτιδίων PBLG-*b*-PAIa, με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης των θερμοδυναμικών συνθηκών στη σταθερότητα των φάσεων και στο μήκος εμμονής των α -ελίκων και των β -φύλλων, καθώς και στις αλλαγές της δυναμικής μέσα στις νανοφάσεις. Γι’ αυτόν το σκοπό χρησιμοποιήσαμε τεχνικές χαρακτηρισμού των θερμικών, δομικών ($\Delta\Theta$, ακτίνες-X, NMR) και δυναμικών ($\Delta\Phi$, NMR) χαρακτηριστικών, ώστε να πάρουμε μια

ολοκληρωμένη εικόνα της αυτοοργάνωσης. Βρέθηκε ότι το ισχυρό θερμοδυναμικό πεδίο επιδρά στη σταθερότητα και το μήκος εμμονής των πολυπεπτιδικών δευτεροταγών δομών. Επιπλέον, οι δυναμικές μέθοδοι υπέδειξαν τη χρονική κλίμακα και τη γεωμετρία των μοριακών και υπερμοριακών κινήσεων.

6.2 Αποτελέσματα

6.2.1 Θερμικές ιδιότητες

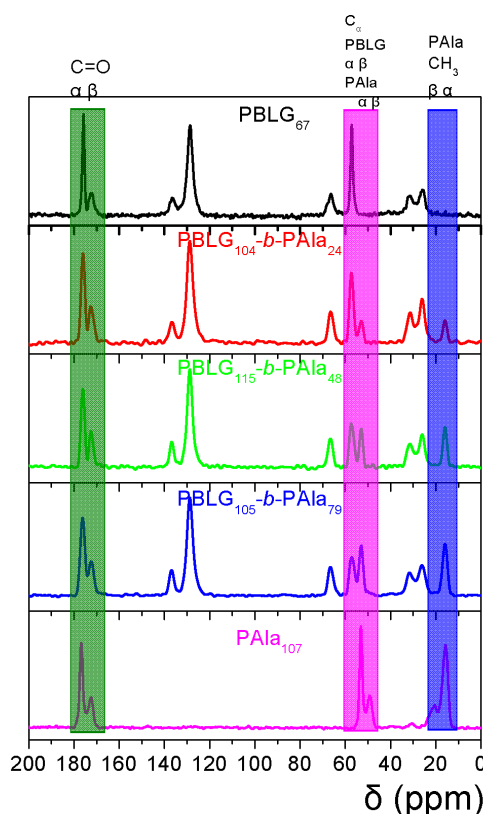
Τα θερμογραφήματα του PBLG, της PAla, και των συμπολυπεπτιδίων παρουσιάζονται στην Εικόνα 6.1 κατά αυξανόμενο ποσοστό PAla. Όπως έχει διαπιστωθεί στο παρελθόν [7,8,11], η μεταβολή βήματος στη ροή θερμότητας του **PBLG₉₁** σχετίζεται με τη μετάβαση υάλου, που οφείλεται στα άμορφα τμήματα του πολυμερούς. Στα συμπολυμερή εμφανίζεται μια παρόμοια μεταβολή, αν και σημαντικά διευρυμένη. Ένα επιπλέον μικρό σκαλοπάτι φαίνεται στα ~470 K σε δύο από τα συμπολυμερή, κοντά στη θερμοκρασία όπου αναμένεται το T_g^{PAla} . Η μεταβολή της ειδικής θερμότητας, Δc_p , της μετάβασης υάλου της συστάδας του PBLG ισούται με 0.40, 0.31, 0.30, και 0.24 J/gK για το **PBLG₉₁**, το **PBLG₁₀₄-b-PAla₂₄**, το **PBLG₁₁₅-b-PAla₄₈**, και το **PBLG₁₀₅-b-PAla₇₉**, αντίστοιχα, ενώ η μεταβολή για τη μετάβαση υάλου της συστάδας της PAla είναι 0.12 και 0.10 J/gK για το **PBLG₁₀₄-b-PAla₂₄** και το **PBLG₁₁₅-b-PAla₄₈**, αντίστοιχα.



Εικόνα 6.1. Θερμογραφήματα $\Delta\Theta\Sigma$ καταγεγραμμένα κατά τη δεύτερη ψύξη (ρυθμός ψύξης 10 K/min). Η θερμοκρασία υάλου του PBLG (T_g^{PBLG}) μετακινείται προς ελαφρώς υψηλότερες θερμοκρασίες και η μετάβαση διευρύνεται καθώς αυξάνεται η περιεκτικότητα των συμπολυμερών σε PAla.

6.2.2 Υπερμοριακή δομή

Η τοπική διαμόρφωση των πεπτιδίων μπορεί να βρεθεί μέσω των χημικών μετατοπίσεων του ^{13}C [29], και επομένως η δευτεροταγής δομή να προσδιοριστεί με ^{13}C CP-MAS NMR. Στην Εικόνα 6.2 φαίνονται αντιπροσωπευτικά φάσματα ^{13}C NMR των καθαρών συστατικών και των συμπολυπεπτιδίων. Το PBLG μεγάλου βαθμού πολυμερισμού ($n>18$) σχηματίζει α-έλικες [8]. Πράγματι, οι συντονισμοί στα $\delta\sim 176$ και 57.5 ppm προέρχονται από το $\text{C}=\text{O}$ αμιδίου και τον άνθρακα C_α , αντίστοιχα, και υποδηλώνουν το σχηματισμό α-ελίκων. Από την άλλη μεριά, η **PAIa**₁₀₇ εμφανίζει δύο συντονισμούς του C_α σε $\delta\sim 53.1$ και 49.4 ppm, που αντιστοιχούν σε α-έλικες και β-φύλλα, αντίστοιχα. Ο σχετικός τους λόγος είναι 66:34.



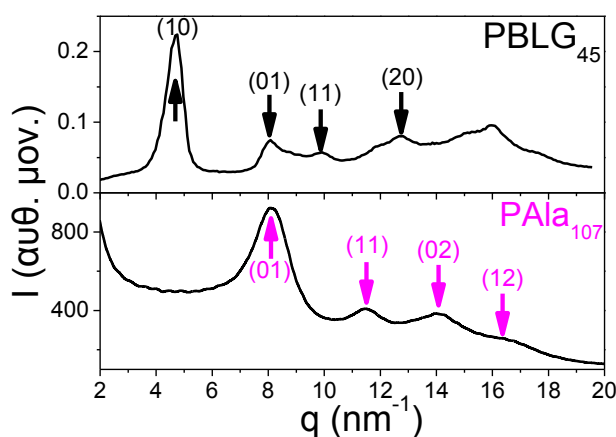
Εικόνα 6.2. Φάσματα ^{13}C NMR των ομο- και συμπολυπεπτιδίων **PBLG**₆₇ και **PAIa**₁₀₇. Στο **PBLG**₆₇, οι ισχυρές κορυφές με χημική μετατόπιση $\delta\sim 176$ και 57.5 ppm οφείλονται στο $\text{C}=\text{O}$ αμιδίου και στον άνθρακα C_α , αντίστοιχα, και υποδηλώνουν το σχηματισμό α-ελίκων. Αντίθετα, τα φάσματα της **PAIa** έχουν δύο συντονισμούς που οφείλονται στον C_α με $\delta\sim 53.1$ και 49.4 ppm, που αντιστοιχούν σε α-έλικες και β-φύλλα, αντίστοιχα. Στα συμπολυμερή παρατηρούνται δύο συντονισμοί του C_α , στα 57.5 και 53.1 ppm, που δείχνουν ότι και οι δύο συστάδες σχηματίζουν αποκλειστικά α-έλικες.

Στα συμπολυπεπτιδία, εμφανίζονται δύο συντονισμοί του C_α , σε $\delta\sim 57.5$ και 53.1 ppm, που σημαίνει ότι και οι δύο συστάδες σχηματίζουν αποκλειστικά α-έλικες. Αυτό το γεγονός είναι ιδιαίτερα εμφανές στα συμπολυμερή **PBLG**₁₀₄-**b**-**PAIa**₂₄ και **PBLG**₁₁₅-**b**-**PAIa**₄₈, αλλά στην περίπτωση του **PBLG**₁₀₅-**b**-**PAIa**₇₉ ($w_{\text{PAIa}}=21\%$) δεν μπορεί να αποκλειστεί και η παρουσία ενός μικρού ποσοστού β-φύλλων ($\sim 5\%$). Παρόλα αυτά, συνολικά η β-φυλλοειδής

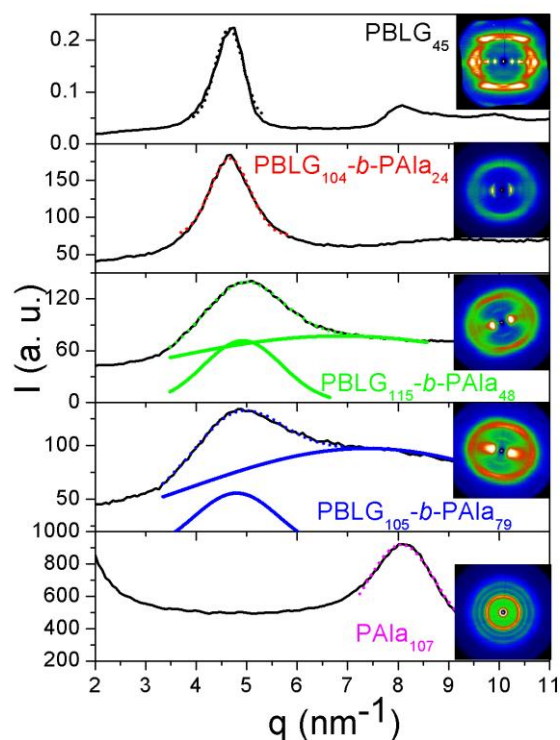
μορφολογία της καθαρής πολυαλανίνης δεν έχει ισχυρή παρουσία στα συμπολυπεπτίδια. Αυτό δείχνει την ισχυρή επίδραση της τοπολογίας των αλυσίδων στη διαμόρφωση της PAla, πιθανότατα λόγω ενθαλπικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ανόμοιων συστάδων στα συμπολυπεπτίδια. Όπως θα δούμε στη συνέχεια, οι ίδιες θερμοδυναμικές επιδράσεις ευθύνονται και για μεταβολές στις α -έλικες.

Τα πειράματα σκέδασης ακτίνων-X σε ευρείες γωνίες μπορούν να προσδιορίσουν τόσο τη δευτεροταγή δομή των πεπτιδίων όσο και τη μοναδιαία κυψελίδα. Ορισμένες αντιπροσωπευτικές καμπύλες σκέδασης των ομοπολυπεπτιδίων φαίνονται στην Εικόνα 6.3α. Η καμπύλη του **PBLG₄₅** εμφανίζει μια σειρά έντονων ισημερινών ανακλάσεων, μαζί με μερικές επιπλέον ανακλάσεις. Οι τελευταίες, υποδηλώνουν τη διαμόρφωση α -έλικας.

α)



β)



Εικόνα 6.3. (α) Ισημερινές εντάσεις WAXS των ομοπολυπεπτιδίων PBLG και PAla. Τα βέλη δείχνουν τις κύριες ανακλάσεις της εξαγωνικής και της ορθορομβικής μοναδιαίας κυψελίδας του **PBLG₄₅** και της **PAla₁₀₇**, αντίστοιχα. (β) Οι ισημερινές εντάσεις των ομοπολυπεπτιδίων και των συμπολυπεπτιδίων, από τα πειράματα σκέδασης σε προσανατολισμένες ίνες, μαζί με τις αντίστοιχες διδιάστατες εικόνες. Ο προσανατολισμός των ινών είναι κατακόρυφος. Στα φάσματα των συμπολυμερών, οι ανακλάσεις (10) και (01) της εξαγωνικής και της ορθορομβικής μοναδιαίας κυψελίδας παραμένουν στην ίδια θέση ανεξάρτητα από τη σύσταση.

Οι ισχυρές ισημερινές ανακλάσεις, με λόγους σχετικών αποστάσεων $1:3^{1/2}:4^{1/2}:7^{1/2}$ (σημειωμένες με βέλη), αντιστοιχούν στα επίπεδα (10), (01), (11), και (20) μιας εξαγωνικής μοναδιαίας κυψελίδας, με πλεγματική παράμετρο $a=1.51$ nm, και χαρακτηριστική απόσταση d που δίνεται από την εξίσωση

$$d_{hex} = \frac{1}{\sqrt{\frac{4}{3a^2}(h^2 + k^2 + hk)}} \quad (6.1)$$

όπου h και k είναι οι δείκτες Miller.

Από την άλλη πλευρά, η **PAla**₁₀₇ φαίνεται ότι σχηματίζει τόσο α -έλικες όσο και β -φύλλα, σε συμφωνία με τη μελέτη με NMR. Υπάρχουν μερικές ανακλάσεις με κυματανύσματα 8.17, 11.6, 14.2, και 16.3 nm⁻¹, χωρίς σημαντική οργάνωση σε μεγάλη κλίμακα. Αυτές οι ανακλάσεις αντιστοιχούν σε μια ορθορομβική μοναδιαία κυψελίδα με χαρακτηριστική απόσταση d ίση με

$$d_{orth} = \frac{1}{\sqrt{\frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2}}} \quad (6.2)$$

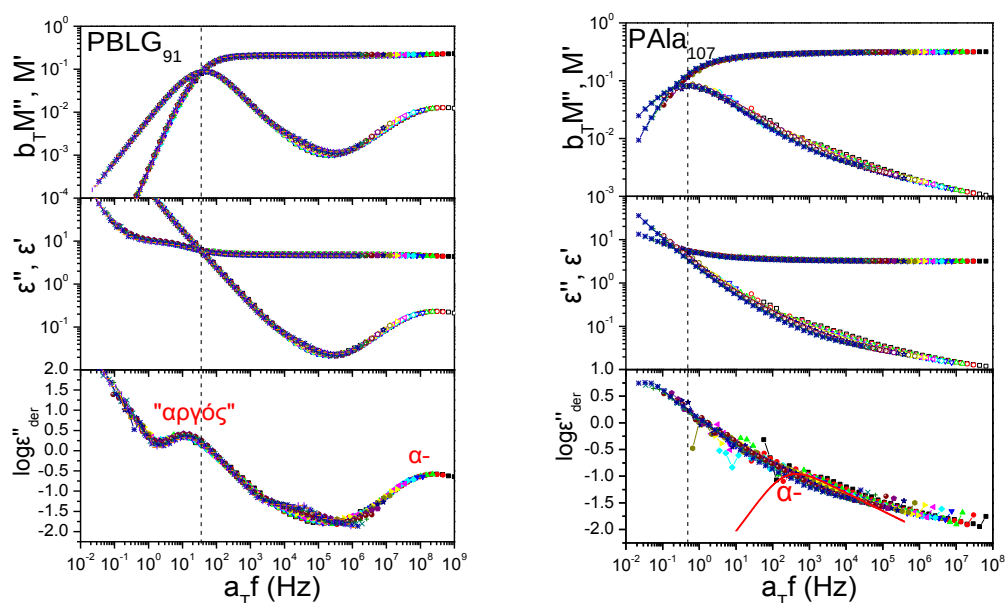
με $a=0.77$ nm και $b=0.55$ nm. Στην Εικόνα 6.3α, τα βέλη αντιστοιχούν στις ανακλάσεις από τα επίπεδα (01), (11), (02), και (12) της μοναδιαίας κυψελίδας.

Στην περίπτωση των συμπολυπεπτιδίων, συνυπάρχουν τόσο οι ανακλάσεις (10) όσο και οι (01) από τις αντίστοιχες εξαγωνικές και ορθορομβικές μοναδιαίες κυψελίδες των PBLG και PAla. Στην Εικόνα 6.3β φαίνονται οι διδιάστατες εικόνες σκέδασης WAXS, μαζί με τις αντίστοιχες ισημερινές εντάσεις. Οι αντίστοιχες παράμετροι των μοναδιαίων κυψελίδων των PBLG και PAla δεν μεταβάλλονται σημαντικά, που σημαίνει ότι υπάρχει νανοφασικός διαχωρισμός μεταξύ των συστάδων. Όμως, οι κορυφές σκέδασης είναι πολύ πλατιές, και το μήκος εμμονής ($\xi=2\pi/\Delta w$) που υπολογίζεται από το εύρος, Δw , των ανακλάσεων (10) και (02) του PBLG και της PAla, αντίστοιχα, ελαττώνεται σημαντικά στα συμπολυπεπτίδια. Επιπλέον, η αλληλεπικάλυψη των ανακλάσεων ανώτερης τάξης του PBLG με εκείνες της PAla δεν επιτρέπουν την ακριβή εύρεση της δευτεροταγούς δομής στα συμπολυπεπτίδια με την τεχνική της σκέδασης ακτίνων-X. Γι' αυτόν το λόγο τα πειράματα ¹³C NMR υπερτερούν στην εύρεση της δευτεροταγούς δομής στα συμπολυπεπτίδια. Ανακεφαλαιώνοντας αυτό το μέρος, το NMR και οι ακτίνες-X έδειξαν την παρουσία α -ελίκων που αντιστοιχούν σε τμήματα τόσο PBLG όσο και PAla, και στην περίπτωση του PBLG οι ακτίνες-X δείχνουν ότι οι α -έλικες έχουν εξαγωνική οργάνωση. Επίσης, η έλλειψη εξάρτησης των πλεγματικών παραμέτρων των PBLG και PAla από τη σύσταση, δηλώνει το

νανοφασικό διαχωρισμό μεταξύ των συστάδων. Εδώ αναφέρουμε ότι η άμεση παρατήρηση του νανοφασικού διαχωρισμού με σκέδαση ακτίνων-X σε μικρές γωνίες δεν κατέστη εφικτή, λόγω της χαμηλής ηλεκτρονιακής αντίθεσης.

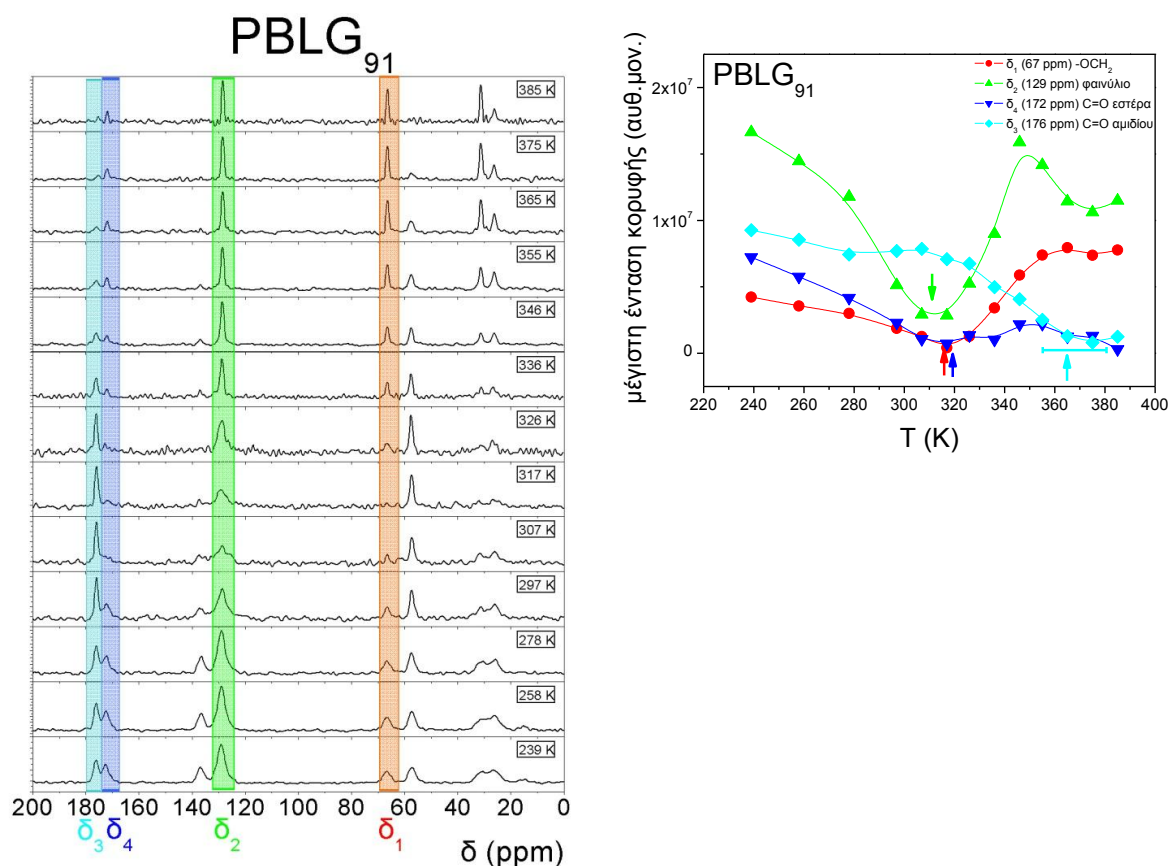
6.2.3 Δυναμική του PBLG

Στην Εικόνα 6.4 παρουσιάζονται υπερτιθεμένα διηλεκτρικά φάσματα των δύο ομοπολυπεπτιδίων PBLG και PAla, σε θερμοκρασίες πάνω από τα αντίστοιχα T_g . Χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικές αναπαραστάσεις: Το ηλεκτρικό μέτρο M^* και η σύνθετη διηλεκτρική επιτρεπτότητα ϵ^* , μαζί με την παράγωγο του ϵ' που δεν έχει αγωγιμότητα. Τα δεδομένα του **PBLG₉₁** έχουν υπερτεθεί ως προς τη θερμοκρασία αναφοράς $T_{ref}=413$ K. Ξεκινώντας από υψηλές συχνότητες, φαίνεται ο α -μηχανισμός, στη συνέχεια ο “ενδιάμεσος”, και τέλος ο “αργός” μηχανισμός. Όπως έχουμε προαναφέρει, ο α -μηχανισμός οφείλεται στη χαλάρωση άμορφων τμημάτων της αλυσίδας, που σχηματίζονται από σπασμένους δεσμούς υδρογόνου και από τα άκρα των αλυσίδων, όπου και πάλι δεν σταθεροποιούνται επαρκώς α -έλικες, ο “ενδιάμεσος” μηχανισμός αντιστοιχεί σε κινήσεις τύπου Rouse τελείως άμορφων αλυσίδων, και ο “αργός” μηχανισμός αντιστοιχεί στη δυναμική της α -ελικοειδούς δευτεροταγούς δομής.



Εικόνα 6.4. Υπερθέσεις του πραγματικού και του φανταστικού μέρους του ηλεκτρικού μέτρου, M^* , και της σύνθετης διηλεκτρικής διαπερατότητας, ϵ^* , των ομοπολυπεπτιδίων σε θερμοκρασία αναφοράς 413 και 473 K, για θερμοκρασίες 338 – 413 και 408 – 473 K, για το **PBLG₉₁** και την **PAla₁₀₇**, αντίστοιχα. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν το σημείο τομής του πραγματικού και του φανταστικού μέρους. Στο **PBLG₉₁** φαίνονται ο τμηματικός (α -) και ο “αργός” μηχανισμός, από χαμηλές προς υψηλές θερμοκρασίες. Από την άλλη πλευρά, ο α -μηχανισμός της **PAla₁₀₇** βρίσκεται σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες και διακρίνεται δύσκολα στα φάσματα.

Χρήσιμες πληροφορίες για τη δυναμική των πλευρικών ομάδων και της κύριας αλυσίδας του PBLG μπορούν να ληφθούν από τη θερμοκρασιακή μεταβολή των φασμάτων ^{13}C NMR με τη θερμοκρασία (Εικόνα 6.5). Γι' αυτόν το σκοπό μελετήθηκε, για πρώτη φορά, η μοριακή προέλευση των μηχανισμών που παρατηρούνται με ΔΦ. Όπως είπαμε το **PBLG₉₁** σχηματίζει μόνο α-έλικες, όπως φαίνεται από τις κορυφές άνθρακα C_α ($\delta \sim 58$ ppm) και $\text{C}=\text{O}$ αμιδίου ($\delta_3 \sim 176$ ppm). Οι συντονισμοί σε $\delta_1 \sim 67$ ppm, $\delta_2 \sim 129$ ppm, και $\delta_4 \sim 172$ ppm που αντιστοιχούν στους άνθρακες OCH_2 , φαινυλίου, και εστέρα της πλευρικής ομάδας, σημειώνονται στην Εικόνα 6.5 με διαφορετικά χρώματα.

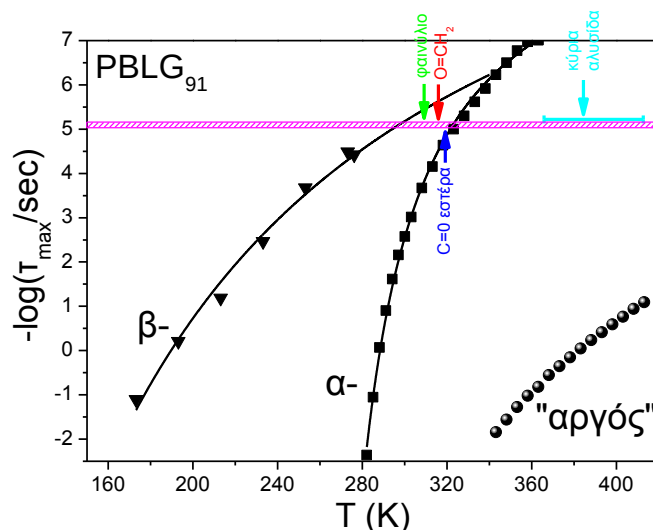


Εικόνα 6.5. (Αριστερά) Φάσματα ^{13}C NMR του **PBLG₉₁** συναρτήσει της θερμοκρασίας. Οι συντονισμοί σε $\delta_1 \sim 67$ ppm, $\delta_2 \sim 129$ ppm, και $\delta_3 \sim 172$ ppm που αντιστοιχούν στους άνθρακες του OCH_2 , φαινυλίου, και εστέρα της πλευρικής ομάδας σημειώνονται με διαφορετικά χρώματα. (Δεξιά) Η θερμοκρασιακή εξάρτηση της μέγιστης έντασης των παραπάνω συντονισμών. Τα βέλη δείχνουν τις θερμοκρασίες όπου η ένταση ελαχιστοποιείται, στις θερμοκρασίες όπου ενεργοποιούνται οι αντίστοιχες μοριακές κινήσεις στη συχνότητα του NMR ($\omega = 2\pi f$, $f = 20$ kHz). Η ταχύτερη μοριακή κίνηση είναι εκείνη του φαινυλίου, και έπειτα του OCH_2 και του εστέρα της πλευρικής ομάδας.

Στην ίδια Εικόνα γίνεται σύγκριση της θερμοκρασιακής εξάρτησης των μέγιστων εντάσεων των παραπάνω συντονισμών. Υπάρχει μια τάση ελάττωσης της έντασης με αύξηση της θερμοκρασίας. Επιπλέον, όμως, παρατηρούνται ελάχιστα της έντασης, ιδιαίτερα για τους συντονισμούς του OCH_2 και του φαινυλίου. Η ελάττωση της έντασης εμφανίζεται επειδή η

τοπική δυναμική αλληλεπιδρά με την περιστροφή υπό μαγική γωνία, τη διασταυρούμενη πόλωση, και τη διπολική αποσύζευξη, στην περιοχή των 20 kHz [30]. Τα βέλη στην Εικόνα δείχνουν τις θερμοκρασίες όπου η ένταση ελαχιστοποιείται, υποδηλώνοντας την ύπαρξη μοριακών κινήσεων στη συχνότητα του NMR ($\omega=2\pi f$, $f=20$ kHz). Η πιο γρήγορη μοριακή κίνηση είναι εκείνη του φαινυλίου, ακολουθούμενη από την κάπως πιο αργή κίνηση των ομάδων OCH_2 και εστέρα της πλευρικής ομάδας. Παρόλα αυτά, η θερμοκρασιακή διαφορά μεταξύ αυτών των συντονισμών είναι μικρότερη από 10 K, και έτσι για πρακτικούς λόγους μπορούμε να υποθέσουμε ότι η πλευρική ομάδα χαλαρώνει ως ένα σύνολο. Σε αυτές τις θερμοκρασίες η κύρια αλυσίδα παραμένει ακίνητη, φανερώνοντας ότι υπάρχει αποσύζευξη της κίνησης της πλευρικής ομάδας από εκείνη της κύριας αλυσίδας. Η κύρια αλυσίδα αρχίζει να κινείται σε πολύ υψηλότερες θερμοκρασίες (κατ' εκτίμηση $T \sim 380$ K) στη συχνότητα του NMR.

Συνδυάζοντας τις πληροφορίες από τη $\Delta\Phi$ και το ^{13}C NMR για το ρυθμό και τη γεωμετρία της κίνησης, αντίστοιχα, γίνεται, για πρώτη φορά, μια σύγκριση των χρόνων χαλάρωσης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6.6. Σε αυτήν την Εικόνα, οι χρόνοι χαλάρωσης που αντιστοιχούν στο β -μηχανισμό ελήφθησαν από $\Delta\Phi$ και έχουν θερμοκρασιακή εξάρτηση τύπου Arrhenius (εξίσωση 3.3) με $\tau_0 \sim 10^{-14}$ s και $E_{\text{act}} = 52 \pm 1$ kJ/mol. Αντίθετα, ο α -μηχανισμός έχει τη συνήθη θερμοκρασιακή εξάρτηση τύπου VFT (εξίσωση 3.4) με $\tau_0 = (5.0 \pm 0.5) \times 10^{-12}$ s, $D_T = 5.5 \pm 0.2$, και $T_0 = 241 \pm 1$. Στην Εικόνα περιλαμβάνεται και ο “αργός” $\Delta\Phi$ μηχανισμός, που σχετίζεται με τη δυναμική των τμημάτων της α -έλικας.



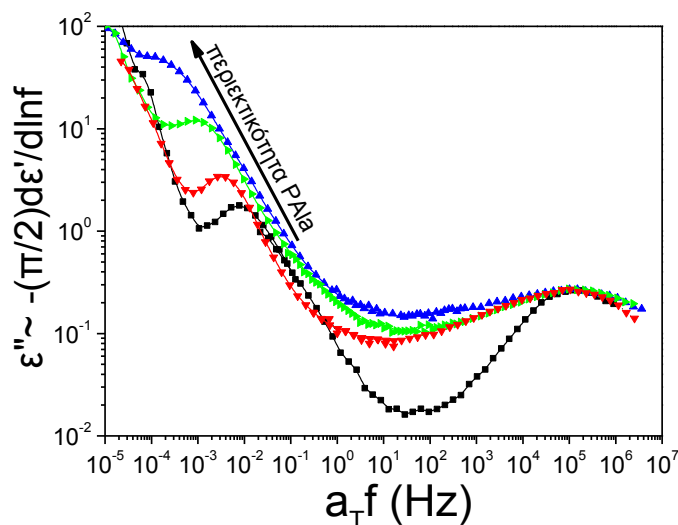
Εικόνα 6.6. Οι χρόνοι χαλάρωσης του β - (τρίγωνα), του α - (τετράγωνα), και του “αργού” μηχανισμού (σφαίρες) συναρτήσει της θερμοκρασίας, όπως μετρήθηκαν με $\Delta\Phi$. Οι γραμμές είναι προσαρμογές των εξισώσεων Arrhenius και VFT στο β - και στον α -μηχανισμό, αντίστοιχα. Οι συντονισμοί του ^{13}C NMR από την Εικόνα 6.5 σημειώνονται με βέλη στην συχνότητα του NMR (20 kHz).

Σαφώς η συνολική δυναμική της α -έλικας είναι πιο αργή από την τοπική τμηματική κίνηση των άμορφων περιοχών. Οι συντονισμοί του ^{13}C NMR της Εικόνας 6.5 σημειώνονται με βέλη πάνω στη συχνότητα που αντιστοιχεί το NMR. Η δυναμική του φαινυλίου, του OCH_2 , και του εστέρα της πλευρικής ομάδας βρίσκονται στην περιοχή όπου συναντώνται ο β - και ο α -μηχανισμός. Επειδή η κίνηση του φαινυλίου δεν συνεισφέρει στη διηλεκτρική ένταση, συμπεραίνουμε ότι ο β -μηχανισμός, από διηλεκτρικής σκοπιάς, αντιστοιχεί στη δυναμική του εστέρα $\text{C}=\text{O}$ και του OCH_2 . Η κίνηση της κύριας αλυσίδας, όπως ανιχνεύεται από το NMR ξεκινάει σε υψηλότερες θερμοκρασίες απ' ότι ο τμηματικός α -μηχανισμός της $\Delta\Phi$. Αυτό συμβαίνει επειδή η $\Delta\Phi$ είναι ευαίσθητη στην κίνηση της κύριας αλυσίδας μέσω των άμορφων περιοχών (εκεί όπου είναι σπασμένες οι έλικες καθώς και στα άκρα), που στο NMR δεν είναι ορατή. Εκεί, αντίθετα, ανιχνεύεται η κίνηση των α -ελικοειδών τμημάτων, με άλλα λόγια, πιο οργανωμένων περιοχών. Έτσι, το NMR “βλέπει” τη δυναμική μέσα από τις κινήσεις π.χ. του $\text{C}=\text{O}$ αμιδίου. Από την άλλη πλευρά, η δυναμική της κύριας αλυσίδας που ανιχνεύεται από το NMR είναι σημαντικά πιο γρήγορη από τον “αργό” μηχανισμό της $\Delta\Phi$, που σχετίζεται με τη χαλάρωση των μακροδιπόλων των α -ελίκων. Αυτό σημαίνει ότι η κίνηση της κύριας αλυσίδας είναι μικρού πλάτους, όπως προκύπτει από το συντονισμό του $\text{C}=\text{O}$ αμιδίου στο NMR. Επομένως, η κίνηση που ανιχνεύει το NMR μπορεί να θεωρηθεί ως πρόδρομος της κίνησης των ελίκων που παρατηρούνται με τη $\Delta\Phi$, ενώ δεν παρατηρείται στη $\Delta\Phi$ λόγω της χαμηλής έντασής της.

6.2.4 Δυναμική των συμπολυπεπτιδίων

Σε αυτό το σημείο στρέφουμε την προσοχή μας στην επίδραση των δομικών αλλαγών που βρέθηκαν από το NMR (αλλαγή της δευτεροταγούς δομής) και τις ακτίνες-X (νανοφασικός διαχωρισμός) στη δυναμική των συμπολυπεπτιδίων. Στην Εικόνα 6.7 συγκρίνουμε τα φάσματα διηλεκτρικών απωλειών του PBLG και των συμπολυμερών, όπως υπολογίστηκαν από την παράγωγο της ηλεκτρικής διαπερατότητας (ϵ''_{der}) στα 333 και 415 K, μετατοπισμένα ως προς το φάσμα των 415 K. Στα συμπολυπεπτίδια, ο α -μηχανισμός του PBLG μένει πρακτικά στην ίδια συχνότητα και διευρύνεται σημαντικά. Επιπλέον, ο “αργός” μηχανισμός, που σχετίζεται με τη χαλάρωση τμημάτων της α -έλικας, είναι πιο ισχυρός και μετακινείται προς χαμηλότερες συχνότητες, σε σχέση πάντα με το καθαρό PBLG. Ο “αργός” μηχανισμός στα συμπολυπεπτίδια είναι δυνατό να προέρχεται μόνο από τη χαλάρωση της δευτεροταγούς δομής του PBLG, καθώς ο αντίστοιχος “αργός” μηχανισμός της PAla θα παρατηρούνταν σε πολύ υψηλότερες θερμοκρασίες/χαμηλότερες συχνότητες. Παρότι η αποσύζευξη του “αργού” μηχανισμού από την αγωγιμότητα είναι στην περίπτωση αυτή

δύσκολη, μπορεί να συναχθεί από την Εικόνα ότι η διηλεκτρική ένταση είναι μεγαλύτερη απ' ότι στο καθαρό PBLG.

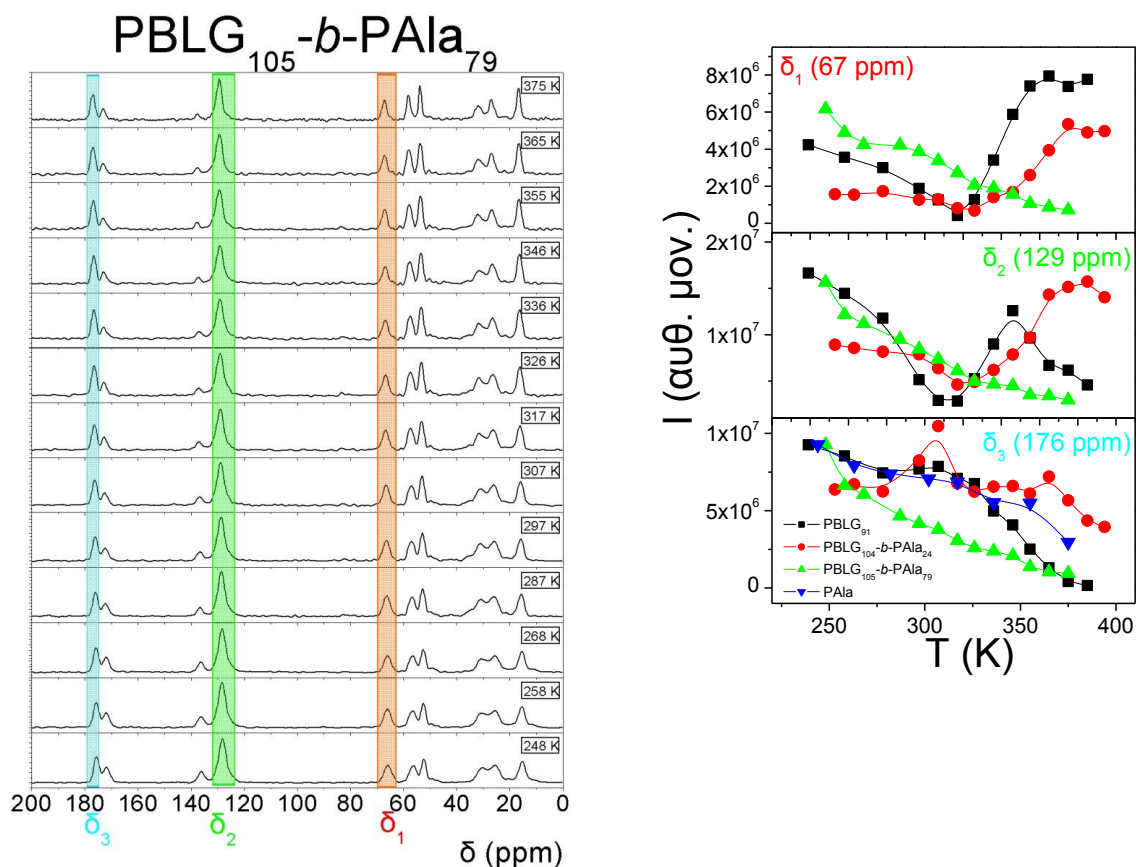


Εικόνα 6.7. Υπερθέσεις φασμάτων ε''_{der} (υπολογισμένων από την παράγωγο του ε') στα 333 και 415 K, μετατοπισμένων ως προς την πρώτη θερμοκρασία. Φαίνεται ο γρήγορος α -μηχανισμός, που σχετίζεται με την υαλώδη μετάβαση της συστάδας του PBLG, και ο “αργός” μηχανισμός που σχετίζεται με τη χαλάρωση των α -ελίκων. **PBLG₉₁** (τετράγωνα), **PBLG₁₀₄-b-PAla₂₄** (κάτω τρίγωνα), **PBLG₁₁₅-b-PAla₄₈** (δεξιά τρίγωνα), **PBLG₁₀₅-b-PAla₇₉** (πάνω τρίγωνα). Όταν αυξάνεται η περιεκτικότητα σε PAla στα συμπολυμερή ο α -μηχανισμός διευρύνεται ενώ ο “αργός” μηχανισμός μετατοπίζεται σε χαμηλότερες συχνότητες και κερδίζει ένταση. Η δεύτερη παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι ατέλειες στις έλικες του PBLG διορθώνονται εν μέρει με την προσθήκη PAla.

Η ενεργός διπολική ροπή που παίρνουμε (με βάση την εξίσωση 3.6) είναι 20 D, δηλαδή μεγαλύτερη από εκείνη του καθαρού PBLG ίδιου μοριακού βάρους. Υπάρχει μερική ελάττωση των ατελειών των α -ελίκων, χάρη στις θερμοδυναμικές επιδράσεις, όπως και στην περίπτωση των τρισυσταδικών συμπολυμερών PBLG-b-PDMS-b-PBLG [13]. Όμως, οι εκτιμώμενες διπολικές ροπές των ελίκων του PBLG απέχουν ακόμη αρκετά από την ιδανική α -έλικα PBLG (~200 D για τον ίδιο βαθμό πολυμερισμού).

Επιστρέφοντας στη συζήτηση για τη γεωμετρία των κινήσεων (^{13}C NMR), στην Εικόνα 6.8 βλέπουμε τα φάσματα του συμπολυμερούς **PBLG₁₀₅-b-PAla₇₉** συναρτήσει της θερμοκρασίας. Όπως αναφέραμε προηγουμένως, και οι δύο συστάδες σχηματίζουν α -έλικες. Οι συντονισμοί σε $\delta \sim 57.5$ και 53.1 ppm αντιστοιχούν στον άνθρακα C_α του PBLG και της PAla. Οι συντονισμοί σε $\delta_1 \sim 67$ ppm, $\delta_2 \sim 129$ ppm, και $\delta_3 \sim 176$ ppm που αντιστοιχούν στο OCH_2 , το φαινύλιο, και το C=O αμιδίου, σημειώνονται με χρώμα στην Εικόνα. Στην ίδια Εικόνα φαίνεται η θερμοκρασιακή εξάρτηση των εντάσεων των παραπάνω συντονισμών για τα ομοπολυπεπίδια και δύο από τα συμπολυπεπίδια **PBLG₁₀₄-b-PAla₂₄** και **PBLG₁₀₅-b-**

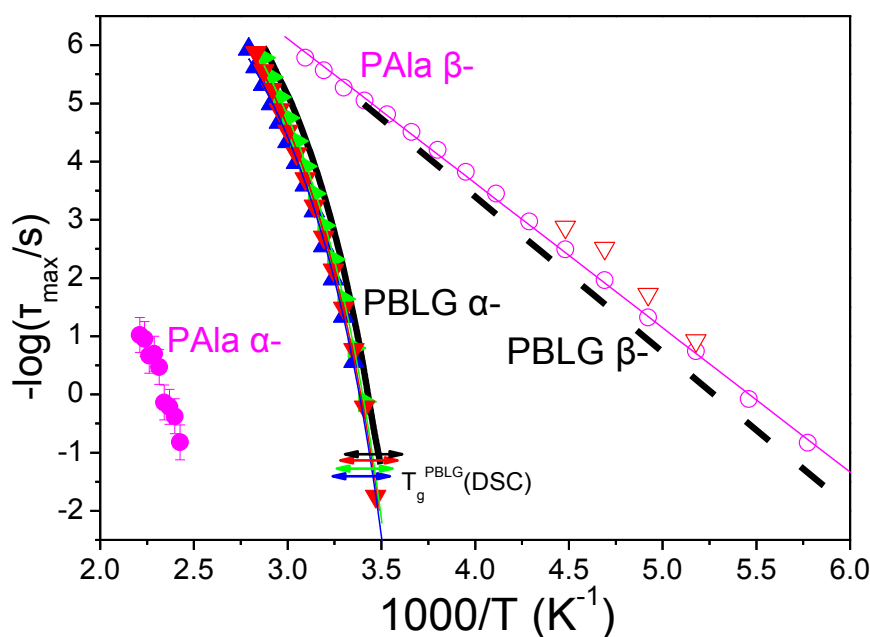
PAla₇₉ (το τρίτο παραλείπεται για λόγους ευκρίνειας). Τα ελάχιστα των εντάσεων που αντιστοιχούν στους συντονισμούς του φαινυλίου (δ_2) και του OCH₂ (δ_1) υπάρχουν και στο συμπολυμερές με μεγάλη περιεκτικότητα σε PBLG (**PBLG₁₀₄-b-PAla₂₄**) αλλά όχι σε εκείνο με τη μικρότερη περιεκτικότητα σε PBLG (**PBLG₁₀₅-b-PAla₇₉**), υποδηλώνοντας μια πιο άκαμπτη δομή. Επομένως, αυξάνοντας την περιεκτικότητα σε PAla στα συμπολυμερή προκαλείται ακαμψία στην κίνηση της πλευρικής ομάδας του PBLG. Γι' αυτό και ο β-μηχανισμός του PBLG δεν φαίνεται ξεκάθαρα στα συμπολυμερή με μεγάλη περιεκτικότητα σε PAla, όπως θα δούμε στη συνέχεια.



Εικόνα 6.8. (Αριστερά) Φάσματα ^{13}C NMR του **PBLG₁₀₅-b-PAla₇₉** συναρτήσει της θερμοκρασίας. Και οι δύο συστάδες σχηματίζουν α-έλικες, όπως υποδηλώνεται από τις κορυφές με $\delta \sim 57.5$ και 53.1 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στους συντονισμούς του C $_{\alpha}$ του PBLG και της PAla. Οι συντονισμοί με $\delta_1 \sim 67$ ppm, $\delta_2 \sim 129$ ppm, και $\delta_3 \sim 176$ ppm που αντιστοιχούν στους άνθρακες του OCH₂, φαινυλίου, και εστέρα της πλευρικής ομάδας σημειώνονται με διαφορετικά χρώματα. (Δεξιά) Η θερμοκρασιακή εξάρτηση της μέγιστης έντασης των παραπάνω συντονισμών για το καθαρό PBLG (τετράγωνα), την PAla (κάτω τρίγωνα), και δύο συμπολυμερή, το **PBLG₁₀₄-b-PAla₂₄** (κύκλοι) και **PBLG₁₀₅-b-PAla₇₉** (πάνω τρίγωνα).

Ο τοπικός μηχανισμός χαλάρωσης και οι μηχανισμοί σε $T < T_g$ στα ομοπολυπεπτίδια και στα συμπολυπεπτίδια συγκρίνονται στην Εικόνα 6.9. Ο β-μηχανισμός της PAla με $\tau_0 \sim 10^{-14}$ s, $E_{\text{act}} = 47.7 \pm 0.4$ kJ/mol, με κατανομή χρόνων που περιγράφεται από τη συνάρτηση HN (εξίσωση 4.41) με παραμέτρους $m=0.4$, $n=0.75$, και διηλεκτρική ένταση $T\Delta\epsilon \sim 25$ K, βρίσκεται

στην περιοχή του β-μηχανισμού του PBLG. Ο β-μηχανισμός του PBLG χαρακτηρίζεται από $\tau_0 \sim 10^{-14}$ s, $E_{\text{act}} = 52 \pm 1$ kJ/mol, $m = mn = 0.45$, και $T\Delta\epsilon \sim 5$ K. Παρά το ότι οι β-μηχανισμοί του PBLG και της PAla είναι κοντά, η προέλευσή τους πρέπει να είναι πολύ διαφορετική. Στο PBLG τα αποτελέσματα από ^{13}C NMR και ΔΦ έδειξαν ότι η υπεύθυνη για τη χαλάρωση είναι η κίνηση της πλευρικής ομάδας, που φέρει τα OCH_2 και $\text{C}=\text{O}$ εστέρα. Αντίθετα, στην πλευρική ομάδα της PAla δεν υπάρχει δίπολο. Έτσι αυτός ο μηχανισμός πρέπει να οφείλεται σε μικρού πλάτους ταλαντώσεις της κύριας αλυσίδας της PAla. Στα συμπολυπεπτίδια, ο β-μηχανισμός παρατηρείται μόνο στο **PBLG₁₀₄-b-PAla₂₄**, και αποδίδεται στο PBLG λόγω της μικρής του διηλεκτρικής έντασης ($T\Delta\epsilon \sim 5$ K). Η εξαφάνιση του β-μηχανισμού του PBLG στα υπόλοιπα συμπολυπεπτίδια συμφωνεί με τα αποτελέσματα του ^{13}C NMR, ότι δηλαδή η κίνηση της πλευρικής ομάδας δεν είναι επιτρεπτή στα συμπολυμερή με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε PAla.



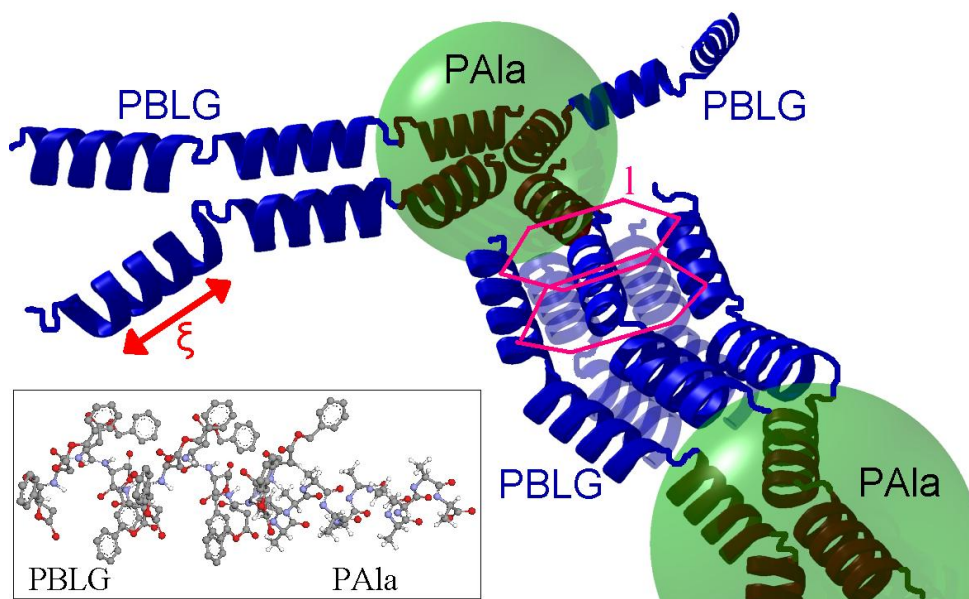
Εικόνα 6.9. Διάγραμμα Arrhenius των χρόνων χαλάρωσης του τμηματικού (α-) μηχανισμού στα ομο- και συμπολυπεπτίδια. Οι α- και β-μηχανισμοί του καθαρού **PBLG** φαίνονται με συνεχή και διακεκομμένη γραμμή, αντίστοιχα, ενώ οι αντίστοιχοι μηχανισμοί της **PAla** φαίνονται με γεμάτους και ανοικτούς κύκλους. Ο α-μηχανισμός των συμπολυπεπτιδίων φαίνεται με τα εξής σύμβολα: **PBLG₁₀₄-b-PAla₂₄** (κάτω τρίγωνα), **PBLG₁₁₅-b-PAla₄₈** (δεξιά τρίγωνα), και **PBLG₁₀₅-b-PAla₇₉** (πάνω τρίγωνα). Ο β-μηχανισμός φαίνεται μόνο στο συμπολυπεπτίδιο **PBLG₁₀₄-b-PAla₂₄** (βλ. κείμενο). Οι γραμμές είναι προσαρμογές της εξίσωσης VFT (α-μηχανισμοί) ή Arrhenius (β-μηχανισμοί). Το T_g της ΔΘΣ που αντιστοιχεί στη συστάδα του PBLG στα συμπολυμερή σημειώνεται με βέλη σε $\tau \sim 10$ s.

Στην Εικόνα 6.9 συμπεριλαμβάνονται και οι τμηματικοί μηχανισμοί των ομοπολυπεπτιδίων. Ο α -μηχανισμός της PAla είναι πολύ ασθενής στη ΔΦ (Εικόνα 6.4), παρόλα αυτά στην Εικόνα δίνουμε μια εκτίμηση των χρόνων χαλάρωσης. Η τμηματική χαλάρωση του PBLG στα συμπολυπεπτίδια σχεδόν συμπίπτει με του καθαρού PBLG, έχοντας την ίδια ισχυρή θερμοκρασιακή εξάρτηση (VFT) και τις ίδιες παραμέτρους VFT (Πίνακας 6.1). Η ελάχιστη εξάρτηση των χρόνων χαλάρωσης του PBLG από τη σύσταση επιβεβαιώνει το νανοφασικό διαχωρισμό μεταξύ των ανόμοιων συστάδων.

Πίνακας 6.1. Παράμετροι VFT και T_g της φάσης του PBLG στα συμπολυπεπτίδια.

δείγμα	$-\log(\tau_0/s)$	D	T_{inf} (PBLG) (K)	$T_g^{\Delta\Phi}$ (PBLG) (K)	$T_g^{\Delta\Theta\Sigma}$ (PBLG) (K)
PBLG ₉₁	11.3±0.2	5.5±0.2	241±1	284±1	286±15
PBLG ₁₀₄ -b-PAla ₂₄	11.3±0.5	6.1±0.8	239±4	286±4	293±20
PBLG ₁₁₅ -b-PAla ₄₈	12.5±0.2	8.1±0.4	229±2	286±2	301±50
PBLG ₁₀₅ -b-PAla ₇₉	12.4±0.4	9.1±0.9	225±4	287±4	305±50

Στο σημείο αυτό, θα προσπαθήσουμε να συνοψίσουμε τα αποτελέσματα της αυτοοργάνωσης και της δυναμικής των συμπολυπεπτιδίων PBLG-b-PAla, επιχειρώντας την ρεαλιστική απεικόνιση της Εικόνας 6.10. Η αναπαράσταση αυτή δείχνει το νανοφασικό διαχωρισμό των περιοχών PBLG και PAla, που βρέθηκε από τη δομική (ακτίνες-X) και τη δυναμική μελέτη (ΔΦ). Οι αντίστοιχες περιοχές αποτελούνται από έλικες (NMR) εξαγωνικά διατεταγμένες (WAXS), που διακόπτονται από άμορφα τμήματα που οφείλονται σε σπασμένους δεσμούς υδρογόνου (ΔΦ). Η επίδραση του θερμοδυναμικού περιορισμού είναι να βελτιώνεται το μήκος εμμόνης, ζ , των α -ελίκων του PBLG στα συμπολυπεπτίδια σε σχέση με το καθαρό PBLG (ΔΦ), αν και μερικά άμορφα τμήματα (σπασίματα) εξακολουθούν να παραμένουν πάνω στην έλικα.



Εικόνα 6.10. Σχηματική αναπαράσταση της αυτοοργάνωσης των συμπολυπεπτιδίων, η οποία απεικονίζει τις έλικες του PBLG και της PAla (NMR, WAXS) οι οποίες είναι διατεταγμένες σε εξαγωνικό πλέγμα (WAXS). Το μήκος εμμονής των ελίκων του PBLG, ξ , προσδιορίζεται με τη $\Delta\Phi$. Στο ένθετο φαίνεται ένα σχέδιο ενός δισυστατικού συμπολυμερούς $\text{PBLG}_{12}\text{-b-PAla}_{12}$ με (ιδανική) τέλεια εκτεταμένη ελικοειδή διαμόρφωση (κόκκινο: O, μπλε: N, γκρι: C).

6.3 Συμπεράσματα

Η συστηματική μελέτη της αυτοοργάνωσης και της δυναμικής μιας σειράς συμπολυπεπτιδίων αποτελούμενα από συστάδες PBLG και PAla έδειξε την ισχυρή επίδραση του θερμοδυναμικού περιορισμού στην πεπτιδική δευτεροταγή δομή. Αν και η καθαρή PAla σχηματίζει τόσο α -έλικες όσο και β -φύλλα, στα συμπολυπεπτίδια τα β -φύλλα δεν ευνοούνται. Αυτό το γεγονός σημαίνει ότι τα β -φύλλα της PAla είναι λιγότερο σταθερά από τις α -έλικες, και άρα πιο ευαίσθητα στο θερμοδυναμικό πεδίο που προκαλείται στα συμπολυμερή. Επιπλέον, η επίδραση του θερμοδυναμικού πεδίου στις α -έλικες του PBLG έχει ως αποτέλεσμα να μειώσει εν μέρει τις ατέλειες των ελίκων, αυξάνοντας το μήκος εμμονής τους. Αυτό έχει σημασία στη σχεδίαση βιομιμητικών πεπτιδίων, όπως είδαμε στο Κεφάλαιο 2.

Η δυναμική του PBLG εξετάστηκε, για πρώτη φορά, σε θερμοκρασίες υψηλότερες και χαμηλότερες από τη θερμοκρασία υάλου, με συνδυασμό NMR και $\Delta\Phi$, με σκοπό τη διερεύνηση της προέλευσης των μηχανισμών. Διαπιστώθηκε μια ιεραρχία κινήσεων, αρχίζοντας από τον τοπικό β -μηχανισμό, συνεχίζοντας στον τμηματικό α -μηχανισμό, και καταλήγοντας στον “αργό” μηχανισμό. Ο διηλεκτρικά ενεργός β -μηχανισμός αντιστοιχεί στη δυναμική της πλευρικής ομάδας, ενώ ο α -μηχανισμός στην τμηματική δυναμική άμορφων περιοχών σε ατέλειες της έλικας και στα άκρα των αλυσίδων. Έτσι, ο συνδυασμός των δύο τεχνικών προσφέρει περισσότερη πληροφορία για τη δυναμική απ’ ότι η καθεμία ξεχωριστά,

επειδή ανιχνεύουν διαφορετικές ιδιότητες της δυναμικής της κύριας αλυσίδας· το NMR είναι ευαίσθητο σε περιορισμένες κινήσεις μικρού εύρους της κύριας αλυσίδας, ενώ η ΔΦ ανιχνεύει τη χαλάρωση των τμημάτων της α-έλικας. Από αυτήν την άποψη, η κίνηση μικρού πλάτους της κύριας αλυσίδας (NMR) αποτελεί πρόδρομο της χαλάρωσης της δευτεροταγούς δομής (ΔΦ). Εν κατακλείδι, τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ένα τρόπο ελέγχου του είδους και του μήκους εμμονής της δευτεροταγούς δομής, μέσω θερμοδυναμικού περιορισμού σε δισυσταδικά συμπολυπεπτίδια.

6.4 Αναφορές

- (1) Douy, A.; Gallot, B. *Polymer* **1982**, 23, 1039.
- (2) Deming, T. J. *Nature* **1997**, 390, 386.
- (3) Klok, H.-A.; Langenwalter, J. F.; Lecommandoux, S. *Macromolecules* **2000**, 33, 7819.
- (4) Lecommandoux, S.; Achard, M.-F.; Langenwalter, J. F.; Klok, H.-A. *Macromolecules* **2001**, 34, 9100.
- (5) Sarikaya, M.; Tamerler, C.; Jen, A. K.-Y.; Schulten, K.; Baneyx, F. *Nature Materials* **2003**, 2, 577.
- (6) Schlaad, H.; Antonietti, M. *Eur. Phys. J. E* **2003**, 10, 17.
- (7) Floudas, G.; Papadopoulos, P.; Klok, H.-A.; Vandermeulen, G. W. M.; Rodriguez-Hernandez, J. *Macromolecules* **2003**, 36, 3673.
- (8) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Klok, H.-A.; Schnell, I.; Pakula, T. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 81.
- (9) Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 1653.
- (10) Schlaad, H.; Smarsly, B.; Losik, M. *Macromolecules* **2004**, 37, 2210.
- (11) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Klok, H.-A.; Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *J. Chem. Phys.* **2005**, 122, 224906.
- (12) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2352.
- (13) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Lieberwirth, I.; Nguyen, T. Q.; Klok, H.-A. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 618.
- (14) Gitsas, A.; Floudas, G.; Dietz, M.; Mondeshki, M.; Spiess, H. W.; Wegner, G. *Macromolecules* **2007**, 40, 8311.
- (15) Duncan, R. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, 2, 347.
- (17) Mondeshki, M.; Mihov, G.; Graf, R.; Spiess, H. W.; Müllen, K.; Papadopoulos, P.; Gitsas, A.; Floudas, G. *Macromolecules* **2006**, 39, 9605.

- (16) Koynov, K.; Mihov, G.; Mondeshki, M.; Moon, C.; Spiess, H. W.; Müllen, K.; Butt, H.-J.; Floudas, G. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1745.
- (18) Babin, J.; Taton, D.; Brinkmann, M.; Lecommandoux, S. *Macromolecules* **2008**, *41*, 1384.
- (19) Gitsas, A.; Floudas, G.; Mondeshki, M.; Spiess, H. W.; Iatrou, H. Hadjichristidis, N. *Biomacromolecules*, **2008**, *9*, 1959.
- (20) Brown, L.; Trotter, I. F. *Trans. Faraday Soc.* **1956**, *52*, 537.
- (21) Chen, M. C.; Lord, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 4750.
- (22) Lee, D.-K.; Ramamoorthy, A. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 271.
- (23) van Beek, J. D.; Hess, S.; Vollrath, F.; Meier, B. H.; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 10266.
- (24) Gosline, J. M.; Guerette, P. A.; Ortlepp, C. S.; Savage, K. N.; *J. Exp. Biol.* **1999**, *202*, 3295.
- (25) Rathore, O.; Sogah, D. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5231.
- (26) Papadopoulos, P.; Sölter, J.; Kremer, F. *Eur. Phys. J.* **2007**, *24*, 193.
- (27) Werten, M. W. T.; Moers, A. P. H. A.; Vong, T.; Zuilhof, H.; van Hest, J. C. M.; de Wolf, F. A. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1705.
- (28) Gitsas, A.; Floudas, G.; Mondeshki, M.; Spiess, H. W.; Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *Macromolecules* **2008**.
- (29) Saito, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T. Ando I. *Macromolecules* **1983**, *16*, 1050.
- (30) Rothwell, W.; Waugh, J. S. *J. Chem Phys.* **1981**, *74*, 2721.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Επίδραση της τοπολογίας των αλυσίδων στην αυτοοργάνωση και στη δυναμική αστεροειδών συμπολυπεπτιδίων

7.1 Εισαγωγή

Όπως διαπιστώσαμε στα δύο προηγούμενα Κεφάλαια, η αρχιτεκτονική είναι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν την αυτοοργάνωση σε συμπολυπεπτίδια. Ειδικά σε συμπολυπεπτίδια κατά συστάδες, αναπτύσσονται πολλαπλά επίπεδα οργάνωσης: ο νανοφασικός διαχωρισμός, η δευτεροταγής οργάνωση, και η τοπική συναρμογή των πλευρικών ομάδων. Ξεχωριστό ενδιαφέρον παρουσιάζει το ερώτημα κατά πόσο ο νανοφασικός διαχωρισμός επιδρά στο μήκος εμμονής της δευτεροταγούς δομής. Τα αστεροειδή συμπολυμερή αποτελούν την επόμενη βαθμίδα πολυπλοκότητας, και θα μελετήσουμε τις μεταβολές στη δομή και στη δυναμική σε ένα τέτοιο σύστημα, σε παραλληλισμό με το αντίστοιχο γραμμικό συμπολυμερές. Η μελέτη αστεροειδών συστημάτων επιβάλλεται επιπλέον για την κατανόηση φυσικών βιολογικών συστημάτων με αντίστοιχη αρχιτεκτονική, όπως είδαμε στην παράγραφο 2.8.

Μια πρόσφατη έρευνα σε διάλυμα δενδριμερών πολυφαινυλενίων με προσαρτημένα πεπτίδια [αναφ. 1 και Κεφάλαιο 8] με NMR και φασματοσκοπία συσχέτισης φθορισμού (FCS) εξέτασε την επίδραση της γενιάς, του πλήθους των υποκατεστημένων θέσεων, και του βαθμού πολυμερισμού στη δευτεροταγή δομή των πεπτιδίων και στις ιδιότητες διάχυσης. Η αλλαγή στη δευτεροταγή δομή από β-φύλλα σε α-έλικες είχε ισχυρή επίδραση στις υδροδυναμικές ακτίνες των αντικειμένων που διαχέονταν. Όταν στα ίδια δενδριμερή πολυφαινυλενίων προσαρτήθηκαν πολυ-L-λυσίνες, βρέθηκε μια σημαντική εξάρτηση της αυτοοργάνωσης από το μήκος των πολυπεπτιδίων στο τήγμα [2]. Σε αυτήν την περίπτωση, οι περιορισμένες πολυ-L-λυσίνες μπορούσαν να πάρουν διαφορετικές δευτεροταγείς δομές από τα αντίστοιχα γραμμικά. Αυτά τα παραδείγματα δείχνουν πως η γνώση των ιδιοτήτων των γραμμικών πολυπεπτιδίων δεν επαρκεί για την πρόβλεψη των αντίστοιχων ιδιοτήτων τοπολογικά σύνθετων συστημάτων.

Τα συμπολυπεπτίδια περισσότερο σύνθετων αρχιτεκτονικών επιτρέπουν τη μελέτη της επίδρασης της τοπολογίας σε συνδυασμό με τον περιορισμό σε νανοφάσεις. Πράγματι, όταν η αυτοοργάνωση αμφίφιλων δισυσταδικών ελικοειδών-δενδριτικών συμπολυπεπτιδίων

από PBLG και δενδριτικές λυσίνες μελετήθηκαν σε νερό [3], παρατηρήθηκαν μεταβολές στη μορφολογία των μικκυλίων, οι οποίες είχαν ισχυρή εξάρτηση από τη γενιά. Μια πρόσφατη έρευνα [4] ανέφερε τη σύνθεση γραμμικών πολυσυσταδικών συμπολυμερών και τριάκτινων αστεροειδών συμπολυμερών από πολυ(γ-βενζυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος) (PBLG) και πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνη) (PZLL). Και τα δύο ομοπολυπεπτίδια σχηματίζουν α-έλικες, οι οποίες όπως έχουμε αναφέρει στα προηγούμενα κεφάλαια κυριαρχούν στη δευτεροταγή δομή των φυσικών πρωτεϊνών. Αυτό το είδος δευτεροταγούς δομής, που σταθεροποιείται από ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου, προσφέρεται για τη μελέτη της δυναμικής με διηλεκτρική φασματοσκοπία, λόγω της ισχυρής διπολικής ροπής κατά μήκος του άξονα της έλικας. Στην αυτήν την εργασία [5] μελετούμε τα προαναφερθέντα συστήματα συμπολυπεπτιδίων PBLG-*b*-PZLL (γραμμικών και αστεριών), ως προς την επίδραση της τοπολογίας των πεπτιδικών αλυσίδων στο νανοφασικό διαχωρισμό, το είδος και το μήκος εμμονής της δευτεροταγούς δομής, καθώς και την τμηματική και τη συνολική δυναμική των πεπτιδίων απουσία διαλύτη.

Η παρούσα μελέτη προσπαθεί να απαντήσει στα παρακάτω ερωτήματα:

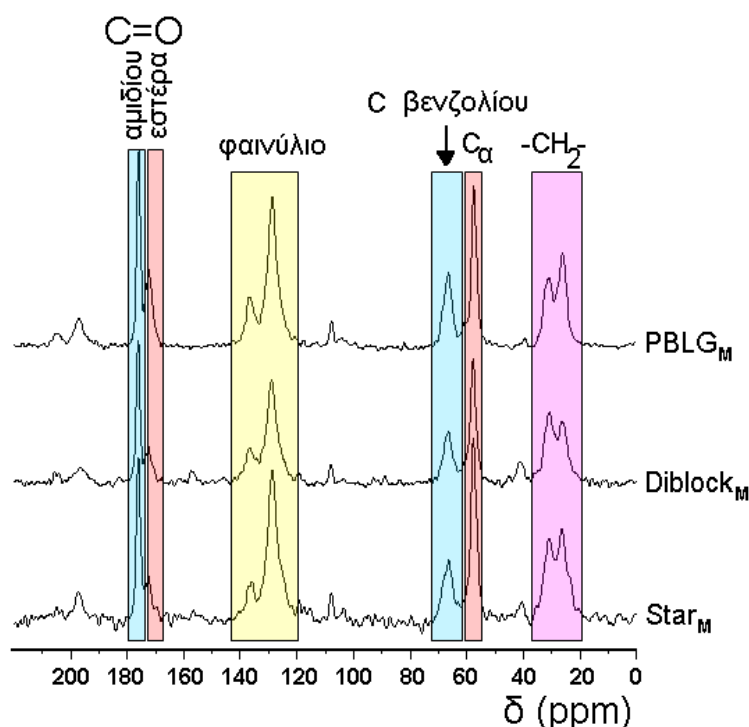
- α) Υπάρχει νανοφασικός διαχωρισμός στις πολύπλοκες αστεροειδείς τοπολογίες των πολυπεπτιδίων; Εδώ αναφέρουμε ότι σε αστεροειδή άμορφων συμπολυμερών η θεωρία μέσου πεδίου (MFT) προβλέπει ελάττωση της θερμοκρασίας τάξης-αταξίας (order-disorder temperature) ως αποτέλεσμα των περιορισμών στο κέντρο του αστεριού.
- β) Σε περίπτωση που δημιουργούνται νανοφάσεις, ποιο είναι το είδος της δευτεροταγούς δομής και το μήκος εμμονής τους;
- γ) Οι α-έλικες παρουσιάζουν τη γνωστή εξαγωνική συμμετρία σε αυτήν την πολύπλοκη τοπολογία;

Ενώ το ερώτημα (α) έχει απαντηθεί στο παρελθόν για αστεροειδή συμπολυμερών με άμορφες συστάδες, τα ερωτήματα (β) και (γ) προκύπτουν αποκλειστικά εξ' αιτίας των δεσμών υδρογόνου που σταθεροποιούν τις δευτεροταγείς δομές των πεπτιδίων και των πρόσθετων επιπέδων οργάνωσης που εισάγουν. Βρέθηκε ότι η αστεροειδής τοπολογία έχει μεγάλη επίδραση στο νανοφασικό διαχωρισμό και στη δυναμική, σε σχέση με τα γραμμικά συμπολυπεπτίδια.

7.2 Αποτελέσματα

7.2.1 Υπερμοριακή οργάνωση. Οι παρατηρούμενες διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις των δευτεροταγών δομών προκύπτουν από μεταβολές των διέδρων γωνιών (Φ και Ψ), ανάλογα με την τοπική διαμόρφωση των μεμονωμένων αμινοξέων, και σχετίζεται με το είδος των δεσμών

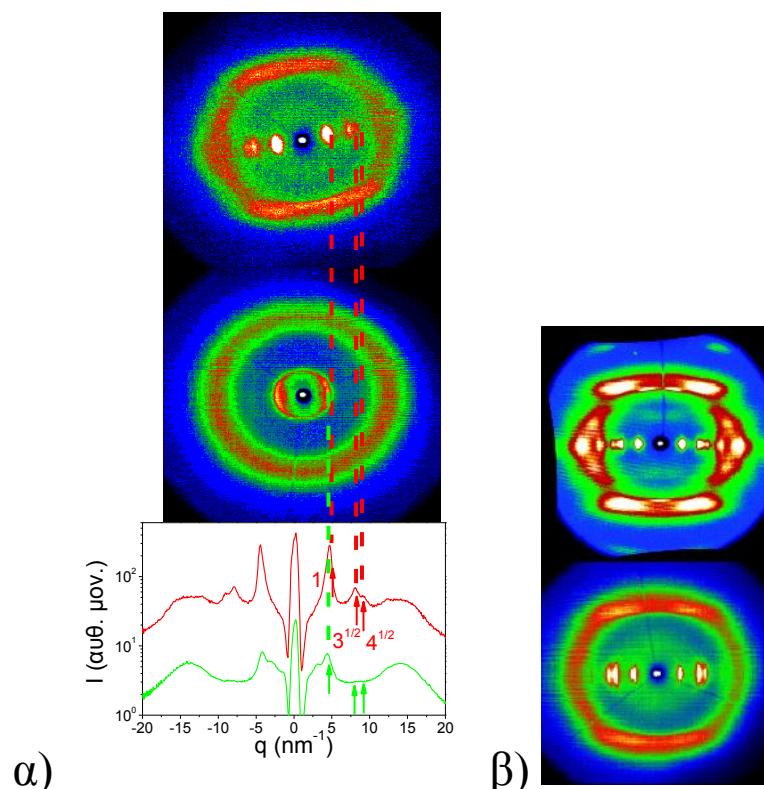
υδρογόνου (ενδο- ή διαμοριακοί). Στην Εικόνα 7.1, φαίνονται χαρακτηριστικά φάσματα NMR στερεάς κατάστασης των συμπολυπεπτιδίων ενδιάμεσου μοριακού βάρους με αρχιτεκτονική αυξανόμενης πολυπλοκότητας (ομοπολυμερές, γραμμικό συμπολυμερές, αστερί). Τα ομοπολυπεπτίδια τόσο του PBLG όσο και της PZLL έχουν την ίδια δευτεροταγή δομή (α -έλικες με 18/5 αμινοξέα ανά στροφή και βήμα έλικας 0.54 nm), πράγμα που δίνει σχεδόν πανομοιότυπα φάσματα ^{13}C για τα γραμμικά και τα αστεροειδή συμπολυπεπτίδια. Έτσι, οι έντονες κορυφές $\delta=176.083$ και 57.544 ppm προέρχονται από το C=O του αμιδίου και τον άνθρακα C_α , αντίστοιχα, που δείχνουν ότι η κυρίαρχη δευτεροταγής δομή είναι η α -έλικα. Η πιθανότητα και οι δύο κορυφές που δηλώνουν α -έλικες να προέρχονται μόνο από τη μία συστάδα (το PBLG ή την PZLL) ενώ η άλλη λαμβάνει άμορφες διαμορφώσεις αποκλείεται, διότι τότε η ευρεία κατανομή των τοπικών διαμορφώσεων στην άμορφη φάση θα προκαλούσε πολύ πλατιές κορυφές απ' ό,τι αυτές της Εικόνας 7.1.



Εικόνα 7.1. Φάσματα ^{13}C CP NMR του ομοπολυπεπτιδίου **PBLG_M** (πάνω), **Diblock_M** (μέσον), και **Star_M** (κάτω), καταγεγραμμένα στα 12 kHz με περιστροφή υπό μαγική γωνία. Οι χημικές μετατοπίσεις στα 176.083 και 57.544 ppm του C=O του αμιδίου και του C_α αντίστοιχα, δηλώνουν την παρουσία μόνο α -ελίκων.

Οι εικόνες σκέδασης ακτίνων-X από ίνες από εφελκυσμό [6] των **Diblock_H** και **Star_H**, μαζί με τις αντίστοιχες ολοκληρωμένες ισημερινές εντάσεις φαίνονται στην Εικόνα 7.2. Η εικόνα WAXS του δυσσταδικού συμπολυπεπτιδίου είναι σχεδόν ταυτόσημη με αντίστοιχες εικόνες από ίνες ομοπολυπεπτιδίων PBLG και PZLL [7,8]. Αποτελείται από μια σειρά ισχυρών ισημερινών ανακλάσεων και μερικές μεσημβρινές γραμμές. Οι ισημερινές

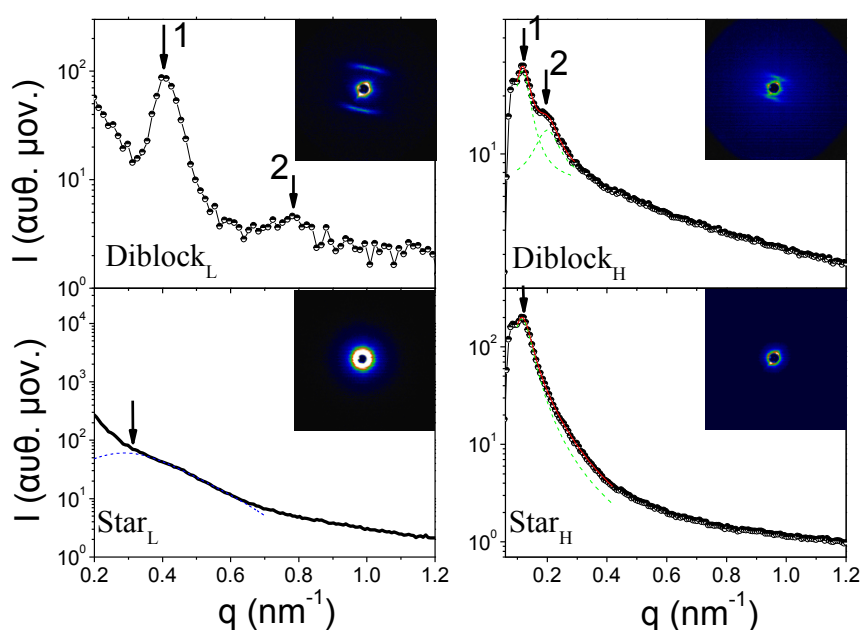
ανακλάσεις, με σχετικές θέσεις $1:3^{1/2}:4^{1/2}$ ως προς την πρώτη κορυφή q^* , αντιστοιχούν σε ανακλάσεις (10), (11), και (20), αντίστοιχα, ενός διδιάστατου εξαγωνικού πλέγματος, το οποίο αντιστοιχεί στη συναρμογή των κυλίνδρων που σχηματίζουν οι έλικες. Οι κύλινδροι περιέχουν α-έλικες τύπου 18/5, με μεταξύ τους απόσταση 1.3 nm [7,9]. Αυτή η δομή για το PBLG έχει περιγραφεί ως νηματική-παρακρυσταλλική με περιοδική τακτοποίηση των α-ελίκων στην κατεύθυνση εγκάρσια στον άξονα της αλυσίδας, ενώ κατά μήκος αυτού του άξονα οι πλευρικές ομάδες γειτονικών αλυσίδων δεν βρίσκονται απέναντι [10]. Θα πρέπει να σημειωθεί η απουσία ανακλάσεων σε $q^* \sim 3.5 \text{ nm}^{-1}$ που σχετίζεται με τη συναρμογή β-φύλλων, καθώς και την πλατιά κορυφή στα $\sim 14 \text{ nm}^{-1}$ που αντιστοιχεί στην άτακτη τακτοποίηση των πλευρικών ομάδων των PBLG και PZLL που αναφέρθηκε προηγουμένως. Αυτά τα αποτελέσματα των γραμμικών συμπολυπεπτιδίων δείχνουν το σχηματισμό α-ελίκων από PBLG και PZLL (σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του NMR) της ίδιας περιοδικότητας, που είναι τακτοποιημένες σε εξαγωνικό πλέγμα. Όμως, η εικόνα WAXS δεν μπορεί να αποδώσει το ακριβές μήκος εμμονής των τμημάτων της α-έλικας.



Εικόνα 7.2. (α) (Επάνω) Διδιάστατες εικόνες σκέδασης WAXS από προσανατολισμένες ίνες των **Diblock_H** (πάνω) και **Star_H** (κάτω), που υπέστησαν εφελκυσμό στα 328 K και μετρήθηκαν στα 373 K. Ο προσανατολισμός της ίνας είναι κατακόρυφος. (Κάτω) Οι αντίστοιχες ισμερινές εντάσεις με σημειωμένες τις θέσεις των πιο έντονων ανακλάσεων. Οι κορυφές με κυματανύσματα με σχετικές θέσεις q^* , $3^{1/2}q^*$, και $4^{1/2}q^*$ δείχνουν εξαγωνική συναρμογή των κυλίνδρων PBLG και PZLL στο **Diblock_H** και ψευδοεξαγωνική συναρμογή στο **Star_H**. (β) Για σύγκριση, παρουσιάζονται οι αντίστοιχες διδιάστατες εικόνες WAXS καθαρού PBLG (πάνω) [7] και καθαρής PZLL (κάτω) [8]. Υπάρχει ομοιότητα μεταξύ τους, διότι οι έλικες που σχηματίζουν είναι του ίδιου τύπου.

Οι διδιάστατες εικόνες WAXS του αντίστοιχου αστεριού, **Star_H**, είναι σημαντικά διαφορετικές. Αν και η θέση της κύριας ισημερινής ανάκλασης είναι πρακτικά αμετακίνητη ($q^* \sim 4.8 \text{ nm}^{-1}$), που δείχνει την παρουσία α-ελίκων στα αστέρια – σε συμφωνία με το NMR, οι ανακλάσεις είναι τώρα πιο πλατιές. Αυτό υποδηλώνει ότι η συναρμογή των α-ελίκων έχει διαταραχτεί. Το αν αυτό είναι αποτέλεσμα μερικής ανάμιξης των δύο συστάδων, ως αποτέλεσμα των επιπλέον χωρικών περιορισμών που υπεισέρχονται, ή λόγω μειωμένου μήκους εμμονής των ελίκων με επιπτώσεις στη συναρμογή, δεν μπορεί να αποσαφηνιστεί αποκλειστικά και μόνο από το WAXS. Για να διερευνηθούν οι δύο αυτές πιθανότητες, χρησιμοποιήθηκαν SAXS και ΔΦ, αντίστοιχα.

Η σκέδαση ακτίνων-X σε μικρές γωνίες μπορεί να υποδείξει αποτελεσματικά την παρουσία νανοφασικού διαχωρισμού και την ακριβή μορφολογία των νανοπεριοχών. Θα πρέπει βεβαίως να λάβουμε υπόψη ότι οι δύο συστάδες έχουν παραπλήσια ηλεκτρονιακή πυκνότητα, και επομένως δεν αναμένεται να υπάρχει μεγάλη αντίθεση στις εικόνες SAXS. Οι διδιάστατες εικόνες και οι αντίστοιχες ολοκληρωμένες μεσημβρινές εντάσεις συγκρίνονται στην Εικόνα 7.3 για τα συμπολυπεπτίδια μικρού (L) και μεγάλου (H) μοριακού βάρους.



Εικόνα 7.3. Καμπύλες SAXS των **Diblock_L** (πάνω αριστερά), **Star_L** (κάτω αριστερά), **Diblock_H** (πάνω δεξιά), και **Star_H** (κάτω δεξιά). Οι διδιάστατες εικόνες και οι αντίστοιχες ολοκληρωμένες εντάσεις των δισυσταδικών συμπολυπεπτιδίων δείχνουν το σχηματισμό φυλλοειδούς μικροδομής (τα βέλη βρίσκονται σε σχετικές θέσεις 1:2 ως προς την κύρια κορυφή). Η μοναδική ανάκλαση στο **Star_L** δείχνει ανάμιξη φάσεων, ενώ στο αστέρι με μεγαλύτερο μοριακό βάρος (**Star_H**) υπάρχει ασθενής μικροφασικός διαχωρισμός, αλλά όχι εκτεταμένος.

Σε όλα τα γραμμικά συμπολυπεπτιδία βρέθηκε μια φυλλοειδής δομή (ανακλάσεις στις θέσεις $1q^*$, $2q^*$), αποτελούμενη από περιοχές PBLG και PZLL. Η χαρακτηριστική απόσταση, d , που αντιστοιχεί στην πρώτη ισχυρή μεσημβρινή ανάκλαση είναι 15.7 στο **Diblock_L** και 57.1 στο **Diblock_H**. Όπως αναμένεται, το d αυξάνεται με το μοριακό βάρος, όμως λόγω της ασύμμετρης σύστασης των συμπολυπεπτιδίων δεν είναι δυνατή μια απ' ευθείας σύγκριση με τη θεωρητική πρόβλεψη [11,12] για συμμετρικά άμορφα-άμορφα (coil-coil) συμπολυμερή ($d \sim N^{1/2}$ ή $d \sim N^{2/3}$, όπου N είναι ο συνολικός βαθμός πολυμερισμού, στο όριο ασθενούς και ισχυρού διαχωρισμού (WSL και SSL), αντίστοιχα). Από την άλλη πλευρά, η θεωρία μέσου πεδίου [13] επιτρέπει μια εκτίμηση της διάταξης των ελίκων που παρουσιάζουν εξαγωνική διάταξη μέσα στη φυλλοειδή μικροδομή. Ο γεωμετρικός παράγοντας γ ($= (8 \times 10^{21}) / \pi N_A M_n / \rho d d_H^2$) μπορεί να υπολογιστεί διαιρώντας το μοριακό όγκο V με τη μέση εγκάρσια έκταση της αλυσίδας ($d/2$, όπου d είναι η απόσταση μεταξύ των φυλλοειδών περιοχών) και με τη διατομή της έλικας ($\pi d_H^2 / 4$, όπου d_H είναι η απόσταση μεταξύ ελίκων). Οι οριακές τιμές 1 και 2 αντιστοιχούν σε έλικες διαχωρισμένες ή συμπλεγμένες η μία με την άλλη, αντίστοιχα. Για τα **Diblock_L** και **Diblock_H** το γ βρέθηκε ίσο με 1.36 και 1.59, αντίστοιχα, που δείχνει μερική συμπλοκή (interdigitation) των ελίκων. Τα αποτελέσματα SAXS για το d μπορούν να συγκριθούν με τις αντίστοιχες αποστάσεις που υπολογίζονται για δομή τέλειων α-ελίκων (με μήκος κατά τον άξονα της έλικας ίσο με 0.15 nm ανά μονομερές). Οι τιμές συνοψίζονται στον Πίνακα 7.1. Η σύγκριση των d_{PBLG} και d_{PZLL} με το μήκος των πλήρως εκτεταμένων ελίκων δείχνει συμπλοκή των συστάδων PZLL, ειδικά για το γραμμικό συμπολυπεπτιδίο με το μικρότερο μοριακό βάρος.

Πίνακας 7.1. Μήκη ελίκων των συστάδων των γραμμικών και αστεροειδών συμπολυπεπτιδίων.

δείγμα	d^{total} (nm) ^a	d_{PBLG} (nm) ^b	$I_{\text{ext helix}}^{\text{PBLG}}$ (nm) ^γ	d_{PZLL} (nm) ^δ	$I_{\text{ext helix}}^{\text{PZLL}}$ (nm) ^δ
Diblock _L	15.7	11.5	13.1	4.2	7.2
Diblock _M	53.7	34.4	27.1	19.3	23.2
Diblock _H	53.7	32.2	24.3	21.5	23.9

$$^a d^{\text{total}} = \frac{2\pi}{q^*}$$

$$^b d_{\text{PBLG}} = d^{\text{total}} f_{\text{PBLG}}$$

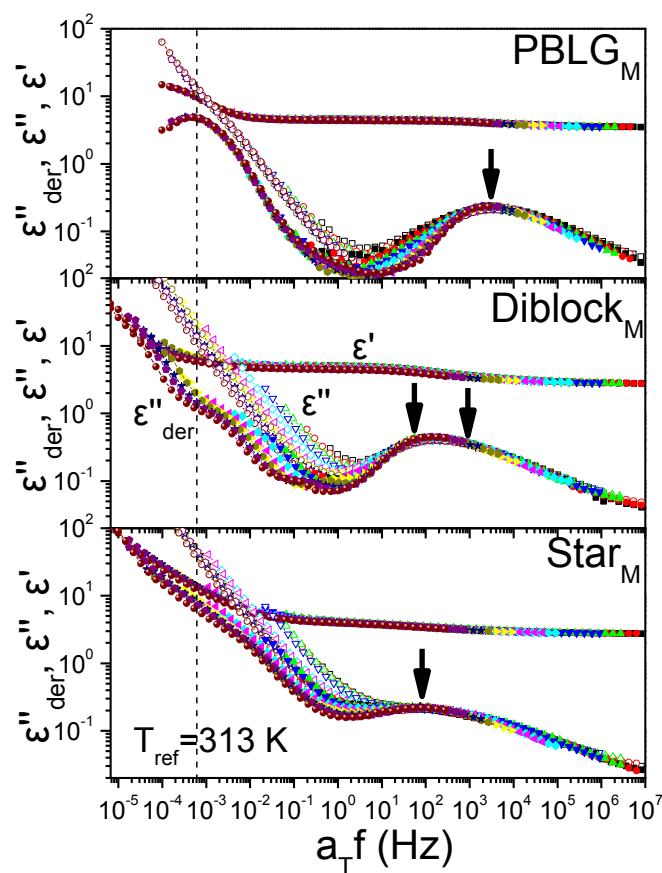
$$^γ I_{\text{ext helix}} = 0.15 N_n$$

$$^δ d_{\text{PZLL}} = d^{\text{total}} - d_{\text{PBLG}}$$

Οι καμπύλες SAXS στα αντίστοιχα αστέρια είναι εντελώς διαφορετικές ως προς τα γραμμικά συμπολυπεπτιδία (Εικόνα 7.3). Παρατηρείται μία μοναδική πλατιά ανάκλαση

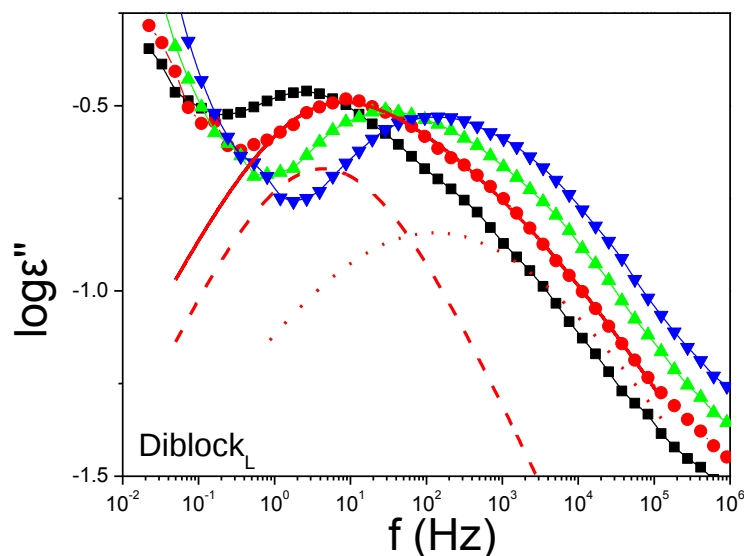
(λόγω correlation hole scattering) στο **Star_L**, η οποία υποδηλώνει ανάμιξη φάσεων των τμημάτων PBLG και PZLL, ενώ μια κάποια ανάκλαση ανώτερης τάξης διακρίνεται στην περίπτωση του **Star_H**. Η ανάμιξη των φάσεων αφήνει τη δευτεροταγή δομή ανεπηρέαστη (α-έλικες όπως βρέθηκε από το NMR και το WAXS). Παρόλα αυτά, το εξαγωνικό πλέγμα συναρμογής των ελίκων είναι παραμορφωμένο στα αστερία, όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα WAXS (Εικόνα 7.2). Αυτή η επίδραση της ανάμιξης φάσεων σε αστεροειδή συμπολυμερή είναι γνωστή για άμορφα-άμορφα συμπολυμερή [12,14]. Για παράδειγμα, ισχύει $(\chi N)_{ODT, \text{αστέρι}} > (\chi N)_{ODT, \text{δισυσταδικό}}$, όπου $(\chi N)_{ODT}$ είναι η κρίσιμη τιμή του χN για τη σταθερότητα της κατάστασης αταξίας, χ η παράμετρος αλληλεπίδρασης Flory-Huggins, και N είναι ο συνολικός βαθμός πολυμερισμού [14]. Αυτό σημαίνει πως ένα τήγμα αστεριών θα παραμείνει στην ομογενή φάση σε θερμοκρασίες τόσο χαμηλές στις οποίες ένα τήγμα γραμμικών συμπολυμερών έχει ήδη υποστεί νανοφασικό διαχωρισμό. Σύμφωνα με τη θεωρία μέσου πεδίου [15], αναμένεται ελάττωση της εντροπίας μετάβασης στην περίπτωση των αστεριών, λόγω των περιορισμών του δεσμού. Η ολική εντροπία μετάβασης ανά μόριο αστεριού $(AB)_n$ είναι ανάλογη προς το $\Delta S_0 - [(n-1)/n]\ln(1/f)$, όπου το ΔS_0 αντιστοιχεί στη μεταβολή της εντροπίας μετάβασης στην περίπτωση του δισυσταδικού συμπολυμερούς. Καθώς το (χN_0) μπορεί να θεωρηθεί ανάλογο προς την εντροπία μετάβασης, αναμένεται ότι η γραμμή ευστάθειας (spinodal) θα είναι χαμηλότερα από ότι ενός δισυσταδικού συμπολυμερούς (το N_0 είναι ο βαθμός πολυμερισμού του δισυσταδικού συμπολυμερούς). Έτσι, ακόμα και για $f=1/2$, το $(\chi N_0)_s$ των αστεριών $(AB)_n$ θα είναι μικρότερο από ότι ενός δισυσταδικού AB. Για παράδειγμα, για $f=0.5$, το (χN_0) ισούται με 10.5, 8.86, και 7.07 για $n=1, 2$, και 4, αντίστοιχα. Επιπλέον, οι καμπύλες ευστάθειας αναμένεται να είναι περισσότερο συμμετρικές σε σχέση με τα αντίστοιχα δισυσταδικά. Παρότι η διαπίστωση ύπαρξης ανάμιξης φάσεων στα αστεροειδή συμπολυπεπτίδια που μελετάμε εδώ συμφωνεί με αυτές τις προβλέψεις, αποκλείεται μια πιο ποσοτική σύγκριση λόγω της εσωτερικής δομής των α-ελίκων των πολυπεπτιδίων.

7.2.2 Μοριακή δυναμική. Τα νανοφασικά διαχωρισμένα δισυσταδικά συμπολυπεπτίδια εμφανίζουν μία και μόνο θερμοκρασία υάλου στη $\Delta\Theta_S$. Αυτό είναι αναμενόμενο, έχοντας υπόψη το παραπλήσιο T_g των αντίστοιχων συστάδων (286 K [7] και 297 K [16] για το PBLG και την PZLL μεγάλου μοριακών βαρών, αντίστοιχα). Τα θερμογράφηματα $\Delta\Theta_S$ των αστεριών είναι πλατύτερα, υποδηλώνοντας ανάμιξη φάσεων. Λόγω της ανεπάρκειας της $\Delta\Theta_S$ να διακρίνει τις δύο θερμοκρασίες υαλώδους μετάβασης, απαιτείται μια πιο λεπτομερής εξέταση της τοπικής δυναμικής με διηλεκτρική φασματοσκοπία.



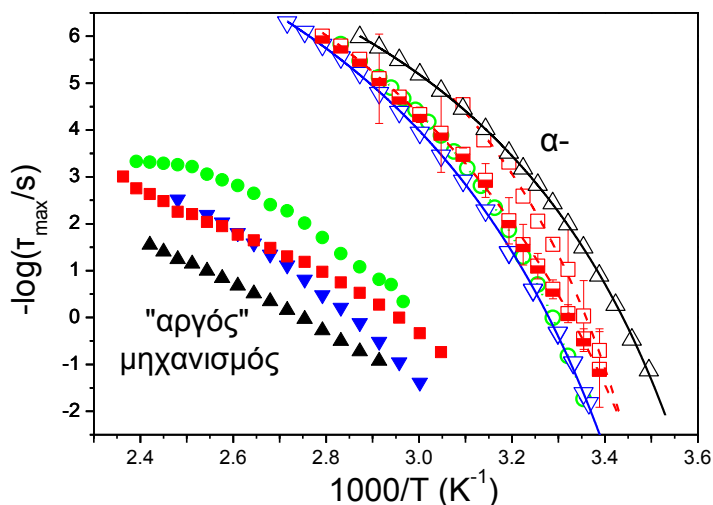
Εικόνα 7.4. Υπερθέσεις του πραγματικού (γεμάτα σύμβολα) και του φανταστικού μέρους (ανοικτά σύμβολα) της σύνθετης διηλεκτρικής διαπερατότητας, ϵ^* , του ομοπολυπεπτιδίου **PBLG_M**, του κλάδου **Diblock_M**, και του αντίστοιχου αστεριού **Star_M**, ως προς την ίδια θερμοκρασία αναφοράς (313 K). Τα δεδομένα αντιστοιχούν στην περιοχή 304 – 348 K, με βήματα των 4 K. Τα βέλη δείχνουν τη θέση των α-μηχανισμών, και οι διακεκομμένες γραμμές τη θέση του “αργού” μηχανισμού στο **PBLG_M** (καλύτερα ορατός στην παράγωγο του ϵ') ο οποίος σχετίζεται με τη χαλάρωση της δευτεροταγούς δομής.

Στην Εικόνα 7.4 φαίνονται υπερθέσεις του πραγματικού και του φανταστικού μέρους της διηλεκτρικής διαπερατότητας, ϵ^* , για το **PBLG_M**, το **Diblock_M**, και το **Star_M**, ως προς την ίδια θερμοκρασία αναφοράς. Το μέγιστο σε υψηλές συχνότητες αντιστοιχεί στον τμηματικό μηχανισμό, ενώ σε χαμηλότερες συχνότητες / υψηλότερες θερμοκρασίες ανιχνεύεται ο “αργός” μηχανισμός και η ιοντική αγωγιμότητα. Όπως έχουμε αναφέρει πιο πριν, αυτά τα δύο μπορούν να προσδιοριστούν με τη μέθοδο της παραγώγου του ϵ' και την τομή του πραγματικού και του φανταστικού μέρους των φασμάτων, αντίστοιχα. Υπάρχουν ορισμένες χαρακτηριστικές διαφορές ανάμεσα στις τρεις τοπολογίες: ο α-μηχανισμός, ο οποίος φαίνεται καλά στο **PBLG_M**, μετακινείται σε χαμηλότερες συχνότητες στο **Star_M**, ενώ στο **Diblock_I** ανιχνεύονται δύο μηχανισμοί τμηματικής χαλάρωσης (Εικόνα 7.5). Επιπλέον, ο πιο αργός μηχανισμός, που σχετίζεται με τη χαλάρωση τμημάτων της α-ελικοειδούς δευτεροταγούς δομής, μετακινείται σε υψηλότερες συχνότητες στο **Star_M**.



Εικόνα 7.5. Παράδειγμα προσαρμογής δύο συναρτήσεων Havriliak-Negami (εξίσωση 4.41) σε φάσμα διηλεκτρικών απωλειών του συμπολυπεπτιδίου **Diblock_L**, που αντιστοιχούν σε δύο μηχανισμούς τμηματικής χαλάρωσης. Φαίνονται τέσσερα φάσματα, τεσσάρων θερμοκρασιών: 304 K (τετράγωνα), 307 K (κύκλοι), 310 K (πάνω τρίγωνα), και 313 K (κάτω τρίγωνα). Οι διακεκομμένη και η εστιγμένη γραμμή αντιπροσωπεύουν την τμηματική χαλάρωση του PBLG και της PZLL, αντίστοιχα, ενώ η συνεχής καμπύλη είναι το άθροισμα των δύο μηχανισμών στα 307 K.

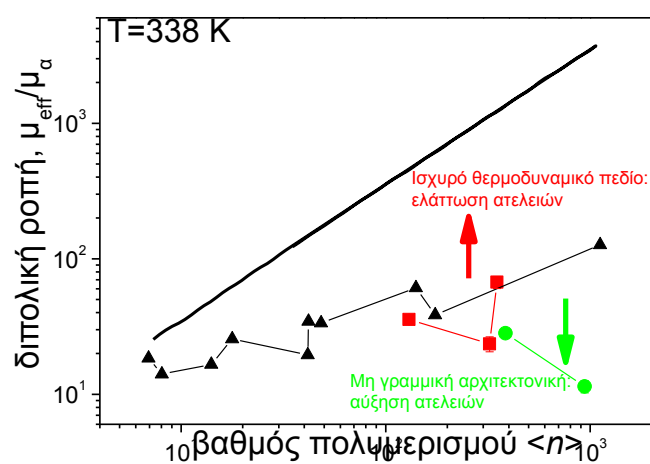
Παρά την πολύ μικρή διαφορά στο T_g των ομοπολυπεπτιδίων PBLG και PZLL, φαίνονται δύο μηχανισμοί τμηματικής χαλάρωσης στο δυσυσταδικό συμπολυμερές, που αντιστοιχούν στην PZLL (χαμηλότερες συχνότητες) και στο PBLG (υψηλότερες συχνότητες). Στην Εικόνα 7.5 παρουσιάζονται μερικές χαρακτηριστικές καμπύλες διηλεκτρικών απωλειών του **Diblock_M**, όπου έχει γίνει προσαρμογή με την εξίσωση 4.41 για δύο μηχανισμούς. Η παράμετρος m , για τον α-μηχανισμό της PZLL και του PBLG είναι ~ 0.24 και ~ 0.45 , αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές είναι κοντά στις αντίστοιχες των καθαρών συστατικών (0.2 και 0.42 στα αντίστοιχα T_g [16]). Στην περίπτωση του **Star_M** η αποσύζευξη των δύο μεγίστων κάτω από την πλατιά κορυφή δεν ήταν δυνατή, και γι' αυτό έγινε προσαρμογή με μία εξίσωση HN.



Εικόνα 7.6. Διάγραμμα Arrhenius της τμηματικής (ανοικτά σύμβολα), και της συνολικής (κλειστά σύμβολα) δυναμικής (χαλάρωση ατελειών της α-έλικας). **PBLG_M** (πάνω τρίγωνα), **PZLL** (κάτω τρίγωνα), **Diblock_M** (τετράγωνα), και **Star_M** (κύκλοι). Οι γραμμές είναι αντιπροσωπευτικές προσαρμογές της εξίσωσης VFT στον τμηματικό μηχανισμό. Στο **Diblock_M** υπάρχουν δύο μηχανισμοί τμηματικής χαλάρωσης, ένας που αντιστοιχεί στο PBLG (ανοικτά τετράγωνα) και ένας στην PZLL (μισογεμάτα τετράγωνα). Στο **Star_M** (ανοικτά τετράγωνα), ο μοναδικός μηχανισμός χαλάρωσης βρίσκεται εγγύτερα στην καθαρή PZLL.

Οι χρόνοι χαλάρωσης που σχετίζονται με το μηχανισμό τμηματικής χαλάρωσης και τον “αργό” μηχανισμό παρουσιάζονται στο διάγραμμα Arrhenius, στην Εικόνα 7.6. Σε αυτήν την Εικόνα συμπεριλαμβάνονται και οι χρόνοι των ομοπολυπεπτιδίων PBLG και PZLL [16]. Οι χρόνοι τμηματικής χαλάρωσης εμφανίζουν τη συνήθη θερμοκρασιακή εξάρτηση τύπου VFT (εξίσωση 3.4). Οι τοπικοί Arrhenius μηχανισμοί που παρατηρούνται στην ύαλο ($T < T_g$) του PBLG και της PZLL παραλείπονται εδώ χάριν απλότητας. Η Εικόνα 7.6 δείχνει δύο τμηματικούς μηχανισμούς στο **Diblock_M**, που αντιστοιχούν στη χαλάρωση των συστάδων PBLG και PZLL. Η εμφάνιση δύο ξεχωριστών δυναμικών στα δυσσταδικά συμπολυμερή δεν αποδεικνύει, *per se*, διαχωρισμό φάσεων, καθώς είναι γνωστό ότι ακόμα και αναμεμιγμένα τμήματα εμφανίζουν ξεχωριστές δυναμικές (θεωρία Lodge-McLeish για συμβατά μίγματα πολυμερών και συμπολυμερών) [17,18]. Επομένως, για το διαχωρισμό φάσεων χρησιμοποιούμε ως οδηγό τα αποτελέσματα του SAXS, τα οποία έδειξαν νανοφασικό διαχωρισμό στην περίπτωση των δυσσταδικών και μερική ανάμιξη στη περίπτωση των αστεριών. Στο **Star_M**, ο μοναδικός μηχανισμός τμηματικής χαλάρωσης δείχνει το πλησίασμα των δύο τμηματικών μηχανισμών. Σε αυτήν την τελευταία περίπτωση, η δυναμική ελέγχεται από την πιο “αργή” συστάδα (PZLL), που βρίσκεται στο κέντρο του αστεριού.

Η δυναμική του “αργού” μηχανισμού που ανιχνεύεται με $\Delta\Phi$ συμπεριλαμβάνεται επίσης στην Εικόνα 7.6. Όπως έχει αναφερθεί στα εισαγωγικά κεφάλαια, αυτός ο μηχανισμός σχετίζεται με τη χαλάρωση των α -ελίκων της δευτεροταγούς δομής. Η ανάλυση της διηλεκτρικής έντασης ($\Delta\epsilon$) αυτού του μηχανισμού επιτρέπει μια ποσοτική εκτίμηση της διαφοράς του μήκους εμμονής της έλικας στα δυσσταδικά συμπολυπεπτιδία και στα αστέρια [7,19-21]. Οι τιμές της κανονικοποιημένης ενεργούς διπολικής ροπής (εξίσωση 3.6) φαίνονται στην Εικόνα 7.7.

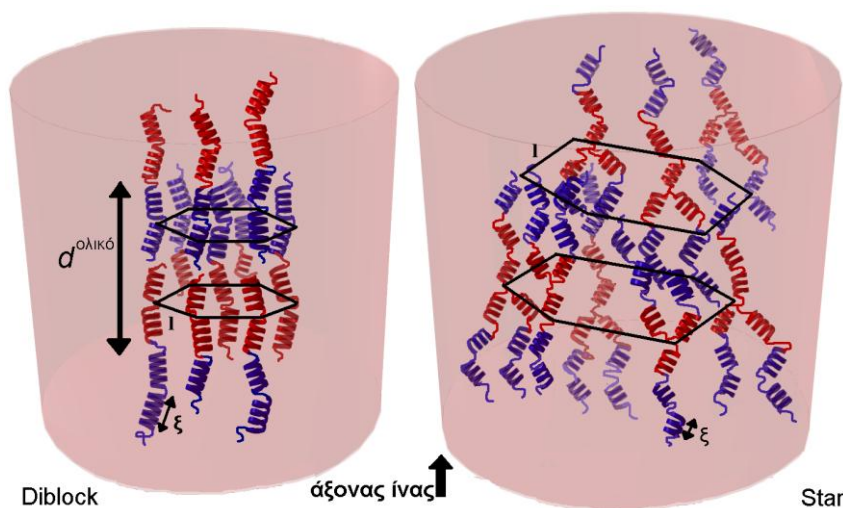


Εικόνα 7.7. Ο λόγος της ενεργούς διπολικής ροπής του “αργού” προς τον α - μηχανισμό των δυσσταδικών συμπολυπεπτιδίων (τετράγωνα) και των αστεριών (κύκλοι). Ο “αργός” μηχανισμός σχετίζεται με τη χαλάρωση της α -ελικοειδούς δευτεροταγούς δομής. Η συνεχής γραμμή είναι η θεωρητικά αναμενόμενη διπολική ροπή μιας ιδανικής α -έλικας (3.4 D/μονομερές) και τα τρίγωνα αντιστοιχούν στην ενεργό διπολική ροπή μιας σειράς ομοπολυπεπτιδίων PBLG [7]. Οι σημαντικά χαμηλότερες τιμές από τις θεωρητικές υποδηλώνουν ότι οι έλικες του PBLG και της PZLL στα δυσσταδικά έχουν ατέλειες, οι οποίες μάλιστα είναι πολλαπλάσιες στα αστέρια.

Ο λόγος της ενεργούς διπολικής ροπής μ του “αργού” μηχανισμού, κανονικοποιημένης ως προς το μ του α -, συγκρίνεται στην Εικόνα 7.7 με τις αντίστοιχες διπολικές ροπές μιας υποθετικής τέλειας έλικας PBLG [7] (συνεχής γραμμή). Οι τιμές που βρέθηκαν για τα δυσσταδικά συμπολυπεπτιδία, και ειδικά για τα αστέρια, είναι πολύ μικρότερες, κάτι που σημαίνει ότι οι έλικες περιέχουν σπασίματα και δεν μοιάζουν με ιδανικές άκαμπτες ράβδους. Το εκτιμώμενο μήκος εμμονής, ξ , για ομοπολυπεπτιδία PBLG και PZLL είναι περίπου 2 nm [8]. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση των δυσσταδικών συμπολυμερών η ενεργός διπολική ροπή είναι παραπλήσια με εκείνη των ομοπολυπεπτιδίων PBLG (τρίγωνα στην Εικόνα 7.7), αλλά στα αστέρια είναι ακόμα μικρότερη. Αυτό το εύρημα συμφωνεί με την επιτάχυνση του “αργού” μηχανισμού στις μετρήσεις $\Delta\Phi$ στα αστέρια.

7.3 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της μελέτης της δομής (NMR, SAXS, WAXS) και της δυναμικής (DS) των δισυσταδικών συμπολυπεπτιδίων και των αστεριών παρουσιάζονται με σχηματικό τρόπο στην Εικόνα 7.8. Αυτή η “δυναμική” εικόνα δείχνει την επίδραση της τοπολογίας στην αυτοοργάνωση των συμπολυπεπτιδίων, που με τη σειρά της επιδρά στη δυναμική του συστήματος. Στα δισυσταδικά συμπολυπεπτίδια βρέθηκε μια φυλλοειδής μορφολογία (SAXS) αποτελούμενη από περιοχές PBLG και PZLL, που και οι δύο σχηματίζουν α-έλικες (NMR, WAXS) οι οποίες είναι εξαγωνικά τακτοποιημένες (WAXS). Μεταξύ των τμημάτων των α-ελίκων παρεμβάλλονται άμορφα τμήματα που χαλαρώνουν μέσω της τμηματικής χαλάρωσης ($\Delta\Phi$). Βρέθηκαν δύο τμηματικοί μηχανισμοί στα δισυσταδικά συμπολυπεπτίδια, περιλαμβάνοντας τους δύο ρυθμούς χαλάρωσης που αντιστοιχούν στα άμορφα τμήματα της PZLL και του PBLG. Η αστεροειδής τοπολογία έχει ως αποτέλεσμα την ανάμιξη των συστάδων PBLG και PZLL (SAXS). Παρόλα αυτά, και τα δύο πολυπεπτίδια σχηματίζουν α-έλικες στα αστέρια (NMR, WAXS), αν και με μικρότερο μήκος εμμονής, ξ ($\Delta\Phi$), οι οποίες τακτοποιούνται σε ψευδοεξαγωνικό πλέγμα (WAXS). Τα παραπάνω αποτελέσματα για τα αστέρια έχουν ορισμένες ομοιότητες με τα διαγράμματα ισορροπίας φάσεων άμορφων (coil-coil) συσταδικών συμπολυμερών αστεριών. Όμως μια ποσοτική σύγκριση των διαγραμμάτων φάσεως προϋποθέτει τη διατύπωση μιας θεωρίας μέσου πεδίου που να λαμβάνει υπόψη την εσωτερική δομή των πολυπεπτιδίων, η οποία ίσως επηρεάζει την καμπυλότητα της ενδοεπιφάνειας.



Εικόνα 7.8. Σχηματική αναπαράσταση της αυτοοργάνωσης στο **Diblock_L** (αριστερά) και στο **Star_L** (δεξιά), βασισμένη στα πειραματικά αποτελέσματα. Στο δισυσταδικό συμπολυπεπτίδιο υπάρχει φυλλοειδής μικροδομή με πάχος $d^{\text{ολικό}}$ (SAXS), η οποία αποτελείται από περιοχές PBLG και PZLL που έχουν και οι δύο α-έλικες (NMR, WAXS) εξαγωνικά τακτοποιημένες (WAXS). Στο αστέρι, υπάρχει ανάμιξη μεταξύ των περιοχών PBLG και PZLL (SAXS). Παρόλα αυτά, και οι δύο περιοχές σχηματίζουν ξανά α-έλικες (NMR, WAXS), αλλά με μικρότερο μήκος εμμονής, ξ ($\Delta\Phi$), που είναι τακτοποιημένες σε ψευδοεξαγωνικό πλέγμα (WAXS).

Η μελέτη έδειξε ότι υπάρχει ισχυρή επίδραση της τοπολογίας των αλυσίδων στην αναμιξιμότητα των συμπολυπεπτιδίων, στο μήκος εμμονής των α -ελίκων, και στη μοριακή δυναμική. Αν και το είδος της δευτεροταγούς δομής δεν αλλάζει στα αστέρια, το μειωμένο μήκος εμμονής ίσως επηρεάζει τις θέσεις σύζευξης, και ως εκ τούτου θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στο σχεδιασμό περίπλοκων αρχιτεκτονικών για συστήματα στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων. Τέλος, η αυξημένη συμβατότητα στα αστέρια σε σχέση με τα δυσσταδικά, τα καθιστά υποψήφια για βελτίωση της αναμιξιμότητας σε μίγματα γραμμικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων.

7.4 Αναφορές

- (1) Koynov, K.; Mihov, G.; Mondeshki, M.; Moon, C.; Spiess, H. W.; Müllen, K.; Butt, H.-J.; Floudas, G. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 1745.
- (2) Mondeshki, M.; Mihov, G.; Graf, R.; Spiess, H. W.; Müllen, K.; Papadopoulos, P.; Gitsas, A.; Floudas, G. *Macromolecules* **2006**, 39, 9605.
- (3) Kim, K. T.; Winnik, M. A.; Manners, I. *Soft Matter* **2006**, 2, 957.
- (4) Aliferis, T. Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *J. Polym. Sci., Polym. Chem.* **2005**, 43, 4670.
- (5) Gitsas, A.; Floudas, G.; Mondeshki, M.; Butt, H.-J.; Spiess, H. W.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *Biomacromolecules* **2008**, 9, 1959.
- (6) Fischbach, I.; Pakula, T.; Minkin, P., Fechtenkötter, A.; Müllen, K.; Spiess, H. W.; Saalwächter, K. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 6408.
- (7) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Klok, H.-A.; Schnell, I.; Pakula, T. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 81.
- (8) Papadopoulos, P.; Floudas, G. *Dielectrics Newsletter* **2005**, Issue Nov.
- (9) Floudas, G.; Papadopoulos, P.; Klok, H.-A.; Vandermeulen, G. W. M.; Rodriguez-Hernandez, J. *Macromolecules* **2003**, 36, 3673.
- (10) Watanabe, J.; Kazumichi, I.; Gehani, R.; Uematsu, I. *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* **1981**, 19, 653.
- (11) Semenov, A. N. *Soviet Phys. JETP* **1985**, 61, 733.
- (12) Hadjichristidis, N.; Pispas, S.; Floudas, G in “*Block Copolymers. Synthetic strategies, physical properties and applications*”, J. Wiley & Sons Inc., New York, 2002.
- (13) Douy, A.; Gallot, B. *Polymer* **1982**, 23, 1039.
- (14) Floudas, G.; Pispas, S.; Hadjichristidis, N.; Pakula, T.; Erukhimovich, I. *Macromolecules* **1996**, 29, 4142.
- (15) de la Cruz, O. M.; Sanchez, I. C. *Macromolecules* **1986**, 19, 2501.

- (16) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Klok, H.-A.; Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 224906.
- (17) Lodge, T. P.; McLeish, T. C. B. *Macromolecules* **2000**, *33*, 5278.
- (18) Lodge, T. P.; Wood, E. R.; Haley, J. C. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **2006**, *44*, 756.
- (19) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2352.
- (20) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Lieberwirth, I.; Nguyen, T. Q.; Klok, H.-A. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 618.
- (21) Gitsas, A.; Floudas, G.; Dietz, M.; Mondeshki, M.; Spiess, H. W.; Wegner, G. *Macromolecules*, **2007**, *40*, 8311.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Δενδριμερή πολυφαινυλενίων με προσαρτημένα πεπτίδια

8.1 Εισαγωγή

Μία πιο τις πιο σύνθετες μοριακές αρχιτεκτονικές είναι τα δενδριμερή. Οι διακριτές αλληλεπιδράσεις (i) μεταξύ των πυρήνων των δενδριμερών, και (ii) μεταξύ των πεπτιδίων στην περιφέρειά τους χρησιμοποιούνται για να ελέγξουν την πεπτιδική οργάνωση. Καθώς τέτοια συστήματα είναι δημοφιλή σε βιολογικές εφαρμογές όπως είδαμε στην παράγραφο 2.9 έχει μεγάλη σημασία η ικανότητα ελέγχου της οργάνωσης των προσαρτημένων πεπτιδίων, ώστε να αλληλεπιδρούν με τους ιστούς με τον επιθυμητό τρόπο. Τα δενδριμερή που βασίζονται σε πολυ-L-λυσίνες έχουν συγκεντρώσει το ενδιαφέρον ως προς τη δυνατότητα ανάπτυξης multiple antigen peptides (MAP) και μη ιογενών συστημάτων μεταφοράς γονιδίων [1,2]. Ένα ενδιαφέρον αποτέλεσμα στη μελέτη των δενδριμερών πολυμερών βασισμένα σε κύρια αλυσίδα πολυ-L-λυσίνων με προσαρτημένους δενδρώνες πολυεστέρα ήταν η παρατήρηση μιας μετάβασης από μια συμπαγή αλυσίδα τύπου α-έλικας σε μια διαταραγμένη και εκτεταμένη διαμόρφωση κατά την αύξηση του μεγέθους των δενδρόνων [3]. Η στερεοχημική άπωση μεταξύ των δενδρόνων θεωρήθηκε υπεύθυνη για την παρατήρηση της μετάβασης της διαμόρφωσης από έλικα σε άμορφη (helix-to-coil).

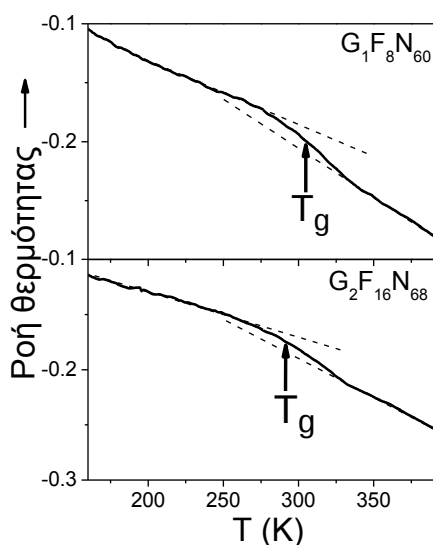
Μια πρόσφατη εξέλιξη σε αυτήν την κατεύθυνση ήταν η ανάπτυξη συνθετικών μεθόδων που οδηγούν σε προσάρτηση πεπτιδίων σε δενδριμερή πολυφαινυλενίων [4,5]. Αυτά τα μόρια είναι μονοδιάσπαρτα και διατηρούν το σχήμα τους, και επιπλέον έχουν τοπολογικά απομονωμένες, μη αλληλεπιδρώσες λειτουργικές ομάδες, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως βάσεις για τη σύνδεση πολυ-L-λυσίνων. Τα νανοδομημένα υλικά που προκύπτουν αποτελούνται από έναν σαφώς καθορισμένο πυρήνα και ένα “χαλαρό” περίβλημα. Ακόμη, τα δενδριμερή πολυφαινυλενίων με φθορίζοντα πυρήνα περιλενιοδιμιδίου, σαν αυτά που χρησιμοποιούνται σε αυτήν την εργασία, παρέχουν τη δυνατότητα οπτικής ανίχνευσης των δενδριτικών συστημάτων. Σε μια προηγούμενη μελέτη αυτών των συστημάτων σε διάλυμα [6], βρέθηκε ότι η υδροδυναμική ακτίνα αυξάνεται απότομα όταν το μήκος των πολυπεπτιδίων γίνει αρκετό ώστε να σχηματίζονται α-έλικες.

Στο Κεφάλαιο αυτό [7] εξετάζουμε μια σειρά δενδριμερών πολυφαινυλενίων με προσαρτημένα πεπτίδια (functionalized polyphenylene dendrimers, PPD) σε τήγμα [5] με διαφορετικά μεγέθη πυρήνα, πλήθος υποκατεστημένων θέσεων, και βαθμό πολυμερισμού των πεπτιδίων (του τύπου $G_nF_nN_n$, όπου G, F, N αντιστοιχούν στη γενιά, το πλήθος των

υποκατεστημένων θέσεων, και το βαθμό πολυμερισμού, αντίστοιχα, με τιμές: $1 \leq g \leq 2$, $4 \leq f \leq 16$, και $9 \leq n \leq 84$ (βλ. κεφ. 4, Πίνακας και Εικόνα 4.4). Στο πλαίσιο αυτής της μελέτης παρατηρήθηκε, για πρώτη φορά, μια χαρακτηριστική εξάρτηση της αυτοοργάνωσης των συστημάτων από το μήκος των πολυπεπτιδίων, ανεξάρτητα από τη γενιά του πυρήνα. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με αντίστοιχες γραμμικές αλυσίδες πολυ-L-λυσίνης (**PLys₂₀** και **PLys₅₉**). Με χρήση σκέδασης ακτίνων-X και NMR στερεάς κατάστασης, δείχνουμε ότι οι πολυ-L-λυσίνες μπορούν να σχηματίσουν διαφορετική δευτεροταγή δομή όταν προσαρτώνται σε πυρήνες πολυφαινυλενίων, από ότι τα αντίστοιχα γραμμικά. Επιπλέον, συνδυάζοντας τεχνικές διηλεκτρικής φασματοσκοπίας και τοπικού NMR στερεάς κατάστασης, εξετάζουμε τη δυναμική των πολυπεπτιδίων και του πυρήνα και βρίσκουμε τις περιοχές κίνησης και τον αντίστοιχο δυναμικό παράγοντα δομής.

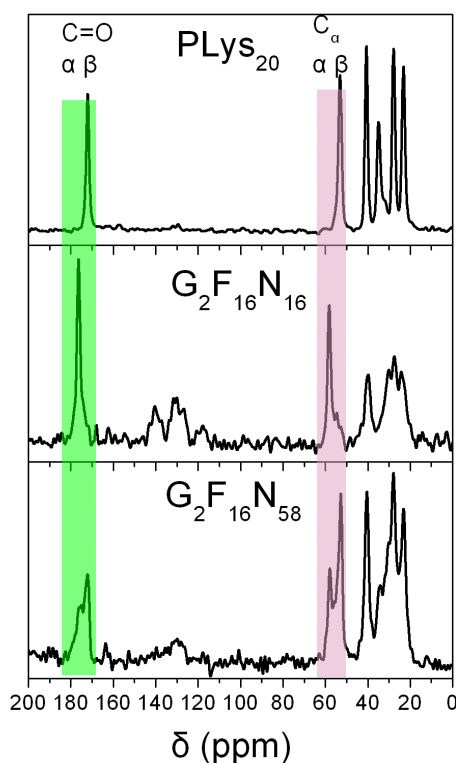
8.2 Αποτελέσματα

8.2.1 Θερμικές ιδιότητες. Η Εικόνα 8.1 δείχνει τα ίχνη της $\Delta\Theta\Sigma$ δύο δειγμάτων, πρώτης (**G₁F₈N₆₀**) και δεύτερης (**G₂F₁₆N₆₈**) γενιάς. Και τα δύο ίχνη εμφανίζουν μεταβολή βήματος στην ειδική θερμότητα, η οποία σχετίζεται με τη μετάβαση υάλου του πολυπεπτιδίου [8].



Εικόνα 8.1. Θερμογραφήματα $\Delta\Theta\Sigma$ καταγεγραμμένα κατά τη δεύτερη θέρμανση (ρυθμός 10 K/min) από δύο PPD με προσαρτημένες πολυ-L-λυσίνες πρώτης (**G₁F₈N₆₀**) (πάνω) και δεύτερης (**G₂F₁₆N₆₈**) (κάτω) γενιάς. Τα βέλη δείχνουν τις αντίστοιχες θερμοκρασίες υάλου.

8.2.2 Αυτοοργάνωση στο τήγμα. Η Εικόνα 8.2 δείχνει μερικά χαρακτηριστικά φάσματα μιας γραμμικής πολυ-L-λυσίνης με 20 μονομερή (**PLys₂₀**) και δύο από τα δενδριμερή με πολυ-L-λυσίνες δεύτερης γενιάς με 16 (**G₂F₁₆N₁₆**) και 58 (**G₂F₁₆N₅₈**) αμινοξέα, αντίστοιχα, μετρημένων στα 323 K.



Εικόνα 8.2. Φάσματα ^{13}C CP NMR, καταγεγραμμένα σε 30 kHz MAS και χρόνο διασταυρούμενης πόλωσης 1 ms, μιας γραμμικής πολυ-L-λυσίνης (**PLys**₂₀) και δύο από τα PPD με πολυ-L-λυσίνες με $n=16$ (**G**₂**F**₁₆**N**₁₆) και $n=58$ (**G**₂**F**₁₆**N**₅₈). Οι συντονισμοί των C_α ($\delta \sim 53 - 58$ ppm) και $\text{C}=\text{O}$ ($\delta \sim 172 - 176$ ppm) υποδηλώνουν ότι η **PLys**₂₀ έχει αποκλειστικά β-φύλλα, ενώ τα υπόλοιπα συστήματα σχηματίζουν ως επί το πλείστον α-έλικες (**G**₂**F**₁₆**N**₁₆) ή μίγμα β-φύλλων και α-ελίκων (**G**₂**F**₁₆**N**₅₈). Τα αποτελέσματα του NMR στερεάς κατάστασης για τις δευτεροταγείς δομές συνοψίζονται στον Πίνακα 8.1.

Στο φάσμα της **PLys**₂₀ τα ισχυρά μέγιστα με χημικές μετατοπίσεις 172 και 53 ppm οφείλονται στο αμίδιο $\text{C}=\text{O}$ και στον άνθρακα C_α , αντίστοιχα, και υποδεικνύουν το σχηματισμό β-φύλλων. Αντίθετα, μια μακρύτερη γραμμική πολυ-L-λυσίνη με 59 μονομερή (**PLys**₅₉) (δεν δείχνεται εδώ) εμφανίζει δύο συντονισμούς που αντιστοιχούν στο $\text{C}=\text{O}$ στα 58 και 53 ppm, και δύο που αντιστοιχούν στον C_α στα 176 και 58 ppm, με σχετικές εντάσεις που φανερώνουν λόγο α-ελίκων/β-φύλλα ίσο με 1:2. Είναι ενδιαφέρον ότι στο σύστημα **G**₂**F**₁₆**N**₁₆ οι (μοναδικοί) συντονισμοί $\text{C}=\text{O}$ και C_α βρίσκονται στα 176 και 58 ppm, αντίστοιχα, φανερώνοντας κυριαρχία της δομής α-έλικας, σε αντίθεση με την **PLys**₂₀. Στην πραγματικότητα, η δομή α-έλικας είναι η επικρατέστερη για τα δενδριμερή με πολυ-L-λυσίνες με ενδιάμεσους βαθμούς πολυμερισμού ($16 \leq n \leq 37$), ανεξαρτήτως γενιάς και πλήθους υποκατεστημένων θέσεων. Τα συστήματα με μικρότερα πεπτίδια ($n \leq 14$) δεν εμφανίζουν κάποια σαφή προτίμηση για μία από τις δύο δευτεροταγείς δομές, όμως η συνολική εικόνα προσομοιάζει περισσότερο με εκείνη που αναμένεται για δομή β-φύλλων. Πιθανώς αυτά τα ολιγοπεπτίδια είναι πολύ μικρά για να σταθεροποιήσουν μια άρτια δευτεροταγή δομή. Στα

μακρύτερες πολυ-L-λυσίνες, $n \geq 54$, σχηματίζεται ένα μίγμα και των δύο διαμορφώσεων, όπως φαίνεται από το φάσμα του $G_2F_{16}N_{58}$ στην Εικόνα 8.2. Σημειώνουμε εδώ ότι μελέτες ακτίνων-X σε πρωτονιωμένες πολυ-L-λυσίνες σε υδατικά διαλύματα έδειξαν τη δυνατότητα μιας μετάβασης από α-έλικες σε β-φύλλα σε υψηλή σχετική υγρασία [9].

Τα αποτελέσματα για τις δευτεροταγείς δομές που παρατηρήθηκαν σε όλα τα δείγματα συγκεντρώνονται στον Πίνακα 8.1. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν μια επίδραση του πυρήνα πολυφαινυλενίων στη δευτεροταγή δομή των πεπτιδίων. Ιδιαίτερα τα συστήματα με πολυ-L-λυσίνες ενδιάμεσου βαθμού πολυμερισμού σχηματίζουν κυρίως α-έλικες, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα γραμμικά. Στη συνέχεια μελετάμε την αιτία αυτής της επίδρασης χρησιμοποιώντας σκέδαση ακτίνων-X.

Πίνακας 8.1. Δευτεροταγείς δομές των PPD με πολυ-L-λυσίνες, προσδιορισμένες από WAXS και NMR στερεάς κατάστασης^α.

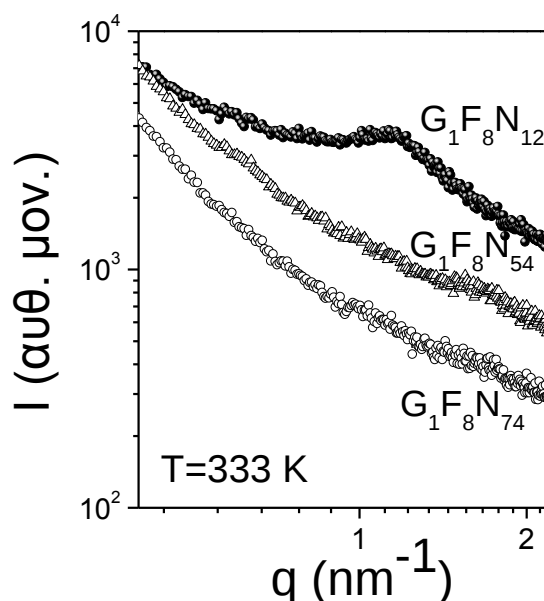
δείγμα	n	δευτεροταγής δομή		αρωματικός πυρήνας	πεπτιδική αλυσίδα	πλευρικές ομάδες ^γ (C _β , C _γ , C _δ CH ₂)		(C _ε CH ₂)	
		NMR	WAXS	παράγοντας δομής S	παράγοντας δομής S	παράγοντας δομής S	γωνία περιπάτου (μοίρες)	παράγ. δομής S	γωνία περιπάτου (μοίρες)
$G_2F_8N_9$	9	dis ^β		0.95		0.67	20	0.45	30
$G_1F_8N_{12}$	12								
$G_1F_4N_{14}$	14	dis ^β		~1	0.95	0.69	18	0.55	25
$G_2F_{16}N_{16}$	16	α	α (hcp)	0.90	0.95	0.67	20	0.60	23
$G_2F_8N_{22}$	22	α	α (hcp)	~1	0.95	0.50	27	0.50	27
$G_2F_8N_{37}$	37	α	α (hcp)	~1	0.95	0.53	26	0.35	41
$G_1F_4N_{54}$	54	α/β (3/1)	α (hcp)	~1	0.95	0.48	29	0.30	45
$G_2F_{16}N_{58}$	58	β/α (2/1)		~1	0.95	0.50	27	0.50	27
$G_2F_{16}N_{68}$	68	α/β (1/1)							
$G_1F_8N_{74}$	74		α (hcp)						
$G_1F_4N_{84}$	84	β/α (1/1)		~1	0.95	0.55	25	0.50	27
PLys ₂₀	20	β							
PLys ₅₉	59	α/β (1/1)							

^α: Ο τοπικός δυναμικός παράγοντας δομής για τον αρωματικό πυρήνα, την κύρια πεπτιδική αλυσίδα, και τις πλευρικές ομάδες των πεπτιδίων, παρουσιάζονται μαζί με τη μέση γωνία περιπάτου [10], που είναι χαρακτηριστική για την κίνηση κάθε ξεχωριστού τμήματος του συστήματος.

^β: Η δευτεροταγής δομή δεν είναι προσδιορισμένη με σαφήνεια.

^γ: Οι τοπικοί δυναμικοί παράγοντες δομής και οι σχετικές γωνίες περιπάτου είναι η μέση τιμή των τοπικών τιμών των ομάδων μεθυλενίων C_β, C_γ, και C_δ (βλ. Εικόνα 4.4). Η ακραία ομάδα C_εCH₂ παρουσιάζεται ξεχωριστά επειδή εμφανίζει μεγαλύτερη κινητικότητα.

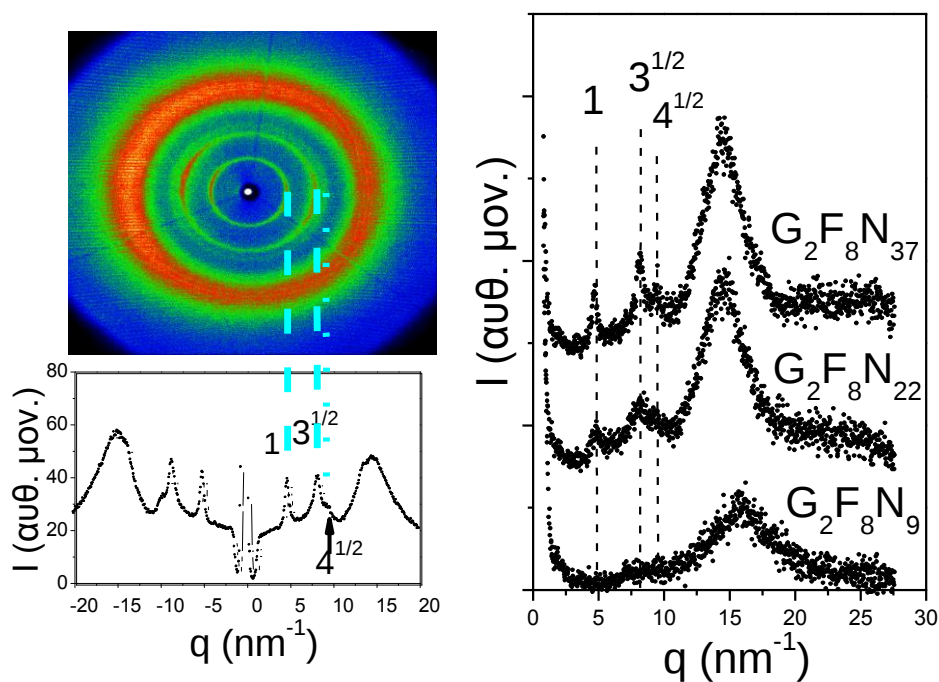
Η σκέδαση ακτίνων-X σε μικρές γωνίες έδειξε μια ευρεία κορυφή που αντιστοιχεί στην απόσταση μεταξύ των πυρήνων πολυφαινυλενίων. Η κορυφή αυτή φανερώνει πως υπάρχουν συσχετίσεις μεταξύ των πυρήνων. Η ένταση και το εύρος της κορυφής είναι συνάρτηση του βαθμού πολυμερισμού της πολυ-L-λυσίνης: όσο κοντύτερη είναι η πεπτιδική αλυσίδα, τόσο καθαρότερη είναι η κορυφή στις ακτίνες-X. Αυτό φαίνεται στην Εικόνα 8.3 για τη σειρά G_1F_8 ως συνάρτηση του μήκους της πολυ-L-λυσίνης ($n=12$, 60, και 74, αντίστοιχα, για τα $G_1F_8N_{12}$, $G_1F_8N_{60}$, και $G_1F_8N_{74}$). Η ευρεία κορυφή σε $q \sim 1.15 \text{ nm}^{-1}$ στο $G_1F_8N_{12}$ δίνει χαρακτηριστική απόσταση 6.7 nm (υποθέτοντας συσχετίσεις μόνο μεταξύ γειτονικών μονάδων, $l=1.23 \times 2\pi/q$, που ισχύει για σκέδαση από άμορφα στερεά [11]). Αυτή η απόσταση είναι συνάρτηση της γενιάς του πυρήνα πολυφαινυλενίων, κάτι που δείχνει σαφή αλληλοσυσχέτιση της θέσης των πυρήνων. Αυτές οι συσχετίσεις γίνονται πολύ ασθενείς για τις μακρύτερες πολυ-L-λυσίνες, όπως φαίνεται από την απουσία της συγκεκριμένης κορυφής για τα $G_1F_8N_{60}$ και $G_1F_8N_{74}$ στα αποτελέσματα SAXS της Εικόνας 8.3.



Εικόνα 8.3. Καμπύλες SAXS από τρία PPD με πολυ-L-λυσίνες πρώτης γενιάς, συναρτήσει του βαθμού πολυμερισμού της πολυ-L-λυσίνης: $n=12$ ($G_1F_8N_{12}$), $n=54$ ($G_1F_8N_{54}$), και $n=74$ ($G_1F_8N_{74}$). Προσέξτε την ευρεία κορυφή σε $q \sim 1.15 \text{ nm}^{-1}$ (με αντίστοιχη απόσταση $l \sim 6.7 \text{ nm}$) η οποία απουσιάζει στα δενδριμερή με μακρύτερες πολυ-L-λυσίνες.

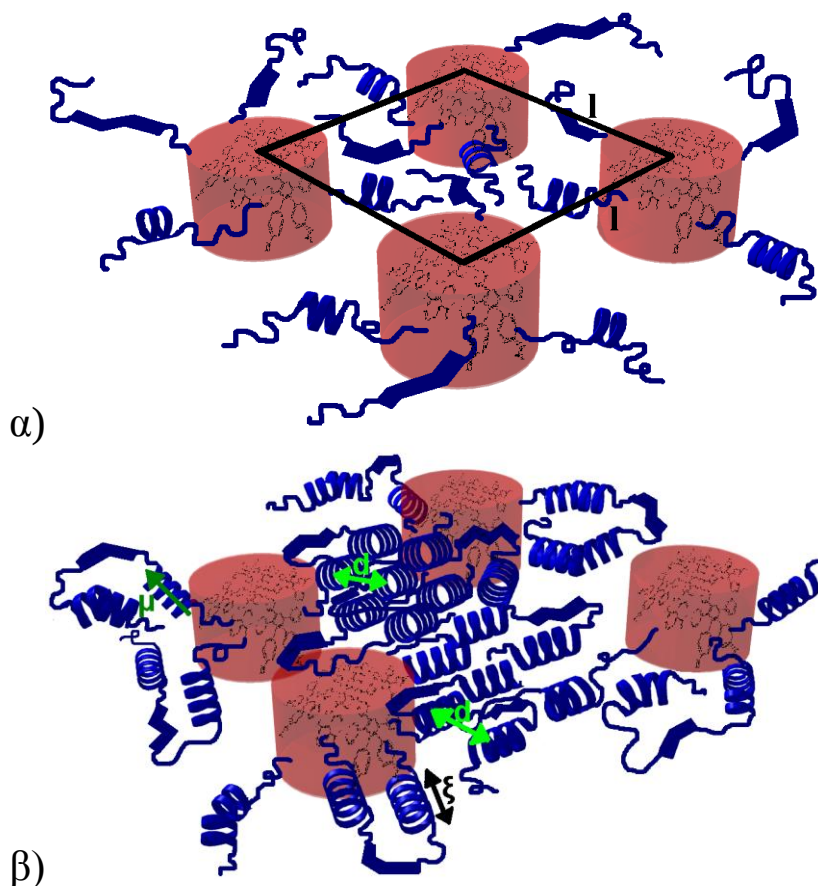
Η σκέδαση ακτίνων-X σε ευρείες γωνίες (WAXS) χρησιμοποιήθηκε για δυο λόγους: πρώτον, για να εξακριβωθούν οι διαμορφώσεις των πεπτιδίων σε σύγκριση με τα αποτελέσματα του NMR, και δεύτερον, για να εκτιμηθεί η εγκάρσια συνοχή (αποτελεσματικότητα της συναρμογής). Σε σχέση με το είδος της δευτεροταγούς δομής, οι

εικόνες WAXS από ίνες από εφελκυσμό (Εικόνα 8.4) αποκάλυψαν εξαγωνικά διατεταγμένες α-έλικες για τα PPD με μακρύτερες αλυσίδες πολυ-L-λυσίνων. Για παράδειγμα, στην Εικόνα 8.4 παρουσιάζεται η διδιάστατη εικόνα και η ολοκληρωμένη ένταση του $G_1F_8N_{74}$ ($n=74$). Η ολοκληρωμένη ένταση περιέχει ισχυρές ισημερινές ανακλάσεις με σχετικές θέσεις $1:3^{1/2}:4^{1/2}$, που υποδηλώνουν εξαγωνικά διατεταγμένες α-έλικες, και μια ευρύτερη ανάκλαση με αντίστοιχη διάσταση ~ 0.5 nm που προέρχεται από ενδοατομικές αποστάσεις. Το είδος της δευτεροταγούς δομής είναι γενικά σε καλή συμφωνία με τα αποτελέσματα του NMR (Πίνακας 8.1). Εκτός από το είδος της δευτεροταγούς δομής, οι εικόνες WAXS φανέρωσαν μια συσχέτιση ανάμεσα στο μήκος των πολυ-L-λυσίνων και στην αποτελεσματικότητα της εγκάρσιας συναρμογής τους: τα φάσματα WAXS έχουν οξείες ανακλάσεις που σχετίζονται με τις εγκάρσιες αποστάσεις των α-ελίκων μόνο στις μακρύτερες πολυ-L-λυσίνες (όπως στα δεξιά της Εικόνας 8.4, για τη σειρά G_2F_8), και όσο πιο μακριά είναι η πολυ-L-λυσίνη, τόσο καλύτερες είναι οι ανακλάσεις των α-ελίκων.



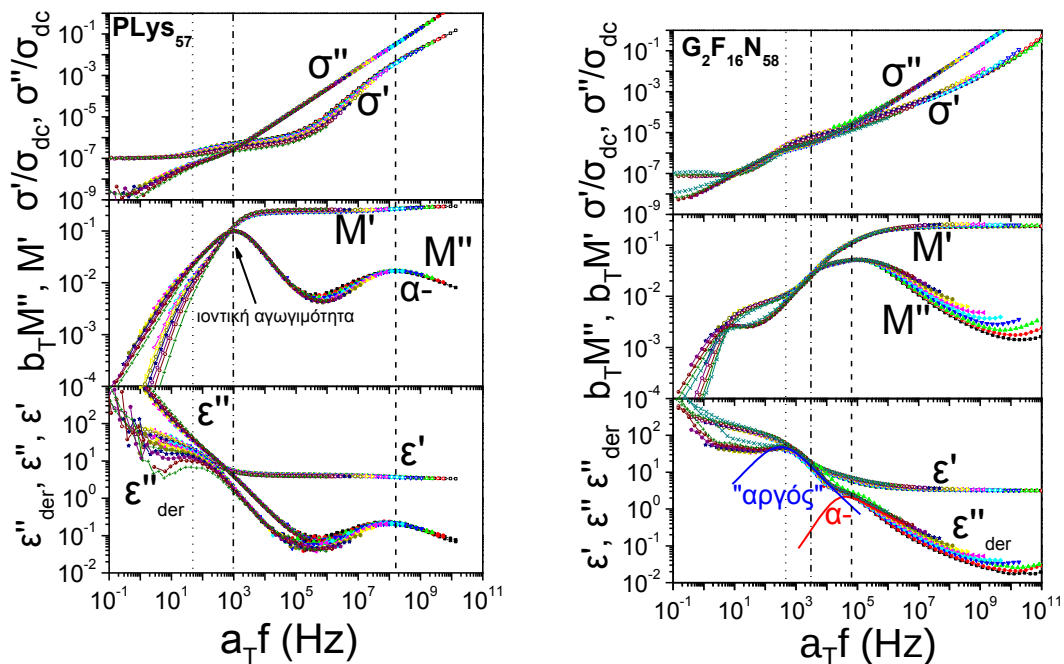
Εικόνα 8.4. (Αριστερά) Διδιάστατη εικόνα WAXS από προσανατολισμένη ίνα $G_1F_8N_{74}$ (που υπέστη εφελκυσμό στα 423 K και μετρήθηκε στα 303 K). Η συνολική ολοκληρωμένη ένταση από τη διδιάστατη εικόνα δείχνεται από κάτω μαζί με τις θέσεις των πιο έντονων ανακλάσεων με σχετικές θέσεις $1:3^{1/2}:4^{1/2}$, που υποδηλώνουν εξαγωνικά διατεταγμένες α-έλικες. (Δεξιά) Η εξάρτηση των ανακλάσεων στο βαθμό πολυμερισμού των πολυ-L-λυσίνων. Παρουσιάζεται η σειρά G_2F_8 , με $n=9$ ($G_2F_8N_9$), $n=22$ ($G_2F_8N_{22}$), και $n=37$ ($G_2F_8N_{37}$) στα 303 K. Σημειώστε τις έντονες ανακλάσεις με σχετικές θέσεις $1:3^{1/2}:4^{1/2}$ για τις μακρύτερες πολυ-L-λυσίνες.

Για τα συστήματα με μικρότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες ($n < 16$), η δευτεροταγής δομή δεν μπορεί να οριστεί επακριβώς, και φαίνεται να αποτελείται κυρίως από τυχαίες διαμορφώσεις. Αυτά τα συστήματα με ολιγολυσίνες εμφανίζουν μόνο συσχετίσεις μεταξύ των πυρήνων πολυφαινυλενίων (SAXS) και πολύ ασθενείς συσχετίσεις μεταξύ των πολυπεπτιδίων (WAXS). Αντίθετα, τα συστήματα με μακρύτερα πολυπεπτίδια ($n > 20$) στερούνται συσχετίσεων μεταξύ των πολυφαινυλικών πυρήνων, αλλά παρουσιάζουν βελτιωμένη εγκάρσια συσχέτιση της δευτεροταγούς δομής τους, η οποία είναι οργανωμένη σε εξαγωνικά διατεταγμένες α -έλικες (Εικόνα 8.4). Αυτή η κατάσταση απεικονίζεται με σχηματικό τρόπο στην Εικόνα 8.5. Απεικονίζονται οι συσχετίσεις μεταξύ πυρήνων για μικρότερες πολυ-L-λυσίνες, οι οποίες απουσιάζουν για μακρύτερες. Στη δεύτερη περίπτωση όμως, οι α -έλικες αυτοοργανώνονται σε εξαγωνικό πλέγμα. Ας σημειωθεί ότι οι έλικες παρουσιάζονται “σπασμένες” για λόγους που θα γίνουν εμφανείς στη συνέχεια.



Εικόνα 8.5. Σχηματική αναπαράσταση της αυτοοργάνωσης στα συστήματα με (α) ολιγοπεπτίδια ($n < 16$) και (β) μακρύτερα πολυπεπτίδια ($n > 20$). Στην πρώτη περίπτωση δεν υπάρχουν σαφώς ορισμένες πεπτιδικές δευτεροταγείς δομές και οι πυρήνες πολυφαινυλενίων παρουσιάζουν μεταξύ τους οργάνωση, όπως προκύπτει από τα SAXS. Στη δεύτερη περίπτωση, κυριαρχεί η α -ελικοειδής δευτεροταγής δομή (με μήκος εμμονής ξ) η οποία, επιπλέον, οργανώνεται σε εξαγωνικό πλέγμα (με χαρακτηριστική απόσταση d) (WAXS). Οι συσχετίσεις μεταξύ των πυρήνων παύουν να υπάρχουν.

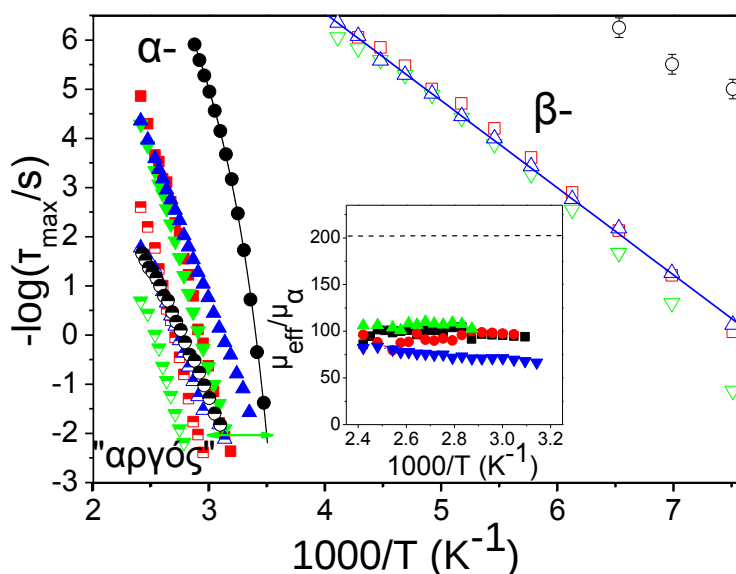
8.2.3 Δυναμική στην “υγρή” κατάσταση ($T > T_g$). Όπως έχουμε επανειλημμένα αναφέρει πιο πριν, η μελέτη των PPD με πολυ-L-λυσίνες με διηλεκτρική φασματοσκοπία μπορεί, εκτός από το να προσδιορίσει τη δυναμική του συστήματος, να αποσαφηνίσει και τη μορφολογία. Στην Εικόνα 8.6 δείχνουμε υπερθέσεις του πραγματικού και του φανταστικού μέρους της αγωγιμότητας σ^* , του ηλεκτρικού μέτρου M^* , και της ηλεκτρικής διαπερατότητας ϵ^* της γραμμικής πολυ-L-λυσίνης **PLys₅₉** και του δενδριμερούς με πολυ-L-λυσίνη **G₂F₁₆N₅₈** ($n=58$) με παραπλήσιο βαθμό πολυμερισμού. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των φασμάτων της γραμμικής και της προσαρτημένης πολυ-L-λυσίνης: ο α -μηχανισμός που φαίνεται καθαρά σε υψηλές συχνότητες στην **PLys₅₉** έχει μετακινηθεί σε χαμηλότερες συχνότητες στο **G₂F₁₆N₅₈**, ενώ ο “αργός” μηχανισμός έχει μετακινηθεί σε υψηλότερες συχνότητες.



Εικόνα 8.6. Υπερθέσεις του πραγματικού και του φανταστικού μέρους της αγωγιμότητας σ^* , του ηλεκτρικού μέτρου M^* , και της ηλεκτρικής διαπερατότητας ϵ^* της **PLys₅₉** (αριστερά) και του **G₂F₁₆N₅₈** (δεξιά) σε θερμοκρασία αναφοράς 413 K. Τα υπερτιθεμένα δεδομένα αντιστοιχούν σε θερμοκρασίες ανά 5 K στην περιοχή 318 – 413 K και 293 – 414 K για την **PLys₅₉** και το **G₂F₁₆N₅₈**, αντίστοιχα. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τη θέση του μεγίστου του α -μηχανισμού. Οι διακεκομμένες/εστιγμένες γραμμές δείχνουν το μηχανισμό λόγω ιοντικής αγωγιμότητας και οι εστιγμένες γραμμές τη θέση του “αργού” μηχανισμού, που σχετίζεται με τη χαλάρωση της πεπτιδικής δευτεροταγούς δομής (φαίνεται καλύτερα στην παράγωγο, ϵ''_{der}).

Οι χρόνοι χαλάρωσης που σχετίζονται με τον τμηματικό μηχανισμό (α -μηχανισμός) της **PLys₅₉** και μερικών δενδριμερών με πολυ-L-λυσίνη με συγκρίσιμους βαθμούς

πολυμερισμού παρουσιάζονται σε αναπαράσταση Arrhenius στην Εικόνα 8.7. Οι χρόνοι χαλάρωσης του α-μηχανισμού της **PLys₅₉** εμφανίζουν τη συνήθη ισχυρή μη Arrhenius εξάρτηση από τη θερμοκρασία που ακολουθεί την εξίσωση VFT (εξίσωση 3.4), με $T_0 = 241 \pm 2$ K, $\tau_0 \sim 10^{-14}$ s, και $D_T = 6.0 \pm 0.5$. Ο συνήθης λειτουργικός ορισμός του T_g (σε $\tau \sim 10^2$ s) συμφωνεί καλά με το T_g της ΔΘΣ (Εικόνα 8.1). Ο α-μηχανισμός στα δενδριμερή με πολυ-L-λυσίνες (i) είναι μετατοπισμένος προς χαμηλότερες συχνότητες (υψηλότερες θερμοκρασίες) και (ii) εμφανίζει ασθενέστερη εξάρτηση από τη θερμοκρασία (με $D=15, 19$, και 32 για τα **G₁F₄N₅₄**, **G₁F₈N₆₀**, και **G₂F₁₆N₅₈**, αντίστοιχα). Επομένως η κύρια επίδραση του σχετικά άκαμπτου πυρήνα πολυφαινυλενίων στη δυναμική είναι να επιβραδύνει τον τμηματικό μηχανισμό. Θα επιστρέψουμε σε αυτό το ζήτημα αργότερα, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του NMR.



Εικόνα 8.7. Αναπαράσταση Arrhenius των διάφορων μηχανισμών χαλάρωσης στη γραμμική **PLys₅₉** (κύκλοι) και τρία από τα PPD με πολυ-L-λυσίνες με παρόμοιους βαθμούς πολυμερισμού: **G₁F₄N₅₄** (τετράγωνα), **G₁F₈N₆₀** (κάτω τρίγωνα), και **G₂F₁₆N₅₈** (πάνω τρίγωνα). Ο τοπικός β-μηχανισμός, ο τμηματικός α-μηχανισμός που σχετίζεται με την υαλώδη μετάβαση, και ο “αργός” μηχανισμός που σχετίζεται με τη χαλάρωση της δευτεροταγούς δομής παριστάνονται με ανοικτά, γεμάτα, και μισογεμάτα σύμβολα, αντίστοιχα. Οι γραμμές αποτελούν αντιπροσωπευτικές προσαρμογές της εξίσωσης VFT και Arrhenius στους μηχανισμούς α- και β-, αντίστοιχα. Το οριζόντιο βέλος δείχνει το ΔT_g του **G₁F₈N₆₀**. Στο ένθετο, φαίνεται η κανονικοποιημένη ενεργός διπολική ροπή των ίδιων συστημάτων, που προέκυψε από τον “αργό” μηχανισμό, και συγκρίνεται με ένα πολυπεπτίδιο με αμιγώς α-έλικα (διακεκομμένη γραμμή) με $n=60$.

Για να εκτιμηθεί το μήκος εμμονής, ξ , υπολογίστηκε η ενεργός διπολική ροπή, μ , με την εξίσωση του Buckingham (3.6) για τον α- και τον “αργό” μηχανισμό, και ο λόγος τους παριστάνεται γραφικά στο ένθετο της Εικόνας 8.7 για τρία από τα δενδριμερή με πολυ-L-λυσίνες και τη γραμμική πολυ-L-λυσίνη **PLys₅₉** συναρτήσει της θερμοκρασίας. Η

διακεκομμένη γραμμή στην ίδια εικόνα είναι η αναμενόμενη διπολική ροπή για ένα πολυπεπτίδιο με αμιγώς α-έλικα (3.4 D/μονομερές) και βαθμό πολυμερισμού $n=60$. Παρατηρήστε ότι τα πειραματικά σημεία βρίσκονται αρκετά χαμηλότερα από το θεωρητικό όριο της τέλει α-έλικας. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος οι έλικες παρουσιάζονται “σπασμένες” στη σχηματική αναπαράσταση της Εικόνας 8.5.

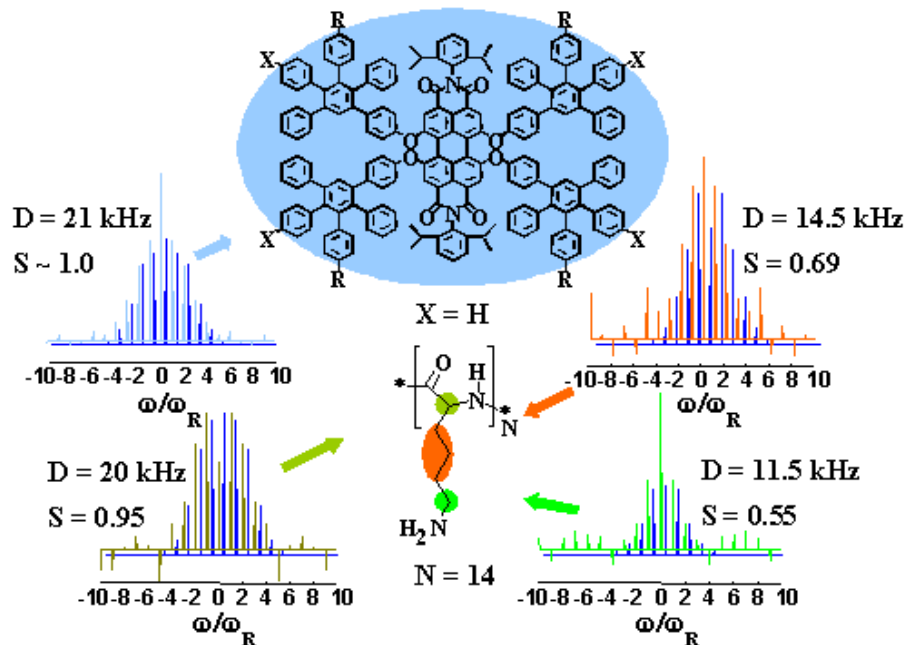
8.2.4 Δυναμική στην υαλώδη κατάσταση. Τόσο στις γραμμικές πολυ-L-λυσίνες όσο και στα PPD με πολυ-L-λυσίνες υπάρχει ακόμα ένας διηλεκτρικά ενεργός μηχανισμός σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, με εξάρτηση από τη θερμοκρασία τύπου Arrhenius (εξίσωση 3.3), με $\tau_0 \sim 10^{-14}$ s, και $E_{act} \sim 35 \pm 1$ kJ/mol η οποία είναι πρακτικά η ίδια σε όλα τα συστήματα υπό μελέτη. Παρόλα αυτά, αυτός ο β-μηχανισμός στα PPD με πολυ-L-λυσίνες είναι αρκετές τάξεις μεγέθους πιο αργός από τον αντίστοιχο μηχανισμό στη γραμμική πολυ-L-λυσίνη, κάτι που δείχνει και πάλι μεγάλη επίδραση της τοπολογίας των αλυσίδων στη δυναμική των πολυπεπτιδίων στην υαλώδη κατάσταση. Επειδή οι κινήσεις σε μεγαλύτερη κλίμακα είναι παγωμένες σε $T < T_g$, μελετήθηκαν οι τοπικές κινήσεις με ειδικές μεθόδους NMR στερεάς κατάστασης. Συγκεκριμένα, τεχνικές βασισμένες σε συμφωνία ετεροπυρηνικού σπιν, όπως η REREDOR (rotor-encoded rotational-echo double resonance) ή η REPT-HDOR (recoupled polarization transfer heteronuclear dipolar order rotod-encoding) [12], μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προσδιορίσουν τις ενεργές διπολικές συζεύξεις $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ μέσω της ανάλυσης των περιστρεφόμενων ιχνών πλευρικών κορυφών που παρατηρούνται στη χημική μετατόπιση του ^{13}C της ομάδας CH_n . Η χημική επιλεκτικότητα των φασμάτων ^{13}C NMR επιτρέπει την αντιστοίχιση των δυναμικών μηχανισμών με συγκεκριμένες θέσεις του μορίου και βοηθάει στην αποσαφήνιση της μοριακής προέλευσης των μηχανισμών. Η σταθερά διπολικής σύζευξης για δύο πυρηνικά σπιν i και j που απέχουν απόσταση r_{ij} είναι

$$D_{ij} \sim \frac{1}{r_{ij}^3} \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta_{ij} - 1) \quad (8.1)$$

όπου θ_{ij} είναι η γωνία του διαπυρηνικού τανυστή r_{ij} ως προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Από τη σταθερά διπολικής σύζευξης, μπορεί να οριστεί ο τοπικός δυναμικός παράγοντας δομής S_{ij} , – ο οποίος είναι ανεξάρτητος των διαπυρηνικών αποστάσεων των συζευγμένων σπιν – ως ο λόγος των μέσων συζεύξεων διπόλου-διπόλου προς εκείνες μιας άκαμπτης ομάδας:

$$S_{ij} = \left\langle \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta_{ij}(t) - 1) \right\rangle_t = \frac{\langle D_{ij}(t) \rangle_t}{D_{ij, static}} \quad (8.2)$$

Για γρήγορες ισοτροπικές αναπροσανατολιστικές κινήσεις, ο δυναμικός παράγοντας δομής εξαφανίζεται επειδή η ενεργός διπολική ανασύζευξη, D_{ij} , έχει μέση τιμή μηδέν, ενώ για μονοαξονικές περιστροφές, το S_{ij} εξαρτάται από τη γωνία μεταξύ του διαπυρηνικού τανυστή και του άξονα περιστροφής, μέσω του δεύτερου πολυωνύμου Legendre της εξίσωσης 8.2.



Εικόνα 8.8. Πλευρικές κορυφές REREDOR καταγεγραμμένες στα 30 kHz MAS, χρόνο ανασύζευξης 67.2 μ s, και ενεργό θερμοκρασία δείγματος 323 K, για το δείγμα $G_1F_4N_{14}$, μαζί με τις υπολογισμένες δομές υπερτιθεμένες. Οι ενεργές σταθερές διπολικής σύζευξης $^{13}C-^1H$, μαζί με τους αντίστοιχους τοπικούς δυναμικούς παράγοντες δομής, S , για τα φαινύλια, την κύρια πεπτιδική αλυσίδα, και τις πλευρικές ομάδες των πεπτιδίων συνοψίζονται στον Πίνακα 8.1. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν έναν πρακτικά παγωμένο πυρήνα πολυφαινυλενίων και μια βαθμίδα κινητικότητας από τη σχετικά ακίνητη πεπτιδική αλυσίδα προς τις πλευρικές ομάδες.

Το NMR στερεάς κατάστασης $^{13}C-^1H$ REREDOR χρησιμοποιήθηκε για να καταγράψει περιστρεφόμενα ίχνη πλευρικών κορυφών για τα περισσότερα συστήματα που μελετούνται σε αυτό το Κεφάλαιο. Από αυτά τα ίχνη προσδιορίστηκαν οι ενεργές διπολικές συζεύξεις $^{13}C-^1H$ και οι αντίστοιχοι τοπικοί δυναμικοί παράγοντες δομής S_{ij} , όπως φαίνεται στον Πίνακα 8.1. Για παράδειγμα, στην Εικόνα 8.8 δείχνουμε τα καταγεγραμμένα ίχνη πλευρικών κορυφών μαζί με υπολογισμένες δομές για το δείγμα $G_1F_4N_{14}$ ($n=14$). Το πλήθος και η ένταση αυτών των ιχνών προέρχεται από το λόγο της σταθεράς διπολικής σύζευξης και της συχνότητας περιστροφής υπό μαγική γωνία. Γενικά, όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση υψηλότερης τάξης πλευρικών κορυφών ως προς την κεντρική κορυφή, τόσο ισχυρότερες είναι οι διπολικές συζεύξεις και οι αντίστοιχοι τοπικοί δυναμικοί παράγοντες δομής.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.1 δείχνουν ότι, στη χρονική κλίμακα λειτουργίας του NMR (30 kHz, $\tau \sim 10^{-5}$ s στα 323 K), ο πυρήνας πολυφαινυλενίων καθώς και η κύρια αλυσίδα των πεπτιδίων είναι πρακτικά παγωμένα (τυπικές τιμές $S \sim 0.9 -$

1), ενώ οι πλευρικές ομάδες της πολυ-L-λυσίνης γενικά χαρακτηρίζονται από μια βαθμίδα κινητικότητας από την άκαμπτη κύρια αλυσίδα προς τις πιο εύκαμπτες ομάδες CH₂ (οι τιμές του S των πλευρικών ομάδων του Πίνακα 8.1 είναι μέσες τιμές των τοπικών δυναμικών παραγόντων δομής των τμημάτων CH₂ στις θέσεις C_β, C_γ, και C_δ, ενώ οι τιμές του S του CH₂ στη θέση C_ε αναφέρονται ξεχωριστά). Όπως αναμενόταν, η υψηλότερη ανισοτροπία παρατηρείται για τα C_β (ακριβώς δίπλα στην πολυπεπτιδική αλυσίδα), όπου η μικρότερη ελευθερία περιστροφής έχει ως αποτέλεσμα σε υψηλότερο τοπικό δυναμικό παράγοντα δομής. Οι σταθερές διπολικής σύζευξης μειώνονται βαθμιαία προς τον C_ε, καθώς οι τιμές που προσδιορίστηκαν ήταν στην περιοχή $D_{CH_2}=11.5 - 14$ kHz ($S=0.5 - 0.7$) για τα διάφορα δείγματα. Παρά του ότι βρίσκονται στη στερεά κατάσταση, οι ομάδες μεθυλενίου εμφανίζουν αξιοσημείωτη ευκινησία, φτάνοντας τιμές του δυναμικού τοπικού παράγοντα δομής μέχρι $S=0.3 - 0.6$ για το C_ε. Η παρατηρούμενη διαφορά των περίπου 6 kHz (ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού και το πλήθος των υποκατεστημένων θέσεων) στις σταθερές σύζευξης διπόλου-διπόλου του C_ε υποδεικνύει μικρές διαφορές στην τοπική συναρμογή.

Επιπλέον, οι τιμές του δυναμικού παράγοντα δομής, όπως περιγράφηκαν στο παρελθόν αλλού [10,13], μπορούν να αιτιολογηθούν με βάση των μέσων γωνιών περιπάτου που κάνει η αντίστοιχη ομάδα κατά την κίνησή της. Οι γωνίες περιπάτου των C_β, C_γ, και C_δ (μέση τιμή), και του C_ε περιέχονται επίσης στον Πίνακα 8.1. Βάση αυτών των μέσων γωνιών περιπάτου, είναι δυνατό να εκτιμηθεί ο όγκος που καταλαμβάνουν οι ομάδες μεθυλενίου κατά την κίνησή τους. Χάριν απλότητας, θεωρούμε κίνηση εντός κώνου [13], και αγνοούμε επιπλέον τοπικές ταλαντώσεις. Επίσης, η δυναμική των πλευρικών ομάδων φαίνεται να είναι ανεξάρτητη του μοριακού βάρους της πολυ-L-λυσίνης και του είδους της δευτεροταγούς δομής. Καθώς η κύρια αλυσίδα της πολυ-L-λυσίνης είναι σχετικά ακίνητη, ο β-μηχανισμός προέρχεται κυρίως από τις ευκίνητες πλευρικές ομάδες.

8.3 Συμπεράσματα

Σε αυτό το Κεφάλαιο μελετήθηκαν συστήματα δενδριμερών με πεπτίδια, που έχουν σημασία στη δόμηση φαρμακευτικών προϊόντων. Σκοπός της μελέτης ήταν να βρεθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πυρήνων και των πολυπεπτιδίων, και η εξάρτησή τους από τη δευτεροταγή δομή. Η μελέτη της μορφολογίας στη στερεά κατάσταση και της δυναμικής σε μια σειρά PPD με προσαρτημένα πεπτίδια πολυ-L-λυσίνης συναρτήσει του μεγέθους του πυρήνα πολυφαινυλενίων, του πλήθους των υποκατεστημένων θέσεων, και το βαθμό πολυμερισμού των πεπτιδίων είχε ως αποτέλεσμα τα παρακάτω ευρήματα:

(1) Ο μηχανισμός αυτοοργάνωσης διέπεται από συσχετίσεις μεταξύ των πυρήνων πολυφαινυλενίων και μεταξύ των α -ελίκων της πολυ-L-λυσίνης για μικρότερες και μακρύτερες πεπτιδικές αλυσίδες, αντίστοιχα. Επομένως ο κυριότερος παράγοντας που ελέγχει την αυτοοργάνωση είναι το μήκος των πολυπεπτιδίων.

(2) Οι απαιτήσεις συναρμογής έχουν συνέπειες στη δευτεροταγή δομή των πεπτιδίων: τα συστήματα με πολυ-L-λυσίνη βαθμού πολυμερισμού $n < 16$ δεν σχηματίζουν σαφώς καθορισμένη δευτεροταγή δομή, οι πολυ-L-λυσίνες με ενδιάμεσο βαθμό πολυμερισμού σχηματίζουν κυρίως α -έλικες – σε αντίθεση με τα αντίστοιχα γραμμικά – και μακρύτερες πολυ-L-λυσίνες ($n \geq 54$) έχουν τόσο α -έλικες όσο και β -φύλλα. Τα παραπάνω είναι ιδιαίτερα σημαντικά στο σχεδιασμό MAP, όπου η γνώση της δευτεροταγούς δομής των πεπτιδίων είναι απαραίτητη [14].

(3) Η παράλληλη μελέτη της μοριακής δυναμικής αποκάλυψε τρεις μηχανισμούς που σχετίζονται με την υαλώδη κατάσταση, την υαλώδη μετάβαση, και τη χαλάρωση τμημάτων της α -έλικας της δευτεροταγούς δομής. Αναλυτικά, (i) η ύπαρξη υαλώδους μετάβασης προσδιορίστηκε από τη μεταβολή βήματος στην ειδική θερμότητα και από την αντίστοιχη θερμοκρασιακή εξάρτηση των χρόνων χαλάρωσης. Αυτός ο μηχανισμός επιβραδύνεται σημαντικά στα PPD με πολυ-L-λυσίνες σε σύγκριση με τις γραμμικές πολυ-L-λυσίνες. (ii) Η δομή των α -ελίκων είναι ελαττωματική, όπως αποδεικνύεται από τα χαρακτηριστικά του πιο αργού μηχανισμού στις διηλεκτρικές μετρήσεις. (iii) Με την τεχνική REREDOR NMR προσδιορίστηκε, για πρώτη φορά, η τοπική γεωμετρία των κινήσεων στην υαλώδη κατάσταση, οι οποίες παρατηρούνται και στις διηλεκτρικές μετρήσεις, καθώς και οι δυναμικοί παράγοντες δομής για τους δεσμούς C-H στα πολυφαινυλενία, τις πεπτιδικές αλυσίδες, και τις πλευρικές ομάδες. Τα ευρήματα αυτά φανερώνουν έναν πρακτικά ακίνητο πυρήνα πολυφαινυλενίων και μια βαθμίδα κινητικότητας από την άκαμπτη κύρια πεπτιδική αλυσίδα προς τις πλευρικές ομάδες των πεπτιδίων.

8.4 Αναφορές

- (1) Choi, J. S.; Joo, D. K.; Kim, C. H.; Kim, K.; Park, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 474.
- (2) Ohsaki, M.; Okuda, T.; Wada, A.; Hirayama, T.; Niidome, T.; Aoyagi, H. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 510.
- (3) Lee, C. C.; Fréchet, J. M. J. *Macromolecules* **2006**, *39*, 476.
- (4) Wiesler, U. M.; Weil, T.; Muellen, K. *Top. Curr. Chem.* **2001**, *212*, 1.
- (5) Mihov, G.; Gregel-Koehler D.; Lübbert, A.; Vandermeulen G. W. M.; Herrmann, A.; Klok, H.-A.; Müllen, K. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 283.
- (6) Koynov, K.; Mihov, G.; Mondeshki, M.; Moon, C.; Spiess, H. W.; Müllen, K.; Butt, H.-J.; Floudas, G. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1745.
- (7) Mondeshki, M.; Mihov, G.; Graf, R.; Spiess, H. W.; Müllen, K.; Papadopoulos, P.; Gitsas, A.; Floudas, G. *Macromolecules* **2006**, *39*, 9605.
- (8) Floudas, G.; Papadopoulos, P.; Klok, H.-A.; Vandermeulen, G. W. M.; Rodriguez-Hernandez, J. *Macromolecules* **2003**, *36*, 3673.
- (9) Paden, F. J.; Keith, H. D.; Giannoni, G. *Biopolymers* **1969**, *7*, 793.
- (10) Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W. “*Multidimensional Solid-state NMR and Polymers*”, pp.364-366, Academic Press, New York, 1994.
- (11) Guinier, A. “*X-ray Diffraction*”, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1963.
- (12) Saalwächter, K.; Graf, R.; Spiess, H. W. *J. Magn. Reson.* **1999**, *140*, 471.
- (13) Rapp, A.; Schnell, I.; Sebastiani, D.; Brown, S.; Percec, V.; Spiess, H. W., *J Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13284.
- (14) Stiriba, S.-E.; Frey, H.; Haag, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1329.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

Επίδραση του περιορισμού σε επιφάνεια στην αυτοοργάνωση και στη δυναμική πολυπεπτιδίων

9.1 Εισαγωγή

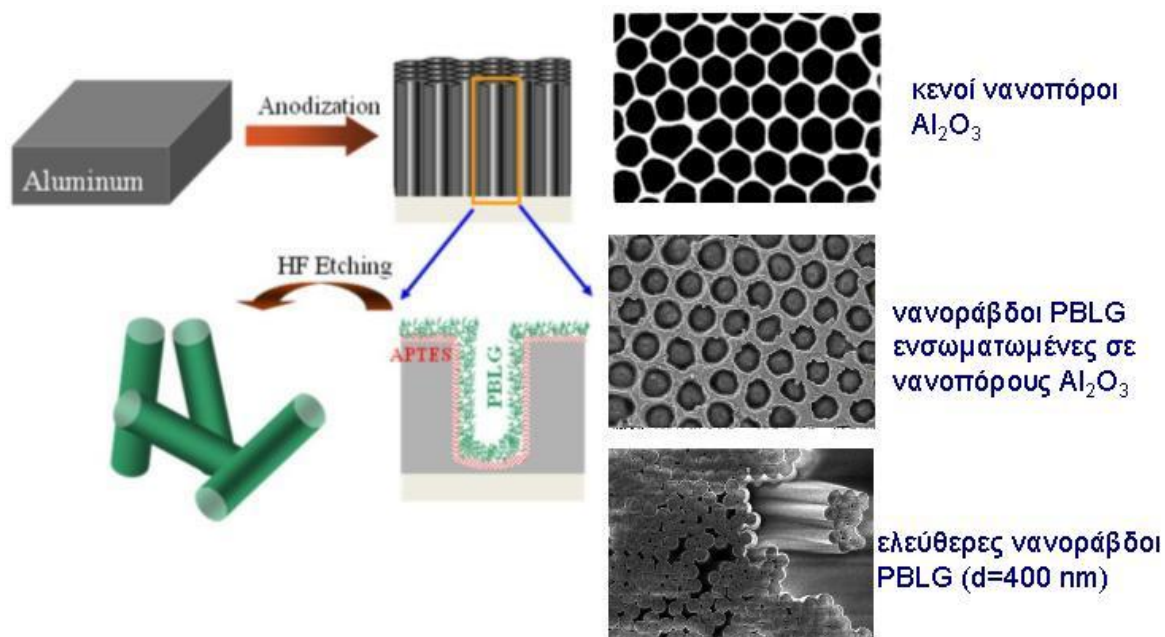
Στα προηγούμενα Κεφάλαια εξετάσαμε τρόπους ελέγχου της δομής και της δυναμικής συνθετικών συμπολυπεπτιδίων. Βρήκαμε ότι ο έλεγχος του είδους της δευτεροταγούς δομής είναι εφικτός με την επιλογή κατάλληλης τοπολογίας. Απώτερος σκοπός είναι η κατανόηση και τελικά η πρόβλεψη της δευτεροταγούς οργάνωσης, σε συνθήκες όπου τα πολυπεπτίδια αλληλεπιδρούν με πόρους και επιφάνειες. Ένα βήμα προς αυτή την κατεύθυνση αποτελεί η μελέτη πρότυπων πολυπεπτιδίων περιορισμένα σε νανοπόρους. Όπως και στο κύτταρο, η συνύπαρξη των πολυπεπτιδίων δίπλα σε περιοριστικές επιφάνειες, αναμένεται να τροποποιεί τόσο την αυτοοργάνωση όσο και τη δυναμική τους.

Η αυτοοργάνωση πολυπεπτιδίων σε περιορισμένες γεωμετρίες και κοντά σε επιφάνειες μπορεί να είναι διαφορετική από εκείνη που παρατηρείται σε μεγάλο όγκο. Πράγματι, ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου και οι αντίστοιχες δευτεροταγείς δομές μπορούν να επηρεαστούν από την προσρόφηση [1]. Τέτοια φαινόμενα περιορισμού λόγω επιφανειών παίζουν σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα και στη λειτουργία των πρωτεϊνών, όπως σε ένζυμα κλεισμένα σε ανόργανες κοιλότητες (βιοανιχνευτές και βιοκαταλύτες) [2]. Για να μελετήσουμε την επίδραση του περιορισμού και της παρουσίας επιφανειών στην αυτοοργάνωση και στη δυναμική των πολυπεπτιδίων, χρησιμοποιήσαμε μια σειρά νανοράβδων (nanorods) PBLG. Οι νανοράβδοι συντέθηκαν μέσα σε πορώδη αλουμίνα (Al_2O_3) [3-6] με ελεγχόμενες διαμέτρους πόρων μεταξύ 25 και 400 nm, και βάθος 100 μm. Αυτά τα πρότυπα συστήματα καθιστούν δυνατή, για πρώτη φορά, την εξέταση πολλών ανοικτών ερωτημάτων που σχετίζονται με την επίδραση του περιορισμού και των επιφανειών στη σταθερότητα και στην οργάνωση των α-ελίκων: Παραμένουν στην ίδια μορφή μέσα στους νανοπόρους; Αν ναι, μπορούν να οργανωθούν σε υπερδομές; Ποια είναι η επίδραση του περιορισμού και της επιφάνειας στην τμηματική και στη συνολική δυναμική των πεπτιδίων [7]; Η απάντηση αυτών των ερωτημάτων αναμένεται να βοηθήσει στην κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο οι πρωτεΐνες κινούνται μέσα από νανοπόρους και μεμβράνες στο κύτταρο.

Για να εξεταστούν αυτά τα ερωτήματα χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι μελέτης της δομής (ακτίνες-X, NMR, FTIR) και της δυναμικής (ΔΦ), στη μελέτη, αντίστοιχα, της αυτοοργάνωσης και της δυναμικής του πιο απλού συνθετικού πολυπεπτιδίου με δευτεροταγή δομή α-έλικας (PBLG), συναρτήσει της διάστασης των πόρων, του βαθμού πολυμερισμού, αλλά και της μεθόδου πολυμερισμού [8]. Βρέθηκε ότι το PBLG διατηρεί την ελικοειδή δομή σε πόρους διαμέτρου μέχρι 25 nm, αλλά οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ της επιφάνειας και του πολυπεπτιδίου αλλάζουν σημαντικά τη δυναμική ενός στρώματος πολυπεπτιδίου κοντά στη διεπιφάνεια. Αυτή η παρατήρηση έχει σημασία στην οργάνωση και στη λειτουργικότητα πρωτεϊνών σε περιορισμένες γεωμετρίες.

9.2 Αποτελέσματα

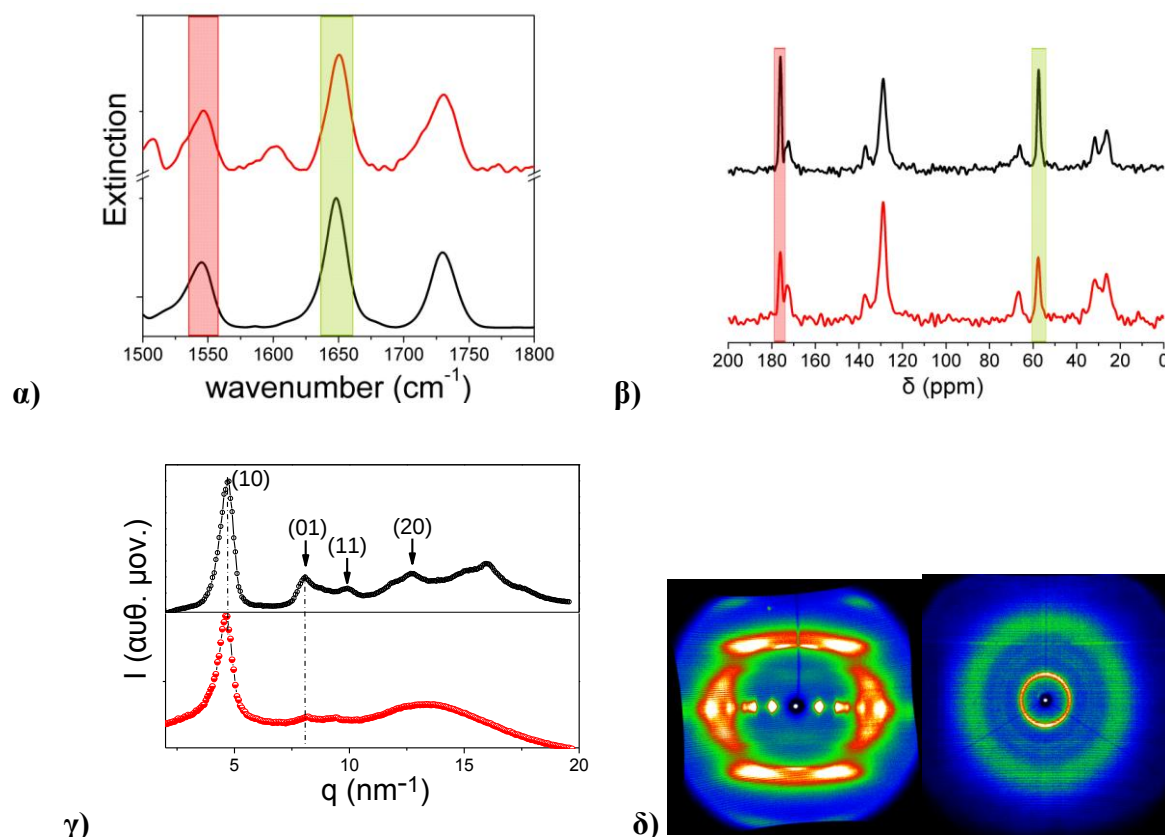
Η Εικόνα 9.1 δείχνει σχηματικά την πορεία σύνθεσης των νανοράβδων PBLG, η οποία περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 4.1.5. Για τον πολυμερισμό του NCA χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες THF και DMF, ιδιαίτερα σε νανοπόρους μικρής διάστασης για καλύτερη διείδυση στους νανοπόρους και κάλυψη της επιφάνειας χάρη στο μικρότερο ιξώδες, καθώς και πολυμερισμός σε τήγμα.



Εικόνα 9.1. (Αριστερά) Σχηματική αναπαράσταση της παρασκευής των νανοράβδων PBLG σε μήτρα αλουμίνιας, και (δεξιά) εικόνες SEM της άδειας μήτρας αλουμίνιας, της μήτρας γεμάτης με PBLG, και ελεύθερων νανοράβδων PBLG μετά την απομάκρυνση της μήτρας ($d=400$ nm).

Η εικόνα SEM ελεύθερων νανοράβδων PBLG που φαίνεται στην Εικόνα 9.1 είναι αντιπροσωπευτική για την ομοιογένεια και τη σταθερότητα όλων των ελεύθερων

νανοράβδων με διάμετρο μεγαλύτερη από 65 nm. Στη συνέχεια έγινε μοριακός και δομικός χαρακτηρισμός των νανοράβδων PBLG.

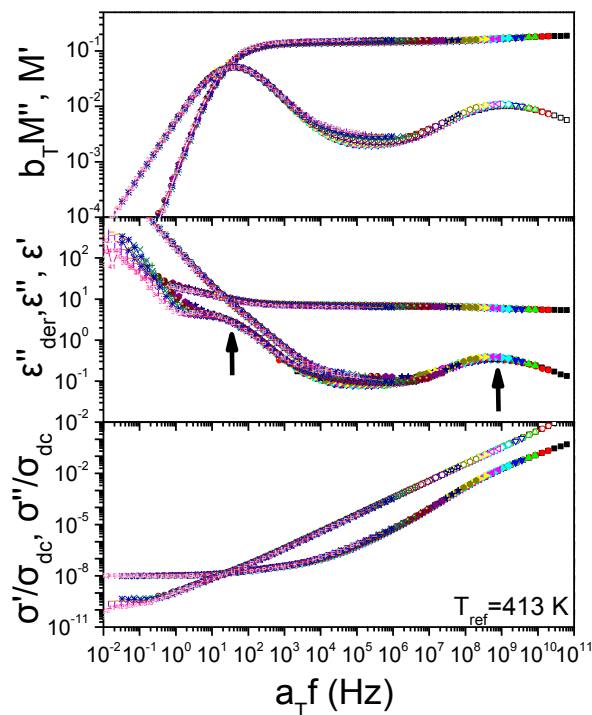


Εικόνα 9.2. (α) Φάσμα FTIR του καθαρού PBLG (μαύρη γραμμή) και ελεύθερων νανοράβδων PBLG 25 nm. Οι ζώνες στα 1550 και 1650 cm^{-1} αντιστοιχούν στο αμίδιο I και αμίδιο II, αντίστοιχα, για PBLG με δευτεροταγή δομή α-έλικας. (β) Φάσματα ^{13}C NMR ενσωματωμένων (κάτω) και ελεύθερων (πάνω) νανοράβδων PBLG. Οι έντονες κορυφές στα $\delta \sim 176$ και 57.5 ppm οφείλονται στο $\text{C}=\text{O}$ του αμιδίου και στον άνθρακα C_α , αντίστοιχα, και δείχνουν το σχηματισμό α-ελίκων. (γ) Καμπύλες WAXS του καθαρού PBLG (πάνω) και ελεύθερων νανοράβδων PBLG 65 nm στα 423 K. Οι ανακλάσεις που σημειώνονται με βέλη αντιστοιχούν στα επίπεδα (10), (01), και (11) της μοναδιαίας κυψελίδας. (δ) Διδιάστατη εικόνα WAXS από προσανατολισμένη ίνα καθαρού PBLG (αριστερά) και ελεύθερων νανοράβδων PBLG διαμέτρου 65 nm (δεξιά). Ο προσανατολισμός των ελίκων δεν είναι εντελώς κατακόρυφος, διότι οι έλικες μέσα στις ίνες έχουν ήδη οριζόντιο προσανατολισμό λόγω του τρόπου πολυμερισμού.

Η πολυπεπτιδική δευτεροταγής δομή μελετήθηκε με FTIR, ^{13}C NMR, και WAXS. Τα φάσματα FTIR εμφανίζουν τις συνήθεις ζώνες απορρόφησης αμιδίου I και αμιδίου II στα 1655 και 1550 cm^{-1} , αντίστοιχα, που σχετίζονται με την α-ελικοειδή διαμόρφωση (Εικόνα 9.2α). Παρομοίως, το ^{13}C NMR είναι πολύ ευαίσθητο στην ανίχνευση των τοπικών πεπτιδικών διαμορφώσεων μέσω των διαφορετικών χημικών μετατοπίσεων. Στην Εικόνα 9.2β φαίνονται χαρακτηριστικά φάσματα ^{13}C NMR ενσωματωμένων και ελεύθερων νανοράβδων PBLG. Είναι γνωστό ότι το PBLG μεγάλου μοριακού βάρους ($n > 18$) σχηματίζει α-έλικες [9,10]. Πράγματι, οι οξείες κορυφές με χημικές μετατοπίσεις $\delta \sim 176$ και 57.5 ppm προέρχονται από το $\text{C}=\text{O}$ αμιδίου και τον άνθρακα C_α , αντίστοιχα, και υποδεικνύουν το

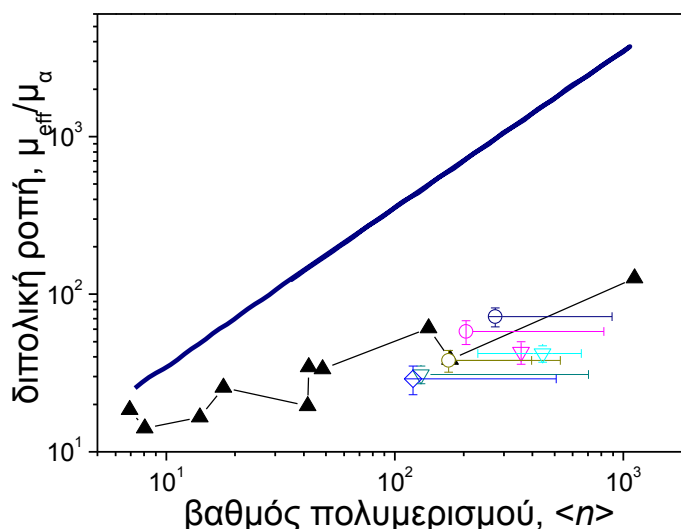
σχηματισμό α-ελίκων. Επιπλέον, η σκέδαση WAXS (Εικόνα 9.2γ) δείχνει τόσο τη δευτεροταγή δομή όσο και τη μοναδιαία κυψελίδα σε κρυσταλλικά υλικά. Οι διδιάστατες εικόνες των ελεύθερων νανοράβδων PBLG μοιάζουν πολύ με την αντίστοιχη του PBLG σε μεγάλο όγκο (στην Εικόνα 9.2δ φαίνεται το PBLG₄₁). Στις νανοράβδους PBLG οι ισχυρές ισημερινές ανακλάσεις με λόγους θέσεων $1:3^{1/2}:4^{1/2}$ αντιστοιχούν στις ανακλάσεις (10), (01), και (11) μιας εξαγωνικής μοναδιαίας κυψελίδας, με πλεγματική παράμετρο $a=1.51$ nm και χαρακτηριστικά απόσταση d που δίνεται από την εξίσωση 6.1. Στα υμένα ελεύθερων νανοράβδων, οι πεπτιδικές αλυσίδες PBLG διατηρούν την εγκάρσια οργάνωση και εμφανίζουν εξαγωνική δομή, αλλά σε μικρότερη έκταση. Αυτά τα αποτελέσματα από τη μελέτη της δομής δείχνουν ότι η εξαγωνική οργάνωση διατηρείται μέσα στις νανοράβδους και ταυτόχρονα διατηρείται και η εξαγωνική τους οργάνωση, όπως και στο καθαρό PBLG. Αυτό σημαίνει ότι τα πολυπεπτίδια διατηρούν τη δευτεροταγή τους δομή σε περιβάλλοντα υψηλής πυκνότητας, όπως σε αυτούς τους νανοπόρους αλουμίνας. Σε μια άλλη εργασία, όταν ομοπολυμερή πολυαδενυλικού οξέος με διάμετρο ~ 2.1 nm και ελικοειδή δευτεροταγή δομή υποχρεώθηκαν να περάσουν μέσα από νανοπόρους σε διμοριακό στρώμα λιπιδίων (από α-αιμολυσίνη) διαμέτρου 1.5 nm, οι έλικες έχασαν την οργάνωσή τους και ξετυλίχτηκαν ώστε να γίνει δυνατή η διέλευση μέσα από τους πόρους [11]. Στην παρούσα εργασία η μικρότερη διάμετρος των πόρων (25 nm) είναι δέκα φορές μεγαλύτερη από την ακτίνα μιας αλυσίδας PBLG σε α-ελικοειδή διαμόρφωση, και πιθανόν γι' αυτόν το λόγο δεν υπάρχει ουσιαστική μεταβολή της δευτεροταγούς δομής.

Στη συνέχεια εξετάζουμε τη δυναμική του PBLG στις ελεύθερες νανοράβδους. Στην περίπτωση αυτή διατηρείται ο γεωμετρικός περιορισμός αλλά το PBLG δεν είναι σε επαφή με κάποια επιφάνεια. Οι μηχανισμοί που αντιστοιχούν στην τμηματική και στη δυναμική των τμημάτων της α-έλικας εμφανίζονται σαν διακριτές κορυφές στην Εικόνα 9.3, σε υψηλές και σε χαμηλές συχνότητες, αντίστοιχα. Στην Εικόνα φαίνονται υπερτιθεμένα διηλεκτρικά φάσματα σε τρεις διαφορετικές αναπαραστάσεις για τις ελεύθερες νανοράβδους PBLG διαμέτρου 65 nm. Τα βέλη στις υψηλές και στις χαμηλές συχνότητες δείχνουν, αντίστοιχα, την τμηματική και τη χαλάρωση της δευτεροταγούς δομής.



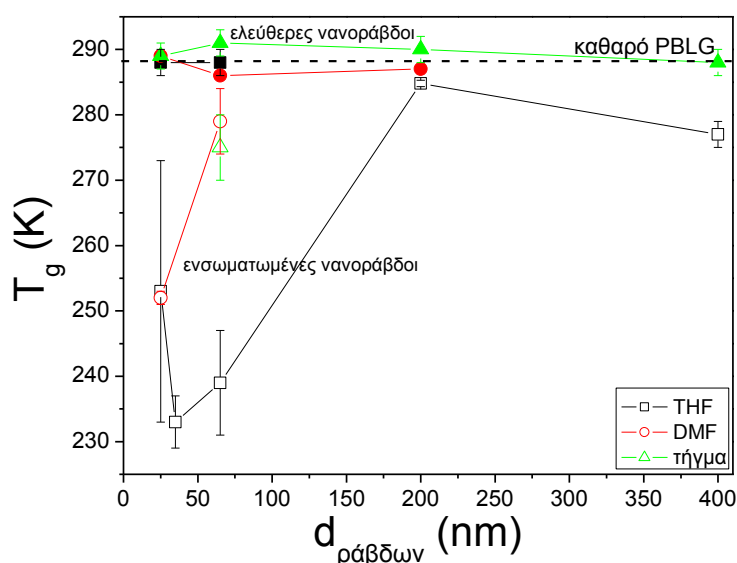
Εικόνα 9.3. Υπερτιθεμένα διηλεκτρικά φάσματα ελεύθερων νανοράβδων PBLG διαμέτρου 65 nm συναρτήσει της συχνότητας. Τα δεδομένα παρουσιάζονται σε τρεις αναπαραστάσεις: (i) ηλεκτρικό μέτρο, M^* , (ii) ηλεκτρική συνάρτηση, ϵ^* , και (iii) αγωγιμότητα, σ^* , σε θερμοκρασία αναφοράς 413 K, στην περιοχή 318-453 K. Τα βέλη στις υψηλές και στις χαμηλές συχνότητες δείχνουν, αντίστοιχα, την τμηματική και τη χαλάρωση της δευτεροταγούς δομής.

Η ένταση του “αργού” μηχανισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί και πάλι για να βρεθεί η ενεργός διπολική ροπή που σχετίζεται με το μήκος εμμονής, ξ , των ελικοειδών τμημάτων. Η ενεργός διπολική ροπή απεικονίζεται στην Εικόνα 9.4 συναρτήσει του βαθμού πολυμερισμού για το καθαρό PBLG (τετράγωνο) και για τις ελεύθερες νανοράβδους. Παρά την ευρεία κατανομή μοριακών βαρών στην τελευταία περίπτωση, είναι φανερό πως οι α-έλικες έχουν μικρότερο μήκος εμμονής από τις “ιδανικές” ($\xi \sim 2$ nm) [9-10,12-13].



Εικόνα 9.4. Ενεργός διπολική ροπή του “αργού” μηχανισμού σε ελεύθερες νανοράβδους PBLG, κανονικοποιημένη ως προς την αντίστοιχη του α-μηχανισμού, συναρτήσει του βαθμού πολυμερισμού. Τα σύμβολα αντιστοιχούν σε καθαρό PBLG (τετράγωνα), και νανοράβδους: 400 nm από τήγμα (ανοιχτός κύκλος), 400 nm από THF (κύκλος με οριζόντια γραμμή), 400 nm από DMF (κύκλος με κατακόρυφη γραμμή), 65 nm από τήγμα (κάτω τρίγωνο), 65 nm από THF (κάτω τρίγωνο με οριζόντια γραμμή), 65 nm από DMF (κάτω τρίγωνο με κατακόρυφη γραμμή), και 25 nm από THF (ρόμβος με οριζόντια γραμμή). Η συνεχής γραμμή δείχνει τη θεωρητική τιμή για μια τέλεια α-έλικα.

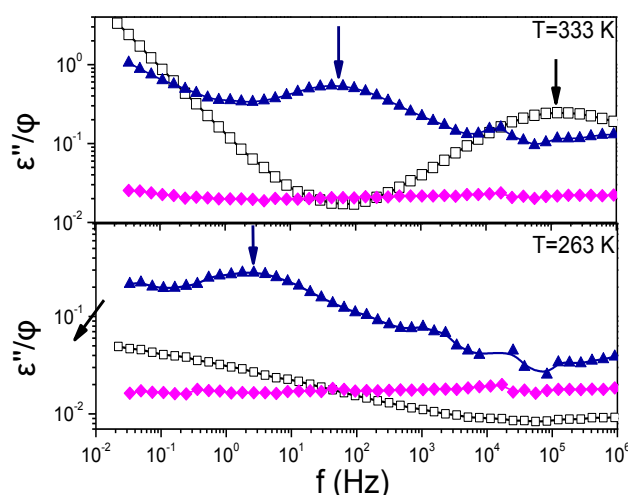
Η τμηματική δυναμική μελετήθηκε στις ελεύθερες νανοράβδους συναρτήσει της θερμοκρασίας, και βρέθηκε η συνήθης ισχυρή θερμοκρασιακή εξάρτηση τύπου VFT (εξίσωση 3.4), όπου $D_T=5.5\pm0.2$, $T_0=241\pm1$ K, και $\tau_0=(5.0\pm0.5)\times10^{-12}$ s. Βρέθηκαν παραπλήσιες παράμετροι VFT σαν το καθαρό PBLG για όλες τις ελεύθερες νανοράβδους, και οι θερμοκρασίες υάλου που υπολογίζονται με παρέκταση της εξίσωσης VFT για $\tau\sim10$ s παρουσιάζονται στην Εικόνα 9.5 ως συνάρτηση της διαμέτρου των νανοπόρων. Αυτά τα αποτελέσματα για την τοπική δυναμική του PBLG δείχνουν ότι οι ελεύθερες νανοράβδοι PBLG είναι όμοιες όχι μόνο στη δομή αλλά και στη δυναμική με το καθαρό PBLG [12]. Ουσιαστικά, δηλαδή μέχρι τα 25 nm, δεν υπάρχει επίδραση του περιορισμού στο είδος της δευτεροταγούς δομής ούτε και στη δυναμική του απόκριση, εκτός από μια ελάττωση της υπερμοριακής οργάνωσης σε ευρεία κλίμακα (ασθενής εξαγωνική οργάνωση των α-ελίκων).



Εικόνα 9.5. Η θερμοκρασία υάλου του PBLG συναρτήσει της διαμέτρου των νανοπόρων, για το καθαρό PBLG (διακεκομμένη γραμμή), τις ελεύθερες νανοράβδους (γεμάτα σύμβολα), και τις ενσωματωμένες νανοράβδους (ανοιχτά σύμβολα). Στην τελευταία περίπτωση, τα δείγματα που παρασκευάστηκαν από τήγμα, από DMF, και από THF φαίνονται με τρίγωνα, κύκλους, και τετράγωνα, αντίστοιχα.

Κατόπιν, μελετήσαμε την αυτοοργάνωση και τη δυναμική των νανοράβδων PBLG μέσα στους νανοπόρους της αλουμίνας. Σε αυτήν την περίπτωση, το PBLG όχι μόνο περιορίζεται γεωμετρικά, αλλά βρίσκεται και σε επαφή με τα τοιχώματα της αλουμίνας. Ως προς τη δευτεροταγή δομή, το ^{13}C NMR έδειξε ότι διατηρούνται οι α -έλικες. Στις νανοράβδους PBLG μέσα σε νανοπόρους διαμέτρου 400 και 200 nm η τοπική δυναμική μοιάζει πολύ με εκείνη του καθαρού PBLG. Όμως στους μικρότερους νανοπόρους βρέθηκε μια συστηματική αλλαγή στη συμπεριφορά των χρόνων τμηματικής χαλάρωσης, όπως φαίνεται στα φάσματα της Εικόνας 9.6. Σε αυτήν την Εικόνα, οι διηλεκτρικές απώλειες του καθαρού PBLG συγκρίνονται με τα αντίστοιχα φάσματα των ενσωματωμένων νανοράβδων PBLG σε μήτρα 35 nm σε δύο θερμοκρασίες, 333 και 263 K. Στην ίδια Εικόνα συμπεριλαμβάνονται φάσματα κενής αλλά σιλιανοποιημένης μήτρας αλουμίνας 25 nm. Η τμηματική δυναμική έχει αντίθετη τάση στις δύο θερμοκρασίες: στα 333 K ο μηχανισμός τμηματικής χαλάρωσης των ενσωματωμένων νανοράβδων μετατοπίζεται προς χαμηλότερες συχνότητες, δηλαδή πιο αργή δυναμική, σε σχέση με το καθαρό PBLG. Αντίθετα, στα 263 K, κάτω από τη θερμοκρασία υάλου του καθαρού PBLG, ο μηχανισμός αυτός γίνεται πιο γρήγορος (μετακίνηση σε υψηλότερες συχνότητες). Αυτό δείχνει τη μεγάλη επίδραση της παρουσίας των τοιχωμάτων των νανοπόρων στην τοπική δυναμική των πολυπεπτιδίων. Αυτό το φαινόμενο δεν είναι πλασματικό εύρημα που οφείλεται στην παρουσία νερού ή άλλων

προσμίξεων, αφού τα φάσματα του άδειου (αλλά με επικάλυψη APTES) δείγματος δεν εμφανίζουν κανένα μηχανισμό στις ίδιες συχνότητες, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.6.

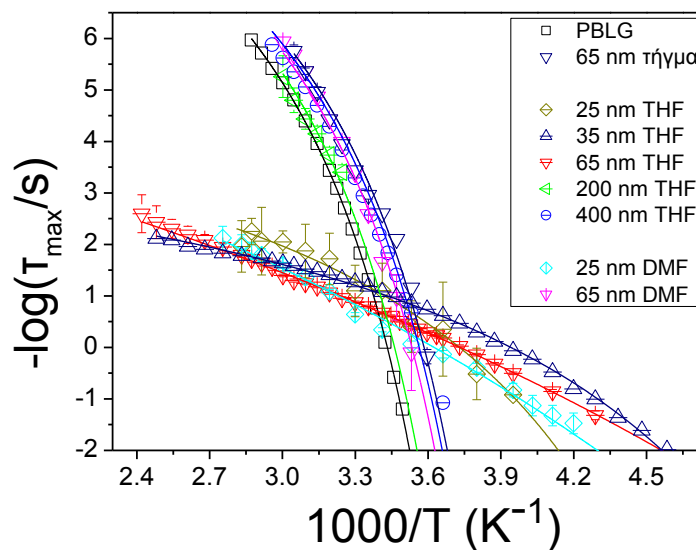


Εικόνα 9.6. Φάσματα διηλεκτρικής απορρόφησης καθαρού PBLG (τετράγωνα), ενσωματωμένων νανοράβδων PBLG 35 nm (τρίγωνα), και μιας άδειας σιλιανοποιημένης μήτρας αλουμίνιας 25 nm (ρόμβοι), στα 333 K (πάνω) και 263 K (κάτω), κανονικοποιημένα ως προς το περιεχόμενο σε PBLG. Στις ενσωματωμένες νανοράβδους, το μέγιστο του α-μηχανισμού (μπλε βέλη) έχει μετακινηθεί σε χαμηλότερες και υψηλότερες θερμοκρασίες, αντίστοιχα, στα 333 και στα 263 K, σε σχέση με το καθαρό PBLG (μαύρα βέλη).

Η “περίεργη” αυτή τμηματική δυναμική του PBLG στους μικρότερους νανοπόρους μπορεί να γίνει καλύτερα αντιληπτή στην Εικόνα 9.7, όπου ο τμηματικός μηχανισμός του PBLG αναπαρίσταται συναρτήσει της αντίστροφης θερμοκρασίας. Η Εικόνα αυτή δείχνει τις μικρές μεταβολές των παραμέτρων VFT για τις ενσωματωμένες νανοράβδους σε νανοπόρους 400 και 200 nm σε σχέση με το καθαρό PBLG. Αντίθετα, η εξάρτηση τύπου VFT της τμηματικής δυναμικής είναι τελείως διαφορετική στους νανοπόρους των 25 και 35 nm (Πίνακας 9.1). Ως αποτέλεσμα, η επίδραση στη θερμοκρασία υάλου είναι εντυπωσιακή: ελάττωση του T_g μέχρι 50 K στους μικρότερους νανοπόρους, ως προς το καθαρό PBLG ή για το ίδιο PBLG σε μεγαλύτερους νανοπόρους.

Πίνακας 9.1. Οι παράμετροι VFT των ενσωματωμένων νανοράβδων PBLG.

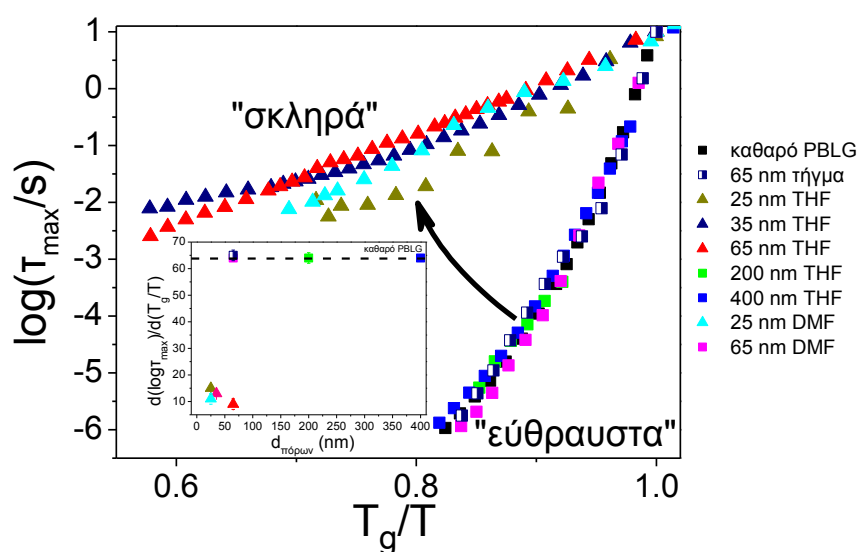
δείγμα	$-\log(\tau_0/s)$	D_T	T_{inf} (K)	T_g (K) ($\tau=10$ s)
καθαρό PBLG	11.34	5.50	241	287±1
65 nm, τήγμα	11.34	5.50	230	275±5
25 nm, THF	4.6	5.1	181	253±20
35 nm, THF	3.55	4.9	158	233±4
65 nm, THF	5.53	27.8	84	239±8
200 nm, THF	11.34	5.50	238.6	284.8±0.5
400 nm, THF	11.34	5.50	232	277±2
25 nm, DMF	6.36	27.8*	95	252±1
65 nm, DMF	11.34	5.50	234	279±5



Εικόνα 9.7. Διάγραμμα Arrhenius των χρόνων τμηματικής χαλάρωσης. Τα σύμβολα αντιστοιχούν σε καθαρό PBLG (τετράγωνα), και νανοράβδους: 400 nm από THF (κύκλος με οριζόντια γραμμή), 200 nm από THF (αριστερό τρίγωνο με οριζόντια γραμμή), 65 nm από τήγμα (κάτω τρίγωνο), 65 nm από THF (κάτω τρίγωνο με οριζόντια γραμμή), 65 nm από DMF (κάτω τρίγωνο με κατακόρυφη γραμμή), 35 nm από THF (πάνω τρίγωνο με οριζόντια γραμμή), 25 nm από THF (ρόμβος με οριζόντια γραμμή), 25 nm από DMF (ρόμβος με κατακόρυφη γραμμή). Οι συνεχείς γραμμές είναι προσαρμογές με την εξίσωση VFT.

Εκτός από την ελάττωση του T_g , η επίδραση του περιορισμού στους νανοπόρους επιδρά σημαντικά και στη θερμοκρασιακή εξάρτηση των χρόνων χαλάρωσης, $\tau(T)$. Η Εικόνα 9.8 δείχνει τους χρόνους τμηματικής χαλάρωσης των ενσωματωμένων νανοράβδων PBLG σε ένα διάγραμμα όπου έχει γίνει κανονικοποίηση ως προς το T_g . Αυτή η αναπαράσταση τονίζει τις πολύ διαφορετικές θερμοκρασιακές εξαρτήσεις των χρόνων χαλάρωσης: το καθαρό PBLG και σε νανοπόρους μεγάλης διαμέτρου έχει δυναμική συμπεριφορά “εύθραυστου” (fragile) ρευστού (δηλαδή η δυναμική είναι πολύ ευαίσθητη σε αλλαγές της θερμοκρασίας), ενώ σε μικρής διαμέτρου νανοπόρους η εξάρτηση προσομοιάζει με “σκληρό” (strong) ρευστό. Ως αποτέλεσμα, ο δείκτης “ευθραυστότητας”, $m = d(\log \tau) / d(T_g / T)_{T=T_g}$ [14], ελαττώνεται από ~65 σε ~10, με ελάττωση της διαμέτρου των νανοπόρων. Τέτοιες μεγάλες μεταβολές στη θερμοκρασιακή εξάρτηση της τμηματικής δυναμικής δεν παρατηρούνται συχνά σε συνθετικά πολυμερή [15]. Επίσης, δεν μπορούν να ερμηνευτούν βάση αυξημένης πυκνότητας στο εσωτερικό των νανοπόρων, διότι αφενός μετρήσεις της πυκνότητας με μικροζυγό δεν έδειξαν κάτι τέτοιο, και αφετέρου η αυξημένη πυκνότητα θα οδηγούσε αύξηση του παρατηρούμενου T_g στις διηλεκτρικές μετρήσεις, καθώς είναι γνωστό ότι η αύξηση της πυκνότητας κάνει πιο

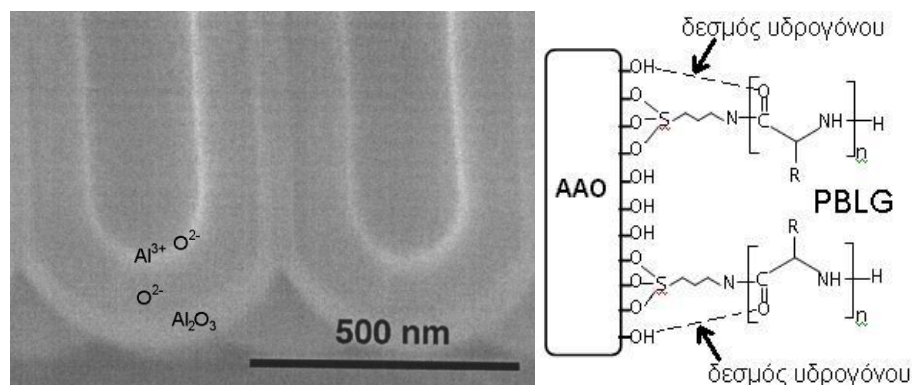
αργό τον α-μηχανισμό λόγω λιγότερου διαθέσιμου ελεύθερου όγκου (παράγραφος 3.2.2.1), με τον ίδιο τρόπο που ενεργεί και η αύξηση της πίεσης [16]. Εδώ υπενθυμίζουμε ότι η απομάκρυνση της αλουμίνας, επέφερε πλήρη εξάλειψη αυτού του φαινομένου, δηλαδή όλες οι ελεύθερες νανοράβδοι ανέκτησαν τόσο τη θερμοκρασία υάλου (~284 K), όσο και την “εύθραυστη” θερμοκρασιακή εξάρτηση. Επίσης, σε νανοπόρους μεγάλης διαμέτρου η δυναμική των άμορφων τμημάτων που βρίσκονται μακριά από τα τοιχώματα, που αποτελούν και την πλειοψηφία, υπερισχύει της δυναμικής του διεπιφανειακού στρώματος.



Εικόνα 9.8. Χρόνοι τμηματικής χαλάρωσης του PBLG μέσα στους νανοπόρους συναρτήσει της κανονικοποιημένης ως προς το T_g θερμοκρασίας. Στο ένθετο σχήμα, φαίνεται ο δείκτης “εύθραυστότητας”, m , συναρτήσει της διαμέτρου των νανοπόρων.

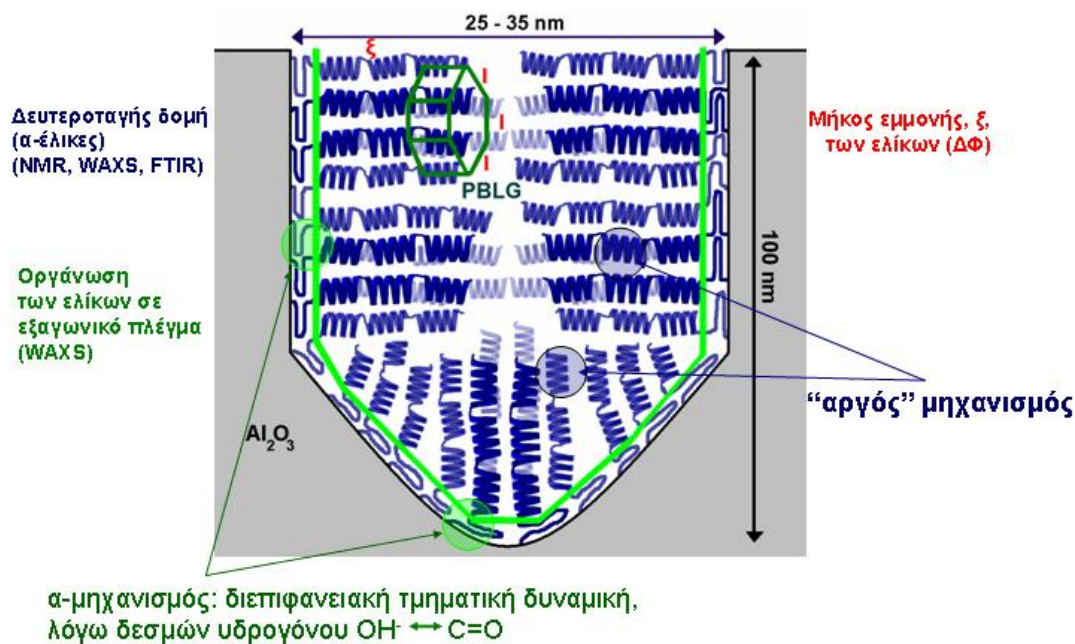
Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν μια ισχυρή επίδραση των επιφανειών στη δυναμική των πολυπεπτιδίων. Όταν τα μονομερή συνδέονται τόσο ισχυρά στην επιφάνεια, ώστε η ενέργεια προσρόφησης να υπερβαίνει τη θερμική, $k_B T$, οι αλυσίδες παγιδεύονται κοντά στα τοιχώματα. Από αυτήν την άποψη, έχει ενδιαφέρον η μελέτη των επιφανειακών ιδιοτήτων της πορώδους αλουμίνας [3-6,17-20]. Πρόσφατα, προτάθηκε μια τριφασική δομή των τοιχωμάτων της αλουμίνας, στην οποία συνυπάρχουν ένα εξωτερικό στρώμα, πλούσιο σε ανιόντα (O^{2-} , Al^{3+}) και πρωτόνια, ένα ενδιάμεσο στρώμα, πλούσιο σε ανιόντα (O^{2-}), και ένα εσωτερικό στρώμα καθαρής αλουμίνας [4], όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.9. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα επιφανειακά φορτία και να αλλάξει τη διαμόρφωσή της σε θερμοκρασίες πάνω από το T_g . Κατά κάποιο τρόπο, η προσρόφηση των τμημάτων PBLG στην επιφάνεια της αλουμίνας οφείλεται στην “αναγνώριση” της επιφανειακής χημικής δομής από τις αλυσίδες. Καθώς είναι γνωστή η τάση των ομάδων OH να

σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το καρβονύλιο [21], αυτοί οι δεσμοί αποσταθεροποιούν τις έλικες κοντά στην επιφάνεια, σχηματίζοντας ένα “διεπιφανειακό στρώμα”. Πειράματα NMR έχουν δείξει ότι πράγματι υπάρχουν στην επιφάνεια ομάδες OH^- στις οποίες δεν προσκολλήθηκαν ομάδες APTES, και έτσι προσφέρονται για το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, όπως φαίνεται σχηματικά στο δεξί τμήμα της Εικόνας 9.9. Η συνεχής δημιουργία και καταστροφή δεσμών υδρογόνου μεταξύ διαφορετικών τμημάτων του πολυπεπτιδίου και της επιφάνειας οδηγούν σε μια δυναμική διαδικασία, η οποία ευθύνεται για την παρατηρούμενη αλλαγή της θερμοκρασιακής εξάρτησης της δυναμικής. Επιπλέον, από πειράματα NMR είναι γνωστό ότι στο σύστημα συνυπάρχουν “γρήγοροι” και “αργοί” ρυθμοί χαλάρωσης, με τους τελευταίους να αντικατοπτρίζονται στην ελάττωση του T_g στις διηλεκτρικές μετρήσεις.



Εικόνα 9.9. (Αριστερά) Εικόνα SEM τομής πορώδους αλουμίνας. Οι πόροι περιβάλλονται από ένα εσωτερικό στρώμα καθαρής αλουμίνας (λευκό), ένα στρώμα πλούσιο σε ανιόντα (σκούρο γκρι), και ένα εξωτερικό στρώμα, πλούσιο σε ανιόντα και κατιόντα (ανοικτό γκρι (εικ. από την αναφ. [4])). (Δεξιά) Οι υδροξυλικές ομάδες που δεν αντιδρούν με τον εκκινητή, σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το καρβονύλιο του PBLG, προξενώντας ένα διεπιφανειακό στρώμα που εμφανίζει μεταβολές στη δυναμική.

Η ποσοτική συσχέτιση μεταξύ των ιόντων OH^- και του ηλεκτρολύτη που χρησιμοποιείται, αποτελούν το αντικείμενο μιας τρέχουσας μελέτης. Γι’ αυτούς τους λόγους, η αλληλεπίδραση ανάμεσα στα προσροφημένα πολυπεπτιδικά τμήματα και τα τοιχώματα της αλουμίνας είναι μεγάλης σημασίας για τον προσδιορισμό του “επιφανειακού” στρώματος και της ασυνήθιστης δυναμικής του. Μια ρεαλιστική εικόνα αυτής της δομής σε νανοπόρους μικρής διαμέτρου, όπως προσδιορίστηκε από στατικές (ακτίνες-X) και δυναμικές ($\Delta\Phi$) μεθόδους, φαίνεται στην Εικόνα 9.10. Αυτό το σχέδιο δείχνει α -έλικες (WAXS, NMR) μειωμένου μήκους εμμονής ($\Delta\Phi$) με εξαγωνική οργάνωση (WAXS). Η χαλάρωση των ελικοειδών τμημάτων προκαλεί τον “αργό” μηχανισμό χαλάρωσης ($\Delta\Phi$), και επιπλέον απεικονίζεται το διεπιφανειακό στρώμα, στο οποίο η τμηματική δυναμική των πεπτιδίων αλλοιώνεται σημαντικά ($\Delta\Phi$).



Εικόνα 9.10. Μια σχηματική – αλλά ρεαλιστική – αναπαράσταση της οργάνωσης του PBLG μέσα τους νανοπόρους, βασισμένη στα πειραματικά ευρήματα. Το PBLG σχηματίζει έλικες που οργάνωνονται σε εξαγωνικό πλέγμα. Κοντά στην επιφάνεια σχηματίζεται ένα στρώμα όπου η τμηματική δυναμική του PBLG μεταβάλλεται δραματικά όταν η διάμετρος των νανοπόρων είναι μικρή.

9.3 Συμπεράσματα

Μια σειρά μητρών πορώδους αλουμίνας χρησιμοποιήθηκε για τον πολυμερισμό πολυπεπτιδίων PBLG, εμβολιασμένων στην επιφάνεια των νανοπόρων. Η μικρότερη διάμετρος των νανοπόρων ήταν 25 nm, δηλαδή σχεδόν δέκα φορές μεγαλύτερη από την ακτίνα της α-έλικας του PBLG, και όμοια με τις διαστάσεις των νανοπόρων των κυττάρων (παρ. 1.1.2.1). Η μελέτη της δομής έδειξε την παρουσία α-ελίκων ανεξάρτητα από τη διάμετρο των νανοράβδων. Οι έλικες είχαν εξαγωνική οργάνωση, αλλά σε περιορισμένη μόνο έκταση. Αυτή ήταν η κυριότερη επίδραση του περιορισμού στη δευτεροταγή δομή. Από την άλλη πλευρά, η επίδραση στη δυναμική ήταν εντονότερη: Στις ελεύθερες νανοράβδους δεν υπήρχε σημαντική επίδραση του περιορισμού. Όταν οι ίδιες νανοράβδοι, όμως, ήταν περιορισμένες μέσα στους νανοπόρους αλουμίνας μικρότερης διαμέτρου, η τοπική δυναμική μεταβαλλόταν σημαντικά. Το πολυπεπτίδιο έγινε από “εύθραυστο” “σκληρό”, και η θερμοκρασία υάλου μειώθηκε μέχρι και 50 K. Η επίδραση της επιφάνειας στη δυναμική γίνεται σημαντική όταν ο περιορισμός είναι ισχυρός (25 nm), και υπερσχύει της δυναμικής των άμορφων τμημάτων που συνεχίζουν να υπάρχουν στο εσωτερικό των νανοπόρων, μακριά από τα τοιχώματα. Λόγω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ υδροξυλικών ομάδων που παραμένουν στην επιφάνεια της αλουμίνας και τμημάτων του πολυπεπτιδίου, δημιουργείται ένα διεπιφανειακό στρώμα που είναι υπεύθυνο για τη μεταβολή της δυναμικής συμπεριφοράς. Ο σχηματισμός και η καταστροφή αυτών των δεσμών υδρογόνου είναι μια

δυναμική διαδικασία, κατά την οποία σε κάθε χρονική στιγμή “συλλαμβάνονται” διαφορετικά τμήματα της αλυσίδας. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι τα διεπιφανειακά φαινόμενα θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη σε εφαρμογές των νανοπόρων σε βιολογικές εφαρμογές.

9.4 Αναφορές

- (1) Rapaport, H.; Kjaer, K.; Jensen, T. R.; Leiserowitz, L.; Tirrell, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12523; Jaworek, T.; Neher, D.; Wegner, G.; Wieringa, R. H.; Schouten, A. J. *Science* **1998**, 279, 57.
- (2) Yang, Z.; Si, S.; Zhang, C. *Micropor. Mesopor. Mater.* **2008**, 111, 359.
- (3) Jessensky, O.; Müller, F.; Gösele, U. *Appl. Phys. Lett.* **1998**, 72, 1173.
- (4) Choi, J.; Luo, Y.; Wehrspohn, R. B.; Hillebrand, R.; Schilling J.; Gösele, U. *J. Appl. Phys.* **2003**, 94, 4757.
- (5) Lee, W.; Ji, R.; Gösele, U.; Nielsch, K. *Nature Materials* **2006**, 5, 741.
- (6) Sulka, C. D. *Nanostr. Mater. Electrochem.* ed. A. Eftekhari, Wiley-VCH, Weinheim, 2008.
- (7) Forrest, J. A.; Jones, R.A.L. in “*Polymer Surfaces, Interfaces and Thin Films*”, Karim, A.; Kumar, S., (eds), Word Scientific, Singapore, 2000; Special Issue on “*Properties of thin polymer films*” Reiter, G., Forrest, J. A. Eds [*Eur. Phys. J E* **2002**, 8, 101]; Special Issue on “*Dynamics in Confinement*” Frick B.; Koza, M.; Zorn, R. Eds [*Eur. Phys. J. E* **2003**, 12, 5].
- (8) Duran, H.; Gitsas, A.; Floudas, G.; Mondeshki, M.; Steinhart, M.; Knoll, W. *Nano Letters* **2008**.
- (9) Floudas, G.; Papadopoulos, P.; Klok, H.-A.; Vandermeulen, G. W. M.; Rodriguez-Hernandez, J. *Macromolecules* **2003**, 36, 3673.
- (10) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Klok, H.-A.; Schnell, I.; Pakula, T. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 81.
- (11) Akeson, M.; Branton, D.; Kasianowicz, J. J.; Brandin, 9.; Deamer, D. W. *Biophysical J.* **1999**, 77, 3227.
- (12) Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Klok, H.-A.; Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *J. Chem. Phys.* **2005**, 122, 224906.
- (13) Gitsas, A.; Floudas, G.; Dietz, M.; Mondeshki, M.; Spiess, H. W.; Wegner, G. *Macromolecules*, **2007**, 40, 8311.
- (14) Bohmer, R.; Ngai, K. L.; Angell, C. A.; Plazek, D. J. *J. Chem. Phys.* **1993**, 99, 4201.

- (15) Schönhals A.; Goering, H.; Schick, C.; Frick, B.; Zorn, R. *Colloid Polym. Sci.* **2004**, 282, 882.
- (16) Floudas, G. in “*Broadband Dielectric Spectroscopy*” chapter 8, Kremer, F.; Schönhals, A. (eds), Springer, Berlin, 2002.
- (17) a) Masuda, H.; Fukuda, K. *Science* **1995**, 268, 1466. b) Masuda, H.; Hasegawa, F.; Ono, S. J. *Electrochem. Soc.* **1997**, 144, L127. c) Masuda, H.; Yada, K.; Osaka, A. *Jpn. J. Appl. Phys. Part 2* **1998**, 37, L1340.
- (18) Nielsch, K.; Choi, J.; Schwirn, K.; Wehrspohn, R. B.; Gösele, U. *Nano Lett.* **2002**, 2, 677.
- (19) Steinhart, M.; Wehrspohn, R. B.; Gösele, U.; Wendorff, J. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 334.
- (20) Steinhart, M.; Murano, S.; Schaper, A. K.; Ogawa, T.; Tsuji, M.; Gösele, U.; Weder, C.; Wendorff, J. H. *Adv. Funct. Mat.* **2005**, 15, 1656.
- (21) Okuom, M. O.; Metin, B.; Blum, F. D. *Langmuir* **2008**, 24, 2539.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

Συμπεράσματα

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η επίδραση της αρχιτεκτονικής και της τοπολογίας καθώς και του περιορισμού και των επιφανειών στην αυτοοργάνωση και στη δυναμική πολυπεπτιδίων. Τα κυριότερα συμπεράσματα στα οποία κατέληξε η μελέτη είναι τα εξής:

Βρέθηκε ότι το ισχυρό θερμοδυναμικό πεδίο που αναπτύσσεται μεταξύ των συστάδων κατά το νανοφασικό διαχωρισμό επιδρά στη σταθερότητα και στο μήκος εμμονής των δευτεροταγών δομών των πολυπεπτιδίων. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι οι ατέλειες των α -ελίκων ελαττώνονται, με συνέπεια την αύξηση του μήκους εμμονής. Ένα σημαντικό συμπέρασμα της εργασίας αυτής, ήταν ότι τα β -φύλλα εμφανίζονται να είναι λιγότερο σταθερά από τις α -έλικες, με αποτέλεσμα να αποσταθεροποιούνται στα συμπολυπεπτίδια.

Η μελέτη της αστεροειδούς τοπολογίας έδειξε ότι υπάρχει ισχυρή επίδραση στο νανοφασικό διαχωρισμό αλλά και στο μήκος εμμονής της δευτεροταγούς δομής. Έτσι, βρέθηκε ότι στα αστέρια υπάρχει τάση για ανάμιξη των συστάδων και για ελάττωση του μήκους εμμονής των α -ελίκων. Αυτό έχει συνέπειες στο σχεδιασμό πολύπλοκων αρχιτεκτονικών για χρήση σε συστήματα στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων.

Η μελέτη δενδριμερών πολυφαινυλενίων με προσαρτημένα πεπτίδια έδειξε ότι ο κυριότερος παράγοντας που ελέγχει την αυτοοργάνωση είναι το μήκος των πολυπεπτιδίων. Ειδικότερα, βρέθηκε ότι η αυτοοργάνωση διέπεται από συσχετίσεις μεταξύ των πυρήνων πολυφαινυλενίων και μεταξύ των α -ελίκων της πολυ-L-λυσίνης, για μικρότερες και μεγαλύτερες αλυσίδες, αντίστοιχα. Επίσης βρέθηκε ότι οι απαιτήσεις συναρμογής της δευτεροταγούς δομής επιφέρουν περιορισμούς στο είδος της δευτεροταγούς δομής με σημασία στο σχεδιασμό MAP, όπου η πρότερη γνώση της δευτεροταγούς δομής είναι απαραίτητη.

Η μελέτη της επίδρασης του περιορισμού και των επιφανειών στην αυτοοργάνωση και στη δυναμική πολυπεπτιδίων έδειξε την παρουσία α -ελίκων ανεξάρτητα από τη διάμετρο των νανοράβδων. Οι έλικες διατηρούσαν την εξαγωνική οργάνωση, αλλά σε περιορισμένη έκταση. Ο περιορισμός δεν είχε σημαντική επίδραση στη δυναμική των ελεύθερων νανοράβδων, αντίθετα, όταν οι ίδιες νανοράβδοι ήταν περιορισμένες σε πόρους μικρής διαμέτρου (25-35 nm), η τοπική δυναμική μεταβαλλόταν σημαντικά. Η μεταβολή της δυναμικής αποδίδεται σε διαρκή σχηματισμό και καταστροφή δεσμών υδρογόνου μεταξύ υδροξυλομάδων των τοιχωμάτων και καρβονυλίων του πολυπεπτιδίου, με αποτέλεσμα τη

δημιουργία ενός διεπιφανειακού στρώματος με διαφορετική δυναμική συμπεριφορά. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν τη σημασία που έχουν τα διεπιφανειακά φαινόμενα, και τη συμβολή τους στην αλληλεπίδραση βιομορίων με νανοπόρους σε βιολογικές εφαρμογές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

Μελλοντικά σχέδια

Η μελέτη συνθετικών συμπολυπεπτιδίων διάφορων αρχιτεκτονικών έδειξε την ισχυρή της επίδραση στη δομή και στη δυναμική τους. Η μελέτη μπορεί να επεκταθεί και σε περισσότερες μορφολογίες, με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση της δυνατότητας ελέγχου της δευτεροταγούς δομής και της δυναμικής σε ένα ή περισσότερα πολυπεπτίδια ταυτόχρονα. Για παράδειγμα, προτείνεται η μελέτη πιο σύνθετων αρχιτεκτονικών, και συστημάτων που περιέχουν μεγαλύτερο πλήθος πεπτιδίων, ώστε να προσομοιάζουν ακόμα περισσότερο στα φυσικά συστήματα. Η ποικιλία των νανοδομών που επιτυγχάνονται σε συμπολυπεπτίδια μπορεί να αυξηθεί με τέτοια συστήματα. Έτσι, η μελέτη τους προσθέτει επιπλέον διαστάσεις στην ιεραρχική δομή.

Επίσης, σε συνέχεια της εργασίας του Κεφαλαίου 9, σχεδιάζεται α) η μελέτη συμπολυπεπτιδίων μέσα σε νανοπόρους, ώστε να εξεταστεί η επίδραση του περιορισμού και των επιφανειών σε πιο περίπλοκες πεπτιδικές δομές και β) η μελέτη πολυπεπτιδίων σε νανοπόρους μικρότερης διαμέτρου (6-8 nm) με εναπόθεση ατμού (vapour deposition), όπου αναμένονται ισχυρότερες επιδράσεις του περιορισμού στην αυτοοργάνωση και στη δυναμική.

Publications originating from this work in refereed journals (see more at www.macromolecules.eu)

- [1] “Hierarchical self-assembly and dynamics of a miktoarm star *chimera* composed of poly(γ -benzyl-L-glutamate), polystyrene and polyisoprene”, Gitsas, A.; Floudas, G.; Mondeshki, M.; Lieberwirth, I.; Spiess, H. W.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N.; Hirao, A. *Macromolecules* **2010**, *43*, 1874.
- [2] “Poly(γ -benzyl-L-glutamate) peptides confined to nanoporous alumina: pore diameter dependence of self-assembly and segmental dynamics”, Duran, H.; Gitsas, A.; Floudas, G.; Mondeshki, M.; Steinhart, M.; Knoll, W. *Macromolecules* **2009**, *42*, 2881.
- [3] “Control of peptide secondary structure and dynamics in poly(γ -benzyl-L-glutamate)-*b*-polyalanine peptides”, Gitsas, A.; Floudas, G.; Mondeshki, M.; Spiess, H. W.; Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *Macromolecules* **2008**, *41*, 8072.
- [4] “Effect of chain topology on the self-organization and dynamics of block copolypeptides: from diblock copolymers to stars”, Gitsas, A.; Floudas, G.; Mondeshki, M.; Butt, H.-J.; Spiess, H. W.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1959.
- [5] “Self-assembly and molecular dynamics of copolymers of γ -methyl-L-glutamate and stearyl-L-glutamate”, Gitsas, A.; Floudas, G.; Dietz, M.; Mondeshki, M.; Spiess, H. W.; Wegner, G. *Macromolecules* **2007**, *40*, 8311.
- [6] “Self-assembly and molecular dynamics of peptide functionalized polyphenylene dendrimers”, Mondeshki, M.; Mihov, G.; Graf, R.; Spiess, H. W.; Müllen, K.; Papadopoulos, P.; Gitsas, A.; Floudas, G. *Macromolecules* **2006**, *39*, 9605.