

ΑΡΙΣΤΕΙΑ Ι

**ΕΡΓΟ: Λειτουργικές Αυτο-οργανούμενες
Νανοδομές από Συμπολυμερή κατά Συστάδες
και Πρωτεΐνες (NANOMACRO) 1129**

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΕ4

**ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ 4.1: Έκθεση αποτελεσμάτων σε 2D
νανοδομές**



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ, ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
πρόγραμμα για την ανάπτυξη

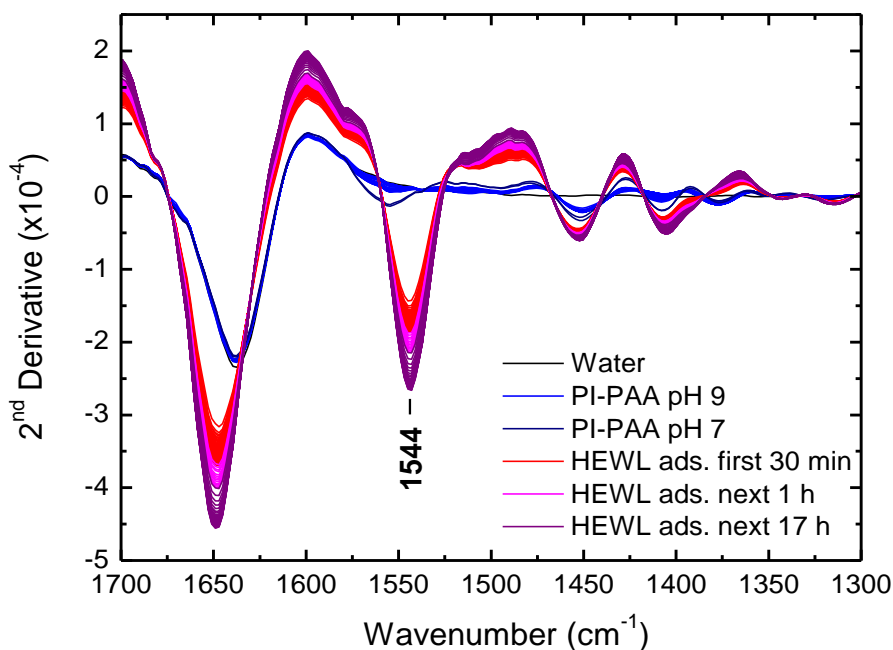


Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Στα πλαίσια του προγράμματος NANOMACRO πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και μελέτη με διάφορες πειραματικές τεχνικές αυτοοργανούμενων υβριδικών νανοδομών σε επιφάνειες με χρήση κάποιων από τα συμπολυμερή κατά συστάδες, των οποίων η αυτοοργάνωση μελετήθηκε στα πλαίσια του έργου, και πρωτεΐνες (2D νανοδομές) μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών. Συγκεκριμένα:

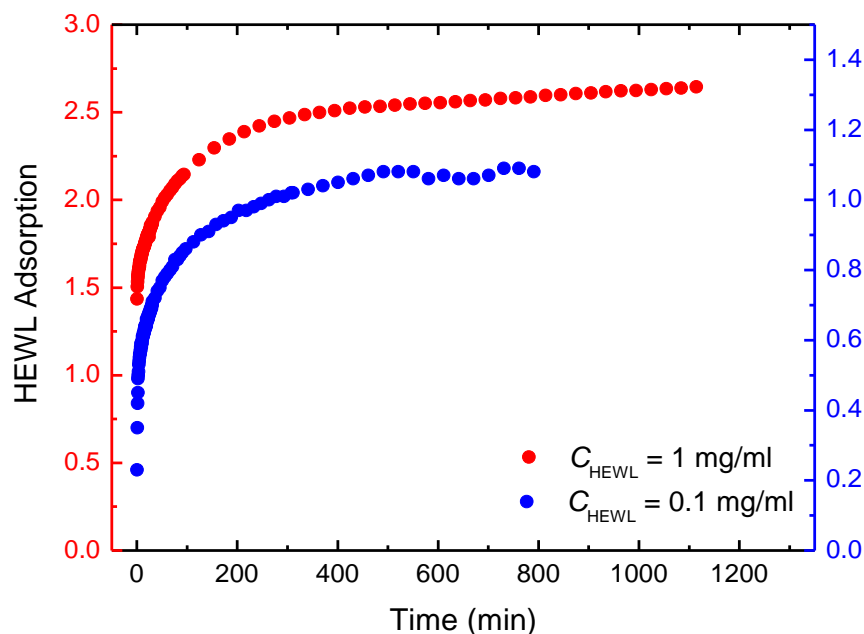
1. Διενεργήθηκαν *in situ* μελέτες της προσρόφησης σε επιφάνεια γερμανίου, με τη χρήση φασματοσκοπίας αποσβεννύμενης ολικής ανάκλασης στο μέσο υπέρυθρο, διαφόρων πολυηλεκτρολυτικών συμπολυμερών από υδατικά διαλύματα, με σκοπό τη μετέπειτα προσρόφηση πρωτεϊνικών μορίων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα συμπολυμερή: PtBS-SCPI, QNPHOS-PEO, PS-PQVP και PI-PAA. Με βάση τα αποτελέσματα αυτών των μελετών κρίθηκε ως καταλληλότερο για περαιτέρω διερεύνηση το συμπολυμερές PI-PAA, καθώς αποδείχθηκε ότι διευκολύνει σε μεγαλύτερο βαθμό (συγκριτικά με τα υπόλοιπα συμπολυμερή) τη μετέπειτα προσρόφηση των πρωτεϊνικών μορίων.

Αρχικά μελετήθηκε η προσρόφηση του συμπολυμερούς αυτού καθ' αυτού και εν συνεχεία διερευνήθηκε η προσρόφηση πρωτεϊνικών μορίων λυσοζύμης (HEWL) στο ήδη προσροφημένο στρώμα του συμπολυμερούς. Ένα τυπικό πείραμα προσρόφησης περιελάμβανε το αρχικό στάδιο του σχηματισμού ενός προσροφημένου στρώματος PI-PAA, μέσω της προσρόφησης από διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml σε pH 9. Στη συνέχεια η κυψελίδα ξεπλενόταν με ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7 και ακολουθούσε η προσρόφηση της HEWL από διάλυμα διαφορετικής συγκέντρωσης σε pH 7. Η καταγραφή της προσρόφησης γινόταν μέσω των φασμάτων 2^{ης} παραγώγου (καθώς στο φάσμα απορρόφησης κυριαρχεί η φασματική υπογραφή του υδατικού μέσου) και συγκεκριμένα μέσω της έντασης της κορυφής περί τους 1544 cm⁻¹, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1 όπου παρουσιάζεται η φασματική εξέλιξη για ένα πείραμα προσρόφησης, συνολικής διάρκειας περί τις 18 ώρες, διαλύματος HEWL συγκέντρωσης 1 mg/ml σε pH 7, στο ήδη προσροφημένο στρώμα του PI-PAA.



Σχήμα 1: Φασματική εξέλιξη 2^{ης} παραγώγου για ένα *in situ* πείραμα προσρόφησης HEWL συγκέντρωσης 1 mg/ml σε pH 7, στο ήδη προσροφημένο στρώμα του PI-PAA.

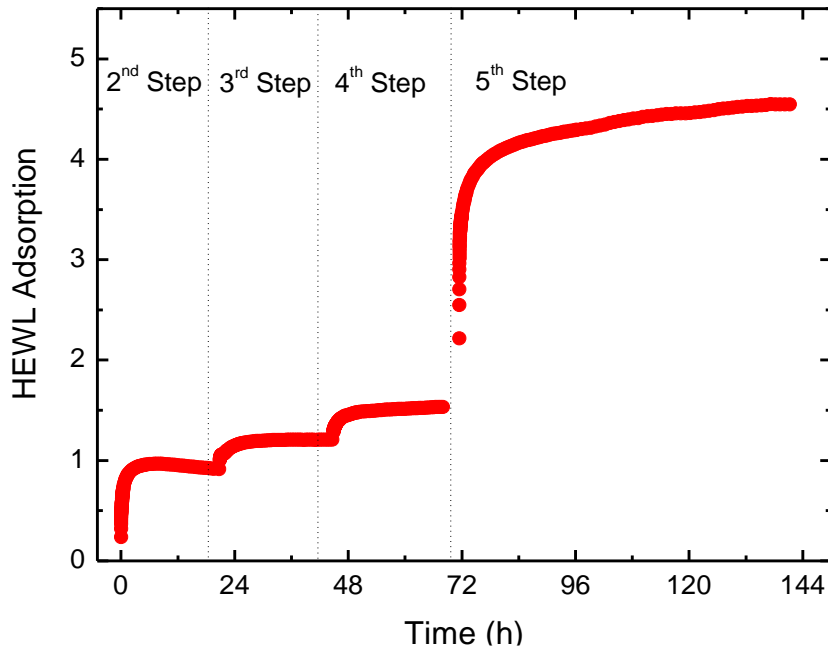
Με τον τρόπο αυτό προκύπτουν οι κινητικές της προσρόφησης που παρουσιάζονται στο Σχήμα 2 για δύο διαφορετικές μελέτες προσρόφησης HEWL από διαλύματα συγκέντρωσης 0.1 και 1 mg/ml σε pH 7. Όπως διαπιστώνεται η συνολική ποσότητα των προσροφημένων πρωτεϊνικών μορίων (ανάλογη της έντασης της κορυφής) εξαρτάται από τη συγκέντρωση του υπερκείμενου διαλύματος.



Σχήμα 2: Κινητικές προσρόφησης από διαλύματα HEWL συγκέντρωσης 0.1 και 1 mg/ml σε pH 7, στο ήδη προσροφημένο στρώμα του PI-PAA.

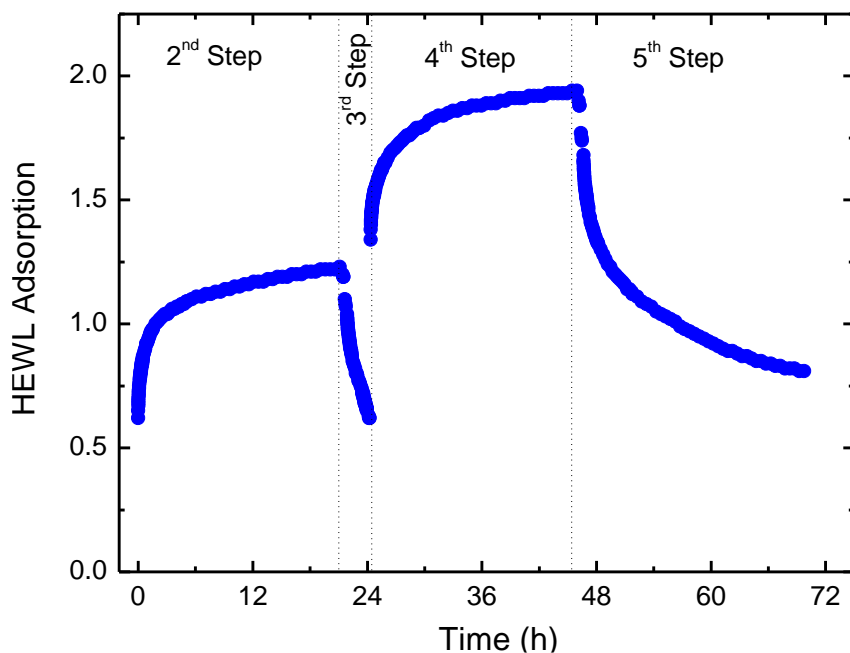
Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές μελέτες προσρόφησης πολλαπλών σταδίων/στρωμάτων του συμπολυμερούς PI-PAA και πρωτεϊνικών μορίων λυσοζύμης ως εξής:

A. Στην πρώτη μελέτη, το πρώτο στάδιο της προσρόφησης αφορούσε το σχηματισμό ενός προσροφημένου στρώματος του συμπολυμερούς PI-PAA (από διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml σε pH 9), πάνω στο οποίο εν συνεχεία προσροφήθηκαν μόρια λυσοζύμης από υδατικό διάλυμα συγκέντρωσης 0.1 mg/ml και pH 7 (2^ο στάδιο). Κατά τα επόμενα δύο στάδια (3^ο και 4^ο) πραγματοποιήθηκε επανατροφοδότηση της προσρόφησης της πρωτεΐνης μέσω εκ νέου γεμίσματος της κυψελίδας με διαλύματα HEWL 0.1 και 1 mg/ml pH 7 αντίστοιχα, ώστε να διερευνηθεί η μέγιστη δυνατότητα κάλυψης της επιφάνειας, καθώς και η εξάρτησή της από τη συγκέντρωση του υπερκείμενου διαλύματος. Με τον τρόπο αυτό εξακριβώθηκε ότι η επανατροφοδότηση της προσρόφησης οδηγεί στην αύξηση της ποσότητας των προσροφημένων πρωτεϊνικών μορίων σε μικρό βαθμό, ο οποίος συσχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση του υπερκείμενου πρωτεϊνικού διαλύματος. Τέλος, πραγματοποιήθηκε εκ νέου προσρόφηση μικκυλίων του συμπολυμερούς PI-PAA πάνω από την ήδη προσροφημένη πρωτεΐνη και επανατροφοδότηση με διάλυμα HEWL 1 mg/ml pH 7 (5^ο στάδιο) και όπως διαπιστώθηκε το ενδιάμεσο στρώμα των προσροφημένων μικκυλίων οδήγησε σε σημαντική αύξηση της προσρόφησης των πρωτεϊνικών μορίων. Η συνολική κινητική της προσρόφησης για το πείραμα αυτό παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.



Σχήμα 3: Συνολική κινητική της προσρόφησης για την πρώτη μελέτη πολλαπλών σταδίων/στρωμάτων.

Β. Στη δεύτερη μελέτη, το πρώτο στάδιο της προσρόφησης αφορούσε το σχηματισμό ενός προσροφημένου στρώματος του συμπολυμερούς PI-PAA-4 (το οποίο είχε χρησιμοποιηθεί και στις προηγούμενες μελέτες), πάνω στο οποίο εν συνεχεία προσροφήθηκαν μόρια λυσοζύμης από υδατικό διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml και pH 7 (2^ο στάδιο). Κατά το επόμενο στάδιο (3^ο) πραγματοποιήθηκε προσρόφηση (πάνω από την ήδη προσροφημένη πρωτεΐνη) μικκυλίων συμπολυμερούς PI-PAA-1, κατάλληλης σύστασης ώστε τα σχηματιζόμενα μικκύλια να χαρακτηρίζονται από μικρού μεγέθους πυρήνα και μεγάλη κορώνα (αντίθετα από τη διαμόρφωση των μικκυλίων PI-PAA-4 που προσροφήθηκαν αρχικά). Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε επανατροφοδότηση της προσρόφησης της πρωτεΐνης μέσω εκ νέου γεμίματος της κυψελίδας με διάλυμα HEWL 1 mg/ml pH 7 (4^ο στάδιο) και στο τελικό στάδιο (5^ο) πραγματοποιήθηκε εκ νέου προσρόφηση μικκυλίων συμπολυμερούς PI-PAA-1. Όπως διαπιστώθηκε η ιδιαίτερα ισχυρή αλληλεπίδραση των μικκυλίων του συμπολυμερούς PI-PAA-1 με τα μόρια της πρωτεΐνης (πιθανότατα λόγω του αυξημένου ποσοστού PAA) είχε ως αποτέλεσμα την αποπροσρόφηση της πρωτεΐνης από το ήδη σχηματισμένο στρώμα. Στο Σχήμα 4 παρουσιάζεται η συνολική κινητική της προσρόφησης της συγκεκριμένης μελέτης.

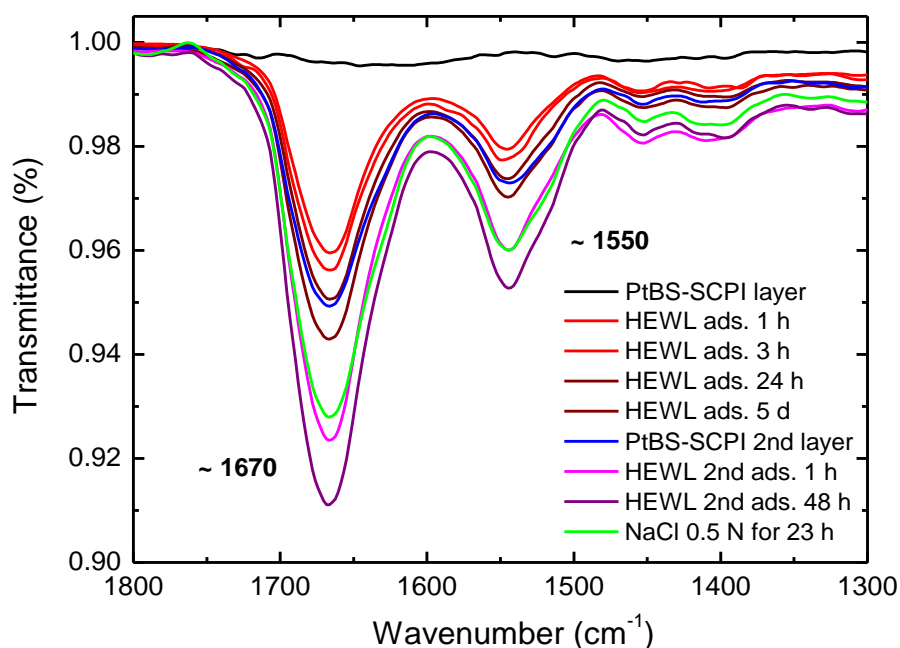


Σχήμα 4: Συνολική κινητική της προσρόφησης για τη δεύτερη μελέτη πολλαπλών σταδίων/στρωμάτων.

2. Εκτός από τις παραπάνω *in situ* μελέτες, παρασκευάστηκαν *ex situ* λεπτά υμένια με χρήση των συμπολυμερών PtBS-SCPI, PS-PQVP και PI-PAA, τόσο με τη μέθοδο της εμφάνισης όσο και με τη μέθοδο της περιστροφικής επίστρωσης από διάλυμα, σε υποστρώματα πυριτίου καθώς και επιχρυσωμένου γυαλιού. Εν συνεχεία μελετήθηκε η προσρόφηση πρωτεϊνικών μορίων HEWL στην επιφάνεια των υμενίων αυτών και ως καταλληλότερα για περαιτέρω διερεύνηση αποδείχθηκαν τα λεπτά υμένια των συμπολυμερών PtBS-SCPI και PI-PAA.

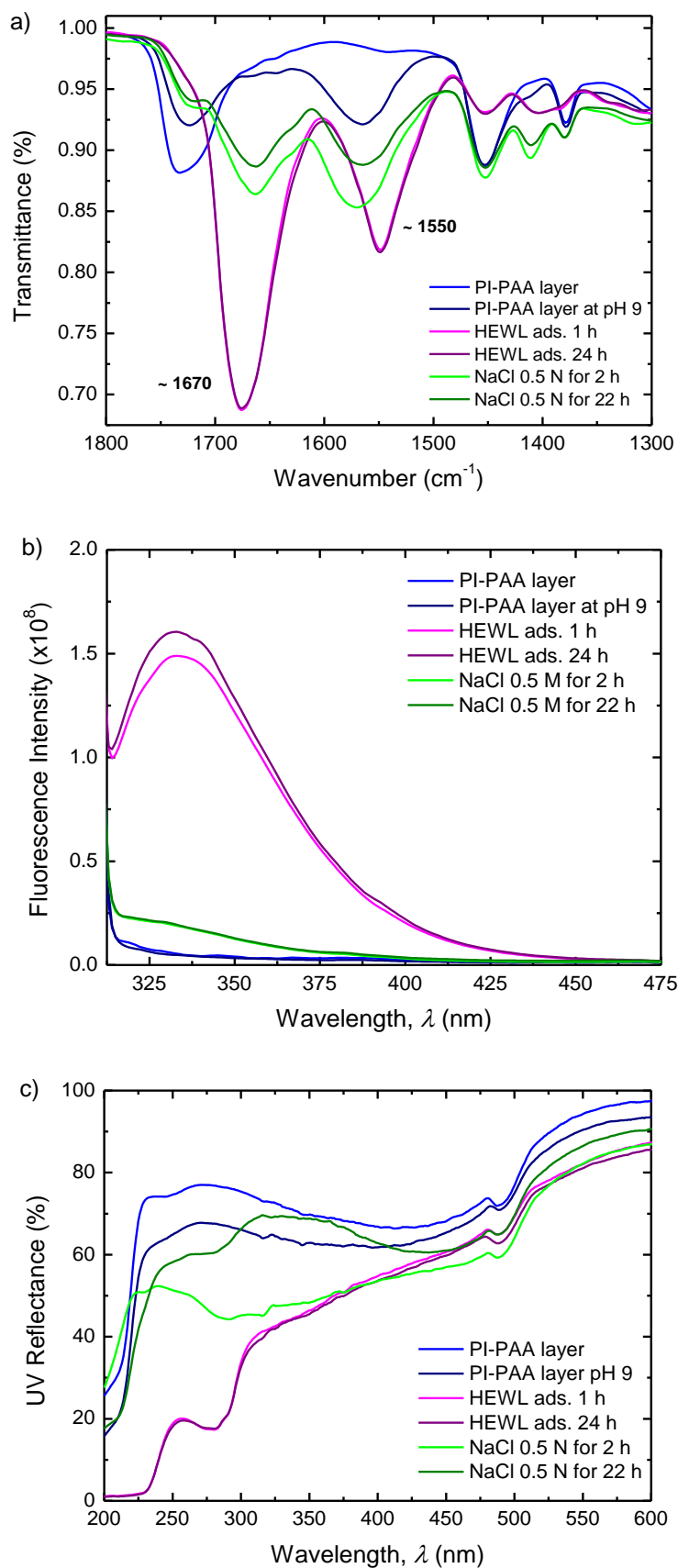
Αναλυτικότερα, διενεργήθηκε λεπτομερής μελέτη της προσρόφησης πρωτεϊνικών μορίων λυσοζύμης πάνω σε λεπτά υμένια του συμπολυμερούς PtBS-SCPI, τα οποία σχηματίστηκαν σε υποστρώματα επιχρυσωμένου γυαλιού μέσω προσρόφησης από υδατικό διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml σε pH 7. Τα υμένια παρέμειναν στο διάλυμα του συμπολυμερούς για τουλάχιστον 12 ώρες ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή κάλυψη της επιφάνειας. Εν συνεχεία τα υμένια ξεπλένονταν με νερό και εμβαπτίζονταν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (από μερικές ώρες έως μερικές ημέρες) σε διάλυμα HEWL συγκέντρωσης 1 mg/ml σε pH 7. Μετά την επίτευξη της μέγιστης προσρόφησης της πρωτεΐνης τα υμένια τοποθετήθηκαν εκ νέου στο διάλυμα του PtBS-SCPI με σκοπό τη δημιουργία ενός δεύτερου στρώματος συμπολυμερούς και εν συνεχεία και πάλι στο διάλυμα της HEWL, ώστε να διερευνηθεί η επιρροή του δεύτερου στρώματος του PtBS-SCPI στη μετέπειτα προσρόφηση της πρωτεΐνης. Το τελικό στάδιο αφορούσε την εμφάνιση των υμενίων σε υδατικό διάλυμα NaCl 0.5 M, γεγονός που είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αποπροσρόφηση των πρωτεϊνικών μορίων. Η καταγραφή της ποσότητας των προσροφημένων πρωτεϊνικών μορίων (καθώς και η εξαγωγή πληροφοριών σχετικά με τη δομή του προσροφημένου στρώματος) πραγματοποιήθηκε με χρήση της μεθόδου εφασματομετρικής ανακλαστικότητας φασματοσκοπίας μέσου υπερύθρου. Η φασματική εξέλιξη της μελέτης προσρόφησης που περιγράφηκε παραπάνω δίνεται στο Σχήμα 5. Όπως διαπιστώνεται η ποσότητα των προσροφημένων πρωτεϊνικών μορίων εξαρτάται από

το χρόνο παραμονής στο πρωτεϊνικό διάλυμα, ο σχηματισμός του δεύτερου στρώματος του συμπολυμερούς οδηγεί σε ενίσχυση της προσρόφησης και τέλος η διαμόρφωση και κατά συνέπεια η δραστηριότητα της πρωτεΐνης διατηρούνται κατά την προσρόφηση.



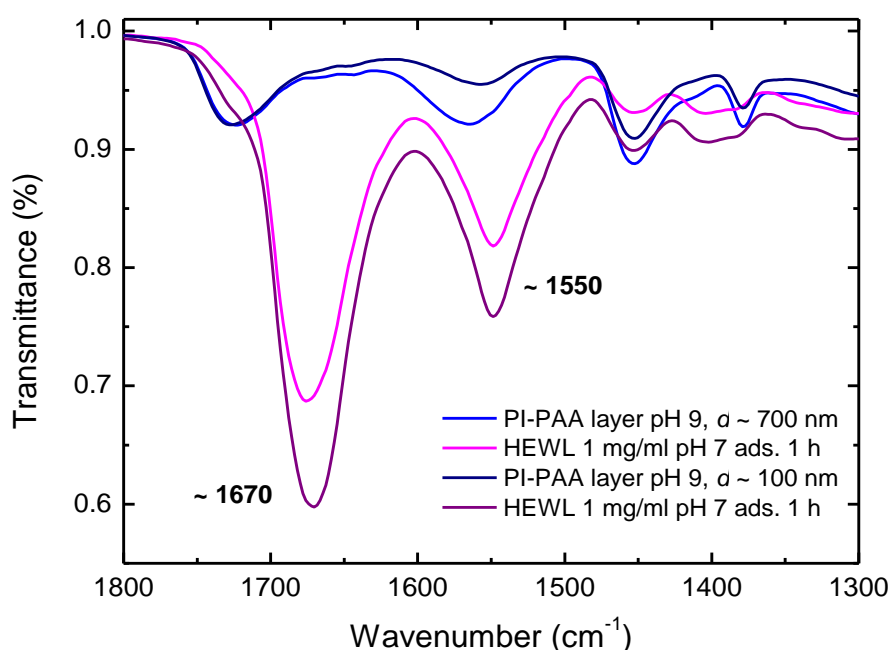
Σχήμα 5: Φασματική εξέλιξη για ένα *ex situ* πείραμα προσρόφησης HEWL συγκέντρωσης 1 mg/ml σε pH 7, στο ήδη προσροφημένο στρώμα του PtBS-SCPI.

Επιπροσθέτως, διενεργήθηκε μελέτη της προσρόφησης HEWL πάνω σε λεπτά υμένια του συμπολυμερούς PI-PAA, τα οποία σχηματίστηκαν επίσης σε υποστρώματα επιχρυσωμένου γυαλιού με τη μέθοδο της περιστροφικής επίστρωσης από οργανικό διάλυμα (*spin coating*). Η διαδικασία της προσρόφησης ήταν παρόμοια με αυτή που ακολουθήθηκε για τα υμένια του συμπολυμερούς PtBS-SCPI. Συγκεκριμένα, το αρχικό στάδιο αφορούσε την εμφύσηση των υμενίων του PI-PAA σε υδατικό διάλυμα με pH 9 για μερικές ώρες, ώστε να επιτευχθεί η αποπρωτονίωση των καρβοξυλικών ομάδων των συστάδων του PAA και ως εκ τούτου η ανάπτυξη φορτίων στην επιφάνεια του προσροφημένου στρώματος. Εν συνεχεία τα υμένια ξεπλένονταν με νερό και εμβαπτιζόνταν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα σε διάλυμα HEWL συγκέντρωσης 1 mg/ml σε pH 7. Όπως παρατηρήθηκε, σε αυτή την περίπτωση ο μέγιστος βαθμός κάλυψης της επιφάνειας με πρωτεϊνικά μόρια επιτυγχάνεται σχετικά γρήγορα, δηλαδή από την πρώτη ώρα της παραμονής του υμενίου στο πρωτεϊνικό διάλυμα. Τέλος, διερευνήθηκε και πάλι η επίδραση αλατούχου διαλύματος 0.5 M στο ήδη προσροφημένο στρώμα και διαπιστώθηκε ότι οδήγησε σε σημαντική αποπροσρόφηση της πρωτεΐνης. Εκτός από μετρήσεις εφαπτομενικής ανακλαστικότητας φασματοσκοπίας μέσω υπερύθρου, τα υμένια αυτά μελετήθηκαν επίσης με χρήση μεθόδων κατοπτρικής ανακλαστικότητας φασματοσκοπικών τεχνικών φθορισμού και υπεριώδους-ορατού. Η συγκεκριμένη φασματική εξέλιξη και για τις τρεις διαφορετικές τεχνικές παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.



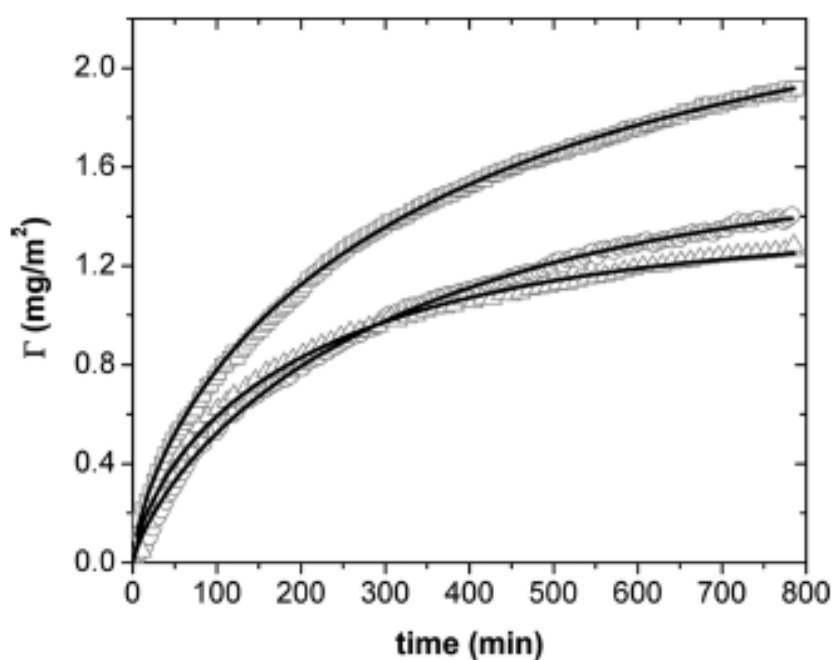
Σχήμα 6: Φασματική εξέλιξη τεχνικών ανακλαστικότητας a) μέσω υπέρυθρου, b) φθορισμού και c) υπεριώδους για ένα *ex situ* πείραμα προσρόφησης HEWL συγκέντρωσης 1 mg/ml σε pH 7, στο ήδη σχηματισμένο στρώμα του PI-PAA.

Τέλος, διερευνήθηκε η επίδραση του πάχους του αρχικού στρώματος του συμπολυμερούς PI-PAA στη μετέπειτα προσρόφιση της λυσοζύμης. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο του spin coating δύο διαφορετικά υμένια πάχους περί τα 100 και 700 nm, αντίστοιχα (το πάχος των υμενίων προσδιορίστηκε με τη χρήση προφίλομέτρου), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για την προσρόφιση πρωτεϊνικών μορίων από διάλυμα HEWL συγκέντρωσης 1 mg/ml σε pH 7. Στο Σχήμα 7 παρουσιάζονται τα φάσματα ανακλαστικότητας μέσω υπερύθρου των αρχικών υμενίων του PI-PAA διαφορετικού πάχους, καθώς και τα αντίστοιχα φάσματα μετά από 1 ώρα εμβάπτισης στο πρωτεϊνικό διάλυμα. Όπως διαπιστώνεται η ποσότητα των προσροφημένων πρωτεϊνικών μορίων είναι μεγαλύτερη για το λεπτότερο υμένιο. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται στη μεγαλύτερη δυνατότητα αναδιάταξης του λεπτότερου στρώματος του συμπολυμερούς PI-PAA, με αποτέλεσμα περισσότερες φορτισμένες ομάδες (οι οποίες λειτουργούν ως σημεία πρόσδεσης των μορίων της HEWL) να βρίσκονται στην επιφάνεια του.



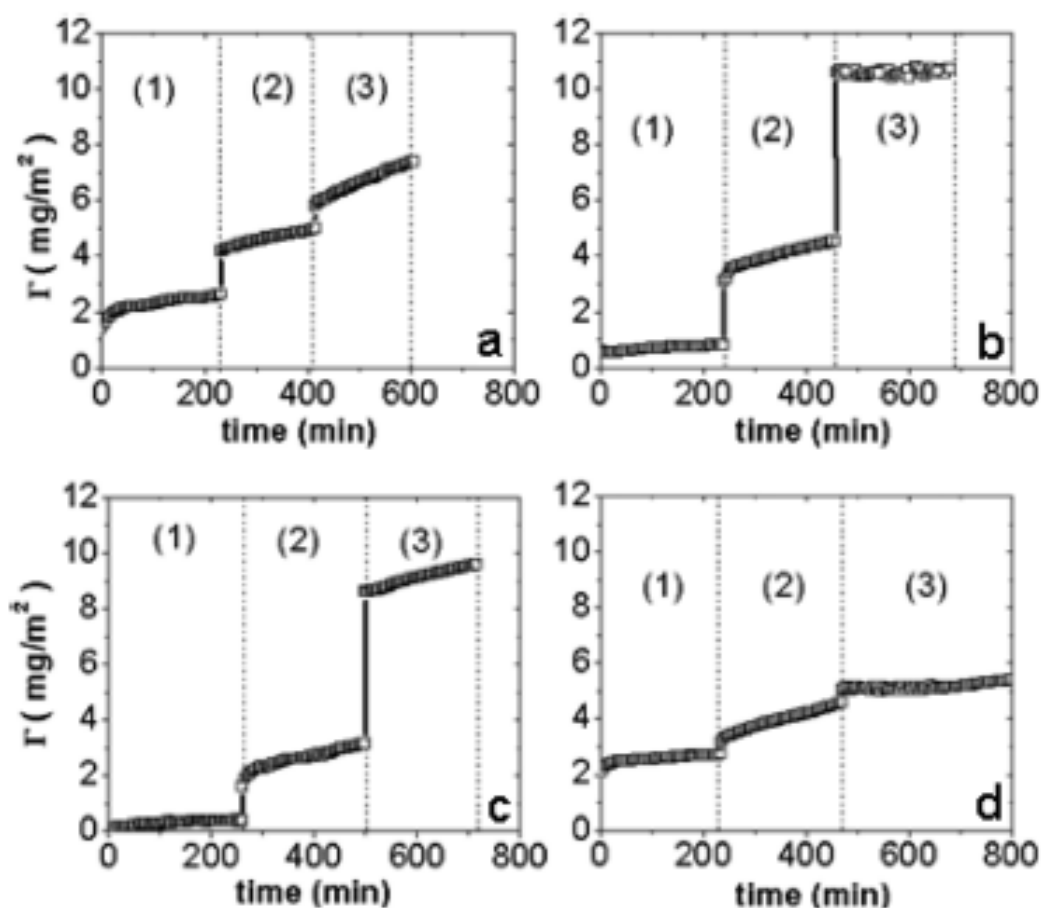
Σχήμα 7: Φάσματα ανακλαστικότητας μέσω υπερύθρου υμενίων PI-PAA διαφορετικού πάχους (100 και 700 nm), καθώς και τα αντίστοιχα φάσματα μετά από εμβάπτιση για 1 ώρα σε διάλυμα HEWL συγκέντρωσης 1 mg/ml σε pH 7.

3. Η αλληλεπίδραση της λυσοζύμης (θετικά φορτισμένη) με προσροφημένο στρώμα μικυλλίων από πολυ(τεταρτοταγές βουτυλο στυρένιο)- πολυ((σουλφαμινοκαρβοξυλο)ισοπρένιο) (PtBS-SCPI) (PtBS: υδρόφοβος πυρήνας, SCPI: αλυσίδα πολυηλεκτρολύτη αρνητικά φορτισμένη) από υδατικά διαλύματα (pH7), διερευνήθηκε με τη μέθοδο συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR) και τη μέθοδο μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM). Τα πειράματα έγιναν στο Πανεπιστήμιο Πατρών στο Τμήμα Φυσικής (Εργαστήριο Φυσικής Στερεάς Κατάστασης). Χρησιμοποιήθηκαν επιφάνειες γυάλινων πρισμάτων με επίστρωση αργύρου πάχους 48-52 nm.



Σχήμα 8: Προσροφημένο ποσό σε συνάρτηση με το χρόνο για προσρόφηση στην διεπιφάνεια Ag/H₂O για διαλύματα PtBS-b-SCPI 0.5 (□), 0.3 (○), and 0.1 (△) mg/mL. Οι συνεχείς καμπύλες είναι προσαρμογή με stretched-exponentials [1].

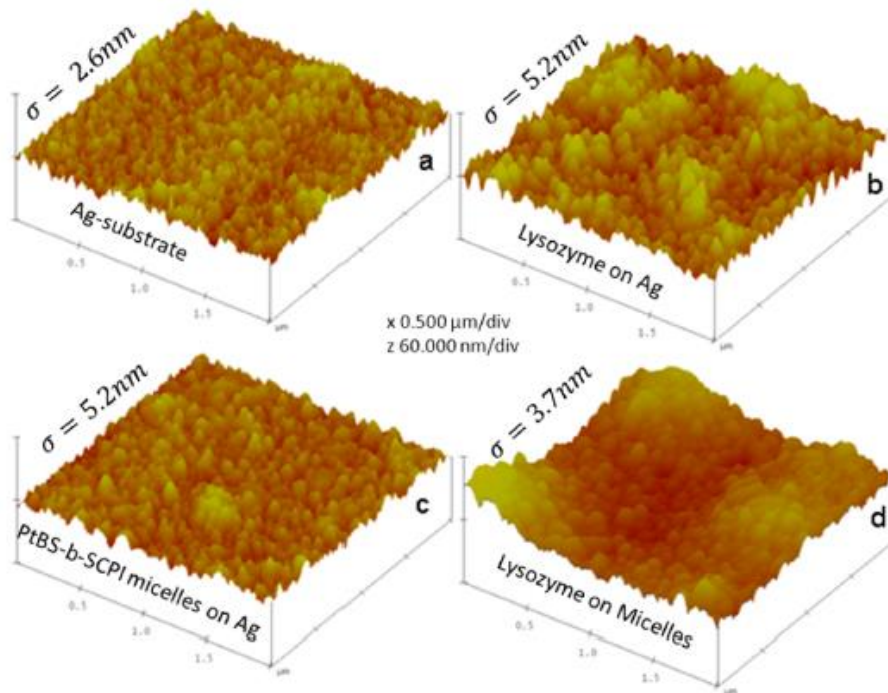
Αρχικά μελετήθηκε η κινητική της προσρόφησης των μικυλλίων με SPR (σχήμα 8). Το τελικό προσροφημένο ποσό συμπολυμερούς αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος και η κινητική γίνεται πιο αργή. Οι καμπύλες περιγράφονται με stretched-exponentials. Η ανάλυση έδειξε ότι τα μικύλλια απέχουν ~40nm όταν έχουν προσροφηθεί, δηλαδή προσροφούνται σε τέτοιες ποσότητες ώστε να επικαλύπτονται οι κορόνες τους (ακτίνα ~100nm) και όχι οι πυρήνες τους (ακτίνα ~4nm) (soft overlap) [1]. Τα προσροφημένα στρώματα που δημιουργήθηκαν από 0.1, 0.3 και 0.5 mg/ml συγκέντρωση μικυλλίων στο διάλυμα, καλούνται για συντομία στρώμα “χαμηλής”, “ενδιάμεσης” και “υψηλής” κάλυψης αντίστοιχα. Επιπλέον, η προσρόφηση των μικυλλίων καθώς και η σύμπλεξη της λυσοζύμης αποδείχθηκε ότι είναι μη-αντιστρεπτή καθώς τα προσροφημένα ποσά δεν άλλαξαν όταν τα αντίστοιχα διαλύματα αντικαταστάθηκαν με καθαρό ρυθμιστικό διάλυμα σε επαφή με τα στρώματα.



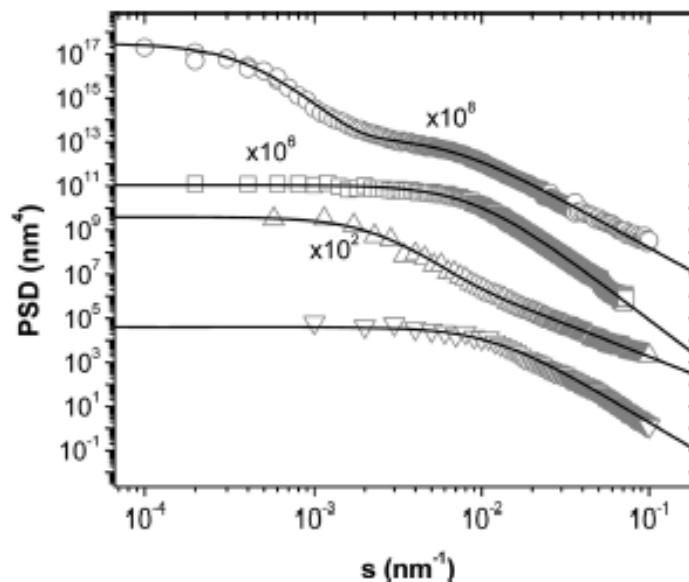
Σχήμα 9: Συμπλεγμένο ποσό λυσοζύμης σε στρώματα “χαμηλής” (a), “ενδιάμεσης” (b) και “υψηλής” κάλυψης από μικύλλια PtBS-b-SCPI, καθώς και σε στρώμα “υψηλής” κάλυψης από διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης άλατος (NaCl). Οι 3 περιοχές (κάθετες γραμμές) αντιστοιχούν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις λυσοζύμης στο διάλυμα: (1) 0.01 mg/ml, (2) 0.03 mg/ml, και (3) 0.1 mg/ml [1].

Τα προσροφημένα στρώματα μικυλλίων δείχνουν να έχουν (1) αυξανόμενη χωρητικότητα σε λυσοζύμη και (2) αυξανόμενη αντίσταση στην είσοδο λυσοζύμης καθώς η κάλυψη με μικύλλια αυξάνεται. Όταν η συγκέντρωση του άλατος είναι μεγάλη το στρώμα μειώνει την αντίσταση και την χωρητικότητα του σε σύμπλεξη με λυσοζύμη (Σχήμα 9).

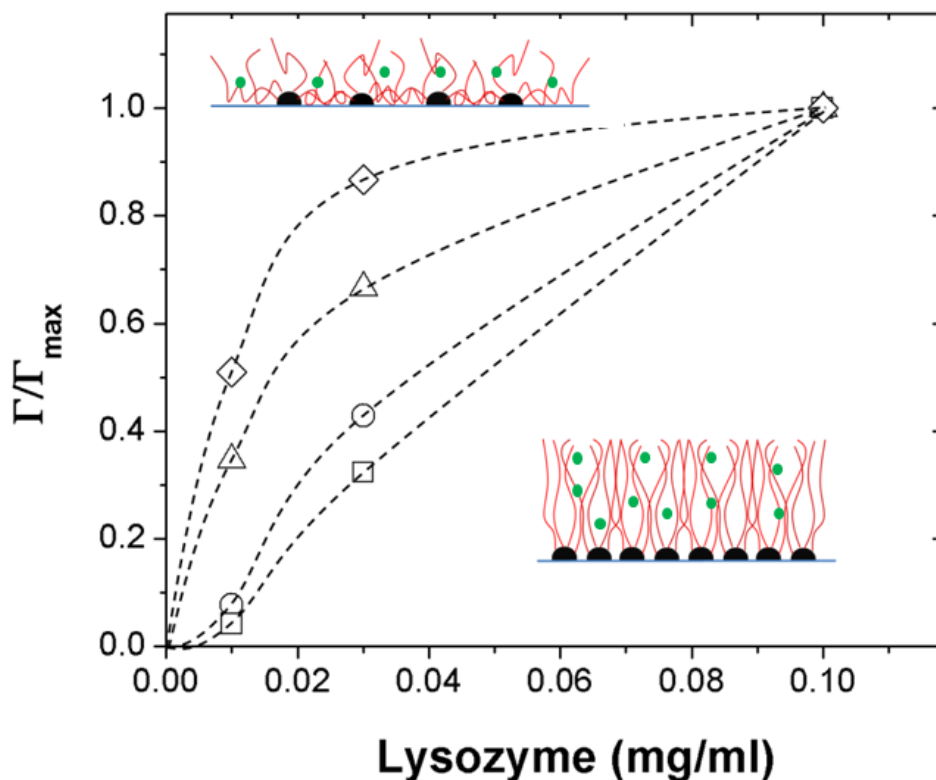
Μετρήσεις AFM (σχήμα 10) δείχνουν ότι τα προσροφημένα στρώματα έχουν ανάγλυφη δομή σε χωρικές κλίμακες αντίστοιχες του μεγέθους των μικυλλίων που σημαίνει ότι τα μικύλλια κρατάνε τη δομή τους κατά την αλληλεπίδραση με την επιφάνεια Ag χωρίς να διασπαστούν [1]. Στο σχήμα 11 γίνεται εμφανές ότι η προσρόφηση της λυσοζύμης σε Ag ή μικύλλια δημιουργεί μια πρόσθετη μεγάλη κλίμακα μήκους (νησίδες σχήματος 10). Ακόμη η μικρή κλίμακα μήκους δείχνει ότι η λυσοζύμη ακολουθεί τη δομή των προϋπάρχοντων στρωμάτων.



Σχήμα 10: Απεικονίσεις AFM 3-D για επιφάνειες (a) στρώματος Ag, (b) προσροφημένης λυσοζύμης σε Ag, (c) προσροφημένων μικυλλίων PtBS-b-SCPI σε Ag(υψηλή κάλυψη) και (d) προσροφημένης λυσοζύμης σε είδη προσροφημένα μικύλλια. Η μέση τραχύτητα σ αναγράφεται για κάθε περίπτωση [1].



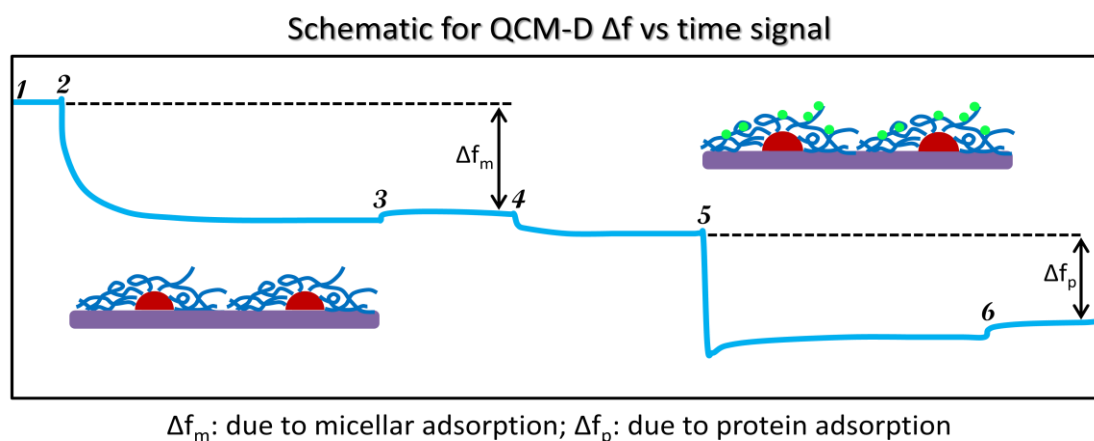
Σχήμα 11: Ακτινικές συναρτήσεις φασματικής πυκνότητας ισχύος (power spectral density) των επιφανειών που μελετήθηκαν με AFM. Υπόστρωμα Ag (∇), προσροφημένη λυσοζύμη (Δ), προσροφημένα μικύλλια (\square), και λυσοζύμη προσροφημένη σε στρώμα μικυλλίων (\circ). Οι καμπύλες είναι προσαρμογή για εξαγωγή χαρακτηριστικών μηκών [1].



Σχήμα 12: Κανονικοποιημένο προσροφημένο ποσό λυσοζύμης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση λυσοζύμης στο διάλυμα. “υψηλή” (τετράγωνα), “ενδιάμεση” (κύκλοι), “χαμηλή” (τρίγωνα) και “υψηλή” με 0.15M NaCl (διαμάντια) κάλυψη. Οι διακεκομμένες γραμμές είναι για καθοδήγηση του ματιού. Φαίνεται επίσης και σχηματικό διάγραμμα για σενάριο σύμπλεξης σε “υψηλή” (κάτω) και “χαμηλή” (πάνω) κάλυψη [1].

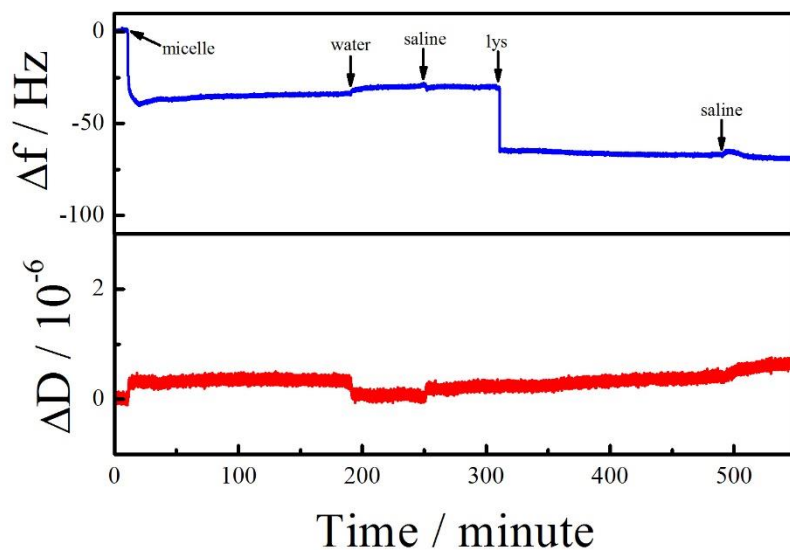
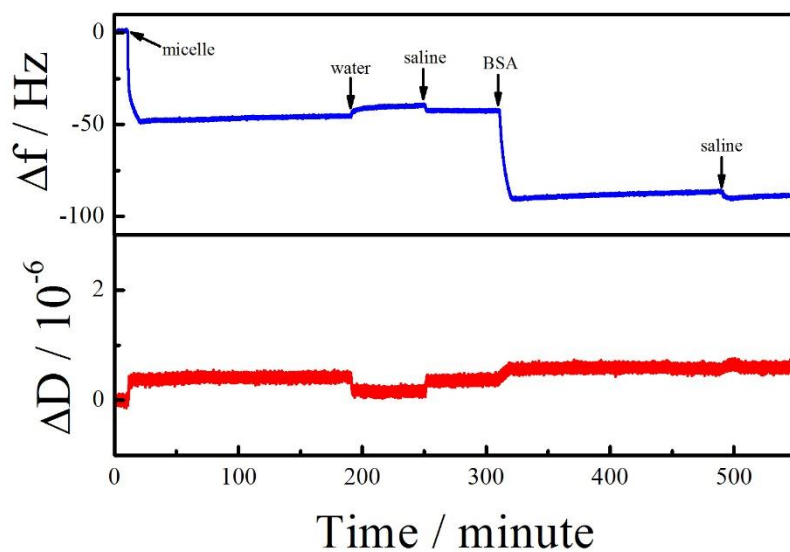
Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης συνοψίζονται στο σχήμα 12. Τα προσροφημένα στρώματα μπορούν να έχουν διαμορφώσεις ανάμεσα σε δύο ακραίες περιπτώσεις. Στην χαμηλή κάλυψη οι αλυσίδες πολυηλεκτρολύτη της κορόνας του μικυλλίου έχουν πολλές επαφές με την επιφάνεια και το στρώμα και τα μόρια λυσοζύμης εισέρχονται εύκολα. Στην περίπτωση υψηλής κάλυψης η δομή είναι κοντά σε αυτή μιας πολυηλεκτρολυτικής βούρτσας. Υπάρχει αρκετός χώρος για να μπουν μόρια λυσοζύμης στα “κανάλια” ανάμεσα στις φορτισμένες αλυσίδες αλλά χρειάζεται και αυξημένη οσμωτική πίεση από το διάλυμα για να προωθούν τα είδη συμπλεγμένα μόρια και να εισέλθουν τα επόμενα [2]. Τέλος υπάρχει σχεδιασμός για πρόταση πειράματος ανακλαστικότητας νετρονίων για τη μελέτη του παραπάνω συστήματος στη διεπιφάνεια νερού-πυριτίου σε συνεργασία με το κέντρο JCNS Munich-Reactor FRMII.

4. Αναπτύχθηκαν και μελετήθηκαν 2D νανοδομές in situ από συμπολυμερή κατά συστάδες και πρωτεΐνες πάνω σε στερεές επιφάνειες με την τεχνική ζυγού κρυστάλλου quartz με απαγωγή (QCM-D). Έγιναν μελέτες προσρόφησης σε συστήματα PS-SCPI με BSA και λυσοζύμη και PnBA-PAA με λυσοζύμη (HEWL). Χρησιμοποιήθηκε το δισυσταδικό συμπολυμερές PS-SCPI με $M_w=25000$ και σύσταση 35wt% σε PS. Το πειραματικό πρωτόκολλο παρουσιάζεται στο σχήμα 13. Όπως φαίνεται στο σχήμα 14, για τα συστήματα PS-SCPI με BSA και λυσοζύμη, οι μεταβολές των παραμέτρων της συχνότητας ταλάντωσης Δf και της απαγωγής ΔD (dissipation) δείχνουν τον σχηματισμό στρώματος πρωτεΐνης πάνω στο αρχικά σχηματισμένο (προσροφημένο) στρώμα μικκυλίων του συμπολυμερούς σε επιφάνεια χρυσού.

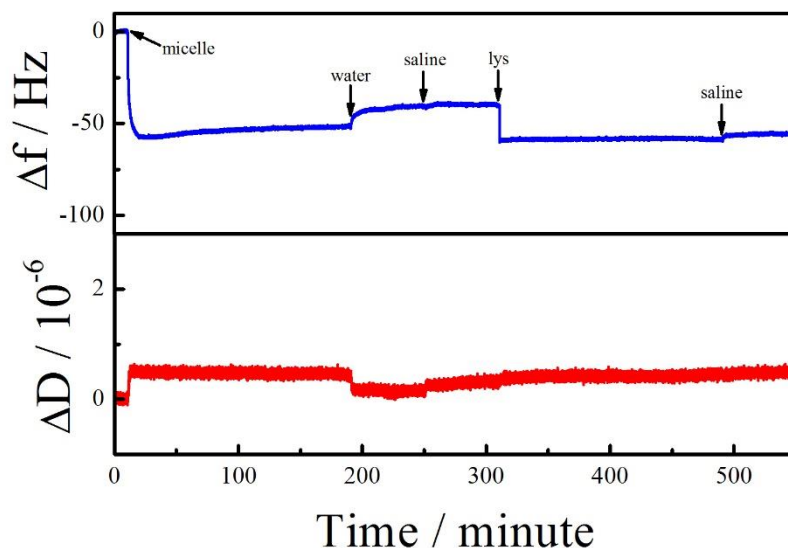
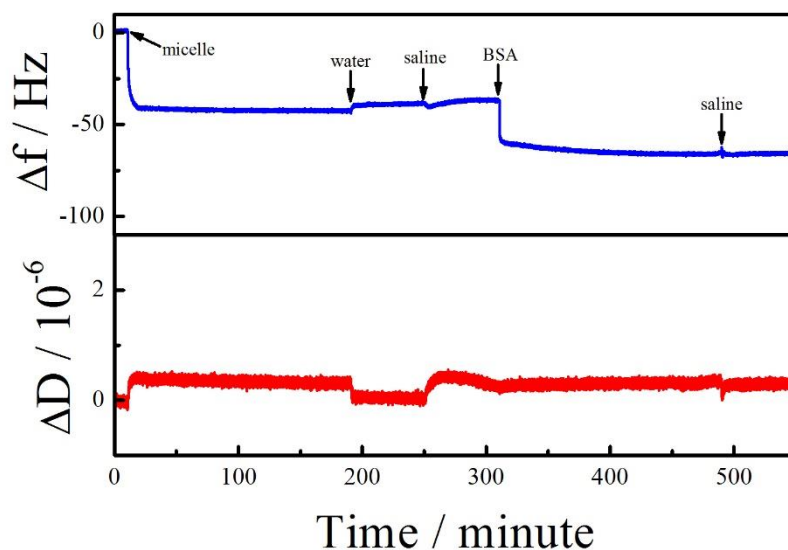


Σχήμα 13: Πειραματικό πρωτόκολλο και μεταβολή σήματος QCM-D για προσρόφηση μικκυλίων PS-SCPI και κατόπιν συμπλοκοποίησης πρωτεϊνών από υδατικά διαλύματα σε επιφάνεια χρυσού πάνω στον κρύσταλλο quartz.

Ανάμεσα στα στάδια προσρόφησης παρεμβάλλεται στάδιο έκπλυσης για να απομακρυνθεί το συστατικό που δεν έχει προσροφηθεί/προσδεθεί καλά στην επιφάνεια. Έτσι ελέγχεται και η σταθερότητα του κάθε στρώματος. Η BSA φέρει συνολικό αρνητικό φορτίο σε pH 7 ενώ η HEWL συνολικό αρνητικό φορτίο. Σε pH 3 και οι δύο πρωτεΐνες είναι θετικά φορτισμένες συνολικά.



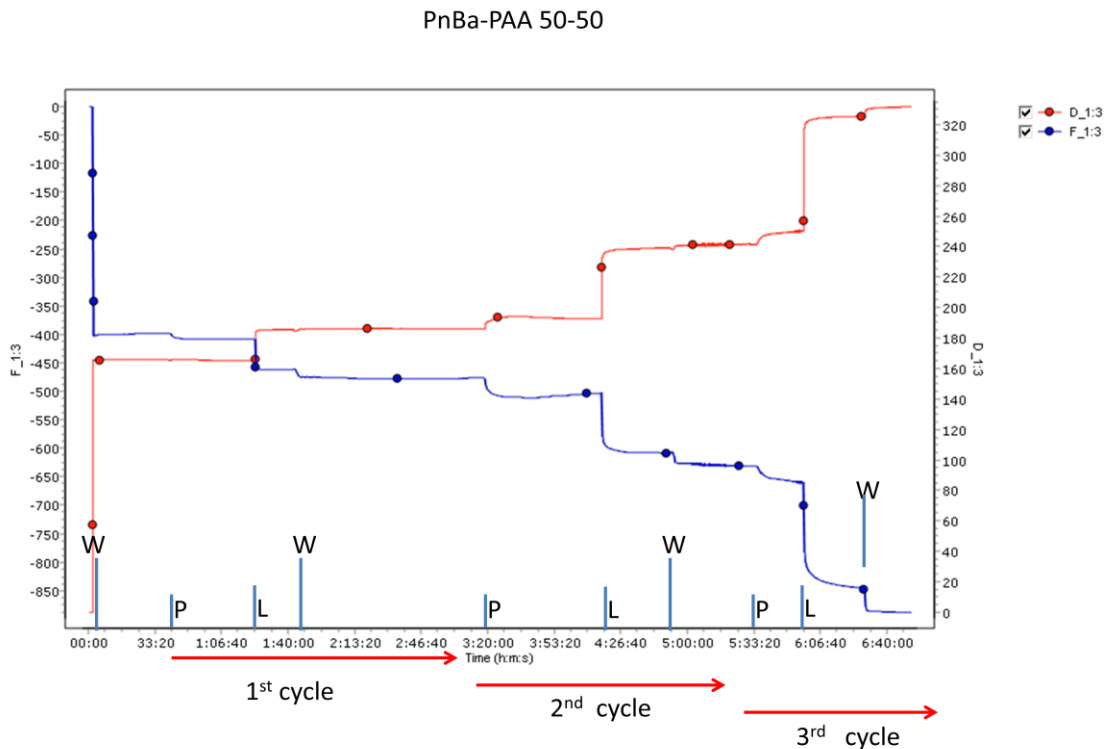
Σχήμα 14: Μεταβολή της συχνότητας ταλάντωσης Δf και της απωγής ΔD (dissipation) σε συστήματα PS-SCPI/BSA (πάνω) και PS-SCPI/λυσοζύμης (κάτω) σε pH 7.



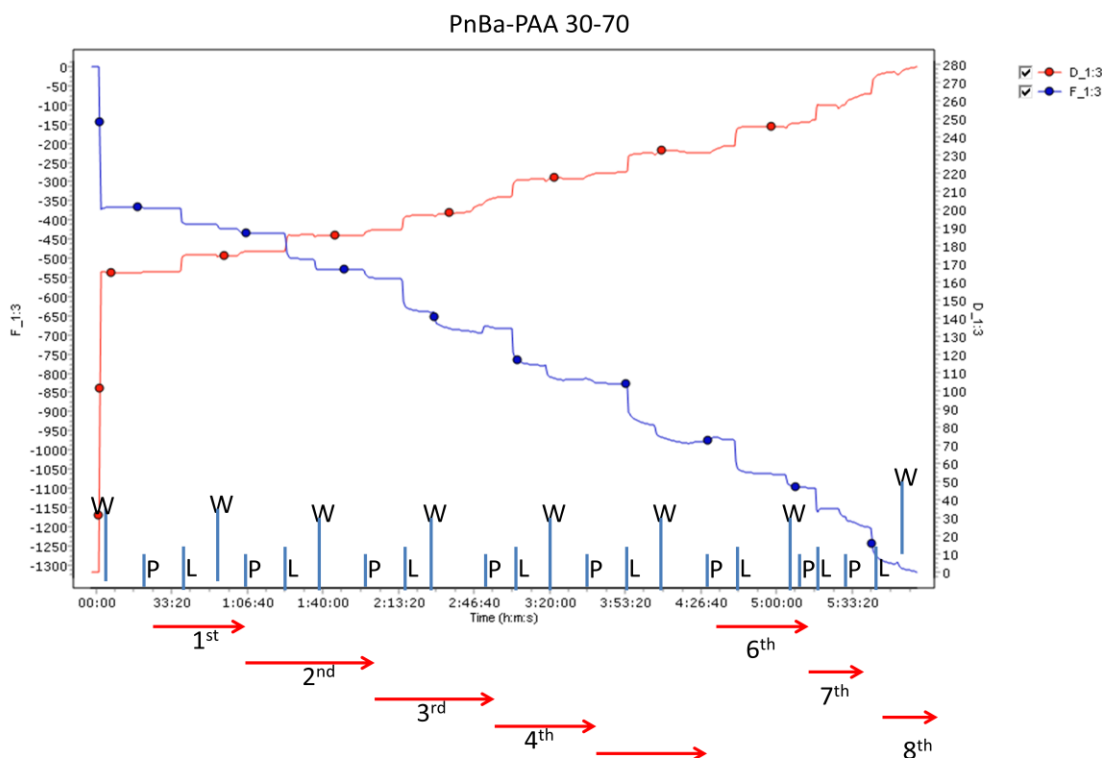
Σχήμα 15: Μεταβολή της συχνότητας ταλάντωσης Δf και της απαγωγής ΔD (dissipation) σε συστήματα PS-SCPI/BSA (πάνω) και PS-SCPI/λυσοζύμης (κάτω) σε pH 3.

Το μεγαλύτερο ποσό προσροφημένης μάζας πρωτεΐνης παρατηρείται σε pH 7 όπου η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση λόγω των φορτίων του πολυμερούς είναι μέγιστη, ειδικά για την περίπτωση της λυσοζύμης που φέρει αντίθετο συνολικό φορτίο σε σχέση με το πολυμερές. Η προσρόφηση/συμπλοκοποίηση της BSA στην τροποποιημένη με μικκύλια PS-SCPI επιφάνεια οφείλεται στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις λόγω των μη τροποποιημένων μονομερών ισοπρενίου στο SCPI, αλλά και στην διασπορά αρνητικών και θετικών φορτίων στην επιφάνεια της πρωτεΐνης. Πρέπει να αναφερθεί ότι το ποσό εξαρτάται και από το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης (BSA MW=66 K, HEWL MW=14,3 K).

Παρασκευάστηκαν εναλλασσόμενα πολυστρωματικά υμένια συμπολυμερών κατά συστάδες με πρωτεΐνες *in situ* και μελετήθηκαν ως προς τη δομή τους και την υδροδυναμική συμπεριφορά. Ενδεικτικά αποτελέσματα από τα συστήματα PnBA-PAA με λυσοζύμη φαίνονται στα σχήματα 16 και 17. Μελετήθηκαν δύο συμπολυμερή με διαφορετικό μοριακό βάρος και σύσταση (PnBA-PAA 50-50 με $M_w = 8000$ και σύσταση σε PnBA 50wt%, PnBA-PAA 30-70 με $M_w = 13000$ και σύσταση σε PnBA 30wt%) σε αλληλεπίδραση με λυσοζύμη (HEWL).



Σχήμα 16: Μεταβολή της συχνότητας ταλάντωσης Δf και της απαγωγής ΔD (dissipation) σε συστήματα PnBA-PAA 50-50/λυσοζύμης σε pH 7. Πραγματοποιούνται τρεις κύκλοι απόθεσης κάθε συστατικού από διαλύματα και η αλληλουχία προσθηκών φαίνεται στο κάτω μέρος του σχήματος.



Σχήμα 17: Μεταβολή της συχνότητας ταλάντωσης Δf και της απαγωγής ΔD (dissipation) σε συστήματα PnBA-PAA 30-70/λυσοζύμης σε pH 7. Πραγματοποιούνται οκτώ κύκλοι απόθεσης κάθε συστατικού από διαλύματα και η αλληλουχία προσθηκών φαίνεται στο κάτω μέρος του σχήματος.

Και στις δύο περιπτώσεις που περιγράφονται οι μεταβολές της συχνότητας ταλάντωσης Δf και της απαγωγής ΔD δείχνουν τον επιτυχή σχηματισμό πολυστρωματικού ψευδο-2D νανοδομών στην επιφάνεια χρυσού πάνω στον κρύσταλλο quartz. Η αποτιθέμενη μάζα αυξάνεται σταδιακά σε κάθε προσθήκη λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συμπολυμερών (αρνητικό φορτίο) και της HEWL (θετικό φορτίο σε pH 7).

Παρατηρούνται μεγαλύτερες αλλαγές/προσρόφηση κάθε φορά που προστίθεται HEWL. Η προσροφημένη/αποτιθέμενη μάζα σε κάθε κύκλο είναι μεγαλύτερη για σύστημα με το συμπολυμερές PnBA-PAA 50-50. Η εξισορρόπηση των νανοςυστημάτων μετά από κάθε προσθήκη είναι επίσης πιο γρήγορη στο σύστημα αυτό, το οποίο παρουσιάζει και μεγαλύτερη σταθερότητα σε έκπλυση με νερό. Η συμπεριφορά αυτή πρέπει να σχετίζεται με το μεγαλύτερο ποσοστό του υδρόφοβου PnBA συμπολυμερές. Η προσρόφηση/σύμπλεξη είναι πολύ γρήγορη και στα δύο συστήματα όπως αναμένεται για ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Οι πολυστρωματικές ψευδο-2D νανοδομές γίνονται πολύ πιο συμπαγείς με την αύξηση του αριθμού προσθηκών/στρωμάτων στα συστήματα. Επίσης το ποσό (μάζα) της συμπλεγμένης HEWL αυξάνεται σε κάθε προσθήκη πρωτεΐνης

5. Έγιναν μετρήσεις σε εναποτιθεμένα στρώματα μικυλλίων PS-QP2VP σε επιφάνεια χρυσού για τη διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης GISAXS για τέτοιες μελέτες. Επίσης έγιναν αρχικές μετρήσεις σε εναποτιθεμένα στρώματα μικυλλίων PS-QP2VP με επιπλέον επίστρωση BSA σε επιφάνεια χρυσού για τη διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης GISAXS για τη μελέτη συμπλοκοποίησης σε επιφάνειες (στο εργαστήριο της Δρ. Μεργιά στο ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος).

Σε συνεργασία με το εργαστήριο του Καθ. Χ. Τοπρακτσιόγλου (τμήμα Φυσικής Πανεπιστήμιο Πατρών) έγιναν διερευνητικά πειράματα ανακλαστικότητας νετρονίων (LLB Saclay, France). Ελέγχθηκε η προσρόφηση QNPHOS-EO στη διεπιφάνεια νερού πυριτίου με σκοπό τη μελέτη της σύμπλεξης των προσροφημένων στρωμάτων με BSA. Στις συνθήκες που έγιναν οι μετρήσεις δεν μετρήθηκε σημαντική διαφορά από την ανακλαστικότητα από το προσροφημένο στρώμα σε σύγκριση με αυτή της καθαρής διεπιφάνειας υγρού/στερεού.

Αναφορές:

- [1] A. Papagiannopoulos, A. Christoulaki, N. Spiliopoulos, A. Vradis, C. Toprakcioglu and S. Pispas; “Complexation of Lysozyme with Adsorbed PtBS-b-SCPI Block Polyelectrolyte Micelles on Silver Surface”, *Langmuir* 31, 685-694, 2015.
- [2] S.A. Sukhishvili and S. Granick; “Adsorption of human serum albumin: Dependence on molecular architecture of the oppositely charged surface”, *J. Chem. Phys.* 110, 10153–10161, 1999.