

ΑΡΙΣΤΕΙΑ Ι

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

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΕ5

ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ 5.1: Έκθεση αποτελεσμάτων στη βιοδραστικότητα και αποδέσμευση πρωτεϊνών



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Στα πλαίσια του προγράμματος NANOMACRO πραγματοποιήθηκαν μελέτες σχετικά με τη βιοδραστικότητα και αποδέσμευση πρωτεϊνών από υβριδικές νανοδομές από συμπολυμερή κατά συστάδες και πρωτεΐνες.

Ενσωμάτωση της ινσουλίνης στις υδρικές νανοδομές PEG-b-PLys:INS

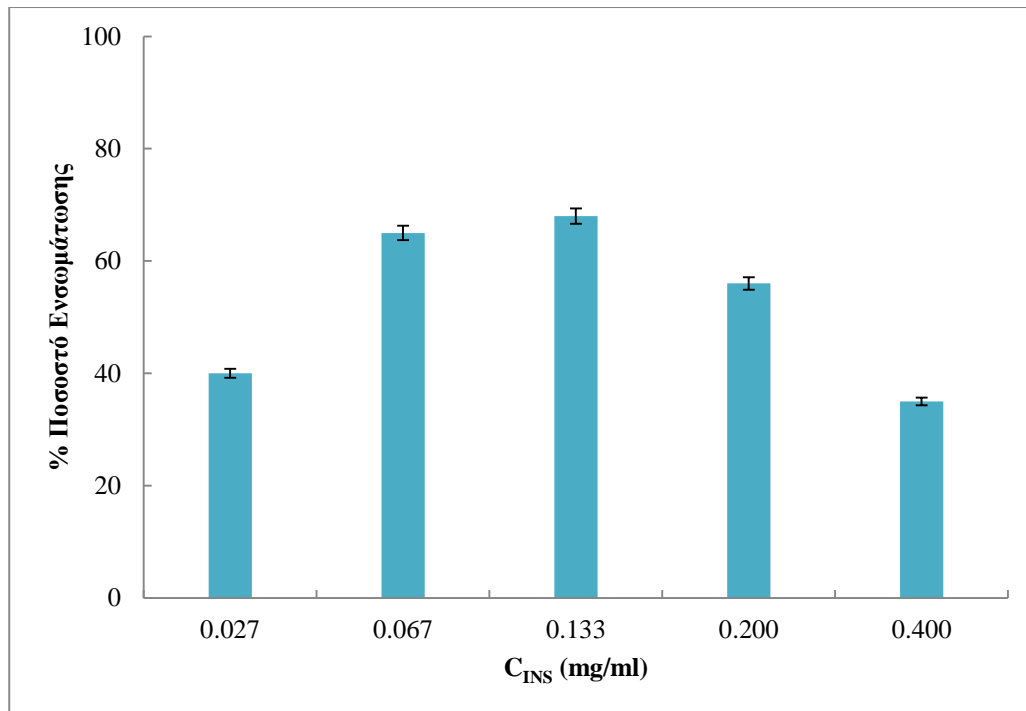
Το ποσοστό ενσωμάτωσης των συμπλεγμάτων του πολυηλεκτρολύτη/συμπολυμερούς κατά συστάδες σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffer saline-PBS) μελετήθηκε. Οι τιμές του ποσοστού ενσωμάτωσης κυμαίνονται από 35 έως 70% για τις διαφορετικές παρασκευές συμπλεγμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Το ποσοστό ενσωμάτωσης επηρεάζεται από την αρχική συγκέντρωση της ινσουλίνης. Συγκεκριμένα, το ποσοστό ενσωμάτωσης αυξήθηκε με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο PBS (Διάγραμμα 1).

Το ποσοστό ενσωμάτωσης της ινσουλίνης σε αυτά τα υβριδικά νανοσυστήματα μειώθηκε με την αύξηση των απόλυτων τιμών του ζ-δυναμικού (δεδομένα που λήφθηκαν/παρατηρήθηκαν κατά το φυσικοχημικό χαρακτηρισμό). Το υψηλότερο ποσοστό ενσωμάτωσης παρατηρήθηκε όταν η αρχική συγκέντρωση της ινσουλίνης ήταν $C_{INS}=0.133\text{mg/ml}$ (ή ισοδύναμα ο λόγος των φορτίων [-]/[+] ίσος με τη μονάδα-1). Σε μεγαλύτερη συγκέντρωση της ινσουλίνης το ζ-δυναμικό των συμπλόκων έγινε περισσότερο αρνητικό και αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι υπάρχει αντιστοιχία μεταξύ της διαδικασίας συμπλοκοποίησης (παρασκευής συμπλεγμάτων) και του ποσοστού ενσωμάτωσης μετά το ισοηλεκτρικό σημείο (όπου οι συγκεντρώσεις των θετικών και των αρνητικών φορτίων πολυμερούς/ πρωτεΐνης είναι ίσες). Αυτή η παρατήρηση επίσης υποδεικνύει πως η διαφοροποίηση της εσωτερικής δομής των συμπλόκων οφείλεται και στους διαφορετικούς λόγους πρωτεΐνης/συμπολυμερούς. Θα πρέπει να τονίσουμε πως οι νανοφορείς δεν αποδεσμεύουν την εγκλωβισμένη ινσουλίνη μέχρι κάποιες ώρες (έως 4 ώρες τουλάχιστον).

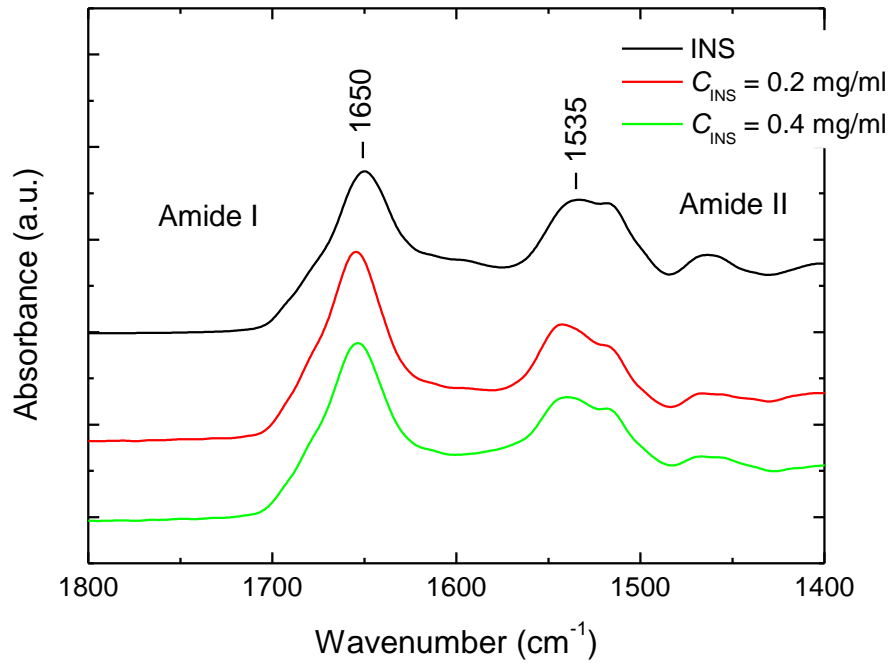
Η δομή της ινσουλίνης (INS) στα σύμπλοκα που σχηματίζει με το δυσσταδικό συμπολυμερές PEG-PLys.

Στο σχήμα 1 παρουσιάζονται τα ληφθέντα φάσματα μέσου υπερύθρου για αντιπροσωπευτικά διαλύματα συμπλόκων του συστήματος PEG-PLys/INS σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl με pH 7.1 και ιοντική ισχύ 0.01 M. Επίσης παρατίθεται το αντίστοιχο φάσμα διαλύματος INS για λόγους σύγκρισης. Η παρατηρούμενη διατήρηση των φασματικών χαρακτηριστικών και κυρίως της θέσης και της κατανομής των κορυφών Amide I και Amide II αποτελεί επιβεβαίωση της διατήρησης της διαμόρφωσης του ενζύμου της ινσουλίνης κατά τη σύμπλεξη.

Κλείνοντας, θα πρέπει να τονίσουμε πως αυτή η παρατήρηση σχετίζεται με τις ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πρωτεΐνης και της συστάδας της πολύ-λυσίνης (PLys) του πολυηλεκτρολύτη.



Διάγραμμα 1: Το (%) ποσοστό ενσωμάτωσης της INS στα σύμπλοκα PEG-b-PLys:INS σε PBS, ως συνάρτηση της αρχικής συγκέντρωσης της ινσουλίνης που προστέθηκε κατά τη δημιουργία των συμπλόκων.



Σχήμα 1: Φάσματα μέσου υπερύθρου για αντιπροσωπευτικά διαλύματα των συμπλόκων του συστήματος PEG-PLys/INS σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl με pH 7.1 και ιοντική ισχύ 0.01 M. Επίσης παρατίθενται το αντίστοιχο φάσμα του αμιγώς πρωτεϊνικού διαλύματος, για λόγους σύγκρισης.

Η δομή της ινσουλίνης στα υδριδικά νανοσυστήματα QNPHOSEO:INS

Η διατήρηση της ενζυμικής δραστηριότητας, η οποία σχετίζεται άμεσα με την πρωτεϊνική διαμόρφωση είναι ένα θέμα μείζονος σημασίας στις περισσότερες εφαρμογές που σχετίζονται με σύμπλοκα πρωτεϊνών και πολυηλεκτρολυτών. Για το λόγο αυτό, η δομή της συμπλοκοποιημένης πρωτεΐνης μελετήθηκε με κυκλικό διχρωισμό και με τεχνικές φασματοσκοπίας υπερύθρου και αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα του συστήματος QNPHOSEO:INS σε pH=7.40 και 0.154M NaCl παρουσιάζονται παρακάτω.

Πρώτα, χρησιμοποιήθηκε ο κυκλικός διχρωϊσμός για τον καθορισμό της δομής της πρωτεΐνης. Το σχήμα 2 παρουσιάζει το μετρούμενο φάσμα για τρία αντιπροσωπευτικά διαλύματα συγκεντρώσεων $C_{INS}=0.07, 0.26$ και 0.4 mg/ml του συστήματος QNPHOSEO:INS σε pH=7.40 και 0.154M NaCl, καθώς και της ινσουλίνης σε συγκέντρωση 1 mg/ml στις ίδιες συνθήκες διαλύματος. Όπως μπορεί να δει κάποιος, μόνο μικρές αλλαγές παρατηρούνται στο φάσμα CD μεταξύ της ελεύθερης και της συμπλοκοποιημένης πρωτεΐνης.

Η ανάλυση του φάσματος, χρησιμοποιώντας το λογισμικό CDNN, έδειξε αποτελέσματα με τις μέσες τιμές της δευτεροταγούς δομής να συνοψίζονται στον Πίνακα 1. Τα ποσοστά της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης διατηρήθηκαν για όλα τα διαλύματα των συμπλόκων, και αυτό αποδεικνύει πως η συμπλοκοποίηση δεν είναι αιτία δομικών μεταβολών στην πρωτεΐνη.

Επιπρόσθετα, οι μετρήσεις από τη φασματοσκοπία υπερύθρου που πραγματοποιήθηκαν δείχνουν πως τα τρία φάσματα IR των αντιπροσωπευτικών διαλυμάτων της ινσουλίνης σε συγκέντρωση $C_{INS}=0.07, 0.26$ και 0.4 mg/ml του συστήματος QNPHOSEO:INS σε pH=7.40 και 0.154M και της ινσουλίνης δεν παρουσίαζαν διαφορές.

Τα φάσματα αποδεικνύουν της απουσία διαμορφώσεων που παρατηρούνται σε περιπτώσεις μετουσίωσης της πρωτεΐνης. Συνοψίζοντας, μπορούμε να ισχυριστούμε πως η ινσουλίνη διατηρεί τη δομή της και τη λειτουργικότητα της μετά τη διαδικασία της συμπλοκοποίησης με το συμπολυμερές QNPHOSEO.

Κλείνοντας, τονίζουμε τα ακόλουθα: Τα αποτελέσματα των φασματοσκοπικών μετρήσεων κυκλικού διχρωισμού και μέσου υπερύθρου (το ένζυμο της ινσουλίνης δεν εμφανίζει εγγενή φθορισμό) για αντιπροσωπευτικά διαλύματα συμπλόκων του συστήματος QNPHOSEO:INS σε pH 7.4 και ιοντική ισχύ 0.154 M, καθώς και του αντίστοιχου αμιγώς πρωτεϊνικού διαλύματος παρουσιάζονται στο σχήμα 2. Και στις δύο διαφορετικές τεχνικές δεν παρατηρούνται σημαντικές φασματικές αλλαγές μεταξύ του ελεύθερου και του συμπλεγμένου ενζύμου, επομένως επιβεβαιώνεται η διατήρηση της δομής του.

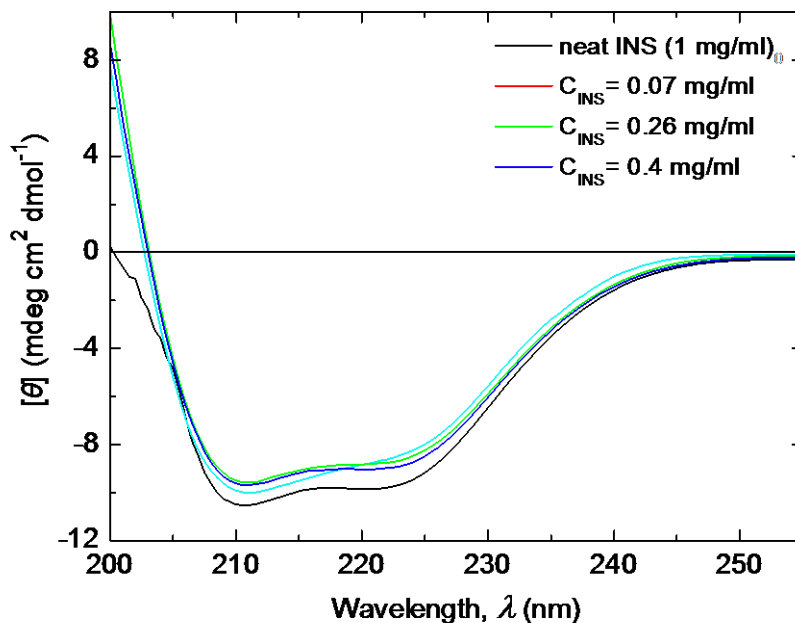
Ποσοστό ενσωμάτωσης και *in vitro* αποδέσμευσης της INS από τους υδριδικούς νανοφορείς QNPHOSEO:INS

Οι τιμές του ποσοστού ενσωμάτωσης κυμαίνονται από 10 έως 40% για τα διαφορετικά συστήματα που σχηματίστηκαν όπως παρατηρούμε στον Πίνακα 2. Σχετίζονται άμεσα με το μέσο διασποράς και την αρχική συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Το ποσοστό ενσωμάτωσης αυξήθηκε με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης και στα δύο υδατικά μέσα. Η *in vitro* αποδέσμευση της ινσουλίνης από τα σύμπλοκα σε διαφορετικούς μοριακούς λόγους του πρωτεϊνικού συστατικού παρουσιάζεται στο σχήμα 3.

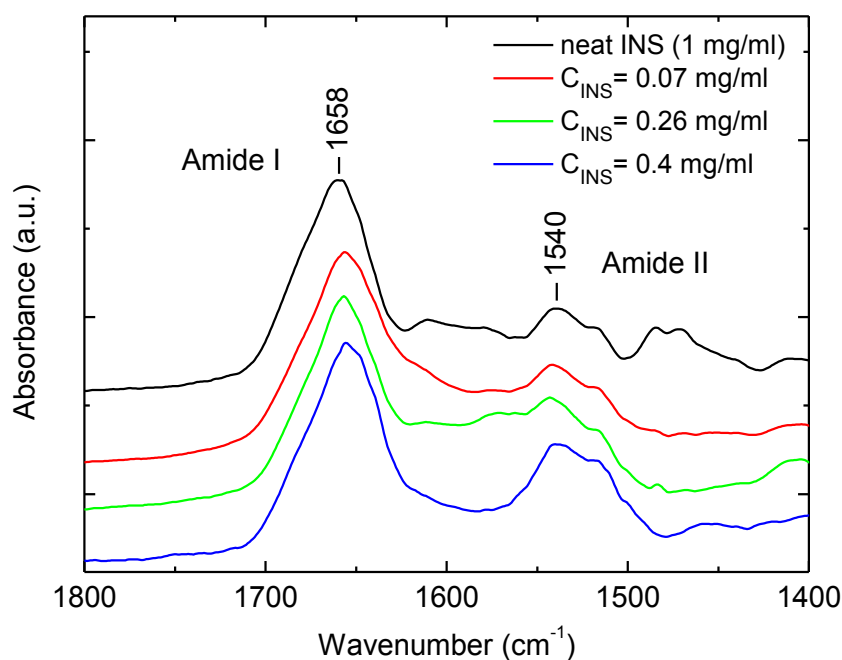
Παρατηρήθηκε ότι η *in vitro* αποδέσμευση της INS από τα σχηματισθέντα συσσωματώματα πολυηλεκτρολύτη είναι αρκετά ταχεία για τα νανοσωματίδια σύστασης QNPHOSEO:INS όπου η αρχική συγκέντρωση της INS ήταν 0.067 mg/ml. Πλήρης αποδέσμευση της ινσουλίνης παρατηρήθηκε μόνο για τα νανοσωματίδια QNPHOSEO:INS (η αρχική συγκέντρωση της ινσουλίνης ήταν 0.067 mg/ml κατά τη διαδικασία σχηματισμού των συμπλόκων) μετά από 50min. Μέχρι το 80% της ινσουλίνης αποδεσμεύτηκε σχεδόν άμεσα από τα νανοσυστήματα QNPHOSEO:INS (όπου η αρχική συγκέντρωση της ινσουλίνης ήταν 0.027 mg/ml). Παρατηρήθηκε ολική αποδέσμευση της ινσουλίνης από τα σύμπλοκα QNPHOSEO:INS (όπου η αρχική συγκέντρωση της ινσουλίνης ήταν 0.260 mg/ml) μετά από 8 ώρες.

Διφασική αποδέσμευση της ινσουλίνης παρατηρήθηκε για αυτό το σύστημα. Η κινητική της αποδέσμευσης από αυτό το νανοςύστημα ακολουθεί μηδενοταξική κινητική, αλλά σαφώς διαχωρισμένες οι δύο φάσεις με δύο διακριτούς ρυθμούς, μία αρχική ταχεία αποδέσμευση ακολουθείται από μία αργότερη κινητική αποδέσμευσης. Ο παράγοντας που καθορίζει την κινητική της αποδέσμευσης της ινσουλίνης είναι η αρχική συγκέντρωση της πρωτεΐνης, η οποία επηρεάζει τα φυσικοχημικά και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των συμπλόκων και συνεπώς και την κινητική της αποδέσμευσης. Από άποψη εφαρμογής, συμπεραίνουμε ότι η ενσωμάτωση και η κινητική της αποδέσμευσης από τα παρόντα νανοςυστήματα μπορεί να ελεγχθεί από το λόγο των δύο συστατικών και σχετίζεται με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του φορέα όπως ορίζει η αρχική συγκέντρωση της ινσουλίνης στα διαλύματα.

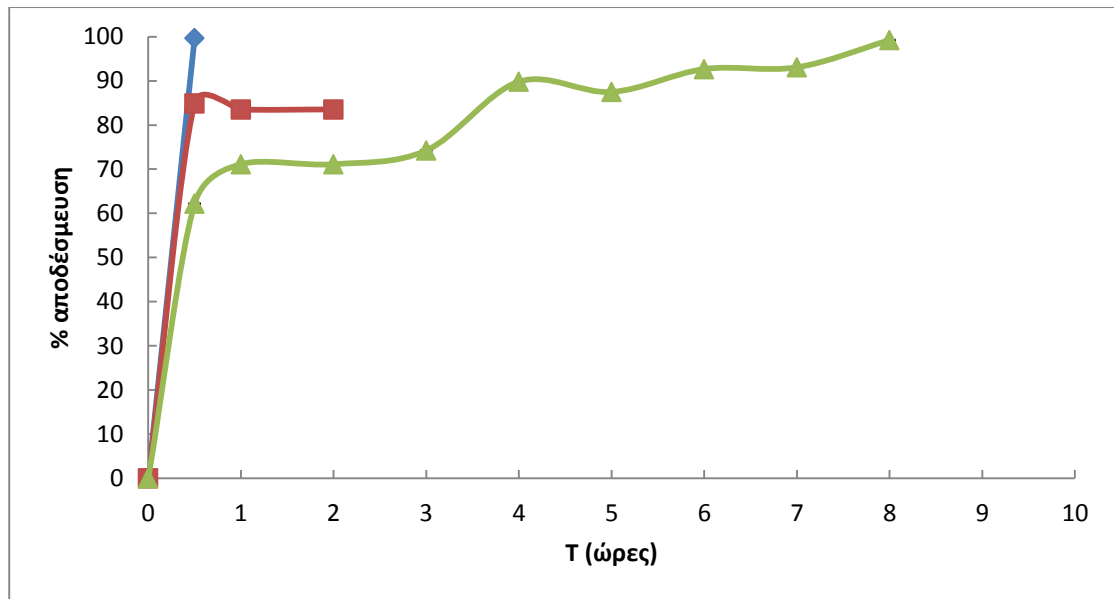
α.



β.



Σχήμα 2. α. Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού στο far-UV και β. φασματοσκοπία υπερόθρου των περιοχών της Αμίνης I και II για τρία αντιπροσωπευτικά διαλύματα με συγκέντρωση ινσουλίνης $C_{INS} = 0.07, 0.26$ και 0.4 mg/ml των συστημάτων QNPHOSEO:INS σε pH=7.4 και 0.154M NaCl. Το φάσμα της ινσουλίνης σε συγκέντρωση 1 mg/ml και στις ίδιες συνθήκες έχει συμπεριληφθεί στο σχήμα για συγκριτικούς λόγους.



Σχήμα 3. Η αποδέσμευση της ινσουλίνης από τρεις διαφορετικούς νανοφορείς με βάση τον πολυηλεκτρολύτη QNPHOSEO (όπου η αρχική συγκέντρωση της ινσουλίνης ήταν $C_{INS}=0.027$ mg/ml –κόκκινη γραμμή, $C_{INS}=0.067$ mg/ml –μπλε γραμμή και $C_{INS}=0.260$ mg/ml –πράσινη γραμμή) στους 37°C σε PBS. Μέσος όρος τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, $SD < 10\%$.

Πίνακας 1. Μέσος όρος επί τις 100% της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης που προκύπτει από την ανάλυση των φασμάτων far-UV CD των τριών αντιπροσωπευτικών διαλυμάτων των συστημάτων QNPHOSEO:INS με συγκέντρωση ινσουλίνης $C_{INS}=0.07$, 0.26 και 0.4 mg/ml σε pH=7.40 και 0.154M NaCl, καθώς και ινσουλίνης που δεν έχει δεσμευτεί σε φορείς σε συγκέντρωση 1 mg/ml και στις ίδιες συνθήκες.

Δείγμα	α -έλικα (%)	β -πτυχωτή αλυσίδα (%)	Τυχαία διαμόρφωση (%)
INS	29	36	35
$C_{INS}=0.07$ mg/ml	30	35	35
$C_{INS}=0.26$ mg/ml	32	34	34
$C_{INS}=0.4$ mg/ml	31	35	34

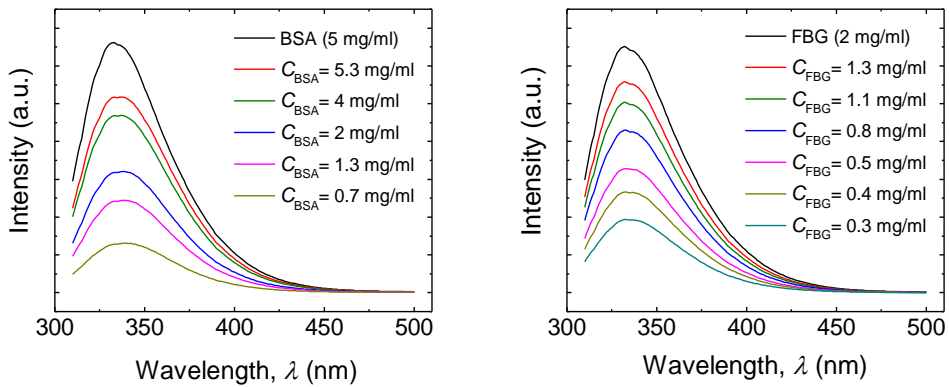
Πίνακας 2. Ποσοστό ενσωμάτωσης (%) των συμπλεγμάτων QNPHOSEO:INS.

QNPHOSEO:INS Αρχική συγκέντρωση INS	Μέσο διασποράς	% Ποσοστό ενσωμάτωσης
0.027mg/ml	pH=7.00 και 0.01 NaCl	10
0.067mg/ml	pH=7.00 και 0.01 NaCl	15
0.027mg/ml	PBS	18
0.067mg/ml	PBS	19
0.260mg/ml	PBS	40

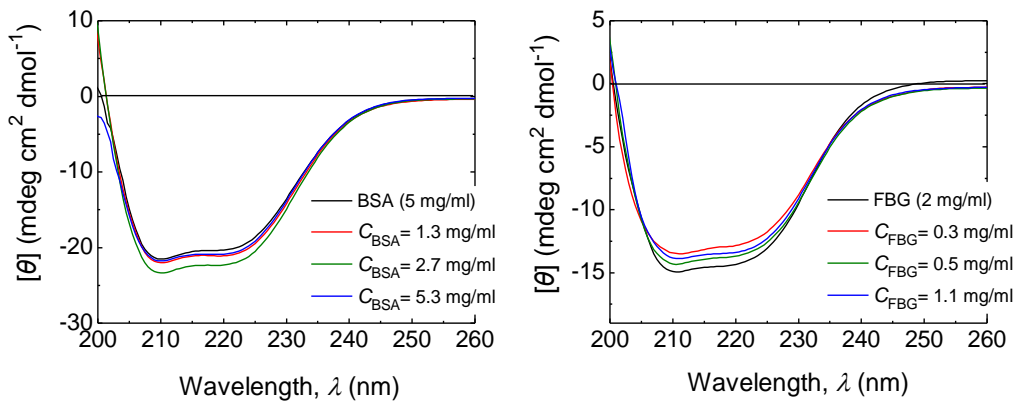
Η δομή των BSA και FBG στις 3D νανοδομές που βασίζονται στο συμπολυμερές QNPHOS-PEO (QNPHOSEO).

Η δομή των μορίων των πρωτεϊνών BSA και FBG στις 3D νανοδομές που σχηματίζονται μεταξύ αυτών και του δυσυσταδικού συμπολυμερούς QNPHOS-PEO. Τα ληφθέντα φάσματα φθορισμού, κυκλικού διχρωισμού και μέσου υπερύθρου για αντιπροσωπευτικά διαλύματα των συστημάτων QNPHOS-PEO/BSA και QNPHOS-PEO/FBG σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M, καθώς και τα αντίστοιχα φάσματα των αμιγώς πρωτεϊνικών διαλυμάτων BSA και FBG παρουσιάζονται στο Σχήμα 4. Όπως παρατηρείται και για τις τρεις διαφορετικές τεχνικές τα φασματικά χαρακτηριστικά των ελεύθερων πρωτεϊνών διατηρούνται για τα διαλύματα των συμπλόκων και των δύο συστημάτων. Επομένως εξάγεται το συμπέρασμα ότι η διαμόρφωση των πρωτεϊνών δεν μεταβάλλεται κατά τη σύμπλεξη.

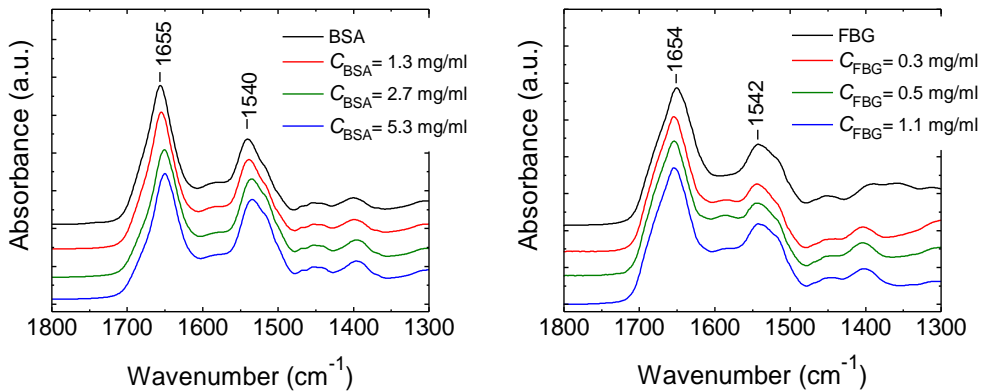
a) Fluorescence



b) Circular Dichroism



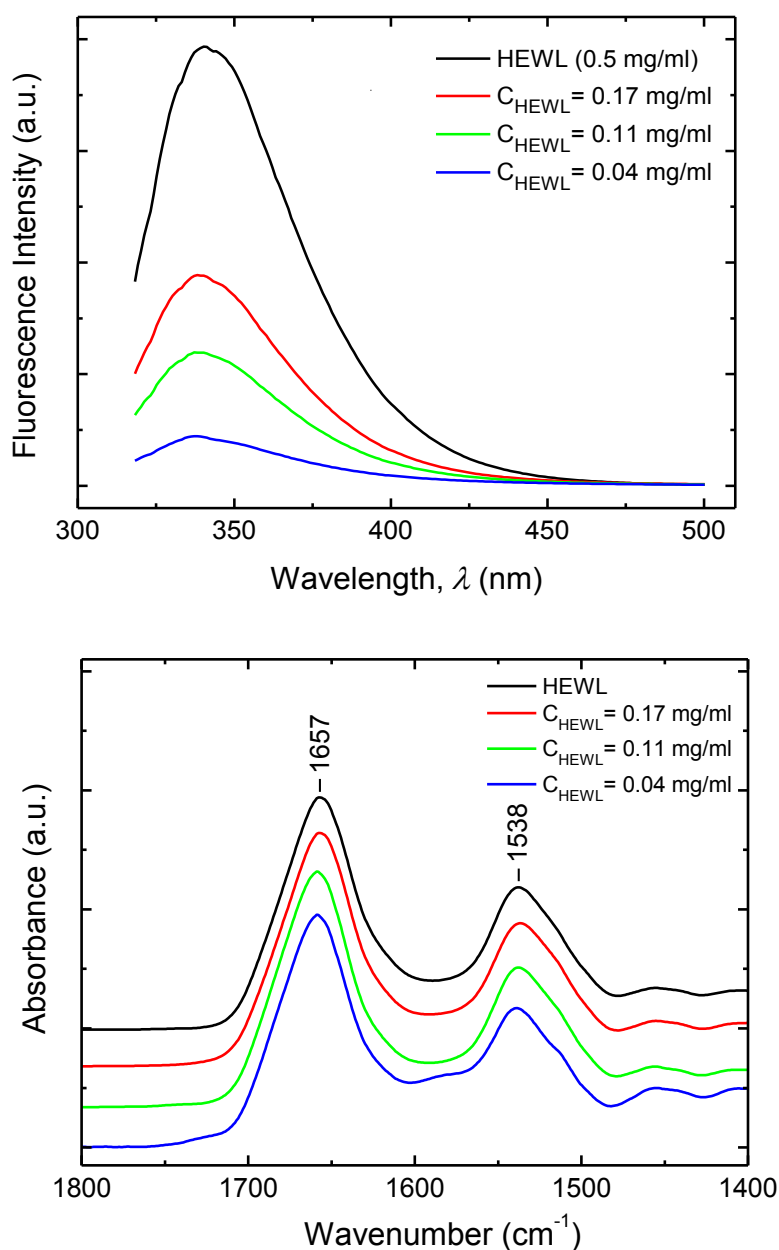
c) Infrared



Σχήμα 4: Φάσματα α) φθορισμού, β) κυκλικού διχρωισμού και γ) μέσου υπέρυθρου για αντιπροσωπευτικά διαλύματα των συμπλόκων των συστημάτων QNPHOSEO/BSA (αριστερά) και QNPHOSEO/FBG (δεξιά) σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M. επίσης παρατίθενται τα αντίστοιχα φάσματα των αμιγώς πρωτεϊνικών διαλυμάτων, για λόγους σύγκρισης.

Η δομή των πρωτεϊνικών μορίων της λυσοζύμης (HEWL) στις αντίστοιχες 3D νανοδομές που προέκυψαν από την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης και των μικκυλίων που σχηματίζει το δισυσταδικό συμπολυμερές PtBS-SCPI.

Η διατήρηση της φασματικής υπογραφής της ελεύθερης HEWL πρωτεΐνης στα φάσματα φθορισμού και μέσου υπερύθρου αντιπροσωπευτικών διαλυμάτων των συμπλόκων του συστήματος που παρουσιάζονται στο σχήμα 5 καταδεικνύει τη διατήρηση της διαμόρφωσής της.

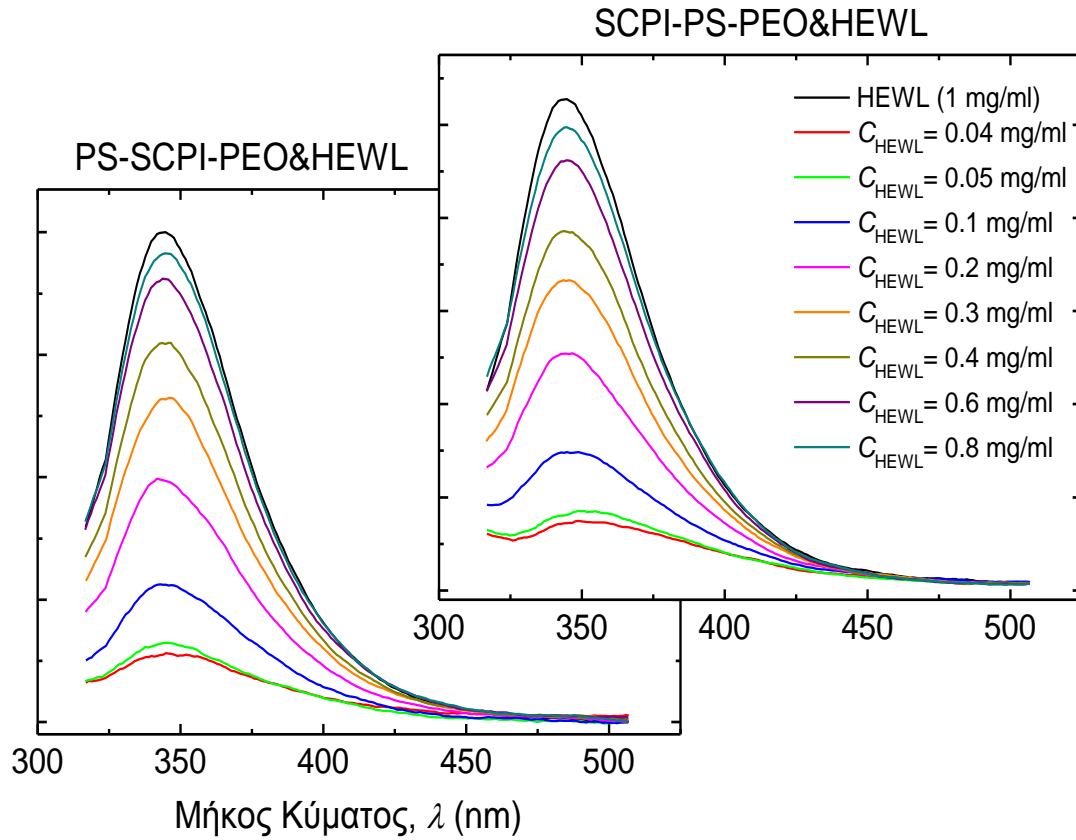


Σχήμα 5: Φάσματα φθορισμού (επάνω) και μέσου υπερύθρου (κάτω) για αντιπροσωπευτικά διαλύματα των συμπλόκων του συστήματος PtBS-SCPI/HEWL σε

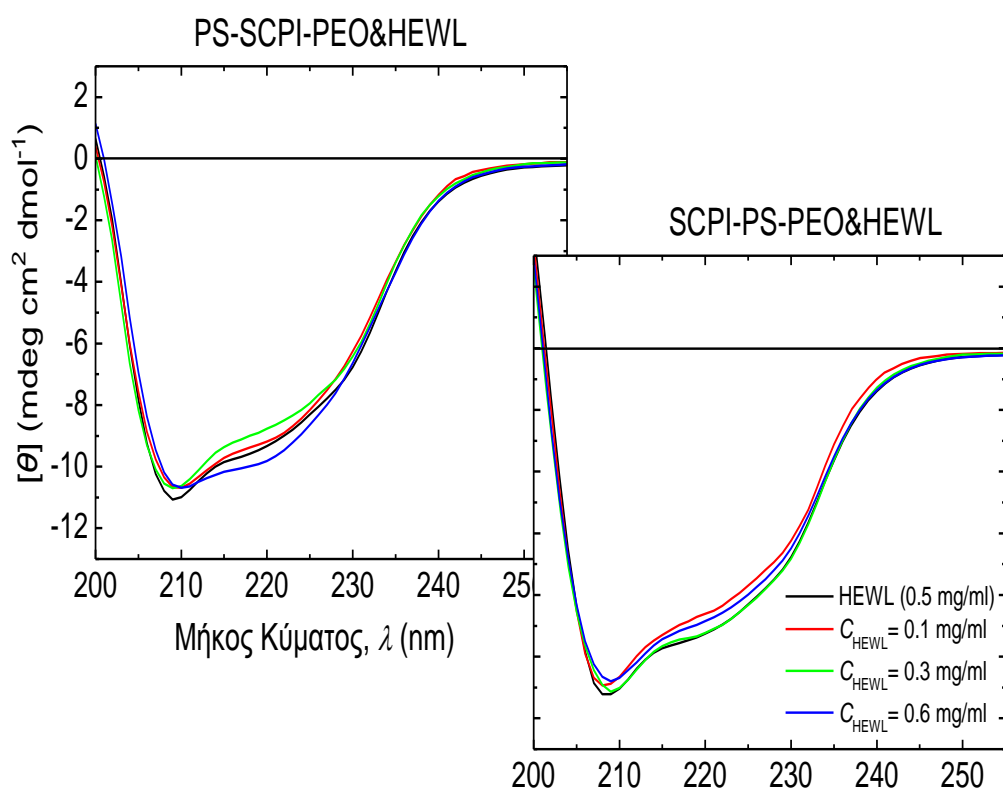
pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M. Επίσης παρατίθενται τα αντίστοιχα φάσματα του αμιγώς πρωτεϊνικού διαλύματος, για λόγους σύγκρισης.

Η δομή της HEWL στις 3D νανοδομές που βασίζονται στα συμπολυμερή PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO.

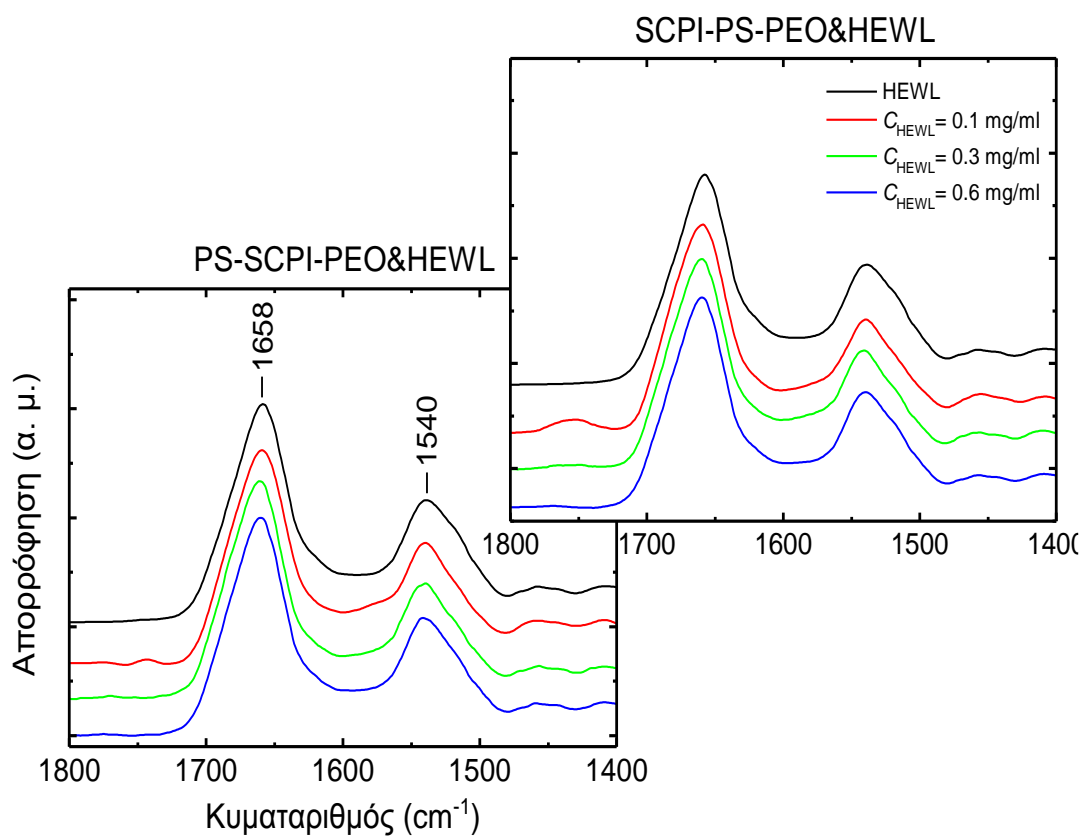
Η δομή της συμπλεγμένης πρωτεΐνης HEWL στα σύμπλοκα που σχηματίζει με τα μικύλια διαφορετικής διαμόρφωσης κορώνας που προκύπτουν μέσω της αυτοοργάνωσης των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτικών συμπολυμερών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO. Στα σχήματα 6, 7 και 8 παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού, κυκλικού διχρωισμού και μέσου υπερύθρου, αντίστοιχα, για τα διαλύματα των συμπλόκων των συστημάτων PS-SCPI-PEO/HEWL και SCPI-PS-PEO/HEWL σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M. Επίσης παρατίθενται τα αντίστοιχα φάσματα των αμιγώς πρωτεϊνικών διαλυμάτων της HEWL για λόγους σύγκρισης. Όπως διαπιστώνεται τα φασματικά χαρακτηριστικά της ελεύθερης πρωτεΐνης διατηρούνται σε όλες τις περιπτώσεις και για τα δύο διαφορετικά συστήματα μικυλίων τριπολυμερών κατά συστάδες. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η δομή των πρωτεϊνικών μορίων της HEWL παραμένει αμετάβλητη κατά τη σύμπλεξη και επομένως και η ενζυμική της δραστηριότητα.



Σχήμα 6: Φάσματα φθορισμού για τα διαλύματα των συμπλόκων των συστημάτων PS-SCPI-PEO/HEWL (αριστερά) και SCPI-PS-PEO/HEWL (δεξιά) σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M. Επίσης παρατίθενται τα αντίστοιχα φάσματα του αμιγώς πρωτεϊνικού διαλύματος, για λόγους σύγκρισης.



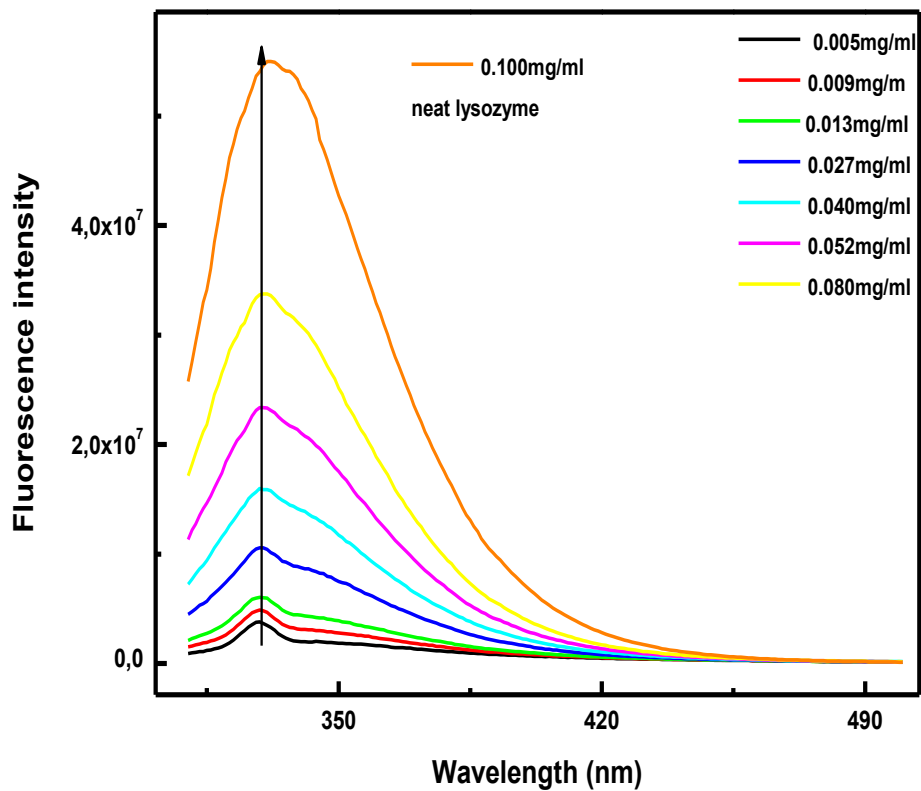
Σχήμα 7: Φάσματα κυκλικού διχρωισμού για αντιπροσωπευτικά διαλύματα των συμπλόκων των συστημάτων PS-SCPI-PEO/HEWL (αριστερά) και SCPI-PS-PEO/HEWL (δεξιά) σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M. Επίσης παρατίθενται τα αντίστοιχα φάσματα του αμιγώς πρωτεϊνικού διαλύματος, για λόγους σύγκρισης.



Σχήμα 8: Φάσματα μέσου υπέρυθρου για αντιπροσωπευτικά διαλύματα των συμπλόκων των συστημάτων PS-SCPI-PEO/HEWL (αριστερά) και SCPI-PS-PEO/HEWL (δεξιά) σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M. Επίσης παρατίθενται τα αντίστοιχα φάσματα του αμιγώς πρωτεϊνικού διαλύματος, για λόγους σύγκρισης.

Η δομή της λυσοζύμης εντός των συμπλόκων PNIPAM-b-PAA:Lys

Μελέτες φασματοσκοπίας φθορισμού διεξήχθησαν προκειμένου να διερευνηθεί αν η λυσοζύμη διατηρεί τη δομή της ή υφίσταται δομική αναδιάταξη που οφείλεται στην αλληλεπίδρασή της με το συμπολυμερές/πολυηλεκτρολύτη PNIPAM-b-PAA. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η πραγματική διαμόρφωση της πρωτεΐνης εντός των νανοδομών πρωτεΐνης-πολυμερούς σχετίζεται ισχυρά με οποιεσδήποτε πιθανές εφαρμογές των σχηματισθέντων 3D νανοδομών, δηλαδή η δραστηριότητα του ενζύμου θα πρέπει να διατηρηθεί υπό την προϋπόθεση ότι η διαμόρφωση του ενζύμου δεν μεταβάλλεται μετά την αλληλεπίδρασή του με το συμπλομερές. Στο σχήμα 9 παρουσιάζονται τα αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα των σταθερών διαλυμάτων των συστημάτων PNIPAM-b-PAA / LYS, καθώς και το αντίστοιχο φάσμα της λυσοζύμης σε συγκέντρωση 0.1 mg / mL. Παρατηρήθηκε ότι η ένταση φθορισμού εξαρτάται από την συγκέντρωση λυσοζύμης στα διαλύματα των συμπλοκών που μελετήθηκαν και αυξάνεται ως συνάρτηση της αύξησης της συγκέντρωσης της λυσοζύμης. Για συγκεντρώσεις λυσοζύμης κάτω από 0.040mg / mL όλα τα φάσματα παρουσίασαν ένα μέγιστο γύρω στα 329 nm, το οποίο είναι ελαφρώς μετατοπισμένα κατά περίπου 3nm, σε σύγκριση με τα φάσματα της πρωτεΐνης, η οποία εμφανίζει ένα μέγιστο στα 332 nm. Αυτή η μικρή μετατόπιση θα μπορούσε να αποδοθεί στο σχηματισμό του συμπλόκου και έχει ως αποτέλεσμα μικρές αλλαγές του περιβάλλοντος της τρυπτοφάνης. Όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία, όταν η λυσοζύμη είναι πλήρως μετουσιωμένη το φάσμα φθορισμού εμφανίζει μια μετατόπιση άνω των 10nm. Στην περίπτωση αυτή, δεδομένου ότι η αλλαγή είναι μόνο 3nm, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι, αν και μικρές αλλαγές στον τριτογενή δομή της λυσοζύμης μπορούν να συμβούν κατά τη διάρκεια της συμπλοκοποίησης της λυσοζύμης με το συμπολυμερές PNIPAM-b-PAA, δεν συμβαίνει μετουσίωση της πρωτεΐνης.



Σχήμα 9. Φάσματα φθορισμού των διαλυμάτων του συστήματος PNIPAM-b-PAA/LYS σε pH 7 και 0.01M NaCl. Το φάσμα της λυσοζύμης LYS παρουσιάζεται για συγκριτικούς λόγους.