

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΣΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΦΥΣΙΚΗΣ

**ΑΥΤΟ-ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΚΑΙ ΔΥΝΑΜΙΚΗ
ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΩΝ**

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ
ΤΟΥ**

ΠΕΡΙΚΛΗ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2005

«Αυτο-οργάνωση και Δυναμική Πολυπεπτιδίων»

Διδακτορική Διατριβή


Περικλή Παπαδόπουλου
Τμήμα Φυσικής
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

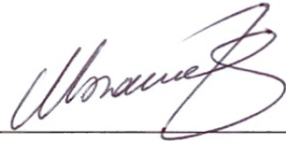
Γεωργάτος Σπυρίδων
Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Παν/μιο Ιωαννίνων



Κοσμάς Μάριος
Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Παν/μιο Ιωαννίνων



Μπάκας Θωμάς
Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Φυσικής, Παν/μιο Ιωαννίνων



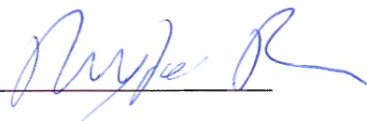
Φίλης Ιωάννης
Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Φυσικής, Παν/μιο Ιωαννίνων




Φλούδας Γεώργιος
Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Φυσικής, Παν/μιο Ιωαννίνων



Φυτάς Γεώργιος
Καθηγητής, Τμήμα Επιστ. και Τεχν. Υλικών, Παν/μιο Κρήτης



Φώτσης Θεόδωρος
Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Παν/μιο Ιωαννίνων



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής που εκπονήθηκε στο Τμήμα Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Φυσικής.

Τις θερμότερες ευχαριστίες οφείλω στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Φλούδα για την υπόδειξη του πολύ ενδιαφέροντος θέματος, την καθοδήγηση και το ειλικρινές ενδιαφέρον για την επιστημονική μου κατάρτιση καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών, καθώς επίσης και τους Καθηγητές κ.κ. Μάριο Κοσμά και Γεώργιο Φυτά για την πολύτιμη βοήθειά τους. Θερμά ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: τους Καθηγητές κ.κ. Σπ. Γεωργάτο και Θ. Φώτση και τους Αναπληρωτές Καθηγητές κ.κ. Θωμά Μπάκα και Ι. Φύλη, για τις καίριες υποδείξεις και παρατηρήσεις τους.

Ευχαριστώ τον Καθ. Harm-Anton Klok της École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) για τη σύνθεση πολλών από τα πολυπεπίδια που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Ν. Χατζηχρηστίδη, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ερμή Ιατρού και τον κ. Θρασύβουλο Αλιφέρη του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών για τη σύνθεση των μοντέλων συμπολυμερών πεπτιδίων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Δεν μπορώ να παραλείψω τις ευχαριστίες μου στους Δρ. I. Schnell του Max-Planck Institut für Polymerforschung (MPI-P) στο Mainz για τις μετρήσεις NMR και Δρ. I. Lieberwirth (MPI-P) για τα πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, στον Καθηγητή κ. K. Müllen και τον Δρ. G. Mihon (MPI-P) για τη σύνθεση των δενδρομερών πολυπεπτιδίων. Οφείλω επίσης να μνημονεύσω τον εκλιπόντα (Ιούνιος 2005) Καθηγητή T. Pakula, για τη συνεργασία σε πειράματα ρεολογίας που έγιναν στο MPI-P.

Ευχαριστώ τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας για την οικονομική υποστήριξη μέσω του Προγράμματος Ενίσχυσης Ερευνητικού Δυναμικού (ΠΕΝΕΔ) 2001, κωδ. 529,.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Κωνσταντίνο Μπουκουβάλα, Αντώνη Γίτσα και Mahdy Elmahdy για το πολύ καλό κλίμα συνεργασίας καθ' όλο το διάστημα εκπόνησης της διατριβής, καθώς και τον κ. Γιώργο Τσουμάνη για την τεχνική υποστήριξη.

Τέλος, ένα πολύ θερμό ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου για τη συνεχή συμπαράστασή της.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εργασία αυτή έγινε η μελέτη της αυτο-οργάνωσης και της δυναμικής βιολογικών μακρομορίων (πολυπεπτιδίων), με σκοπό να απαντηθούν ορισμένα ερωτήματα, για τα οποία η βιβλιογραφία δίνει αντικρουόμενα αποτελέσματα. Το πρώτο αφορά το πάγωμα της δυναμικής των πεπτιδίων σε μια ορισμένη θερμοκρασία, γνωστή ως θερμοκρασία υάλου (T_g). Για το θέμα αυτό, ενώ υπάρχει γενικά συμφωνία για την ύπαρξη μιας δυναμικής μετάβασης στις πρωτεΐνες (η οποία τις καθιστά βιολογικά ανενεργές), οι απόψεις για την προέλευσή της δίστανται: α) συνδέεται με τοπικές κινήσεις πλευρικών αλυσίδων και μικρών μορίων που συνυπάρχουν με τις πρωτεΐνες, όπως προτείνουν ορισμένα πειράματα και προσομοιώσεις, ή β) είναι ενδογενές χαρακτηριστικό αυτών των συστημάτων; Επίσης, για το ίδιο θέμα, δεν έχει αποσαφηνισθεί η θερμοδυναμική παράμετρος που είναι υπεύθυνη για το πάγωμα της δυναμικής στο T_g . Το δεύτερο ερώτημα είναι κατά πόσον οι δευτεροταγείς δομές είναι ιδανικές ή έχουν πεπερασμένο μήκος εμμοής. Στην περίπτωση που ισχύει το δεύτερο, ποιες παράμετροι καθορίζουν την ακριβή τιμή του (είδος αμινοξέος, διαλύτες, εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο); Τέλος, τίθεται το ερώτημα ποια είναι η επίδραση του θερμοδυναμικού πεδίου, που είναι υπεύθυνο για το διαχωρισμό των συστάδων σε συσταδικά συμπολυμερή, στο είδος των δευτεροταγών δομών των πολυπεπτιδίων και το μήκος εμμοής τους;

Η απάντηση των παραπάνω ερωτημάτων απαιτεί τη χρήση μοντέλων συστημάτων ομοπολυπεπτιδίων και συμπολυμερών (με μικρή διασπορά μοριακών βαρών), αλλά και διαφορετικών «στατικών» και «δυναμικών» τεχνικών ικανών να καταγράψουν τη δομή και τη δυναμική των πολυπεπτιδίων. Γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές ^{13}C -NMR, SAXS, WAXS, TEM, ΔΘΣ και ΠΟΜ και οι ΔΦ και ρεολογία, αντίστοιχα. Ο συνδυασμός στατικών και δυναμικών μεθόδων έδειξε ότι η «μετάβαση υάλου» αποτελεί ενδογενές χαρακτηριστικό των πεπτιδίων, ανεξάρτητα από το είδος της δευτεροταγούς δομής, το είδος του πλευρικού υποκαταστάτη και την ύπαρξη διαλύτη, σε αντίθεση με τα μέχρι τώρα δεδομένα της βιβλιογραφίας. Σε διαλύματα πεπτιδίων παρατηρούνται δύο σημεία υάλου, του διαλύτη και του πεπτιδίου, ενώ η εξάρτηση του σημείου υάλου από το μοριακό βάρος τύπου Fox-Flory αποδεικνύει ότι η «μετάβαση υάλου» δεν οφείλεται σε κινήσεις πλευρικών αλυσίδων. Οι δευτεροταγείς δομές δεν είναι ιδανικές και περιέχουν «ατέλειες» με σπασμένους δεσμούς υδρογόνου. Η παρατηρούμενη «μετάβαση υάλου» οφείλεται στην τμηματική (*segmental*) κίνηση εντός των ατελειών. Η εφαρμογή εξωτερικής πίεσης έδειξε ότι η θερμοδυναμική παράμετρος που είναι υπεύθυνη για το «πάγωμα» της δυναμικής στο σημείο υάλου είναι η θερμοκρασία, ενώ η πυκνότητα βρέθηκε να έχει πολύ μικρότερη

επίδραση.

Η ύπαρξη ατελειών οδηγεί σε ένα πεπερασμένο μήκος εμμοής ζ των δευτεροταγών δομών. Στα ξηρά ομοπολυπεπτίδια με α -ελικοειδή δομή το μήκος εμμοής έχει τιμή $\zeta \sim 2$ nm η οποία αυξάνεται με την προσθήκη διαλύτη ή την επίδραση ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου. Το ισχυρό θερμοδυναμικό πεδίο που εμφανίζεται σε συσταδικά συμπολυμερή κατά τον διαχωρισμό φάσεων, έχει την τάση να εκτείνει τις αλυσίδες και να μειώνει τον αριθμό ατελειών, αυξάνοντας το μήκος εμμοής των α -ελίκων. Αντίθετα, το ασθενές θερμοδυναμικό πεδίο στην περίπτωση αναμεμιγμένων συσταδικών συμπολυμερών, αποσταθεροποιεί τις β -φυλλοειδείς δομές, με πιθανές εφαρμογές στη φαρμακευτική, καθώς η συσσώρευση β -φύλλων συνδέεται με εμφάνιση ασθενειών του εγκεφάλου (*prion*).

ABSTRACT

In the present thesis we studied the hierarchical self-assembly and dynamics of biological macromolecules (polypeptides) in order to give answers to some open questions, for which the existing literature data give ambiguous results. The first is concerned with the “freezing” of the protein dynamics at a certain temperature, known as the glass temperature (T_g). Although there is consensus on the existence of a dynamic arrest at T_g , which inhibits biological activity, its origin is not well understood: is it related to local motions of the side chains and/or small molecules coexisting with the proteins, as it is suggested by a number of experiments and simulations, or is it an intrinsic feature of these systems? In addition, the dominant thermodynamic parameter that controls the freezing of the dynamics at T_g remains unknown. The second question is the persistence length of the secondary structures, which are usually considered to be ideal. Which parameters control this length (type of amino-acid, solvents, external electric field)? Finally, what is the effect of the thermodynamic field, which is responsible for phase segregation in block copolymers, on the type and persistence length of secondary structures?

The answer to these questions requires the use of model homo- and copolypeptides with narrow molecular weight distributions and different “static” and “dynamic” techniques for the investigation of the structure over multiple length scales as well as of the associated dynamics of polypeptides. For this reason we employed ^{13}C -NMR, SAXS, WAXS, TEM, DSC and POM and DS and rheology, respectively. The combination of static and dynamic methods revealed that the “glass transition” is an intrinsic feature of polypeptides, irrespective of the type of secondary structure, side chain and the coexistence of small molecules (solvent), in contrast with the previous studies. In polypeptide solutions two glass transitions are observed, corresponding to the solvent and the peptide, whereas the Fox-Flory molecular weight dependence reveals that the “transition” is not related to side chain relaxations. The secondary structures are “defected”, i.e., they contain broken hydrogen bonds and the “glass transition” reflects their relaxation. The thermodynamic parameter which is responsible for the freezing of the dynamics at T_g is thermal energy, in contrast with the minimal effect of density.

As a result of the existence of defects along the backbone, the persistence length of the secondary structures is finite. The α -helical structure in bulk homopolypeptides has a persistence length of ~ 2 nm, which is increased by the addition of small quantities of helicogenic solvents or the application of strong external electric field. The strong thermodynamic field, which appears in

phase segregated block copolymers, extends the polymer chains and increases the persistence length of α -helical structures. On the contrary, the weak thermodynamic field in the case of disordered copolymers destabilizes β -sheets. Given that aggregates of β -sheets have been associated with amyloid and prion diseases, the latter effect could have potential applications in pharmaceuticals.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΔΟΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ – ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΩΝ.....	13
1.1 Εισαγωγή.....	13
1.2 Χημική δομή των πρωτεϊνών.....	13
1.3 Δυνάμεις αλληλεπίδρασης στις πρωτεΐνες.....	15
1.4 Επίπεδα δομής των πρωτεϊνών.....	16
1.5 Μέθοδοι προσδιορισμού της δομής.....	22
1.6 Συνθετικά πολυπεπτίδια – συμπολυμερή.....	28
1.7 Συμπεράσματα βιβλιογραφίας.....	31
1.8 Στόχος της παρούσας εργασίας.....	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ - ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ.....	35
2.1 Εισαγωγή.....	35
2.2 Ευκαμψία κύριας αλυσίδας – μετουσίωση.....	35
2.3 Σύγκριση πρωτεϊνών – συνθετικών μακρομορίων.....	38
2.4 Δυναμική πολυμερών.....	39
2.5 «Μετάβαση υάλου» και βιολογικά μακρομόρια – Πειραματικές ενδείξεις.....	46
2.6 Συμπεράσματα από τις προηγούμενες μελέτες.....	71
2.7 Στόχος της παρούσας εργασίας.....	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	77
3.1 Υλικά.....	77
3.2 Πειραματικές μέθοδοι χαρακτηρισμού της δομής.....	84
3.3 Πειραματικές μέθοδοι μελέτης της δυναμικής.....	90
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΥΤΟ-ΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΥΑΛΩΔΟΥΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ.....	109
4.1 Εισαγωγή.....	109
4.2 Ομοπολυπεπτίδια πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικού οξέος) (PBLG) διαφόρων μοριακών βαρών.....	110
4.3 Ομοπολυπεπτίδια πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνης) (PZLL), πολυ(L-λευκίνης) (PLeu), πολυγλυκίνης (PGly) και πολυ(ο-βενζυλο-L-τυροσίνης) (PTyr).....	124
4.4 Διαλύματα PBLG σε μ-κρεσόλη.....	132
4.5 Επίδραση της πίεσης στη δυναμική των πεπτιδίων.....	135
4.6 Συμπεράσματα.....	144
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΜΗΚΟΣ ΕΜΜΟΝΗΣ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΩΝ ΔΟΜΩΝ.....	149
5.1 Εισαγωγή.....	149
5.2 Μηχανισμοί χαλάρωσης πάνω από το σημείο υάλου.....	149
5.3 Εκτίμηση του μήκους εμμόνης των α-ελίκων.....	155
5.4 Προσανατολισμός α-ελίκων από ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο.....	158
5.5 Κινητικότητα των ιόντων.....	166
5.6 Συμπεράσματα.....	168
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 – ΑΥΤΟ-ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΣΕ ΣΥΣΤΑΔΙΚΑ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΗ ΜΕ ΠΕΠΤΙΔΙΑ...	171
6.1 Εισαγωγή.....	171

6.2 Αυτο-οργάνωση και δυναμική τρισυσταδικών συμπολυμερών πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικού οξέος)- <i>b</i> -πολυ(αιθυλενογλυκόλης)- <i>b</i> -πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικού οξέος) (PBLG- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PBLG).....	173
6.3 Αυτο-οργάνωση τρισυσταδικών συμπολυμερών πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικού οξέος)- <i>b</i> -πολυ(διμεθυλο-σιλοξάνιου)- <i>b</i> -πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικού οξέος) (PBLG- <i>b</i> -PDMS- <i>b</i> -PBLG).....	188
6.4 Δισυσταδικά συμπολυπεπτίδια πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικού οξέος)- <i>b</i> -πολυγλυκίνης (PBLG- <i>b</i> -PGly).....	196
6.5 Δισυσταδικό συμπολυμερές πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνης)- <i>b</i> -πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικού οξέος) (PZLL- <i>b</i> -PBLG) και τρισυσταδικό PZLL- <i>b</i> -PBLG- <i>b</i> -PZLL.....	208
6.6 Μήκος εμμονής των δευτεροταγών δομών στα συσταδικά συμπολυμερή με πεπτίδια.....	211
6.7 Συμπεράσματα.....	217
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	221
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ.....	225
CURRICULUM VITAE.....	229

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΔΟΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ – ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

1.1 Εισαγωγή

Οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια είναι από τις σημαντικότερες ενώσεις που απαντούν σε ζωντανούς οργανισμούς. Αποτελούν το ~50% του ξηρού βάρους των κυττάρων και έχουν τη μεγαλύτερη ποικιλία δομών από όλα τα βιομόρια. Χρησιμεύουν ως δομικά στοιχεία των οργανισμών, αλλά η σπουδαιότητά τους βρίσκεται κυρίως στο ότι επιτελούν πολλές λειτουργίες ως ένζυμα, καταλύοντας με μεγάλη εκλεκτικότητα πολλές χημικές αντιδράσεις. Η βιολογική δράση τους εξαρτάται άμεσα από τη δομή τους, γιατί πρέπει να έχουν κατάλληλο σχήμα και δραστικές ομάδες ατόμων για να συνδεθούν με τα υποστρώματα. Στα επόμενα υποκεφάλαια παρουσιάζονται συνοπτικά η δομή των πρωτεϊνών και οι κυριότερες πειραματικές μέθοδοι εύρεσής της.

1.2 Χημική δομή των πρωτεϊνών

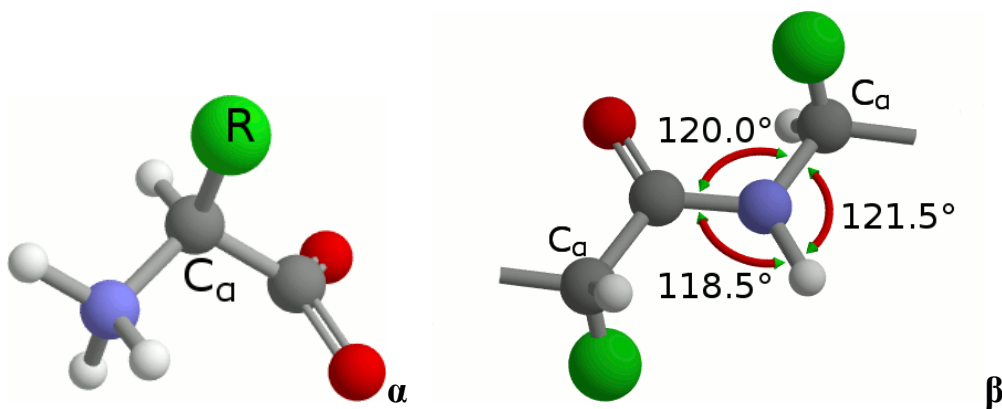
Από χημική άποψη, οι πρωτεΐνες μπορούν να θεωρηθούν γραμμικά, μη διακλαδισμένα πολυμερή που προέρχονται από αμινοξέα. Η σύνθεσή τους στη φύση γίνεται στα ριβοσώματα των κυττάρων μέσω του mRNA που μεταφέρει τη γενετική πληροφορία από το DNA. Τα αμινοξέα που βρίσκονται στη φύση είναι 20, αν και υπάρχουν και ορισμένα άλλα, που δεν κωδικοποιούνται απευθείας στο DNA, αλλά σχηματίζονται με χημική αντίδραση μετά τη μετάφραση του mRNA. Η χημική δομή τους φαίνεται στον Πίνακα 1.1. Όλα είναι α -αμινοξέα, με τον άνθρακα C_{α} να έχει τέσσερις διαφορετικούς υποκαταστάτες (εκτός από τη γλυκίνη, όπου $R=H$) και να είναι κέντρο στερεοϊσομερείας. Τα φυσικά αμινοξέα βρίσκονται όλα στην L στερεοϊσομερή μορφή (εικ. 1.1α). Οι πλευρικές ομάδες ατόμων τους (R) διαφέρουν πολύ στο μέγεθος και τις χαρακτηριστικές ομάδες που περιέχουν, και είναι αυτές που ορίζουν το ρόλο του αμινοξέος μέσα στην πρωτεΐνη. Ορισμένες δεν περιέχουν ηλεκτραρνητικά άτομα και είναι μη πολικές, άλλες είναι πολικές αλλά μη ιονιζόμενες, ενώ άλλες είναι βασικές ή όξινες. Οι τελευταίες δύο κατηγορίες μπορούν να αποκτήσουν φορτίο προσλαμβάνοντας ή αποβάλλοντας πρωτόνιο, αντίστοιχα, ανάλογα με το pH.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΔΟΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ – ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

Πίνακας 1.1. Τα 20 κοινά αμινοξέα των πρωτεϊνών. Τα καρβοξύλια και οι αμινομάδες παρουσιάζονται μη ιονισμένα.

<p>Δομή των α-L-αμινοξέων. Η αμινομάδα (-NH₂) και το καρβοξύλιο (-COOH) ενώνονται με άλλα αμινοξέα για το σχηματισμό της πεπτιδικής αλυσίδας. Η ομάδα R είναι η πλευρική αλυσίδα.</p>		
Μη πολικές πλευρικές αλυσίδες		
αλανίνη (Ala, A)		μεθειονίνη (Met, M)
βαλίνη (Val, V)		προλίνη (Pro, P)
γλυκίνη (Gly, G)		
ισολευκίνη (Ile, I)		τρυπτοφάνη (Trp, W)
λευκίνη (Leu, L)		
		φαινυλαλανίνη (Phe, F)
Πολικές πλευρικές αλυσίδες		
ασπαραγίνη (Asn, N)		σερίνη (Ser, S)
γλουταμίνη (Gln, Q)		θρεονίνη (Thr, T)
Όξινες πλευρικές αλυσίδες		Βασικές πλευρικές αλυσίδες
ασπαρτικό οξύ (Asp, D)		αργινίνη (Arg, R)
γλουταμινικό οξύ (Glu, E)		
κυστεΐνη (Cys, C)		ιστιδίνη (His, H)
τυροσίνη (Tyr, Y)		
		λυσίνη (Lys, K)

Το καρβοξύλιο ενός αμινοξέος μπορεί να ενωθεί με την αμινομάδα ενός άλλου προς σχηματισμό αμιδικού δεσμού (-CONH-) με αποβολή ενός μορίου H₂O, όπως και κατά τη σύνθεση πολυαμιδίων. Στις πρωτεΐνες ο δεσμός αυτός ονομάζεται πεπτιδικός και είναι καθοριστικής σημασίας για τις ιδιότητές τους. Αν και θα περιμέναμε μόνο ο δεσμός C=O να είναι διπλός και οι υπόλοιποι απλοί, μελέτες της γεωμετρίας του έδειξαν ότι όλες οι γωνίες γύρω από τα άτομα άνθρακα και αζώτου του δεσμού είναι σχεδόν ακριβώς 120°, που σημαίνει ότι και ο πεπτιδικός δεσμός C-N έχει χαρακτήρα διπλού δεσμού. Αυτό έχει ως συνέπεια να μην επιτρέπονται περιστροφές γύρω του και τα άτομα C, O, N, H και οι άνθρακες C_α των γειτονικών αμινοξέων να βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο (εικ. 1.1β). Στις φυσικές πρωτεΐνες ο πεπτιδικός δεσμός έχει *trans* διαμόρφωση. Επιπλέον, όπως θα δούμε και πιο κάτω, το άτομο του υδρογόνου που συνδέεται με το άζωτο μπορεί να σχηματίσει δεσμό υδρογόνου με ηλεκτραρνητικά άτομα. Η αλυσίδα που σχηματίζουν τα άτομα N, C_α και C θα αναφέρεται ως πεπτιδική ή κύρια αλυσίδα.



Εικ. 1.1. (α) Δομή α-L-αμινοξέος. Η πλευρική αλυσίδα συμβολίζεται με R. Τα χρώματα υποδηλώνουν το είδος των ατόμων: (λευκό) υδρογόνο, (μαύρο) άνθρακας, (κόκκινο) οξυγόνο, (μωβ) άζωτο. (β) Πεπτιδικός δεσμός. Οι γωνίες γύρω από το άτομο του αζώτου είναι ~120°, που σημαίνει ότι και ο δεσμός C-N έχει χαρακτήρα διπλού δεσμού. Τα άτομα C, O, N, H και ο δύο άνθρακες C_α βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο σε *trans* διαμόρφωση.

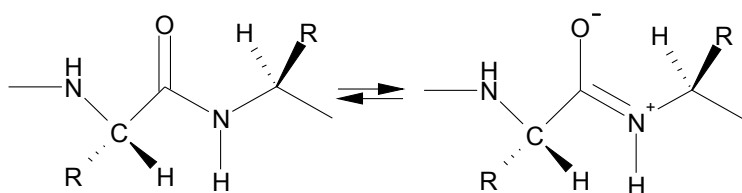
1.3 Δυνάμεις αλληλεπίδρασης στις πρωτεΐνες

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο τμήμα, οι πρωτεΐνες περιέχουν πολλά είδη ατόμων με μεγάλη διαφορά στην ηλεκτραρνητικότητα. Επομένως, σε αντίθεση με τα περισσότερα συνθετικά μακρομόρια, υπάρχουν πολλά είδη αλληλεπιδράσεων. Οι κυριότερες δυνάμεις είναι:

- **Δυνάμεις van der Waals.** Είναι ασθενείς δυνάμεις μεταξύ επαγόμενων ηλεκτρικών φορτίων και σταθεροποιούν κυρίως το εσωτερικό των πρωτεϊνών.
- **Δυνάμεις διπόλου-διπόλου.** Λόγω του μεγάλου αριθμού ηλεκτραρνητικών ατόμων

υπάρχουν πολλοί πολικοί δεσμοί. Ειδικότερα, οι πεπτιδικό δεσμοί, λόγω συντονισμού, έχουν αρκετά μεγάλη διπολική ροπή (εικ. 1.2).

- **Δεσμοί υδρογόνου.** Τα άτομα του υδρογόνου και του οξυγόνου του πεπτιδικού δεσμού, όπως και ορισμένες πλευρικές αλυσίδες, έχουν την τάση να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου. Η ενέργειά τους είναι σχετικά μικρή (~12 kJ/mol), αλλά λόγω του μεγάλου αριθμού τους αποτελούν υπολογίσιμο παράγοντα για την τελική διαμόρφωση.
- **Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.** Ένας μεγάλος αριθμός αμινοξέων έχει μη πολικές πλευρικές αλυσίδες, με αποτέλεσμα τα τμήματα που τα περιέχουν να έχουν την τάση να συγκεντρώνονται μακριά από το υδατικό περιβάλλον, στο εσωτερικό της πρωτεΐνης. Είναι από τους κυριότερους παράγοντες που καθορίζουν την τρισδιάστατη πρωτεϊνική δομή.
- **Ηλεκτροστατικές (Coulomb) αλληλεπιδράσεις.** Οι όξινες και οι βασικές πλευρικές αλυσίδες συνήθως είναι φορτισμένες και συγκεντρώνονται στο εξωτερικό της πρωτεΐνης.



Εικ. 1.2. Πολικότητα του πεπτιδικού δεσμού. Λόγω συντονισμού, το άτομο του οξυγόνου έχει φορτίο ~ -0.28, ενώ του αζώτου ~ +0.28, δημιουργώντας μια μόνιμη διπολική ροπή.

1.4 Επίπεδα δομής των πρωτεϊνών

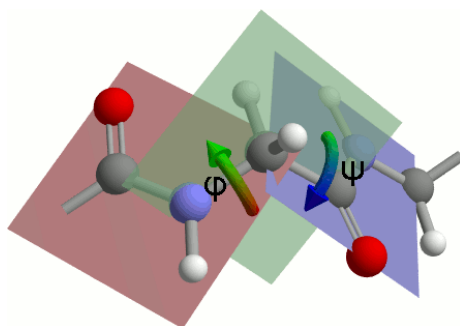
1.4.1 Πρωτοταγής (1°) δομή

Ο μεγάλος αριθμός διαφορετικών αλληλεπιδράσεων στις πρωτεΐνες οργανώνει τη δομή τους σε πολλαπλά επίπεδα. Η αλληλουχία των αμινοξέων πάνω στην πεπτιδική αλυσίδα ονομάζεται πρωτοταγής (1°) δομή της πρωτεΐνης (ή του πεπτιδίου). Τα δύο άκρα της αλυσίδας δεν είναι ισοδύναμα: το ένα έχει ελεύθερη αμινομάδα (N-άκρο) και είναι αυτό από το οποίο ξεκινά η αρίθμηση, ενώ το άλλο έχει καρβοξύλιο. Συμβατικά, τα μόρια που περιέχουν μέχρι 10 αμινοξέα ονομάζονται διπεπίδια, τριπεπίδια, κ.ο.κ., από 10 ως 20 ονομάζονται ολιγοπεπίδια και πολυπεπίδια όταν έχουν μεγαλύτερο μέγεθος. Πρωτεΐνες λέγονται τα μόρια με βιολογική δράση

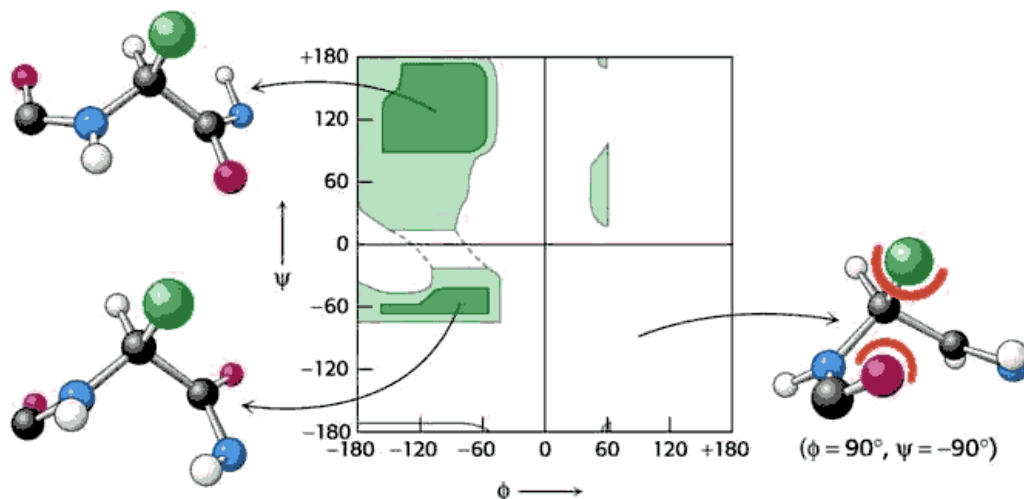
και μπορούν να έχουν μία ή περισσότερες πεπτιδικές αλυσίδες.

1.4.2 Δευτεροταγής (2°) δομή

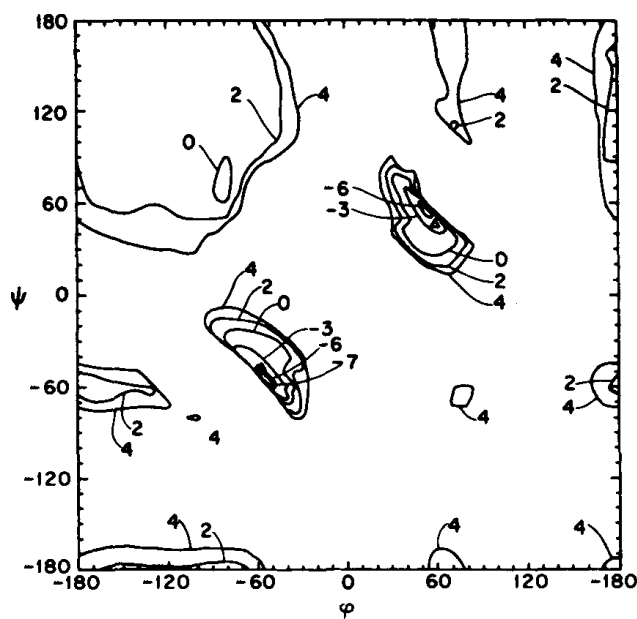
Η διαμόρφωση της αλυσίδας σπάνια είναι εντελώς τυχαία, όπως στα άμορφα πολυμερή. Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, υπάρχει η δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ του HN και του C=O άλλου αμινοξέος, ο οποίος μπορεί να σταθεροποιήσει μία τοπική διαμόρφωση που ονομάζεται δευτεροταγής (2°) δομή. Λόγω του ότι ο πεπτιδικός δεσμός είναι επίπεδος και δεν επιτρέπει περιστροφές γύρω του, για την περιγραφή της διαμόρφωσης αρκούν δύο διέδρες γωνίες: η γωνία ϕ , που σχηματίζει το επίπεδο του πεπτιδικού δεσμού με το επίπεδο που σχηματίζουν τα άτομα N, C $_{\alpha}$ και C=O του επόμενου αμινοξέος, και η γωνία ψ μεταξύ του επιπέδου των NC $_{\alpha}$ C και του επόμενου πεπτιδικού δεσμού (εικ. 1.3). Οι γωνίες δείχνουν την περιστροφή γύρω από τους δεσμούς N-C $_{\alpha}$ και C $_{\alpha}$ -C, αντίστοιχα. Η πιο εκτεταμένη διαμόρφωση λαμβάνεται για $\phi=\psi=180^{\circ}$. Δεν είναι επιτρεπόμενοι όλοι οι συνδυασμοί (ϕ,ψ), γιατί οι γωνίες επηρεάζουν και τη θέση των πλευρικών αλυσίδων οι οποίες μπορεί να έρθουν πολύ κοντά μεταξύ τους ή με άτομα της κύριας αλυσίδας. Το διάγραμμα *Ramachandran* (εικ. 1.4) δείχνει τις τιμές (ϕ,ψ) που δεν οδηγούν σε επικάλυψη ατομικών τροχιακών [1]. Πιο πολλές πληροφορίες δίνει το διάγραμμα της ενέργειας συναρτήσεως των ϕ,ψ , γιατί λαμβάνει υπόψη όλες τις αλληλεπιδράσεις. Η εικ. 1.5 είναι το αντίστοιχο διάγραμμα για την πολυ(L-αλανίνη) [2]. Οι περιοχές όπου η ενέργεια είναι σημαντικά μειωμένη αντιστοιχούν σε δομές που ευνοούν το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου αφήνοντας και ελεύθερο χώρο για τις πλευρικές αλυσίδες.



Εικ. 1.3. Ορισμός των γωνιών περιστροφής ϕ,ψ γύρω από τους δεσμούς N-C $_{\alpha}$ και C $_{\alpha}$ -C. Εδώ $\phi=-120^{\circ}$, $\psi=+120^{\circ}$.



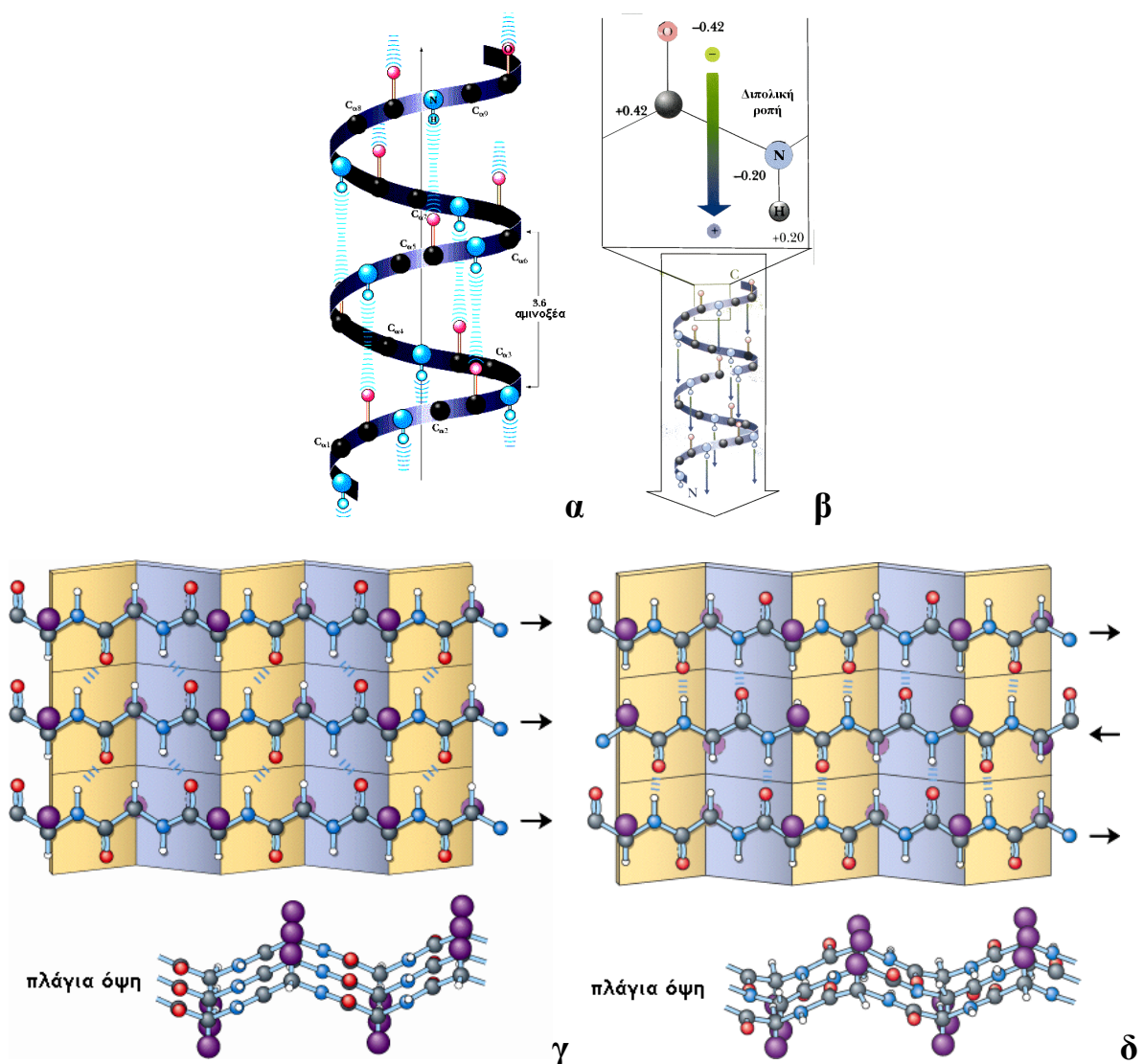
Εικ. 1.4. Γενικό διάγραμμα Ramachandran για α -L-αμινοξέα [1]. Οι περιοχές που σημειώνονται με πράσινο δείχνουν τις τιμές (ϕ, ψ) που αντιστοιχούν σε διαμορφώσεις που δεν οδηγούν σε επικάλυψη ατομικών τροχιακών και επομένως είναι επιτρεπόμενες, ενώ οι λευκές είναι «απαγορευμένες». Το μοντέλο κάτω δεξιά δείχνει μια χαρακτηριστική περίπτωση διαμόρφωσης που οδηγεί σε άπωση van der Waals.



Εικ. 1.5. Ενερgetικό διάγραμμα συναρτήσεως των γωνιών ϕ, ψ για την πολυ(L-αλανίνη) (εικ. από [2]). Οι περιοχές μεγαλύτερης σταθερότητας ($\phi \approx -60^\circ, \psi \approx -60^\circ$ και $\phi \approx +60^\circ, \psi \approx +60^\circ$) συμπίπτουν με επιτρεπόμενες στο διάγραμμα Ramachandran (εικ. 1.4).

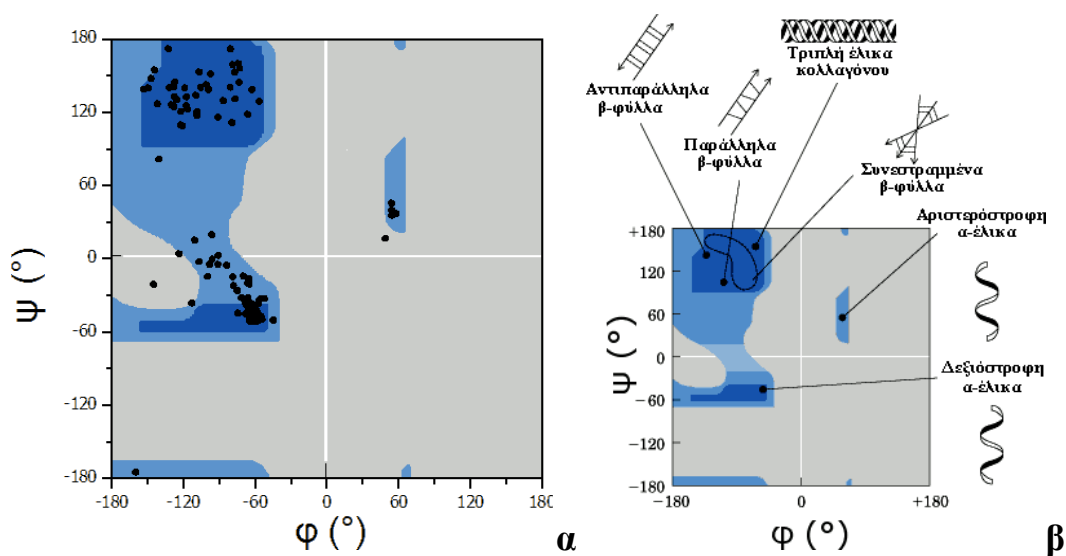
Από τα παραπάνω διαγράμματα προκύπτει ότι οι σταθερότερες και πιο συχνά απαντώμενες δευτεροταγείς δομές είναι δύο: η α -έλικα και η β -φυλλοειδής δομή (εικ. 1.6), που αντιστοιχούν σε γωνίες $\phi = -58^\circ, \psi = -47^\circ$ και $\phi \sim -120^\circ, \psi \sim +120^\circ$. Η α -έλικα είναι δεξιόστροφη, περιλαμβάνει 3.6 (=18/5) αμινοξέα ανά στροφή και το βήμα της είναι 5.1 Å (μετατόπιση 1.5 Å / αμινοξύ). Οι δεσμοί υδρογόνου είναι ενδομοριακοί μεταξύ του n -οστού και του $(n+4)$ -οστού αμινοξέος και οι πλευρικές

αλυσίδες τοποθετούνται στο εξωτερικό της έλικας. Ο άξονας της έλικας είναι παράλληλος με τους δεσμούς υδρογόνου, με αποτέλεσμα οι διπολικές ροπές των πεπτιδικών δεσμών να προστίθενται και να σχηματίζεται μια μεγάλη συνολική διπολική ροπή ~ 3.5 Debye/μονομερές (Κεφ. 2). Στη β -φυλλοειδή δομή οι δεσμοί υδρογόνου δεν σχηματίζονται μεταξύ γειτονικών αμινοξέων, αλλά μεταξύ διαφορετικών πεπτιδικών αλυσίδων ή μακρινών αμινοξέων της ίδιας αλυσίδας που αναδιπλώνεται. Οι αλυσίδες (β -strands) ενός β -φύλλου μπορεί να είναι παράλληλες ή αντιπαράλληλες και η απόσταση μεταξύ τους είναι ~ 6 Å, ενώ μεταξύ διαδοχικών αμινοξέων είναι ~ 3.5 Å. Η απόσταση μεταξύ β -φύλλων εξαρτάται από το μέγεθος των πλευρικών αλυσίδων.

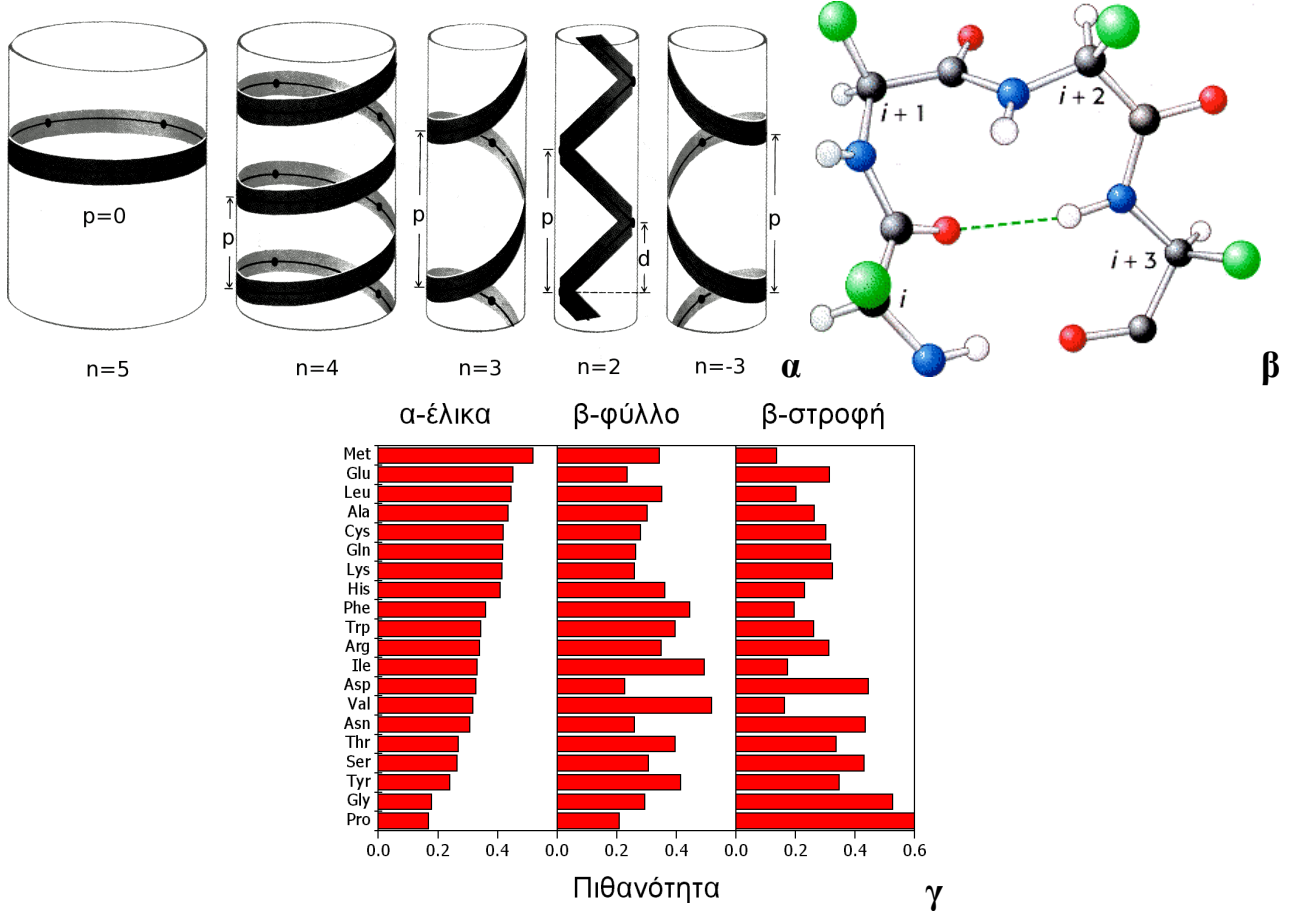


Εικ. 1.6. Κυριότερες δευτεροταγείς δομές: (α) α -έλικα ($\varphi = -58^\circ$, $\psi = -47^\circ$), με 3.6 αμινοξέα ανά στροφή. Απεικονίζονται μόνο τα άτομα της κύριας αλυσίδας. (β) διπολική ροπή της α -έλικας. Οι δεσμοί υδρογόνου είναι παράλληλοι προς τον άξονα της έλικας, με αποτέλεσμα η διπολική ροπή των πεπτιδικών δεσμών να προστίθεται. Η συνολική διπολική ροπή είναι 3.5 Debye/μονομερές, όπως θα αναφερθεί στο Κεφ. 2. (γ) παράλληλα και (δ) αντιπαράλληλα β -φύλλα ($\varphi \sim -120^\circ$, $\psi \sim +120^\circ$). Οι δεσμοί υδρογόνου σημειώνονται με διακεκομμένες γραμμές. (εικόνες από αναφ. [3]).

Εκτός από τις δύο δομές που αναφέρθηκαν υπάρχουν και άλλες (εικ. 1.7-1.8), όπως η έλικα 3_{10} (δεσμός υδρογόνου μεταξύ των n και $n+3$ αμινοξέων), ενώ μερικά αμινοξέα, όπως η προλίνη, ευνοούν τη δημιουργία β -στροφών που επιτρέπουν την αλλαγή κατεύθυνσης (εικ. 1.8β). Κατά κανόνα οι δομές που αναφέρθηκαν εναλλάσσονται πάνω στην αλυσίδα και παρεμβάλλονται και άμορφα τμήματα. Η εικ. 1.8γ δείχνει στατιστικά δεδομένα για τη συμμετοχή των 20 αμινοξέων στις κυριότερες δευτεροταγείς δομές.



Εικ. 1.7. (α) τιμές γωνιών (ϕ, ψ) για όλα τα αμινοξέα (εκτός Gly, Pro) της πρωτεΐνης φραταζίνης. Η συντριπτική πλειοψηφία τους βρίσκεται εντός των επιτρεπόμενων περιοχών. (β) Σταθερές δευτεροταγείς δομές που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένες τιμές (ϕ, ψ).

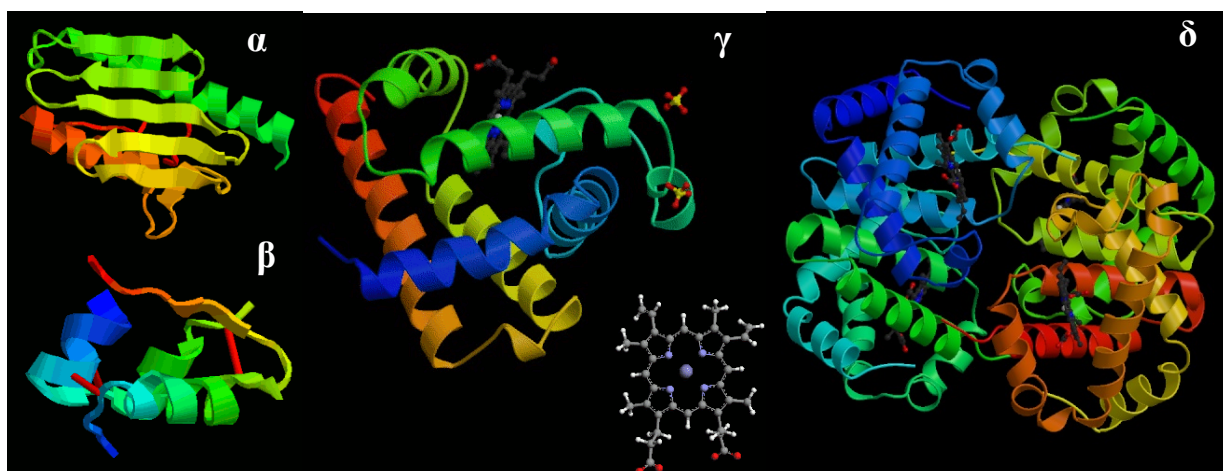


Εικ. 1.8. (α) Διάφορα μοντέλα ελίκων που μπορούν να σχηματιστούν από πεπτιδικές αλυσίδες. Το n υποδηλώνει τον αριθμό των αμινοξέων ανά στροφή [3]. (β) Δομή β-στροφής (β-turn) που επιτρέπει αλλαγή κατεύθυνσης της αλυσίδας. (γ) Πιθανότητα συμμετοχής των αμινοξέων στις τρεις κυριότερες δομές, από στατιστικά δεδομένα σε μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών (δεδομένα από αναφ. [4]).

1.4.3 Τριτοταγής (3°) και τεταρτοταγής (4°) δομή

Η πρωτεϊνική αλυσίδα μπορεί να πάρει μια συνολική σταθερή διαμόρφωση που ονομάζεται τριτοταγής (3°) δομή (εικ. 1.9α), ενώ η δευτεροταγής δομή συνήθως αναφέρεται στην τοπική διαμόρφωση τμήματος της αλυσίδας με λίγα αμινοξέα. Η τριτοταγής δομή σταθεροποιείται με τις αλληλεπιδράσεις που αναφέρθηκαν πιο πάνω, αλλά και με δισουλφιδικούς δεσμούς -S-S- μεταξύ πλευρικών αλυσίδων κυστεΐνης που λειτουργούν ως σταυροδεσμοί (*crosslinks*) (εικ. 1.9β). Πολλές πρωτεΐνες περιέχουν και άλλα μικρά μόρια (συμπαράγοντες), που είναι απαραίτητα για τη δράση τους, όπως η αίμη στην αιμοσφαιρίνη και τη μυοσφαιρίνη (εικ. 1.9γ) που συνδέονται με αυτές με μη ομοιοπολικό δεσμό. Οι πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους αποτελούνται συνήθως από περισσότερες από μία πεπτιδικές αλυσίδες συνδεδεμένες με μη ομοιοπολικό δεσμό, σχηματίζοντας μια υπερμοριακή δομή που ονομάζεται τεταρτοταγής (4°) δομή. Η δομή αυτή σταθεροποιείται συνήθως μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων. Η εικ. 1.9δ δείχνει την 4° δομή της αιμοσφαιρίνης

που αποτελείται από τέσσερις αλυσίδες, ανά δύο ίδιες.



Εικ. 1.9. (α) Τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης φραταξίνης, όπου διακρίνονται οι α-έλικες, τα β-φύλλα και άμορφα τμήματα. (β) Μόριο της ινσουλίνης. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί -S-S- σημειώνονται με κόκκινο. (γ) Η πρωτεΐνη μυσφαιρίνη που αποτελείται από μια αλυσίδα και ένα μόριο αίμης (κάτω δεξιά σε μεγέθυνση, το άτομο στο κέντρο είναι Fe). (δ) Τεταρτοταγής δομή της αιμοσφαιρίνης, που περιλαμβάνει τέσσερις αλυσίδες, ανά δύο ίδιες (εικόνες από Protein Databank, κωδικοί 1EKG, 2INS, 1A6M, 1A3N, αντίστοιχα).

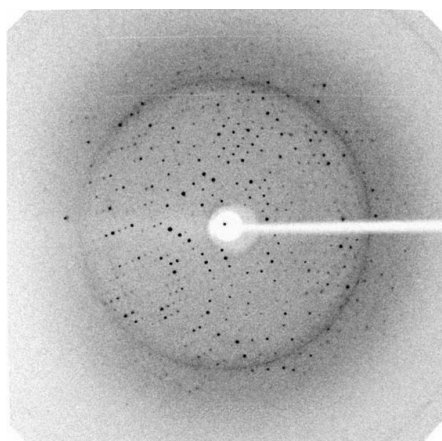
Τονίζεται ιδιαίτερα ότι, αν και όλες οι ιδιότητες των πρωτεϊνών καθορίζονται από την πρωτοταγή τους δομή, παραμένει πολύ δύσκολη η κατανόηση της διαδικασίας κατά την οποία παίρνουν την τελική 3^ο ή 4^ο δομή τους ξεκινώντας από την τυχαία διαμόρφωση που έχουν αμέσως μετά τη σύνθεσή τους στα ριβοσώματα. Η αποτυχία αυτής της διαδικασίας, που ονομάζεται δίπλωση (*fold*ing) καθιστά ανενεργή την πρωτεΐνη και μπορεί να είναι και αιτία ασθενειών που σχετίζονται με συσσωματώματα πρωτεϊνών (*Prions - proteinaceous infectious particles*). Αρκετές πρωτεΐνες μπορούν να σχηματίσουν αμυλοειδή (*amyloid*), συμπαγείς ίνες από πεπτιδικές αλυσίδες που έχουν κυρίως β-φυλλοειδή δομή, στα οποία οφείλονται νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η ασθένεια του Alzheimer ή η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια Creutzfeldt–Jakob [5]. Ορισμένες μελέτες της κινητικής της δίπλωσης θα αναφερθούν στο Κεφ. 2.

1.5 Μέθοδοι προσδιορισμού της δομής

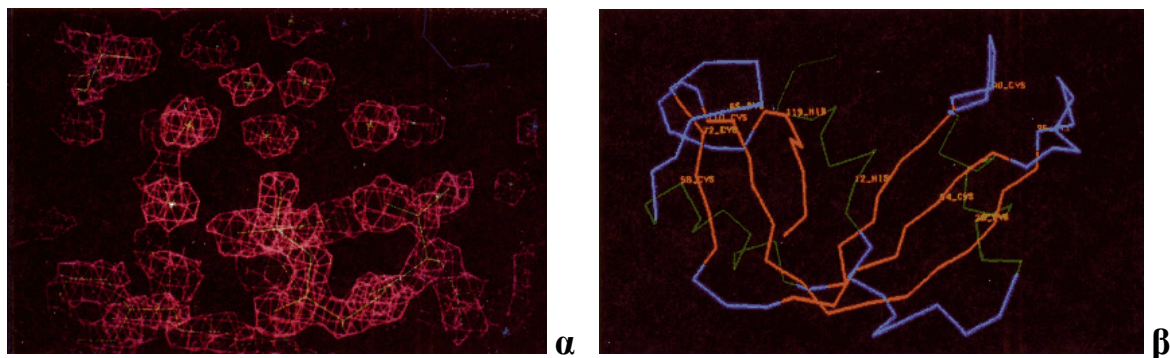
Πριν από κάθε προσπάθεια προσδιορισμού της γεωμετρίας του μορίου μιας πρωτεΐνης είναι απαραίτητη η εύρεση της αλληλουχίας των αμινοξέων που γίνεται με χημικές μεθόδους. Η πληροφορία αυτή συνδυάζεται με τα άλλα πειραματικά αποτελέσματα ώστε να σχηματιστεί ολοκληρωμένη εικόνα του μορίου. Πιο κάτω αναφέρονται οι κυριότερες μέθοδοι για την εύρεση της τρισδιάστατης δομής.

1.5.1 Σκέδαση ακτίνων-X

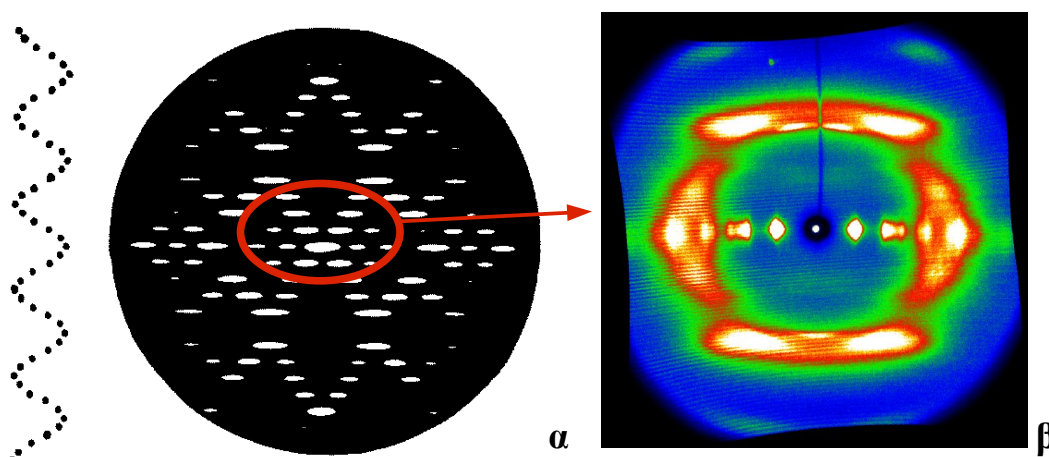
Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες πρωτεϊνών με σκέδαση ακτίνων-X είναι από τις πρώτες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς δίνουν άμεσες πληροφορίες για τη δομή (εικ. 1.10). Στις μετρήσεις χρησιμοποιούνται μονοκρύσταλλοι πρωτεϊνών, σε κάθε πλεγματοειδές σημείο των οποίων βρίσκεται ένα μόριο πρωτεΐνης, που αποτελεί τη βάση του πλέγματος. Από την ανάλυση προκύπτει αρχικά ο τρισδιάστατος «χάρτης» της ηλεκτρονιακής πυκνότητας που δίνει μια χονδρική εικόνα της δομής. Οι λεπτομέρειες προσδιορίζονται στη συνέχεια, με τη χρήση της πρωτοταγούς δομής και κατάλληλους αλγορίθμους, ώστε να βρεθεί ποια διαμόρφωση ταιριάζει καλύτερα με την εικόνα από τις ακτίνες-X [6]. Η εικ. 1.11 δείχνει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα και την κύρια αλυσίδα της ριβονουκλεάσης-A [7]. Η εύρεση της δευτεροταγούς δομής πρωτεϊνών με απλή δομή είναι σχετικά εύκολη. Η ύπαρξη της α -έλικας και της β -φυλλοειδούς δομής που είχε προβλεφθεί με μοντέλα, επιβεβαιώθηκε με μετρήσεις στην κερατίνη και τη φιβροΐνη του μεταξιού, αντίστοιχα. Η εικ. 1.12 δείχνει τη χαρακτηριστική εικόνα σκέδασης από μια τέλεια α -έλικα [8]. Ο προσδιορισμός της τριτοταγούς και τεταρτοταγούς δομής μεγάλων πρωτεϊνών είναι αρκετά επίπονος, γιατί αυτές περιλαμβάνουν πολύ μεγάλο αριθμό ατόμων και επιπλέον αρκετές φορές είναι δύσκολη η δημιουργία καλά σχηματισμένων μονοκρυστάλλων.



Εικ. 1.10. Ανακλάσεις Bragg από κρύσταλλο της πρωτεΐνης HAM1 του *Escherichia coli* [9].



Εικ. 1.11. (α) Ηλεκτρονιακή πυκνότητα στην επιφάνεια της ριβονουκλεάσης-Α που προέκυψε από ανάλυση της σκέδασης ακτίνων-Χ (β) Διαμόρφωση της πεπτιδικής αλυσίδας της πρωτεΐνης, που υπολογίστηκε μέσω της ηλεκτρονιακής πυκνότητας και της πρωτοταγούς δομής (εικόνες από [7]).



Εικ. 1.12. (α) Μοντέλο διακεκομμένης έλικας, που περιγράφει ικανοποιητικά την κύρια αλυσίδα των πεπτιδίων που σχηματίζουν α-έλικα, και υπολογισμένη εικόνα σκέδασης ακτίνων-Χ που αντιστοιχεί σε αυτή (εικ. από [8]). (β) Εικόνα σκέδασης από προσανατολισμένο ομοπολυπεπτίδιο πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ). Οι ομοιότητες με την κεντρική περιοχή της εικόνας (α) είναι εμφανείς και υποδεικνύουν το σχηματισμό α-έλικας (εικ. από [10]).

1.5.2 Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance – NMR)

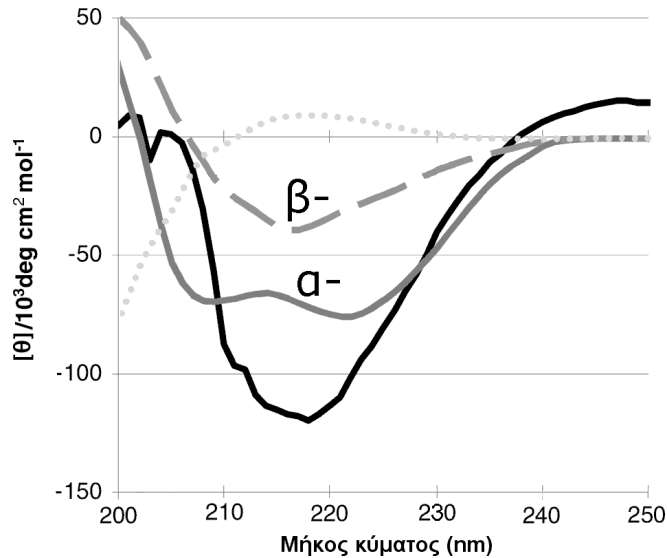
Το NMR δίνει πληροφορίες για το περιβάλλον συγκεκριμένων πυρήνων με μη μηδενικό σπιν, όπως οι ^1H , ^{13}C και ^{15}N . Όταν το μόριο τοποθετείται σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 , κάθε πυρήνας «βλέπει» λίγο διαφορετική ένταση πεδίου B λόγω των ηλεκτρονίων του και των γειτονικών του ατόμων, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η συχνότητα Larmor $\omega = \gamma B$, όπου γ ο γυρομαγνητικός λόγος ($\sim 42 \text{ MHz/Tesla}$ για το πρωτόνιο), όπου συντονίζεται. Η χημική μετατόπιση $\delta = \Delta\omega_0/\omega_0$ είναι χαρακτηριστική της ομάδας ατόμων όπου ανήκει ο πυρήνας, εξαρτάται, όμως, από τη διαμόρφωση. Για παράδειγμα, ο άνθρακας C_α των πεπτιδίων έχει τιμές του $\delta \sim 56 \text{ ppm}$ όταν ανήκει σε α-έλικα και $\delta \sim 50 \text{ ppm}$ σε β-φύλλο, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για τον άνθρακα $C=O$ του πεπτιδικού δεσμού είναι ~ 176 και $\sim 167 \text{ ppm}$ (Πίνακας 1.2) [11]. Στις πρωτεΐνες συνήθως δεν

αρκεί αυτή η πληροφορία, γι' αυτό και χρησιμοποιούνται ειδικές τεχνικές πολυδιάστατου NMR που μελετούν τη μεταφορά μαγνήτισης από έναν πυρήνα σε όμοιους ή διαφορετικούς γειτονικούς, αποκαλύπτοντας ποια αμινοξέα βρίσκονται κοντά στο χώρο (εικ. 1.13). Έχει διαπιστωθεί ότι ο συνδυασμός ^1H -, ^{13}C - και ^{15}N -NMR μπορεί να δώσει πολύ ακριβείς πληροφορίες για τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να αρχίζει να αντικαθιστά την κρυσταλλογραφία. Επιπλέον, έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε διαλύματα πρωτεϊνών [12-15].

Πίνακας 1.2. Τιμές της χημικής μετατόπισης των ανθράκων C_α , C_β (άνθρακας της πλευρικής αλυσίδας που συνδέεται με τον C_α) και C=O (του πεπτιδικού δεσμού) σε διάφορα ομοπολυπεπίδια, όταν σχηματίζουν α -έλικα ή β -φύλλα. Η τελευταία γραμμή περιέχει τις μέσες τιμές από όλα τα πεπίδια.

Πολυπεπίδιο	C_α			C_β			C=O		
	α -έλικα	β -φύλλο	Δ^α	α -έλικα	β -φύλλο	Δ^α	α -έλικα	β -φύλλο	Δ^α
(Ala) _n	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) _n	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 ^δ	39.6 ^δ	(4.1)	175.8	171.3	4.5
[Glu(OBzl)] _n	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
[Glu(OMe)] _n	57.0	51.4	5.6				175.7	172.5	3.2
	47.0 ^ε	51.2	(-4.2)	26.3	29.8	-3.5	175.9	172.2	3.7
(B, M) _n ^β	56.4	50.8	5.6	25.7	28.5	-2.8	176.1	171.7	4.4
[Asp(OBzl)] _n	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) _n	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) _n	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) _n ^γ	57.4			29.9			176.5		
[Lys(Z)] _n	57.6	51.4	6.2	29.3	28.5	-0.8	175.7	170.4	5.3
(Arg) _n ^γ	57.1			28.9			176.8		
(Phe) _n	61.3	53.2	8.1	35.0	39.3	-4.3	175.2	169.0	6.2
(Met) _n	57.2	52.2	5.0	30.2	34.8	-4.6	175.1	170.6	4.5
(Tyr) _n	54.8	52.1	6.5	36.1	39.3	-3.2	176.7	169.6	7.1
	~58.6		~2.7						
(Gly) _n		43.2						168.4	
		44.3						169.2	
			$5.1 \pm 1.0^\epsilon$			$-4.1 \pm 0.7^\epsilon$	$175.8 \pm 0.8^\epsilon$	$170.9 \pm 1.2^\epsilon$	$4.5 \pm 1.1^\epsilon$

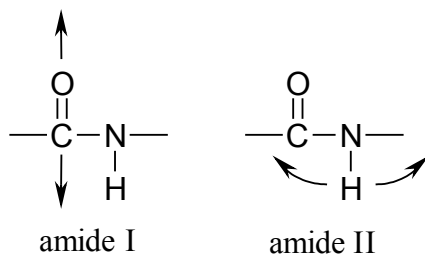
(α) Διαφορά χημικής μετατόπισης του C_α α -έλικας από β -φύλλου. (β) Μέση τιμή των [Glu(OBzl)]_n και [Glu(OMe)]_n. (γ) Η μέτρηση της (Lys)_n έγινε σε ουδέτερο υδατικό διάλυμα. (από αναφ. [11]).



Εικ. 1.14. Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού – ελλειπτικότητα $[\theta]=3300*(\epsilon_L-\epsilon_R)$, όπου ϵ_L και ϵ_R οι συντελεστές απορρόφησης για αριστερόστροφη και δεξιόστροφη πόλωση, αντίστοιχα, συναρτήσεως του μήκους κύματος στο μακρινό υπεριώδες για διάφορες δομές: (γκρι συνεχής καμπύλη) α -έλικα, (διακεκομμένη καμπύλη) β -φύλλα, (τελείες) τυχαία διαμόρφωση, (μαύρη συνεχής γραμμή) ένα συνθετικό πεπτιδίο. Η ομοιότητα του φάσματος του συνθετικού πεπτιδίου με της β -φυλλοειδούς δομής δείχνει ότι περιέχει μεγάλο ποσοστό β -φύλλων (εικ. από [16]).

1.5.4 Φασματοσκοπία υπερόθρου (Fourier Transform IR spectroscopy – FTIR)

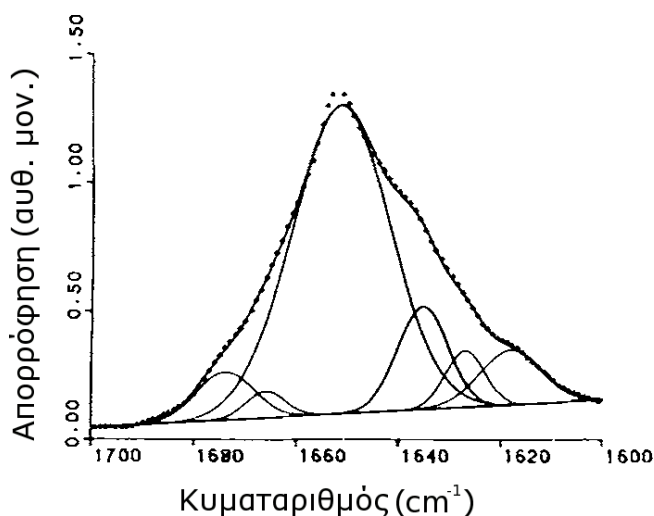
Οι δονήσεις των μορίων έχουν ενέργεια που αντιστοιχεί σε φωτόνια στην περιοχή του υπερόθρου (IR). Η ακριβής ενέργεια εξαρτάται από τις μάζες των ατόμων, το είδος της δόνησης (έκταση (*stretching*), λύγισμα (*bending*), συστροφή (*twisting*), κλπ.), και το είδος των δεσμών στους οποίους συμμετέχουν τα άτομα. Για να οδηγήσει μια δόνηση σε απορρόφηση στο υπέρυθρο απαραίτητη προϋπόθεση είναι να προκαλεί μεταβολή της διπολικής ροπής. Η προϋπόθεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα οι κυριότερες ζώνες απορρόφησης να προέρχονται από πολικούς δεσμούς. Στις πρωτεΐνες υπάρχει μεγάλος αριθμός ζωνών, δύο, όμως, είναι οι κυριότερες που αντιστοιχούν σε δονήσεις του πολικού πεπτιδικού δεσμού: η *amide I*, που αντανακλά κυρίως την έκταση του δεσμού C=O, και η *amide II*, που οφείλεται κυρίως στο λύγισμα του δεσμού N-H (εικ. 1.15). Οι δεσμοί υδρογόνου επηρεάζουν τη θέση των ζωνών, οι οποίες, επομένως, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εύρεση της δευτεροταγούς δομής. Ο πίνακας 1.3 δείχνει τη θέση των κορυφών απορρόφησης για την α -έλικα και τα β -φύλλα [17]. Συνήθως χρησιμοποιείται η ζώνη *amide I*, γιατί δίνει καλύτερα ποσοτικά αποτελέσματα. Η ανάλυση του φάσματος απορρόφησης της αιμοσφαιρίνης (εικ. 1.16) δείχνει, σε συμφωνία με τις άλλες μεθόδους, ότι περιέχει κυρίως α -έλικες (εικ. 1.9) [18].



Εικ. 1.15. Κυριότερες δονήσεις του πεπτιδικού δεσμού που οδηγούν σε απορρόφηση στο υπέρυθρο. (Αριστερά) Έκταση (*stretching*) του δεσμού C=O που αντιστοιχεί στη ζώνη απορρόφησης *amide I*, (δεξιά) λόγισμα (*bending*) του δεσμού N-H που αντιστοιχεί στη ζώνη *amide II*. Και οι δύο περιλαμβάνουν άτομα που συμμετέχουν σε δεσμό υδρογόνου, επομένως δίνουν πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή.

Πίνακας 1.3. Θέσεις (σε κυματαριθμούς) των ζωνών απορρόφησης *amide I* και *II* για τις κυριότερες δευτεροταγείς δομές. Τα β-φύλλα έχουν χαμηλότερες ενέργειες κατά $\sim 20 \text{ cm}^{-1}$ [17,18].

Δευτεροταγής δομή	Ζώνη απορρόφησης (cm^{-1})	
	<i>amide I</i>	<i>amide II</i>
α -έλικα	1652	1548
β -φύλλα	1629	~ 1530



Εικ. 1.16. Ζώνη απορρόφησης *amide I* της αιμοσφαιρίνης. Τα σημεία είναι τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι συνεχείς γραμμές προέρχονται από προσαρμογή με καμπύλες Lorentz που αντιστοιχούν σε διαφορετικές δευτεροταγείς δομές. Η ανάλυση δείχνει ότι η κυριότερη συνεισφορά προέρχεται από την α -ελικοειδή δομή ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$), σε συμφωνία και με τις άλλες μεθόδους που δείχνουν ότι η αιμοσφαιρίνη περιέχει κυρίως α -έλικες (βλέπε και εικ. 1.9). (εικ. από αναφ. [18]).

1.6 Συνθετικά πολυπεπίδια – συμπολυμερή

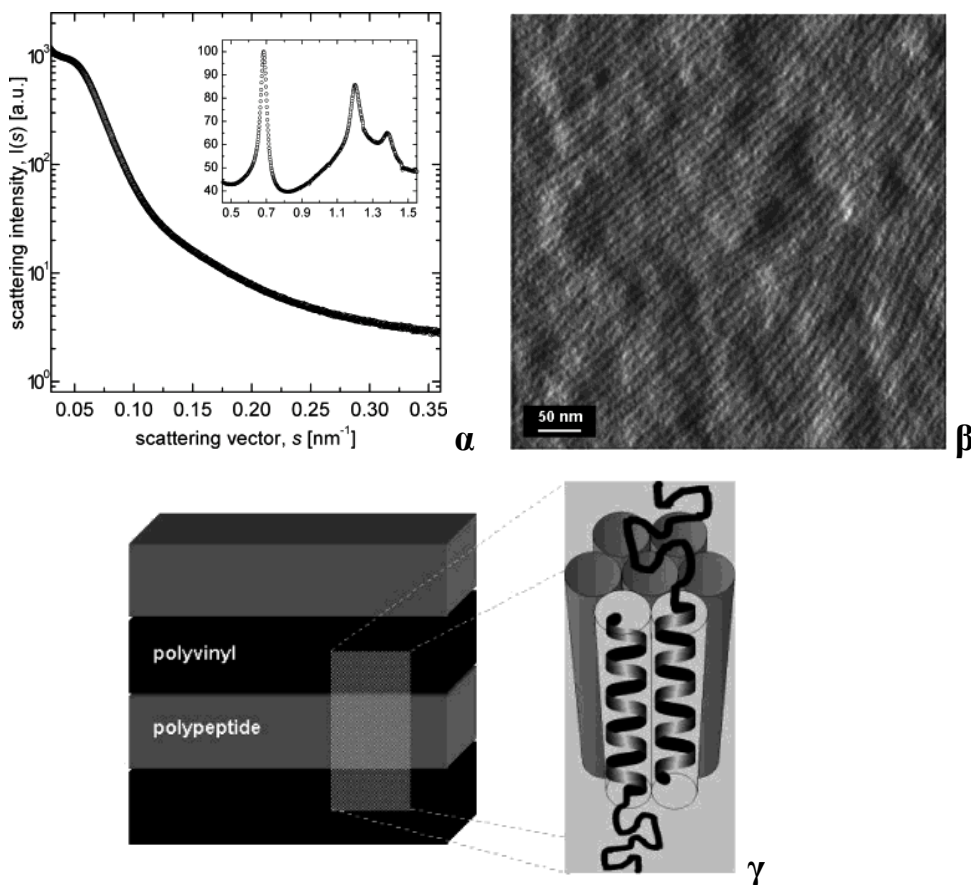
Οι πρώτες προσπάθειες σύνθεσης πεπτιδίων είχαν σκοπό την άμεση χρήση τους σε

βιολογικές εφαρμογές και μέχρι σήμερα αυτή είναι η κυριότερη κατεύθυνση της πεπτιδοχημείας. Η πλειοψηφία των προηγούμενων εργασιών περιορίζεται σε μελέτες κρυσταλλογραφίας ομοπολυπεπτιδίων και της δευτεροταγούς δομής τους σε διαλύματα. Ένα από τα πιο διεξοδικά μελετημένα συστήματα είναι το πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ) (PBLG) που βρέθηκε να σχηματίζει πολύ σταθερή α-έλικα παρουσία και απουσία διαλυτών. Σχετικά πρόσφατα ξεκίνησε η σύνθεση πολυπεπτιδίων για τη μελέτη σε ξηρή κατάσταση (*bulk*) ως ένα πρώτο βήμα για την κατανόηση της συμπεριφοράς των ιδιαίτερα πολύπλοκων πρωτεϊνών. Μία βασική αιτία είναι η δυσκολία στη σύνθεση. Νέες τεχνικές, όμως, επιτρέπουν τη σύνθεση πολυπεπτιδίων και συμπολυμερών τους με συνθετικά μακρομόρια με την επιθυμητή μοριακή αρχιτεκτονική που συνδυάζουν πολλών ειδών αλληλεπιδράσεις σε ένα μόριο και δημιουργούν δομές σε πολλαπλά επίπεδα, όπως οι πρωτεΐνες (εικ.1.17) [19,20].

Υπάρχουν τρεις κύριες κατευθύνσεις στην προσπάθεια σύνθεσης μοντέλων πολυπεπτιδίων με χαμηλή πολυδιασπορά μοριακών βαρών. Ο D. Tirrell έχει επιτύχει τη σύνθεση ακριβώς μονοδιάσπαρτων ομοπολυπεπτιδίων πολυ(L-γλουταμινικού οξέος) (PLGA) και PBLG με τη χρήση γενετικής μηχανικής σε βακτήρια *E. coli* [21]. Η δομή αυτών των συστημάτων ήταν σημετική παρακρυσταλλική, ενώ προηγουμένως είχε παρατηρηθεί μόνο η νηματική, λόγω της ανομοιομορφίας των μηκών των πεπτιδίων (Κεφ. 4). Η ομάδα του T. J. Deming με τη χρήση οργανικών συμπλόκων νικελίου, αντί για αμίνες, ως απαρχητές βελτίωσε την τεχνική πολυμερισμού των N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων (NCA) και οδηγήθηκε σε στενότερη κατανομή μοριακών βαρών [22]. Με την ίδια τεχνική παρασκευάστηκαν και συμπολυμερή [23,24]. Η τρίτη σημαντική συνθετική μέθοδος είναι ο πολυμερισμός των NCA υπό υψηλό κενό, ώστε να μην υπάρχουν προσμίξεις που μπορούν να ξεκινήσουν ή να τερματίσουν τον πολυμερισμό (π.χ. H₂O) [25]. Ο πολυμερισμός είναι «ζωντανός», γιατί τα άκρα των αλυσίδων παραμένουν ενεργά ως την εξάντληση του μονομερούς NCA. Η σύνθεση συσταδικών συμπολυμερών πεπτιδίων έγινε για πρώτη φορά με αυτή τη μέθοδο, με διαδοχική προσθήκη διαφορετικών μονομερών. Στην παρούσα μελέτη γίνεται χρήση μοντέλων ομοπολυπεπτιδίων και συμπολυμερών πεπτιδίων (η σύνθεση έγινε στο Τμ. Χημείας του Π. Αθηνών) καθώς και συμπολυμερών με συνθετικά μακρομόρια (και των αντίστοιχων ομοπολυμερών, σύνθεση στην École Polytechnique Fédérale de Lausanne και το Max-Planck Institut für Polymerforschung από τον H.-A. Klok).

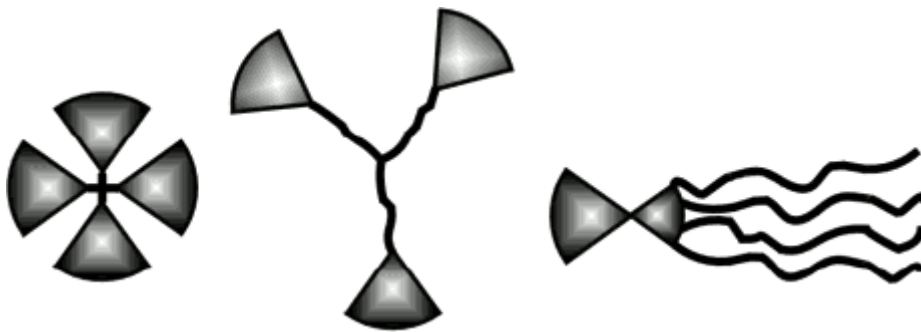
Πιο πρόσφατα, μελετήθηκαν συσταδικά συμπολυμερή αποτελούμενα από πεπτιδικές και συνθετικές συστάδες. Μία πρώτη εργασία των Douy *et al.* σε συμπολυμερές πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ)-*b*-πολυστυρένιο (PBLG-*b*-PS) έδειξε διαχωρισμό των συστάδων και σχηματισμό φυλλοειδών (*lamellar*) νανοφάσεων, καθώς και αναδιπλώσεις της έλικας του PBLG

μέσα στη νανοφάση [26]. Νεότερες εργασίες σε συμπολυμερή συστάδων ραβδοειδούς-άμορφου μακρομορίου (*rod-coil*) έχουν γίνει από τις ομάδες των Lecommandoux και Schlaad καθώς και στην παρούσα μελέτη. Η συστάδα που συμπεριφέρεται ως άκαμπτη ράβδος είναι πεπτίδιο PBLG ή πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνη) (PZLL) που σχηματίζει σταθερή α -έλικα, καθώς το «λύγισμα» της α -έλικας απαιτεί μεγάλο ποσό ενέργειας για το σπάσιμο δεσμών υδρογόνου, ενώ το άμορφο τμήμα ποικίλει, με πιο συνηθισμένα τα πολυστυρένιο, πολυβουταδιένιο και πολυϊσοπρένιο [27-33]. Επίσης υπάρχουν μερικά αποτελέσματα πάνω στη δομή πεπτιδικών συμπολυμερών με συστάδες PBLG και πολυ(L-λευκίνη) από την ομάδα του T. J. Deming [23]. Γενικά, παρατηρείται νανοφασικός διαχωρισμός που υποδεικνύει τη ασυμβατότητα των πεπτιδίων με τα συνθετικά μακρομόρια. Η α -ελικοειδής δομή θεωρείται εκ των προτέρων άκαμπτη, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκαν αναδιπλώσεις.



Εικ. 1.17. (α) Ακτινικός μέσος όρος σκεδαζόμενης έντασης ακτίνων-X σε μικρές και μεγάλες (ένθετο) γωνίες από ένα συσταδικό συμπολυμερές PS-*b*-PZLL, που υποδεικνύουν την οργάνωση α -ελίκων σε εξαγωνικό πλέγμα και νανοφασικό διαχωρισμό, αντίστοιχα. (β) Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου από το ίδιο δείγμα, που δείχνει το διαχωρισμό των συστάδων και την ύπαρξη φυλλοειδών (*lamellar*) νανοφάσεων. (γ) Μοντέλο κυλίνδρων σε φυλλοειδή δομή (*cylinder-in-lamellar*) του συμπολυμερούς βασισμένο στα προηγούμενα πειραματικά αποτελέσματα (εικόνες από [31]).

Σημαντικές προσπάθειες γίνονται προς την κατεύθυνση του συνδυασμού σε ένα μόριο πεπτιδίων και βιοσυμβατών πολυμερών, όπως πολυαιθυλενοξείδιο (PEO), με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στη μεταφορά φαρμάκων (*drug delivery*) (εικ. 1.18). Στην επιφάνεια δενδρομερούς συνδέονται πολλά μόρια φαρμάκου ή διαφορετικά φάρμακα, ώστε να εισχωρούν ταυτόχρονα σε ένα κύτταρο με σκοπό την αύξηση της αποτελεσματικότητας, λόγω της υψηλής τοπικής συγκέντρωσης. Πολύ ενδιαφέρουσες μελέτες σε αυτόν τον τομέα έχουν γίνει από τον J. M. J. Fréchet [34,35]. Από άλλες ομάδες έχει γίνει μελέτη και άλλων συμπολυμερών όπως PBLG-PEO-PBLG ή PAla-PEO, αλλά το ενδιαφέρον εστιάζεται κυρίως στη σύνθεση ή σε άλλου είδους βιολογικές εφαρμογές [36,37].



Εικ. 1.18. Δενδρομερή που προορίζονται για χρήση ως μεταφορείς φαρμάκων (*drug delivery*). Περιλαμβάνουν κλάδους πολυεστέρα (γκρι τρίγωνα), στην επιφάνεια των οποίων συνδέεται το φάρμακο, και αλυσίδες πολυ(αιθυλενοξειδίου) (μαύρες γραμμές), ώστε να είναι υδατοδιαλυτά. Η σύνθεση έγινε από τον J. M. J. Fréchet (εικ. από [34]).

1.7 Συμπεράσματα βιβλιογραφίας

1. Έχει γίνει πολύ εκτενής μελέτη της δομής πρωτεϊνών, με ή χωρίς υποστρώματα, με χρήση σκέδασης ακτίνων-X και NMR και υπάρχουν μεγάλες βάσεις δεδομένων.
2. Είναι εφικτή η σύνθεση ομοπολυπεπτιδίων καθώς και συμπολυμερών πολυπεπτιδίων με στενές κατανομές μοριακών βαρών. Σημαντικές έρευνες γίνονται σε δενδρομερή με πεπτιδία συνδεδεμένα στην επιφάνεια με σκοπό τη μεταφορά φαρμάκων στον οργανισμό (*drug delivery*).
3. Η μελέτη της δομής συνθετικών πεπτιδίων περιορίζεται στη δευτεροταγή δομή σε διαλύματα και σε κρυσταλλογραφία σε ξηρή μορφή.
4. Η α -έλικα θεωρείται εκ των προτέρων άκαμπτη και με βάση αυτό φτιάχνονται συνήθως τα μοντέλα της νανοδομής συμπολυμερών.

1.8 Στόχος της παρούσας εργασίας

Η έρευνα πάνω σε βιο-μιμητικά υλικά είναι ένα νέο πεδίο με πολλές προοπτικές. Οι μέχρι τώρα μελέτες στη βιβλιογραφία έχουν αφήσει πολλά προβλήματα ανοιχτά, όσον αφορά (α) τη δυναμική «μετάβαση υάλου» των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών, (β) το μήκος εμμοής των δευτεροταγών δομών και (γ) την επίδραση του ισχυρού θερμοδυναμικού πεδίου, που αναπτύσσεται σε νανοδομημένα συμπολυμερή πεπτιδίων στις δευτεροταγείς δομές τους. Στην παρούσα εργασία θα γίνει προσπάθεια να δοθεί απάντηση στα προβλήματα αυτά, μέσω της μελέτης κατάλληλα επιλεγμένων συστημάτων. Πιο συγκεκριμένα:

1. Όπως θα αναφερθεί και στο Κεφ. 2, δεν έχει διασαφηνισθεί η αιτία που προκαλεί το «πάγωμα» της δυναμικής (*dynamic arrest*) στις πρωτεΐνες και τα πεπτίδια με τη μείωση της θερμοκρασίας, και ιδιαίτερα η σχέση του «παγώματος» με τη δομή. Γι' αυτό το λόγο έγινε η μελέτη ομοπολυπεπτιδίων με διαφορετική δευτεροταγή δομή (α -έλικα, β -φύλλο ή μίγμα) και μοριακά βάρη, απουσία ή παρουσία διαλύτη. Οι μετρήσεις έγιναν συναρτήσει της θερμοκρασίας και της πίεσης για να βρεθεί η επίδραση των τριών θερμοδυναμικών μεταβλητών (T,P,V) στη δομή και τη δυναμική.
2. Οι δευτεροταγείς δομές, ιδιαίτερα η α -έλικα, θεωρούνται εκ των προτέρων ιδανικές, επειδή σταθεροποιούνται με πολλούς δεσμούς υδρογόνου. Εδώ παρουσιάζονται αποτελέσματα για το μήκος εμμοής α -ελίκων σε ξηρή μορφή (*bulk*), αλλά και παρουσία διαλύτη. Επίσης γίνεται μελέτη της επίδρασης ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου στις δευτεροταγείς δομές.
3. Για τη μελέτη της αυτο-οργάνωσης σε πολλαπλά επίπεδα επιλέχθηκαν συμπολυμερή με πεπτίδια που συνδυάζουν είτε πεπτιδικές συστάδες με διαφορετικές δευτεροταγείς δομές (α -έλικα και β -φύλλα) είτε πεπτίδια με εύκαμπτα συνθετικά πολυμερή. Επίσης μελετήθηκαν συμπολυμερή αποτελούμενα από πεπτίδια και υδατοδιαλυτό βιοσυμβατό συνθετικό πολυμερές. Παρουσιάζονται ακόμη αποτελέσματα σχετικά με το είδος των νανοφάσεων και γίνεται σύγκριση με γνωστά διαγράμματα φάσεων συνθετικών συστημάτων. Τέλος, αναλύονται αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση του θερμοδυναμικού περιορισμού ή της ανάμιξης στις δευτεροταγείς δομές και το μήκος εμμοής τους.

Τα συστήματα που μελετήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά στο Κεφ. 3.

Αναφορές

- [1] Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C. ; Sasisekharan, V. *J. Molec. Biol.* **7**, 95 (1963).
- [2] Brant, D. A. *Macromolecules* **1**, 291 (1968).
- [3] Garrett, R.; Grisham, C. M. *Biochemistry*, 2nd ed. Saunders College Pub., Fort Worth (1999).
- [4] Creighton, T. E. *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2nd ed. W. H. Freeman & Co. (1992).
- [5] Dobson, C. M. *Nature* **426**, 884 (2003).
- [6] Drenth, J. in *Principles of protein x-ray crystallography (2nd ed.)*, Springer-Verlag New York, 1999.
- [7] Tilton, R. F.; Dewan, J. C.; Petsko, G. A. *Biochemistry* **31**, 2469 (1992).
- [8] Holmes, K. C.; Blow, D. M. "*The Use of X-ray Diffraction in the Study of Protein and Nucleic Acid Structure.*" Wiley (Interscience), New York, 1966.
- [9] Abergel, C. *Acta Cryst.* **D60**, 1413 (2004).
- [10] Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Klok, H.-A.; Schnell, I.; Pakula, T. *Biomacromolecules* **5**, 81 (2004).
- [11] Shoji, A.; Ozaki, T.; Saitô, H.; Tabeta, R.; Ando, I. *Macromolecules* **17**, 1472 (1984).
- [12] Gardner, K. H.; Kay, L. E. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 357 (1998).
- [13] Tugarinov, V.; Hwang, P. M.; Kay, L. E. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 107 (2004).
- [14] Kay, L. E. *J. Mag. Res.* **173**, 193 (2005).
- [15] Alam, S. L.; Volkman, B. F.; Markley, J. L.; Satterlee, J. D. *J. Biomol. NMR* **11**, 119 (1998).
- [16] Higashiya, S.; Ngo, S. C.; Bousman, K. S.; Wells, C. C.; Welch, J. T.; Rana, N.; Carlsen, A.; Eisenbraun, E. T.; Geer, R. E.; Kaloyeros, A. E. *Abstr. Pap. Am. Chem. S.* **226**: 291-PMSE Part 2 (Sep. 2003).
- [17] Chirgadze, Y. N.; Nevskaya, N.A. *Biopolymers* **15**, 607 (1976), Chirgadze, Y. N.; Nevskaya, N.A. *Biopolymers* **15**, 627 (1976), Nevskaya, N.A.; Chirgadze, Y. N. *Biopolymers* **15**, 637 (1976).
- [18] Byler, D. M.; Susi, H. *Biopolymers* **25**, 469 (1986).
- [19] Muthukumar, M. *Science* **277**, 1225 (1997).

- [20] Stupp, S. T. *Science* **277**, 1242 (1997).
- [21] Yu, S. M.; Soto, C. M.; Tirrell, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 6552 (2000).
- [22] Deming, T. J. *Nature* **390**, 386 (1977).
- [23] Minich, E. A.; Nowak, A.P.; Deming, T. J.; Pochana, D. J. *Polymer* **45**, 1951 (2004).
- [24] Brzezinska, K. R.; Curtin, S. A.; Deming, T. J. *Macromolecules* **35**, 2970 (2002).
- [25] Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *Biomacromolecules* **5**, 1653 (2004).
- [26] Douy, A.; Gallot, B. *Polymer* **23**, 1039 (1982).
- [27] Klok, H.-A.; Langenwalter, J.F.; Lecommandoux, S. *Macromolecules* **33**, 7819 (2000).
- [28] Babin, J.; Rodriguez-Hernandez, J.; Lecommandoux, S.; Klok, H.-A.; Achard, M.-F. *Faraday Discuss.* **218**, 1 (2004).
- [29] Łosik, M.; Kubowicz, S.; Smarsly, B.; Schlaad, H. *Eur. Phys. J. E* **15**, 407 (2004).
- [30] Schlaad, H.; Antonietti, M. *Eur. Phys. J. E* **10**, 17 (2003).
- [31] Schlaad, H.; Smarsly, B.; Losik, M. *Macromolecules* **37**, 2210 (2004).
- [32] Schlaad, H.; Kukula, H. ; Smarsly, B.; Antonietti, M.; Pakula T. *Polymer* **43**, 5321 (2002).
- [33] Minich, E.A.; Nowak, A.P.; Deming, T.J.; Pochana, D.J. *Polymer* **45**, 1951 (2004).
- [34] Gillies, E. R.; Fréchet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14137 (2002).
- [35] Ihre, H.; Padilla, O.; Fréchet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5908 (2001).
- [36] Wu, G.L; Sun, P.C.; Lin, H.; Ma, J.B *J. Mol. Struct.* **689**, 143 (2004).
- [37] Kim, H.J.; Choi, E.Y.; Oh, J.S.; Lee, H.C.; Park, S.S.; Cho C.S. *Biomaterials* **21**, 131 (2000).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ - ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

2.1 Εισαγωγή

Στο πρώτο κεφάλαιο έγινε περιγραφή των κυριότερων δομών των πεπτιδικών συστημάτων. Ένα ζήτημα, στο οποίο δεν έχει δοθεί οριστική απάντηση, είναι κατά πόσον αυτές οι δομές μπορούν να θεωρηθούν στατικές ή έχουν δυναμικό χαρακτήρα, δηλαδή αν υπάρχει ισορροπία ανάμεσα σε έναν μεγάλο αριθμό δυνατών διαμορφώσεων. Στην τελευταία περίπτωση προκύπτει και το πρόβλημα της προέλευσης των κινήσεων, καθώς η πολύπλοκη δομή τους δεν επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων χωρίς διεξοδική ανάλυση.

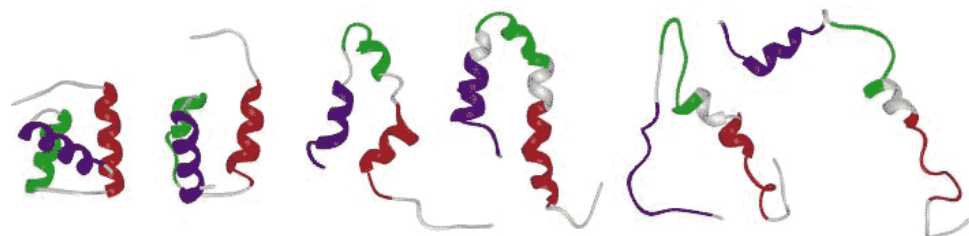
Στη βιβλιογραφία υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός εργασιών στη δυναμική πρωτεϊνών και πολυπεπτιδίων, με αντικρουόμενα, όμως, πολλές φορές αποτελέσματα. Αν και γενικά υπάρχει συμφωνία για την ύπαρξη μιας δυναμικής μετάβασης (γνωστής ως «μετάβαση υάλου») σε ενυδατωμένες πρωτεΐνες, που οδηγεί σε μείωση του 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. Πολλές εργασίες προτείνουν ότι είναι απλώς η υαλώδης «μετάβαση» των διαλυτών στην οποία δεν συμμετέχει το μακρομόριο, ενώ άλλες προτείνουν ότι η δυναμική του μακρομορίου ακολουθεί αυτή του διαλύτη. Πιο πρόσφατες εργασίες δίνουν ενδείξεις ότι η ύπαρξη αυτής της μετάβασης είναι εγγενές χαρακτηριστικό των βιολογικών μακρομορίων, όπως των αντίστοιχων συνθετικών.

Μια βασική αιτία για τις έντονες ασυμφωνίες σχετικά με τη δυναμική των πεπτιδίων είναι ότι τα αποτελέσματα προέρχονται από πολλές διαφορετικές μεθόδους που ανιχνεύουν κινήσεις σε πολύ διαφορετικές χρονικές και χωρικές κλίμακες. Πιο κάτω θα γίνει συνοπτική παρουσίαση των κυριότερων αποτελεσμάτων των τεχνικών που έχουν χρησιμοποιηθεί γι' αυτό το σκοπό.

2.2 Ευκαμψία κύριας αλυσίδας – μετουσίωση

Η πλειοψηφία των φυσικών πρωτεϊνών διατηρεί την τριτοταγή δομή της, η οποία είναι

αρκετά συμπαγής, με τις υδρόφοβες ομάδες στο εσωτερικό και τις υδρόφιλες στην επιφάνεια, μόνο μέχρι μια ορισμένη θερμοκρασία, υπό φυσιολογικές συνθήκες. Πάνω από αυτή τη θερμοκρασία η τριτοταγής δομή καταστρέφεται και η πρωτεϊνική αλυσίδα παίρνει μια νέα, πιο εκτεταμένη διαμόρφωση. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται μετουσίωση (*denaturation*) της πρωτεΐνης. Άλλοι παράγοντες, εκτός από τη θερμοκρασία, που μπορούν να προκαλέσουν μετουσίωση είναι η αλλαγή του pH, η προσθήκη ουσιών, όπως η ουρία ((NH₂)₂CO), που έχουν την τάση να αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες ομάδες ατόμων της πρωτεΐνης, ακόμα και η αύξηση της πίεσης [1]. Αυτή η δραστική μεταβολή της τριτοταγούς δομής μπορεί να είναι αντιστρεπτή ή όχι. Η εικ. 2.1 δείχνει σχηματικά τα στάδια μετάβασης από τη φυσική στην εκτεταμένη μετουσιωμένη μορφή.

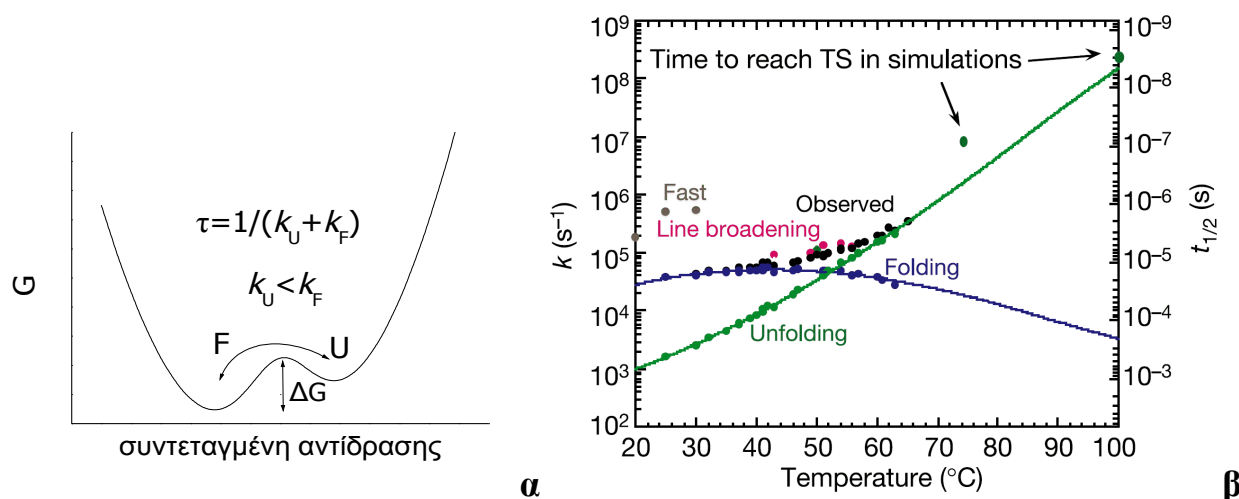


Εικ. 2.1. Στάδια μετουσίωσης της πρωτεΐνης *engrailed homeodomain* στους 225 K. Οι εικόνες προέρχονται από προσομοίωση των Mayor *et al.* και αντιστοιχούν σε χρόνους 0, 0.26, 8, 15, 25 και 30 ns. [2]

Η μετουσίωση κάνει φανερό ότι οι πρωτεϊνικές δομές δεν είναι στατικές, αλλά έχουν δυναμικό χαρακτήρα. Η μετατροπή της αρχικής συμπαγούς πρωτεΐνης σε μια πολύ πιο εκτεταμένη δομή περιλαμβάνει πολλές περιστροφές γύρω από απλούς δεσμούς της κύριας αλυσίδας (γωνίες φ,ψ), αλλά και την καταστροφή πολλών δεσμών υδρογόνου και δημιουργία νέων. Οι κινήσεις αυτές δεν εμφανίζονται ξαφνικά στη θερμοκρασία μετουσίωσης, αλλά συμβαίνουν και κάτω από αυτή. Επειδή, όμως, η πολύ εκτεταμένη μετουσιωμένη πρωτεΐνη δεν ευνοείται θερμοδυναμικά έναντι της φυσικής μορφής, η αναδίπλωση δε συμβαίνει κάτω από αυτή τη θερμοκρασία. Γενικά, υπάρχει ισορροπία μεταξύ της φυσικής και της αναδιπλωμένης διαμόρφωσης, η θέση της οποίας εξαρτάται από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν. Το μόριο, μέσω των κινήσεων, «εξερευνά» όλες τις δυνατές διαμορφώσεις έως ότου καταλήξει στη σταθερότερη από αυτές ανάλογα με τις συνθήκες. Αξιοσημείωτο είναι ότι η φυσική μορφή των πρωτεϊνών δεν είναι ιδιαίτερα πιο σταθερή από άλλες, δηλαδή υπάρχουν πολλές διαμορφώσεις με πολύ μικρή ενεργειακή διαφορά μεταξύ τους. Ακόμα και με τη μετουσιωμένη μορφή η διαφορά δεν είναι μεγάλη: η φυσική πρωτεΐνη *engrailed homeodomain* (En-HD) της δροσόφιλας ευνοείται μόνο κατά 16-20 kJ/mol σε σχέση με τη μετουσιωμένη, υπό φυσιολογικές συνθήκες (kT~2.5 kJ/mol σε θερμοκρασία δωματίου) [2]. Τα

χαμηλά ενεργειακά φράγματα συνεπάγονται και ταχεία εναλλαγή μεταξύ των διαμορφώσεων (εικ. 2.2α).

Η κινητική της διαδικασίας δίπλωσης – αναδίπλωσης (*folding – unfolding*) έχει γίνει αντικείμενο πολλών μελετών. Οι Mayor *et al.* μελέτησαν την πρωτεΐνη *engrailed homeodomain* (En-HD) και μερικές παραλλαγές της από μετάλλαξη [2,3]. Ο χρόνος της δίπλωσης – αναδίπλωσης υπολογίζεται με τη βοήθεια απότομων μεταβολών της θερμοκρασίας (*T-jumps*). Για παράδειγμα, αυξάνεται απότομα η θερμοκρασία πάνω από τη θερμοκρασία μετουσίωσης και μετράται ο χρόνος $t_{1/2}$ που χρειάζεται ώστε η ένταση του φθορισμού από κάποιο αμινοξύ, στη συγκεκριμένη περίπτωση από την τρυπτοφάνη, να γίνει ο μέσος όρος της αρχικής και τελικής τιμής της. Η εικ. 2.2 δείχνει τους χρόνους που προέκυψαν.



Εικ. 2.2. (α) Μοντέλο δύο καταστάσεων της μετάβασης από την φυσική (F) στην αναδιπλωμένη (U) διαμόρφωση. Εδώ δείχνεται ότι η φυσική μορφή σταθερότερη (χαμηλότερη ενέργεια G), αλλά μπορεί να ισχύει και το αντίθετο. Οι ρυθμοί μετάβασης μεταξύ των δύο καταστάσεων εξαρτώνται από το ενεργειακό φράγμα ΔG . (β) Ρυθμοί (αριστερός άξονας) και χρόνοι (δεξιός άξονας) χαλάρωσης της πρωτεΐνης *engrailed homeodomain*. Τα μαύρα σημεία προέρχονται από τα κινητικά πειράματα φθορισμού με «άλματα» θερμοκρασίας και δίνουν τον ρυθμό $k_{obs}=k_F+k_U$, όπου k_F , k_U είναι ο ρυθμός δίπλωσης και αναδίπλωσης, αντίστοιχα, σύμφωνα με το μοντέλο δύο καταστάσεων της εικ. (α). Από μετρήσεις σε ισορροπία [3] προκύπτει ο λόγος των πληθυσμών φυσικής–μετουσιωμένης πρωτεΐνης, επομένως και ο λόγος k_F/k_U . Τα μπλε και πράσινα σημεία αντιστοιχούν στους ρυθμούς k_F , k_U , ενώ τα κόκκινα σημεία προέκυψαν από μετρήσεις NMR. Τα καφέ σημεία αντιστοιχούν σε μετάβαση μεταξύ της φυσικής κατάστασης και μιας ενδιάμεσης (*transition state – TS*) πριν το σύστημα φτάσει στην πλήρως αναδιπλωμένη διαμόρφωση. Τα σημεία από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (με βέλη) δείχνουν ρυθμούς αναδίπλωσης μέχρι την ενδιάμεση κατάσταση και συμφωνούν αρκετά καλά με τα πειραματικά. Οι γραμμές είναι οδηγοί για το μάτι. [2,3]

Η μεταβολή του χαρακτηριστικού χρόνου με τη θερμοκρασία είναι πολύ έντονη, από ms ως ns, και θυμίζει αντίστοιχη εξάρτηση που παρατηρείται σε πολυμερή. Επίσης, δείχνει ότι η κίνηση της κύριας αλυσίδας γίνεται σε πολύ πιο αργούς χρόνους από αυτούς που παρατηρούνται με άλλες

μεθόδους (σκέδαση νετρονίων – neutron scattering (NS), φασματοσκοπία υπερύθρου – Fourier transform infrared (FTIR), φασματοσκοπία Raman, φασματοσκοπία Mössbauer) και συνήθως αντιστοιχούν σε χαλάρωση πλευρικών αλυσίδων.

Η μετουσίωση επιφέρει επίσης μεταβολές στη θερμοχωρητικότητα των πρωτεϊνικών συστημάτων (C. A. Angell [4]). Παρατηρείται διαφορά στις μετρήσεις διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (Differential scanning calorimetry – DSC) της πρωτεΐνης λεγουμίνης πριν και μετά τη μετουσίωσή της. Αυτό συμβαίνει και στην ξηρή αλλά και στην ενυδατωμένη πρωτεΐνη, που σημαίνει ότι δεν σχετίζεται με το υδατικό στρώμα στην επιφάνεια της πρωτεΐνης. Η μετουσιωμένη πρωτεΐνη βρέθηκε να έχει μια αρκετά εμφανή μετάβαση υάλου, σε αντίθεση με την ξηρή φυσική πρωτεΐνη όπου μόλις διακρίνεται. Η αναδίπλωση μιας πρωτεΐνης περιλαμβάνει συνεργατική καταστροφή πολλών δεσμών υδρογόνου.

Παρόμοιες μετρήσεις έχουν γίνει από τους Yang *et al.* με χρήση κυκλικού διχρωϊσμού (*circular dichroism* – CD) και «άλματα» θερμοκρασίας [5]. Οι χρόνοι που μετρήθηκαν ήταν της τάξης των μς. Η διαδικασία δίπλωσης αντιμετωπίζεται ως μετάβαση μεταξύ καταστάσεων που χωρίζονται από φράγμα δυναμικού και περιγράφεται από την εξίσωση Arrhenius

$$\tau_{\max} = \tau_0 \exp\left(\frac{E_{act}}{k_B T}\right) \quad (2.1)$$

όπου τ_0 είναι το όριο του χρόνου χαλάρωσης σε υψηλές θερμοκρασίες και E_{act} η ενέργεια ενεργοποίησης. Αναφέρουν ότι οι πρωτεΐνες είναι πολύ μεγάλες για να διπλώσουν σε χρόνους της τάξης των ps, που είναι χαρακτηριστικοί χρόνοι μικρών μορίων. Υπολογισμοί δίνουν τιμές μέχρι και 200μς για τον συντελεστή τ_0 της εξίσωσης. Μία ακόμα ενδιαφέρουσα εργασία είναι των Zipp *et al.* που βρήκαν ότι η πίεση μπορεί να προκαλέσει μετουσίωση στη μυοσφαιρίνη [1]. Η διαδικασία ήταν αντιστρεπτή και χρησιμοποιήθηκε για κινητικές μετρήσεις. Ο χρόνος αναδίπλωσης που υπολογίστηκε ήταν της τάξης των λεπτών και είχε εξάρτηση από τη θερμοκρασία, την πίεση και το pH.

2.3 Σύγκριση πρωτεϊνών – συνθετικών μακρομορίων

Στο προηγούμενο κεφάλαιο, όπου έγινε παρουσίαση των διαφόρων επιπέδων οργάνωσης της δομής των πολυπεπτιδίων και των πρωτεϊνών, τονίστηκε ότι αυτά τα συστήματα μπορούν να θεωρηθούν ως μακρομόρια που προέρχονται από αμινοξέα. Οι ομοιότητες με τα συνθετικά μακρομόρια δεν φαίνονται εκ πρώτης όψεως πολύ μεγάλες ανάμεσα στις δύο κατηγορίες συστημάτων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, σε αντίθεση με τα πολυπεπτίδια, δεν παρατηρούνται

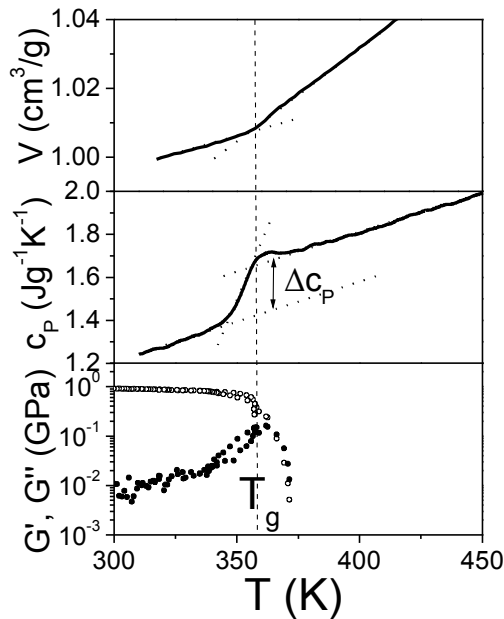
πολλαπλά επίπεδα οργάνωσης στα άμορφα συνθετικά πολυμερή. Η αιτία είναι ότι στα βιολογικά συστήματα εμφανίζονται πολλαπλές ενδομοριακές και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Μπορούν να συνυπάρχουν δυνάμεις *van der Waals*, δεσμοί υδρογόνου, ηλεκτροστατικές δυνάμεις Coulomb από φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες, δυνάμεις διπόλου-διπόλου κ.ά [6,7]. Αυτό είναι σχεδόν αδύνατο να συμβεί στα συνθετικά συστήματα, αν και η σύνθεση νέων συμπολυμερών με πεπτίδια κινείται προς αυτή την κατεύθυνση.

Ο μακρομοριακός χαρακτήρας των πρωτεϊνών είναι πολύ πιο εμφανής κατά τη μελέτη της δυναμικής τους. Η σύνδεση των μονομερών με ομοιοπολικό δεσμό επιβάλλει περιορισμούς στην κίνησή τους. Γι' αυτό είναι χρήσιμο να γίνει, σε αυτό το σημείο, μια σύντομη αναφορά στα βασικά χαρακτηριστικά της δυναμικής των πολυμερικών συστημάτων καθώς και σε θεωρίες που προσπαθούν να εξηγήσουν την προέλευση των μοριακών τους κινήσεων.

2.4 Δυναμική πολυμερών

2.4.1 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. Η εικ. 2.3 δείχνει την εξάρτηση από τη θερμοκρασία του μέτρου διάτμησης $G=\tau/\gamma$, όπου τ είναι η διατμητική τάση και γ η παραμόρφωση, για ένα άμορφο συμπολυμερές πολυαιθυλενίου-πολυνορβορνενίου [8]. Υπάρχει μια θερμοκρασία (T_g) πάνω από την οποία το μέτρο ελαστικότητας μειώνεται απότομα κατά τρεις δεκάδες περίπου. Αυτό συμβαίνει, γιατί, κάτω από αυτή τη θερμοκρασία, οι κινήσεις των πολυμερικών αλυσίδων είναι «παγωμένες» και έτσι οι μόνες κινήσεις που γίνονται είναι οι πολύ τοπικές περιστροφές πλευρικών αλυσίδων ή τοπικές κινήσεις της κύριας αλυσίδας. Το υλικό τότε, ενώ έχει ουσιαστικά τη δομή υγρού, παρουσιάζει μηχανικές ιδιότητες στερεού και ανήκει στη κατηγορία υλικών που ονομάζονται «ύαλο». Πάνω από τη θερμοκρασία T_g , που ονομάζεται θερμοκρασία υάλου, αρχίζουν να κινούνται μικρά τμήματα των αλυσίδων και, σε ακόμα υψηλότερες θερμοκρασίες, μπορεί να κινηθεί ολόκληρο το μακρομόριο, οπότε το σύστημα ρέει.



Εικ. 2.3. Μετάβαση υάλου σε συμπολυμερές πολυαιθυλενίου-πολυνορβορνενίου. (από πάνω προς τα κάτω): Ειδικός όγκος $V \equiv 1/\rho$, ειδική θερμοχωρητικότητα $c_p = (dQ/dT)_P$, πραγματικό (\circ, G') και φανταστικό (\bullet, G'') μέρος του μέτρου διάτμησης $G^* (= \tau/\gamma)$, όπου τ είναι η διατμητική τάση και γ η παραμόρφωση, συναρτήσει της θερμοκρασίας. Ο συντελεστής θερμικής διαστολής $\alpha = (1/V)(\partial V/\partial T)_P$ και η θερμοχωρητικότητα παρουσιάζουν ασυνέχεια στους ~ 360 K, όπως σε θερμοδυναμικές μεταβάσεις δεύτερης τάξης. Στην ίδια θερμοκρασία εμφανίζεται μηχανισμός χαλάρωσης που οδηγεί σε μείωση του $|G^*|$ [8].

Το «ξεπάγωμα» των βαθμών ελευθερίας του συστήματος σε $T > T_g$ οδηγεί σε μεταβολή της

ειδικής θερμοχωρητικότητας $c_p = \frac{1}{m} \left(\frac{dQ}{dT} \right)_P$, όπως προκύπτει από μετρήσεις διαφορικής

θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC) (εικ. 2.3). Αυτό συνεπάγεται ότι η ενθαλπία του συστήματος,

$\Delta H = \int C_p dT$, δεν παρουσιάζει ασυνέχεια στο T_g , αλλά μόνο αλλαγή της εξάρτησης από τη θερμοκρασία. Αντίστοιχη μεταβολή στη θερμοκρασία υάλου παρατηρείται στον συντελεστή θερμικής διαστολής υπό σταθερή πίεση. Οι παρατηρήσεις αυτές δεν περιορίζονται σε πολυμερικά συστήματα, αλλά είναι γενικό χαρακτηριστικό όλων των άμορφων υλικών. Ακόμα και συστήματα μικρών μορίων που δεν καταφέρνουν να κρυσταλλωθούν, π.χ. λόγω ταχείας ψύξης, εμφανίζουν ανάλογες ιδιότητες.

Από τα παραπάνω θα μπορούσε να βγει το συμπέρασμα ότι η μετάβαση από την υαλώδη κατάσταση στο τήγμα είναι μια θερμοδυναμική μεταβολή δεύτερης τάξης, αλλά, όμως, πειραματικά δεδομένα δεν συμφωνούν. Το βασικότερο από αυτά είναι ότι η θερμοκρασία υάλου

δεν είναι σαφώς καθορισμένη, αλλά παρουσιάζει έντονη εξάρτηση από την κλίμακα χρόνου του πειράματος. Αν οι θερμομετρικές μετρήσεις γίνουν με πιο αργό ρυθμό θέρμανσης, η αύξηση της θερμοχωρητικότητας θα παρατηρηθεί σε χαμηλότερη θερμοκρασία, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με πιο γρήγορο ρυθμό. Αυτό που είναι ακόμα πιο σημαντικό είναι ότι ο χρόνος χαλάρωσης του συστήματος δεν παρουσιάζει ασυνέχεια στο T_g , απλώς σε $T < T_g$ γίνεται τόσο μεγάλος που, μετά από ένα σημείο, δεν μπορεί να μετρηθεί μέσα σε λογικά χρονικά πλαίσια. Επομένως, η μετάβαση υάλου δεν είναι μια πραγματική θερμοδυναμική μετάβαση, αλλά ένα κινητικό φαινόμενο που εξαρτάται έντονα από την κλίμακα χρόνου στην οποία το παρατηρούμε.

2.4.1.1 Θεωρίες για τη μετάβαση «υάλου» που σχετίζονται με τον όγκο του συστήματος

Παρά την εντατική έρευνα πάνω στα υαλώδη συστήματα, δεν υπάρχει ακόμα μια θεωρία που να εξηγεί ικανοποιητικά όλα τα πειραματικά αποτελέσματα του φαινομένου της υαλώδους «μετάπτωσης». Οι προσπάθειες που γίνονται κινούνται, σε γενικές γραμμές, προς δύο κατευθύνσεις. Η πρώτη θεωρεί ότι η επιβράδυνση των χρόνων χαλάρωσης κοντά στο T_g οφείλεται στην έλλειψη «ελεύθερου» όγκου που είναι απαραίτητος για τις κινήσεις. Η επίδραση της θερμοκρασίας στη δυναμική ερμηνεύεται απλώς μέσα από τη μεταβολή του όγκου του συστήματος λόγω συστολής, χωρίς να παίζουν ρόλο οι άλλες θερμοδυναμικές συναρτήσεις του συστήματος. Το παλαιότερο και απλούστερο μοντέλο είναι αυτό των Turnbull και Cohen [9]. Ως ελεύθερος όγκος, V_f , ορίζεται η διαφορά μεταξύ του ειδικού όγκου V και του «κατειλημμένου» όγκου V_{oc} , ο οποίος μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι ο όγκος του αντίστοιχου κρυστάλλου στην ίδια θερμοκρασία. Το μοντέλο δεν χρησιμοποιεί στατιστική μηχανική και προτείνει ότι οι χρόνοι χαλάρωσης τ , ή το ιξώδες η , είναι συναρτήσεις μόνο του κλασματικού ελεύθερου όγκου $f=V_f/V_{oc}$ και προκύπτουν από παραλλαγή της εξίσωσης Doolittle για το ιξώδες [10]

$$\eta = \eta_0 \exp(b/f) \quad (2.2)$$

όπου η_0 και b είναι σταθερές. Για τον κλασματικό ελεύθερο όγκο ισχύει η ακόλουθη σχέση, αν ο συντελεστής a_f του ελεύθερου όγκου καθώς και η συμπιεστότητα β_f θεωρηθούν σταθερά,

$$f(T, P) = f(T_{ref}, P_{ref}) + a_f (T - T_{ref}) - \beta_f (P - P_{ref}) \quad (2.3)$$

όπου T_{ref} και P_{ref} είναι κάποια θερμοκρασία και πίεση αναφοράς, αντίστοιχα. Να σημειωθεί ότι τα a_f και β_f δεν είναι αναγκαστικά ίσα με τις αντίστοιχες τιμές του «πραγματικού» όγκου, αν και πρόσφατα αποτελέσματα προσομοιώσεων έδειξαν την πλήρη αναλογία τους [11]. Με τη χρήση της εξίσωσης Doolittle και του κλάσματος ελεύθερου όγκου προκύπτει η ακόλουθη σχέση, που είναι συνδυασμός της εξίσωσης Vogel-Fulcher-Tammann (VFT) [12] για την εξάρτηση από τη

θερμοκρασία και της τροποποιημένης μορφής της για την πίεση

$$\tau(T, P) = \tau_0 \exp\left(\frac{b}{a_f(T-T_0)}\right) \exp\left(\frac{b}{\beta_f(P_0-P)}\right) \quad (2.4)$$

όπου $T_0 = T_{\text{ref}} - f(T_{\text{ref}}, P_{\text{ref}})/a_f$ και $P_0 = f(T_{\text{ref}}, P_{\text{ref}})/\beta_f$. Το πλεονέκτημα του μοντέλου είναι ότι προβλέπει σωστά την παρατηρούμενη πειραματικά εξάρτηση των χρόνων από τη θερμοκρασία και την πίεση ταυτόχρονα, με κατάλληλη επιλογή των a_f και β_f , η οποία, όμως, είναι αυθαίρετη καθώς ουσιαστικά δεν μπορούν να υπολογιστούν πειραματικά ανεξάρτητα από τους χρόνους. Έχουν προταθεί και άλλα, πιο πολύπλοκα, μοντέλα ελεύθερου όγκου, αλλά είτε δεν συμφωνούν ικανοποιητικά με το πείραμα, είτε οδηγούν σε τιμές των παραμέτρων τους που στερούνται φυσικής σημασίας. Ένα καίριο πλήγμα στη θεωρία του ελεύθερου όγκου έδωσαν πρόσφατα πειράματα χαρακτηριστικών χρόνων συναρτήσεως της πίεσης και της θερμοκρασίας, $\tau(T, P)$. Αν επιλεγούν δύο ζευγάρια τιμών (T, P) , τέτοια ώστε να αντιστοιχούν σε ίσο όγκο V , οι χρόνοι χαλάρωσης που προκύπτουν δεν είναι ίσοι, όπως θα προέβλεπε η θεωρία, αλλά μειώνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας [13,14].

Η δεύτερη κατηγορία μοντέλων προσπαθεί να συνδέσει τη δυναμική με τις θερμοδυναμικές παραμέτρους των υαλωδών συστημάτων, ιδιαίτερα με την εντροπία, και να δείξει ότι, αν και η παρατηρούμενη μετάβαση υάλου είναι κινητικό φαινόμενο, κρύβει μια πραγματική θερμοδυναμική μεταβολή. Στο μοντέλο συνεργατικότητας των Adam και Gibbs [15] η μάζα του άμορφου υλικού χωρίζεται σε περιοχές που χαλαρώνουν ανεξάρτητα από τις υπόλοιπες. Για τη χαλάρωση υπάρχει ένα ενεργειακό φράγμα που πρέπει να υπερπηδηθεί. Γι' αυτό η θερμική ενέργεια $k_B T$ παίζει καθοριστικό ρόλο σε αυτό το μοντέλο. Άμεση συνέπεια αυτού είναι ότι το μέγεθος των περιοχών εξαρτάται έντονα από τη θερμοκρασία, καθώς το ενεργειακό φράγμα είναι συνάρτηση του αριθμού των μορίων που περιέχουν. Ο χρόνος χαλάρωσης αυξάνεται με το μέγεθος αυτών των περιοχών, η εντροπία, όμως, μειώνεται, γιατί περιορίζεται ο αριθμός των δυνατών διαμορφώσεων. Τα δύο μεγέθη συνδέονται μεταξύ τους μέσω της σχέσης

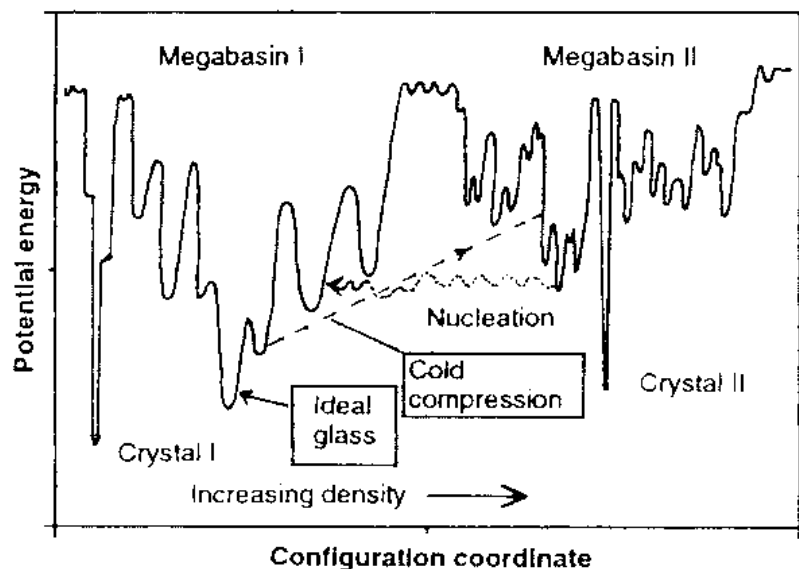
$$\tau = \tau_{AG} \exp\left(\frac{C\Delta\mu}{TS_C}\right) \quad (2.5)$$

όπου τ_{AG} είναι ο χρόνος χαλάρωσης στο όριο των υψηλών θερμοκρασιών, C είναι σταθερά, $\Delta\mu$ το ενεργειακό φράγμα ανά μόριο και S_C η εντροπία λόγω διαμορφώσεων, που μπορεί να υπολογιστεί από τη θερμιδομετρία. Η τελευταία μπορεί να υπολογιστεί μόνο πάνω από το T_g , αλλά η προέκτασή της μηδενίζεται σε κάποια θερμοκρασία κάτω από το T_g [16]. Αυτό υπονοεί ότι, αν και η παρατηρούμενη μετάβαση υάλου δεν είναι πραγματική θερμοδυναμική μεταβολή, υπάρχει

μια μεταβολή δεύτερης τάξεως «κρυμμένη» κάτω από αυτή, η οποία, όμως, είναι απρόσιτη λόγω του υπερβολικά μεγάλου χρόνου που χρειάζεται να έρθει το σύστημα σε ισορροπία σε αυτές τις χαμηλές θερμοκρασίες. Η αντικατάσταση της S_c στην Εξ. 2.5 δίνει την Εξ. VFT.

2.4.1.2 Ενεργειακό «τοπίο» και δυναμική

Οι πιο σύγχρονες προσπάθειες για την ερμηνεία της μετάβασης υάλου βασίζονται στο ενεργειακό «τοπίο» των άμορφων συστημάτων, που πρότεινε ο C. A. Angell (εικ. 2.4) [4], δηλαδή την δυναμική ενέργεια ως συνάρτηση της διαμόρφωσης. Το τοπίο περιλαμβάνει πολλά τοπικά ελάχιστα σε διάφορες κλίμακες που χωρίζονται μεταξύ τους με αρκετά υψηλά ενεργειακά φράγματα. 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 γι' αυτό γίνεται ύαλος. Με τη θεώρηση αυτή για τη μετάβαση υάλου δεν είναι απαραίτητη η μείωση του όγκου. Η αλλαγή του συντελεστή διαστολής κατά τη μετάβαση οφείλεται στην αδυναμία αλλαγής διαμόρφωσης, δηλαδή τη μείωση των βαθμών ελευθερίας. Η μετάβαση υάλου και σε μεμονωμένα μακρομόρια, π.χ. διαλύματα πρωτεϊνών, μπορεί να ερμηνευτεί μέσω του ενεργειακού τοπίου, κάτι που δεν μπορεί να συμβεί με το μοντέλο συνεργατικότητας.

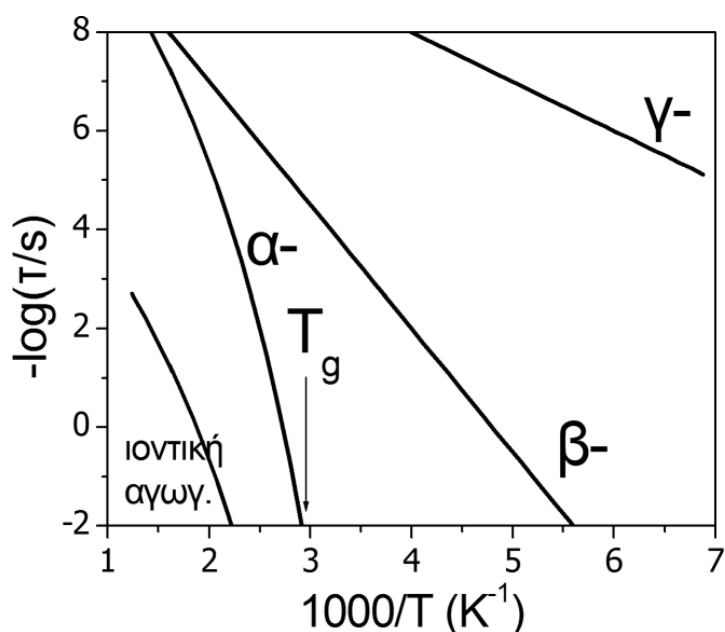


Εικ. 2.4. Ενεργειακό «τοπίο» μακρομορίου – ενέργεια ως συνάρτηση της διαμόρφωσης. Στην πραγματικότητα είναι πολυδιάστατο, λόγω των πολλών ανεξάρτητων μεταβλητών (απλών δεσμών γύρω από τους οποίους γίνονται περιστροφές), αλλά εδώ έχει απλοποιηθεί σε μονοδιάστατο. Περιλαμβάνει πολλά μέγιστα και ελάχιστα 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 μην 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 [4].

Από τα παραπάνω έγινε φανερό ότι δεν έχει δοθεί οριστική απάντηση στο θέμα της προέλευσης της μετάβασης υάλου. Το «πάγωμα» των κινήσεων στη αντίστοιχη θερμοκρασία μπορεί να αποδοθεί είτε στην έλλειψη «ελεύθερου» όγκου, είτε στη μειωμένη θερμική ενέργεια $k_B T$. Μελέτες της δυναμικής υπό ισόχωρες συνθήκες δείχνουν την ανεπάρκεια της θεωρίας του ελεύθερου όγκου, προτείνοντας ως πιο κατάλληλη την ερμηνεία της μετάβασης υάλου μέσω του ενεργειακού τοπίου. Έρευνες στο εργαστήριό μας έδειξαν ότι η σχετική συνεισφορά της θερμικής ενέργειας και του ελεύθερου όγκου εξαρτάται από το μέγεθος του μορίου [17,18]. Στο Κεφ. 4 θα αναφερθούν ποσοτικά αποτελέσματα για την εξάρτηση της δυναμικής από τους δύο παράγοντες.

2.4.2 Κύριοι και δευτερεύοντες μηχανισμοί χαλάρωσης

Η μελέτη της δυναμικής άμορφων συστημάτων αποκαλύπτει ότι δεν υπάρχει ένας μοναδικός μηχανισμός χαλάρωσης. Εκτός από τον κύριο μηχανισμό χαλάρωσης που συνδέεται με το T_g , κατά κανόνα παρατηρούνται και άλλοι, πιο ασθενείς και πιο γρήγοροι, μηχανισμοί οι οποίοι ονομάζονται δευτερεύοντες. Συμβατικά ο κύριος μηχανισμός ονομάζεται α -μηχανισμός, ενώ οι δευτερεύοντες β -, γ - κ.ο.κ. με σειρά μειούμενων χρόνων χαλάρωσης (εικ. 2.5).



Εικ. 2.5. Σχηματικό διάγραμμα Arrhenius (χρόνοι συναρτήσεως του αντιστρόφου της θερμοκρασίας) των μηχανισμών χαλάρωσης άμορφου συστήματος. Ο α - (κύριος) μηχανισμός σχετίζεται με τη μετάβαση υάλου και έχει VFT θερμοκρασιακή εξάρτηση, ενώ οι β - και γ - αντανakλούν τοπικές κινήσεις και έχουν Arrhenius εξάρτηση. Σε υψηλές θερμοκρασίες αρχίζει να εμφανίζεται η κίνηση των ιόντων.

Στα πολυμερικά συστήματα ο α -μηχανισμός δείχνει τη χαλάρωση τμημάτων των αλυσίδων που αποτελούνται από λίγα μονομερή (τμήματα), γι' αυτό και ονομάζεται τμηματικός (*segmental*) μηχανισμός. Η προέλευση των δευτερευόντων μηχανισμών ποικίλει. Πολλές φορές αντανakλούν περιστροφές μικρότερων ομάδων ατόμων του μορίου, οι οποίες χρειάζονται λιγότερο όγκο και έχουν συνήθως μικρότερο ενεργειακό φράγμα. Αυτό είναι μια πολύ συνηθισμένη περίπτωση στα μακρομόρια, που εκτός από την κύρια αλυσίδα διαθέτουν και πλευρικές. Άλλη περίπτωση είναι να υπάρχει τοπικά αυξημένος ελεύθερος όγκος, με αποτέλεσμα η χαλάρωση μικρού ποσοστού μορίων να γίνεται πολύ πιο γρήγορα από τα άλλα. Η υαλώδης κατάσταση ευνοεί την ύπαρξη μικρών κενών, αφού το σύστημα δεν βρίσκεται σε ισορροπία και δεν έχει περιοδική δομή. Μία επίσης συνηθισμένη πηγή δευτερευόντων μηχανισμών είναι μικρά μόρια, π.χ. νερού, που μπορούν να κινούνται μέσα στα κενά της υαλώδους μήτρας στην οποία βρίσκονται.

Μια χαρακτηριστική διαφορά των α - και β - μηχανισμών είναι ότι οι πρώτοι είναι κινήσεις αρκετά μεγάλων τμημάτων της κύριας αλυσίδας, ενώ οι δεύτεροι είναι πολύ τοπικοί. Αυτό αντανakλάται στη θερμοκρασιακή εξάρτηση των χρόνων χαλάρωσής τους. Οι β -μηχανισμοί έχουν εξάρτηση τύπου Arrhenius (2.1), δηλαδή μοναδική ενέργεια ενεργοποίησης, ενώ οι α -μηχανισμοί VFT εξάρτηση [12]

$$\tau(T) = \tau_0 \exp\left(\frac{D_T T_0}{T - T_0}\right) \quad (2.6)$$

όπου τ_0 το όριο των χρόνων χαλάρωσης σε υψηλές θερμοκρασίες, T_0 το «ιδανικό» σημείο υάλου και D_T αδιάστατη παράμετρος. Ο μεγάλος αριθμός μηχανισμών χαλάρωσης μπορεί να προκαλέσει σύγχυση σχετικά με την προέλευση της μετάβασης υάλου και είναι απαραίτητη η προσεκτική μελέτη των μηχανισμών σε μεγάλο εύρος χρονικών κλιμάκων, όπως και διερεύνηση, με διάφορες μεθόδους, των μοριακών κινήσεων που αντανακλά ο κάθε μηχανισμός. Το πρόβλημα αυτό είναι ιδιαίτερα έντονο στις πρωτεΐνες και τα πολυπεπτίδια, καθώς είναι μόρια με πολύπλοκη δομή, αλλά και επειδή πολλές φορές περιέχουν νερό ή άλλα μικρά μόρια. Στα επόμενα τμήματα θα γίνει συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της βιβλιογραφίας πάνω στη δυναμική αυτών των συστημάτων, καθώς και η ερμηνεία που δίνεται για την προέλευση της μετάβασης υάλου σε αυτά.

2.5 «Μετάβαση υάλου» και βιολογικά μακρομόρια – Πειραματικές ενδείξεις

2.5.1 Σκέδαση ακτίνων X

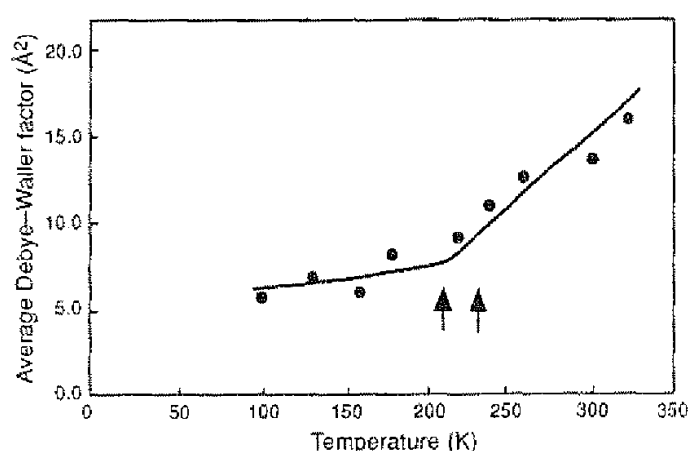
Η σκέδαση ακτίνων X αναφέρθηκε στο Κεφ. 1 ως μια από τις βασικότερες μεθόδους για τη μελέτη της δομής πολύ ευρείας κατηγορίας υλικών, συμπεριλαμβανομένων των πολυμερών, των πρωτεϊνών και των πολυπεπτιδίων. Επειδή οι ακτίνες X σκεδάζονται από ηλεκτρόνια, δίνουν ουσιαστικά την κατανομή τη ηλεκτρονιακής πυκνότητας και, κατά συνέπεια, τις θέσεις των ατόμων στο χώρο. Εκ πρώτης όψεως φαίνεται ότι δεν μπορούν με αυτή τη μέθοδο να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με τη δυναμική των μορίων. Όμως, κάθε κίνηση, ανεξαρτήτως προελεύσεως, καταστρέφει την περιοδικότητα του πλέγματος και ελαττώνει το μήκος συνοχής των δομών. Αυτό έχει ως συνέπεια τη διεύρυνση όλων των ανακλάσεων από τους κρυστάλλους και τη σημαντική μείωση της έντασης των ανακλάσεων ανώτερης τάξης. Από τις εντάσεις προκύπτει ο παράγοντας *Debye-Waller*, που σχετίζεται με το μέσο τετράγωνο των μετατοπίσεων $\langle u^2 \rangle$, μέσω της σχέσης

$$I/I_0 \sim e^{-2W} \sim \exp\left(-q^2 \langle u^2 \rangle\right) \quad (2.7)$$

όπου q το διάνυσμα του αντιστρόφου πλέγματος. Η ανάλυση μπορεί να δώσει την εξάρτηση του $\langle u^2 \rangle$ από τη θερμοκρασία ή άλλους παράγοντες. Το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι είναι αδύνατον να διαχωρίσει την προέλευση των μετατοπίσεων και τους χαρακτηριστικούς χρόνους στους οποίους γίνονται. Μπορεί να προέρχονται από ατέλειες και κενά στους κρυστάλλους, που έχουν στατικό χαρακτήρα, ή από δυναμικές διεργασίες όπως δονήσεις,

περιστροφές, κινήσεις ολόκληρων μορίων, συνεργατικές κινήσεις, κ.ά., με πολύ μικρούς χαρακτηριστικούς χρόνους, ακόμα και της τάξης των ps. Παρόλα αυτά μπορεί να δώσει ενδείξεις για την εμφάνιση μηχανισμών χαλάρωσης σε κάποια θερμοκρασία, έστω και αν η ακριβής προέλευσή τους παραμένει άγνωστη.

Μια σημαντική εργασία πάνω στη δυναμική πρωτεϊνών ως συνάρτηση της θερμοκρασίας με τη χρήση ακτίνων-X είναι των Rasmussen *et al.* [19]. Η πρωτεΐνη που μελετήθηκε ήταν η ριβονουκλεάση A μέσα σε μίγμα μεθανόλης/νερού. Παρατηρήθηκε, μέσω του παράγοντα *Debye-Waller*, μία δυναμική μετάβαση στους 220K περίπου, όπως φαίνεται στη εικ. 2.6.



Εικ. 2.6. Εξάρτηση από τη θερμοκρασία του παράγοντα *Debye-Waller* για την ενυδατωμένη ριβονουκλεάση A. Στους ~220K παρατηρείται αύξηση των μη αρμονικών κινήσεων, που θεωρείται η μετάβαση υάλου του συστήματος [19].

Για να βρεθεί αν αυτή η αλλαγή της δυναμικής σχετίζεται με τη βιολογική δράση της πρωτεΐνης, έγιναν κρυσταλλογραφικές μελέτες, παρουσία νουκλεοτιδίου που έπαιζε το ρόλο υποστρώματος της πρωτεΐνης και που υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι συνδεδεμένο στο ενεργό κέντρο. Οι μετρήσεις έδειξαν ότι, σε $T < 220$ K, η σύνδεση του υποστρώματος είναι αδύνατη, ή τουλάχιστον χρειάζεται υπερβολικά μεγάλο χρόνο για να γίνει, ενώ σε $T > 220$ K το υπόστρωμα είναι σταθερά συνδεδεμένο στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης. Είναι σαφές ότι υπάρχει σύνδεση μεταξύ του δυναμικού μηχανισμού και της βιολογικής δράσης, η προέλευση, όμως, του μηχανισμού είναι αβέβαιη. Οι συγγραφείς πρότειναν ως πιθανή ερμηνεία το ότι κάτω από τη θερμοκρασία μετάβασης το μόριο της πρωτεΐνης είναι πολύ άκαμπτο και δεν επιτρέπει τη σύνδεση, δεν αποκλείουν, όμως, και την πιθανότητα τα μόρια του διαλύτη (μητρικού υγρού) να είναι αυτά που δεν μπορούν να κινηθούν και μπλοκάρουν το ενεργό κέντρο. Μία ακόμη πιθανότητα είναι να ισχύουν και τα δύο, δηλαδή η δυναμική του διαλύτη και της πρωτεΐνης να συνδέονται και να

«ξεπαγώνουν» μαζί στην παρατηρούμενη θερμοκρασία. Η ίδια πρωτεΐνη μελετήθηκε και από τους Tilton *et al.* που προσπάθησαν να βρουν την ευκαμψία συγκεκριμένων ομάδων ατόμων [20]. Από την ανάλυση προέκυψε ότι, εκτός από τις πλευρικές ομάδες, κινείται σημαντικά και η κύρια αλυσίδα, ιδιαίτερα οι βρόχοι που σχηματίζει κοντά στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και δεν έχουν συγκεκριμένη δευτεροταγή δομή. Επίσης βρέθηκε ότι τα β -φύλλα είναι πιο άκαμπτα σε σχέση με τις α -έλικες, δίνοντας μικρότερο παράγοντα Debye-Waller, αν και αρχίζουν να κινούνται στην ίδια θερμοκρασία.

Με σκέδαση ακτίνων-X μελετήθηκε και η πρωτεΐνη κραμβίνη από τους Teeter *et al.* [21]. Στους 180 K παρατηρήθηκε μια μετάβαση παρόμοια με της ριβονουκλεάσης A, αλλά βρέθηκε ότι και τα μόρια του νερού συμμετέχουν σε αυτή. Οι συγγραφείς συμπέραναν ότι αυτή η υαλώδης «μετάβαση» οφείλεται κυρίως στο λεπτό στρώμα νερού στην επιφάνεια της πρωτεΐνης.

Έχουν πραγματοποιηθεί και άλλες μελέτες που συμφωνούν σε γενικές γραμμές με τις προηγούμενες. Η μετάβαση υάλου θεωρείται γενικό χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών, αλλά πολύ συχνά θεωρείται ότι συνδέεται με το νερό στην επιφάνειά τους. Πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι οι μετρήσεις σε ξηρές πρωτεΐνες είναι ελάχιστες.

2.5.2 Σκέδαση νετρονίων

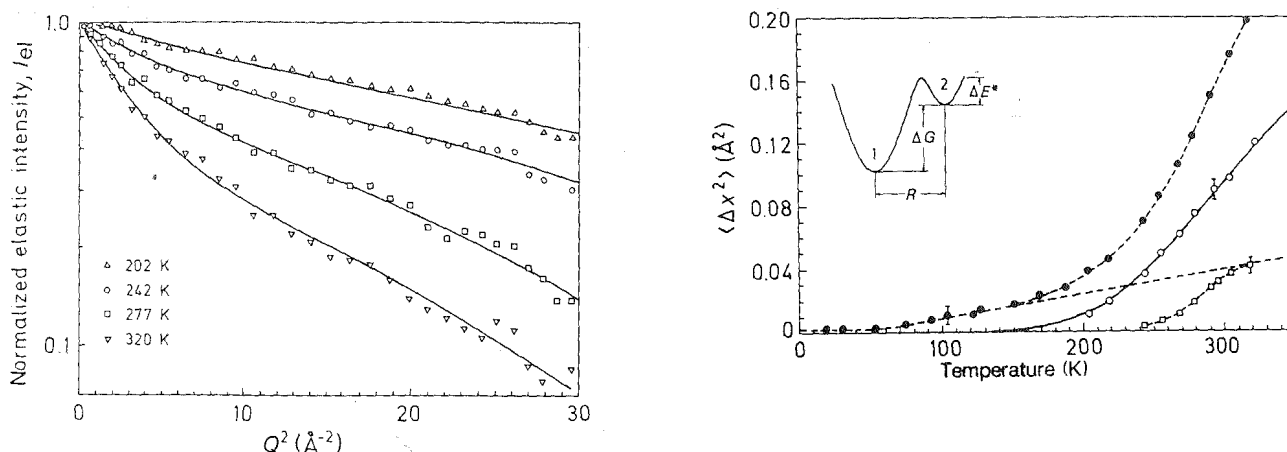
Η σκέδαση ακτίνων-X είναι πολύ κατάλληλη για τη μελέτη της μοριακής δομής, γιατί το μήκος κύματος είναι συγκρίσιμο με τις ενδοατομικές αποστάσεις, αλλά δεν δίνει άμεσες πληροφορίες για τη δυναμική. Η αιτία για αυτό είναι η πολύ μεγάλη ενέργεια των φωτονίων, που είναι της τάξης των keV, σε σχέση με την ενέργεια των δονήσεων και των άλλων κινήσεων, που είναι της τάξης των meV. Τα νετρόνια, αντίθετα, μπορούν να έχουν παρόμοιο μήκος κύματος με πολύ μικρότερη ενέργεια, λόγω της μάζας τους. Επίσης, επειδή σκεδάζονται από τους πυρήνες και όχι από τα ηλεκτρόνια, δίνουν πληροφορίες για όλα τα άτομα χωρίς έμφαση στα βαρύτερα από αυτά. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στις οργανικές ενώσεις που περιέχουν πολλά άτομα υδρογόνου. Τα άτομα που σκεδάζουν έντονα τις ακτίνες-X στις πρωτεΐνες είναι το θείο (S) της κυστεΐνης και της μεθειονίνης και ακολουθούν τα O και N, τα οποία δεν έχουν ομοιόμορφη κατανομή στο χώρο και, επομένως, δεν δίνουν αρκετά καλή εικόνα για τη συνολική συμπεριφορά του μορίου. Αντίθετα, τα νετρόνια σκεδάζονται κυρίως από το ^1H που έχει περίπου ομοιόμορφη κατανομή.

Ανάλογα με το αν ανταλλάσσεται ενέργεια κατά τη σκέδαση διακρίνουμε δύο περιπτώσεις: ελαστική, όπου τα σκεδαζόμενα νετρόνια έχουν την ίδια ενέργεια με τα προσπίπτοντα οπότε παίρνουμε πληροφορίες για τη δομή ανάλογες με τη σκέδαση ακτίνων-X, και ανελαστική σκέδαση,

όπου η διαφορά ενέργειας οφείλεται στη δημιουργία ή καταστροφή φωνονίου. Υπάρχει και η ενδιάμεση περίπτωση της ημι-ελαστικής (*quasi-elastic*) σκέδασης, όπου η διαφορά στην ενέργεια οφείλεται απλώς στο φαινόμενο *Doppler* λόγω θερμικών κινήσεων. Η κλίμακα χρόνου που είναι προσπελάσιμη εξαρτάται από τη διακριτική ικανότητα ΔE . Επειδή αυτή είναι της τάξης των μεV, οι χρόνοι $\tau \sim \hbar/\Delta E$ είναι μικρότεροι από ns.

Εκτός από τις παραπάνω υπάρχει και άλλη μια σημαντική διαφορά από τις ακτίνες-X. Τα σκεδαζόμενα νετρόνια μπορεί να έχουν ίδιο spin με τα προσπίπτοντα ή διαφορετικό. Μόνο στην πρώτη περίπτωση εμφανίζονται φαινόμενα συμβολής, οπότε η σκέδαση ονομάζεται σύμφωνη (*coherent*), ενώ στη δεύτερη έχουμε ασύμφωνη (*incoherent*) σκέδαση. Η ενεργός διατομή σκέδασης είναι διαφορετική για τις δύο διαδικασίες. Σημαντική ιδιότητα των νετρονίων είναι ότι η ενεργός διατομή σκέδασης εξαρτάται από τα ισότοπα. Από τα ^1H και ^2D το δεύτερο σκεδάζει πολύ λιγότερο ($\sigma_{\text{coh}}^{\text{H}}=1.76$, $\sigma_{\text{inc}}^{\text{H}}=80.27$, $\sigma_{\text{coh}}^{\text{D}}=5.59$, $\sigma_{\text{inc}}^{\text{D}}=2.05$ barn [22]) και γι' αυτό η επιλεκτική δευτερίωση εφαρμόζεται συχνά προκειμένου να μελετηθούν συγκεκριμένες ομάδες ατόμων. Τα πρωτόνια δίνουν εντονότερη ασύμφωνη σκέδαση και γι' αυτό οι ανακλάσεις Bragg από τους περισσότερους οργανικούς κρυστάλλους είναι ασθενείς. Η ένταση της ελαστικής ασύμφωνης σκέδασης συνδέεται με το μέσο τετράγωνο των μετατοπίσεων με τη σχέση Debye-Waller (2.7). Συμπερασματικά, η σκέδαση νετρονίων είναι κατάλληλη για τη μελέτη της δυναμικής των πρωτεϊνών, αλλά μόνο σε χρόνους της τάξης των ps-ns [23].

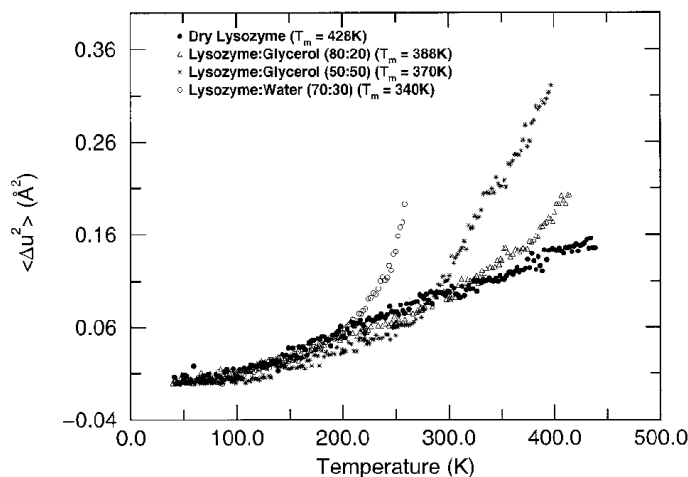
Υπάρχουν αρκετές μελέτες της δυναμικής πρωτεϊνών με σκέδαση νετρονίων. Οι Doster *et al.* έκαναν μετρήσεις στη μυοσφαιρίνη σε εύρος θερμοκρασιών 4-300 K [24]. Μέχρι τους 180 K η πρωτεΐνη συμπεριφέρεται σαν αρμονικό στερεό παρουσιάζοντας μόνο δονητικές κινήσεις ($\langle u^2 \rangle \sim T$). Σε $T > 180$ K αρχίζει να εμφανίζεται η μη-αρμονική συμπεριφορά, που πρέπει να σημειωθεί ότι δεν συνοδεύεται από αλλαγή της δομής. Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι όμοια με των υαλωδών συστημάτων. Η εικ. 2.7 δείχνει το μέσο τετράγωνο των μετατοπίσεων που οφείλεται στις δονήσεις και τις μη αρμονικές κινήσεις που εμφανίζονται στους 200 K περίπου. Η πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν ενυδατωμένη με D_2O (0,38 g D_2O / g δείγματος). Η σκεδαζόμενη ένταση, επομένως, αντανακλά σχεδόν αποκλειστικά κινήσεις της πρωτεΐνης και όχι του υδατικού στρώματος.



Εικ. 2.7. (αριστερά) Ελαστικά σκεδαζόμενη ένταση από ενυδατωμένη μυσφαιρίνη συναρτήσει του κυματανύσματος q για διάφορες θερμοκρασίες: (πάνω τρίγωνα) 202 K, (κύκλοι) 242 K, (τετράγωνα) 277 K, (κάτω τρίγωνα) 320 K. Η ένταση σε μικρές τιμές του q (μικρότερες από αυτές που αντιστοιχούν στο πλάτος των κινήσεων) υπακούει στη σχέση Debye-Waller (2.7). (δεξιά) Μέσο τετράγωνο των μετατοπίσεων $\langle u^2 \rangle$, υπολογισμένο από την αρχική κλίση στην αριστερή εικόνα. Οι γεμάτοι κύκλοι είναι η συνολική τιμή, ενώ τα ανοιχτά τετράγωνα είναι η μετατόπιση από μη αρμονικές κινήσεις μόνο. Η διακεκομμένη γραμμή είναι η συνεισφορά των αρμονικών δονήσεων ($\langle u^2 \rangle \sim T$) [24].

Εκτός από την ελαστική, και η ανελαστική σκέδαση δίνει ενδείξεις ότι η συγκεκριμένη μετάβαση έχει παρόμοια χαρακτηριστικά με την υαλώδη. Οι Cordone *et al.* μελέτησαν τη δυναμική της μυσφαιρίνης ως συνάρτηση του περιβάλλοντος υγρού [25]. Σε D_2O εμφανίζεται η μετάβαση που αναφέρθηκε πιο πάνω, αλλά η δυναμική γίνεται τελείως διαφορετική όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται μέσα σε τρεαλόζη. Δεν υπάρχει πλέον η δυναμική μετάβαση, τουλάχιστον κάτω από τους 300 K, και οι κινήσεις που παρατηρούνται είναι μόνο οι αρμονικές δονήσεις που προέρχονται από το σάκχαρο. Επιπλέον, η πρωτεΐνη δεν είναι βιολογικά ενεργή. Για το λόγο αυτό οι συγγραφείς προτείνουν ότι οι δυναμικές της πρωτεΐνης και των μικρών μορίων συνδέονται, τουλάχιστον σε χρόνους της τάξης των ps.

Η λυσοζύμη είναι ένα άλλο εκτενώς μελετημένο σύστημα. Τα αποτελέσματα της σκέδασης νετρονίων δεν διαφέρουν ποιοτικά από της μυσφαιρίνης. Έτσι οι Tsai *et al.* έδειξαν ότι η ενυδατωμένη λυσοζύμη εμφανίζει μια δυναμική μετάβαση στους ~ 210 K [26]. Αν το νερό αντικατασταθεί από μείγμα γλυκερόλης και νερού, που έχει υψηλότερο T_g , η μετάβαση μετατοπίζεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Αντίθετα, η ξηρή λυσοζύμη δεν αποκλίνει από την αρμονική συμπεριφορά ($\langle u^2 \rangle \sim T$) μέχρι τους 430 K όπου μετουσιώνεται (εικ. 2.8). Παρόμοια εξάρτηση της δυναμικής της λυσοζύμης από το διαλύτη βρέθηκε και από τους Paciaroni *et al.* [27].



Εικ. 2.8. (Αριστερά) Μέσο τετράγωνο των μετατοπίσεων $\langle u^2 \rangle$ της λυσοζύμης σε D_2O (ανοιχτοί κύκλοι), μίγμα γλυκερόλης/ D_2O 80:20 (πάνω τρίγωνα) και 50:50 (αστερίσκοι) και σε ξηρή μορφή (κλειστοί κύκλοι). Η θερμοκρασία της δυναμικής μετάβασης εξαρτάται από το διαλύτη και δεν παρατηρείται στην ξηρή πρωτεΐνη, η οποία εμφανίζει αρμονική συμπεριφορά ($\langle u^2 \rangle \sim T$) μέχρι τη θερμοκρασία μετουσίωσης (430 K) [26].

Πρόσφατα οι Caliskan *et al.* μελέτησαν τη λυσοζύμη σε γλυκερόλη και τρεαλόζη [28]. Βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη ακολουθεί τη δυναμική του περιβάλλοντος. Στη γλυκερόλη, που έχει χαμηλότερο T_g , αλλά λιγότερες δονήσεις στην υαλώδη κατάσταση σε σχέση με την τρεαλόζη, η αύξηση των παρατηρούμενων κινήσεων κατά τη μετάβαση είναι πιο έντονη, αλλά σε $T < T_g$ οι δονήσεις είναι πιο περιορισμένες. Παρόμοια αποτελέσματα υπάρχουν και από μετρήσεις σε άλλες πρωτεΐνες, όπως είναι η βακτηριοροδοψίνη [29], η οποία στην ενυδατωμένη της κατάσταση παρουσιάζει μετάβαση στους ~ 200 K, στην ξηρή, όμως, κατάσταση δεν δείχνει ούτε δυναμική μετάβαση ούτε και βιολογική δράση. Ο M. Weik βρήκε ότι σε ένα είδος κυτταρικών μεμβρανών (ιώδεις μεμβράνες – *purple membranes*) το πλάτος των μη αρμονικών κινήσεων μειώνεται με τη μείωση της υγρασίας του δείγματος και μηδενίζεται εντελώς στα ξηρά δείγματα [30].

Πιο πρόσφατες δημοσιεύσεις, όμως, δείχνουν κάποια αποτελέσματα που δεν συμφωνούν με τα προηγούμενα, όσον αφορά τη σύνδεση της δυναμικής πρωτεΐνης – μικρών μορίων. Οι Réat *et al.* μελέτησαν την ξυλανάση και βρήκαν ότι παρουσιάζει μία δυναμική μετάβαση, ανεξάρτητα από το διαλύτη – περιβάλλον της, ακόμα και όταν είναι ξηρή [31]. Το μέγεθος των μετατοπίσεων βρέθηκε να εξαρτάται αρκετά από το περιβάλλον, αλλά η θερμοκρασία της μετάβασης μόνο ασθενώς. Σοβαρές ενδείξεις ότι η δυναμική μετάβαση είναι τουλάχιστον εν μέρει ενδογενής δίνει η εργασία των Kurkal *et al.* [32]. Η εστεράση χοΐρου παρουσιάζει πάντα μετάβαση με χαρακτηριστικά υαλώδους μετάπτωσης, ακόμα και ξηρή. Η θερμοκρασία της μετάβασης εξαρτάται έντονα από την υδάτωση και βρέθηκε στους ~ 290 K για πρωτεΐνη με 50% κ.β. D_2O . Ακόμα και τα πολύ ξηρά

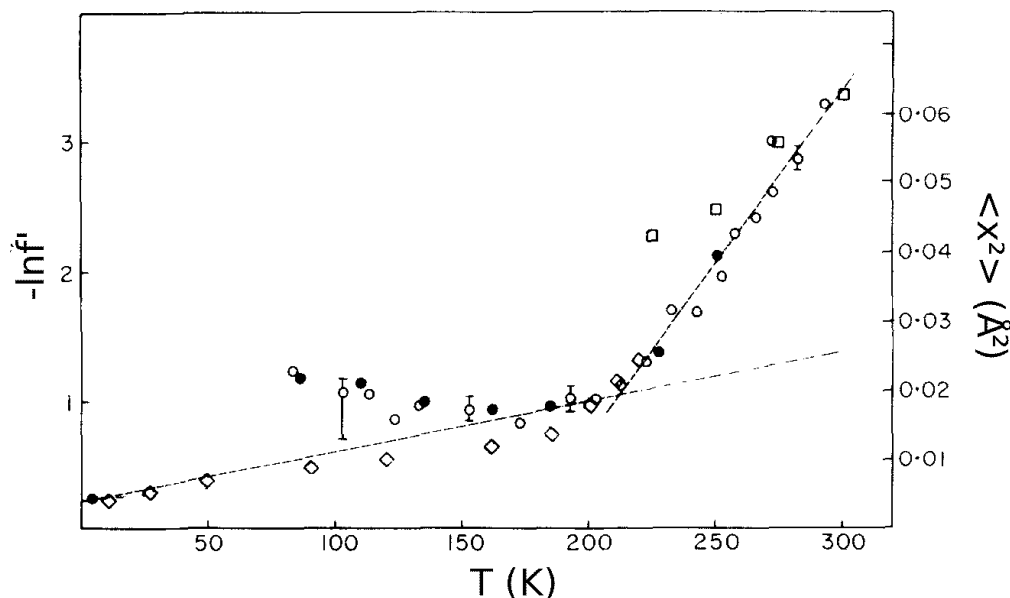
δείγματα παρουσίαζαν βιολογική δράση.

Εν συντομία, η σκέδαση νετρονίων δείχνει ότι η μετάβαση που παρατηρείται σε πολλές πρωτεΐνες στους ~200 K, μέσω της αύξησης των κινήσεων σε χρόνους ~ ps, είναι μια πραγματική δυναμική μετάβαση με χαρακτηριστικά υαλώδους μετάπτωσης που επηρεάζει τη βιολογική δράση και δεν σχετίζεται με αλλαγή της δομής. Η θερμοκρασία της μετάβασης εξαρτάται από το διαλύτη, ενώ δεν υπάρχει ένδειξη για ύπαρξη μετάβασης στις περισσότερες ξηρές πρωτεΐνες.

2.5.3 Φασματοσκοπία Mössbauer

Η φασματοσκοπία Mössbauer εξετάζει τη δομή ή τη δυναμική των υλικών με την απορρόφηση ακτίνων-γ αυστηρά καθορισμένης συχνότητας από ορισμένους πυρήνες. Οι αλλαγές στη συχνότητα των φωτονίων που απορροφά ένας πυρήνας μπορεί να οφείλονται σε διάφορες αιτίες, όπως η αλλαγή του συνολικού φορτίου του ατόμου, οπότε αλλάζουν ελαφρά οι ενεργειακές στάθμες, οι θερμικές κινήσεις του πυρήνα, οπότε μετατοπίζονται οι συχνότητες λόγω φαινομένου Doppler, κ.ά. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και μπορεί να εντοπίσει ταχύτητες μικρότερες από 1 mm/s. Γι' αυτό το λόγο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της δυναμικής συγκεκριμένων ατόμων. Δυστυχώς ο αριθμός πυρήνων που είναι κατάλληλοι είναι περιορισμένος, με αποτέλεσμα να μην εφαρμόζεται η μέθοδος στις περισσότερες πρωτεΐνες. Ένας από τους πιο συνηθισμένους πυρήνες που χρησιμοποιούνται είναι ο ^{57}Fe , που αποτελεί το ~2% του φυσικού σιδήρου και βρίσκεται σε πρωτεΐνες όπως η αιμοσφαιρίνη και η μυοσφαιρίνη, οι οποίες μεταφέρουν οξυγόνο ή και άλλα μικρά μόρια. Το μεγάλο πλεονέκτημα στις συγκεκριμένες περιπτώσεις είναι ότι τα άτομα σιδήρου βρίσκονται στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης, γι' αυτό και μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες για τη δυναμική και τη σχέση της με τη βιολογική δραστηριότητα. Η κλίμακα χρόνου των κινήσεων που εξετάζει η μέθοδος εξαρτάται από το είδος του πυρήνα και στην περίπτωση του ^{57}Fe είναι $\sim 10^{-7}$ s, δηλαδή παρατηρούνται αρκετά πιο αργές κινήσεις σε σχέση με τη σκέδαση νετρονίων. Το μέγεθος των κινήσεων υπολογίζεται μέσα από κατάλληλη ανάλυση των καμπυλών απορρόφησης, κυρίως μέσω του παράγοντα Lamb-Mössbauer f που υπολογίζεται από το ποσοστό ακτίνων-γ που δεν αλλάζουν ενέργεια και σχετίζεται με το μέσο τετράγωνο των μετατοπίσεων $\langle u^2 \rangle$ με τη σχέση $f = \exp\left(-4\pi^2 \langle u^2 \rangle / \lambda^2\right)$ (όμοια με τη σχέση 2.7 για τον παράγοντα Debye-Waller), όπου λ είναι το μήκος κύματος των ακτίνων-γ [33].

Μία από τις πρώτες εργασίες είναι η μελέτη της μυοσφαιρίνης από τους Parak *et al.* [34]. Ο παράγοντας Lamb-Mössbauer παρουσιάζει απότομη αύξηση στους ~210 K, όπως δείχνει η εικ. 2.9.



Εικ. 2.9. Δυναμική της μωσφαιρίνης: εξάρτηση του λογαρίθμου του παράγοντα Lamb-Mössbauer f που συνδέεται με το μέσο τετράγωνο των μετατοπίσεων $\langle x^2 \rangle$ μέσω της σχέσης $f = \exp(-4\pi^2 \langle x^2 \rangle / \lambda^2)$ (αριστερά) και του $\langle x^2 \rangle$ που υπολογίζεται από αυτόν (δεξιά) από τη θερμοκρασία. Παρατηρείται έντονη αλλαγή στους ~ 210 K, σε συμφωνία με τη σκέδαση νετρονίων. Τα σημεία προέρχονται από διάφορες μετρήσεις: οι κλειστοί κύκλοι, τα τετράγωνα και οι ρόμβοι προέρχονται από τις αναφορές [35],[36] και [37], αντίστοιχα, ενώ η εικόνα είναι από την αναφορά [34].

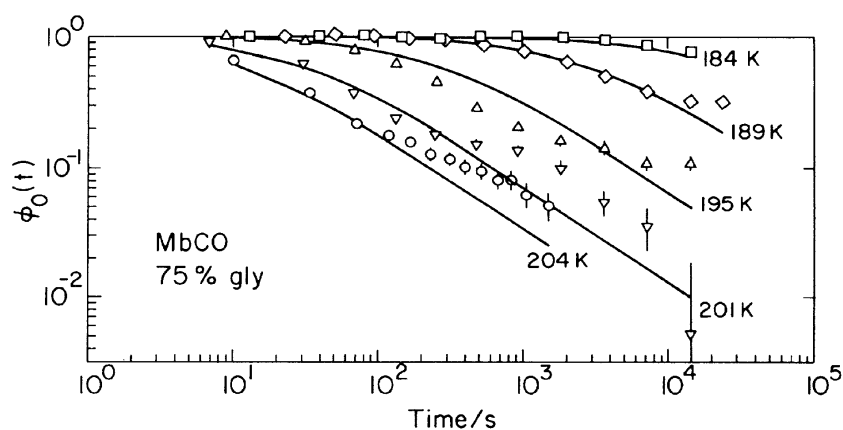
Η θερμοκρασία στην οποία παρουσιάζεται η αλλαγή, αλλά και το μέγεθος των μετατοπίσεων, συμφωνούν με τα αποτελέσματα των προηγούμενων μεθόδων. Η ίδια πρωτεΐνη μελετήθηκε και από τους Knapp *et al.* με αντίστοιχα αποτελέσματα [38]. Οι συγγραφείς εδώ σημειώνουν επιπλέον ότι, εκτός από τη μεταβολή στην απορρόφηση και τον παράγοντα Lamb-Mössbauer, η δυναμική μετάβαση προκαλεί και αλλαγή στο εύρος των γραμμών απορρόφησης, που οφείλεται σε κινήσεις με χαρακτήρα διάχυσης. Γενικά, υπάρχουν ενδείξεις ότι η μετάβαση σχετίζεται όχι μόνο με δονήσεις, αλλά και με κινήσεις μεγαλύτερης κλίμακας.

2.5.4 Φασματοσκοπία Υπερύθρου (Fourier Transform Infrared – FTIR)

Η φασματοσκοπία FTIR είναι μέθοδος που δεν δίνει άμεσα πληροφορίες για τη δυναμική, αλλά περισσότερο για τους δεσμούς μεταξύ των ατόμων. Παρόλα αυτά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εξεταστεί ο χρόνος που χρειάζεται ένα σύστημα για να έρθει στην ισορροπία και έτσι να εξαχθούν έμμεσα χρόνοι χαλάρωσης.

Οι Iben *et al.* μελέτησαν μωσφαιρίνη που είχε συνδεδεμένο μονοξειδίο του άνθρακα στο ενεργό κέντρο [39]. Ως μέτρο της σύνδεσης του CO στο άτομο σιδήρου της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν οι ζώνες απορρόφησης του CO $1930-1970 \text{ cm}^{-1}$. Οι μετρήσεις έγιναν συναρτήσει της πίεσης και της θερμοκρασίας. Παρατηρήθηκε ότι κάτω από τους ~ 200 K η

απορρόφηση δεν μεταβαλλόταν με τη θερμοκρασία, γεγονός που αποδόθηκε στο ότι η πρωτεΐνη σε αυτές της θερμοκρασίες βρισκόταν εκτός ισορροπίας. Ο χρόνος επαναφοράς του συστήματος σε ισορροπία μελετήθηκε με τη βοήθεια απότομων μεταβολών της πίεσης. Αφού εφαρμοζόταν μεγάλη πίεση στο σύστημα για κάποιο χρόνο, στη συνέχεια μηδενιζόταν απότομα και υπολογιζόταν η συνάρτηση χαλάρωσης $\Phi_0(t)=[A_0(t)-A_0(\infty)]/[A_0(0)-A_0(\infty)]$, όπου $A_0(t)$ είναι η απορρόφηση του μορίου του CO στα $\sim 1965\text{ cm}^{-1}$ ως συνάρτηση του χρόνου (εικ. 2.10). Ο χρόνος επαναφοράς είχε έντονη εξάρτηση από τη θερμοκρασία και παρουσίαζε απότομη μείωση στους $\sim 200\text{ K}$. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι χρόνοι είναι της τάξης των εκατοντάδων δευτερολέπτων, υπονοώντας ότι συμβαίνουν και πολύ πιο αργές κινήσεις από αυτές που παρατηρούνται με σκέδαση νετρονίων, φασματοσκοπία Mössbauer και Raman κλπ.

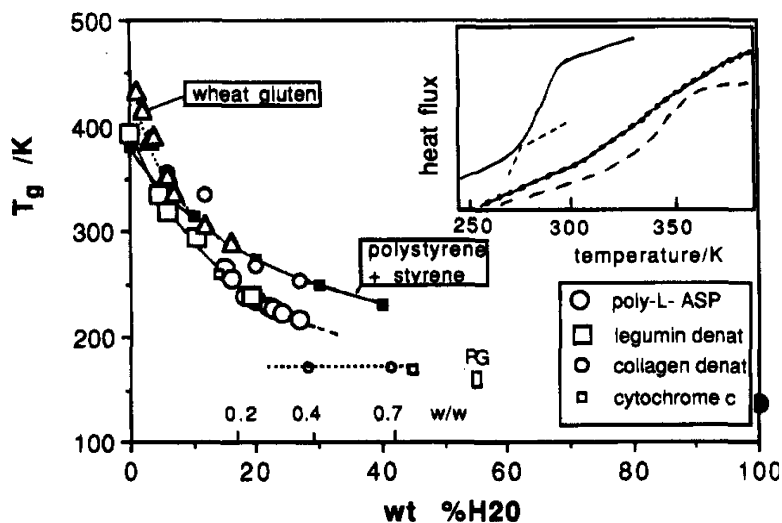


Εικ. 2.10. Συνάρτηση χαλάρωσης $\Phi_0(t)=[A_0(t)-A_0(\infty)]/[A_0(0)-A_0(\infty)]$, όπου $A_0(t)$ η απορρόφηση του CO στα $\sim 1965\text{ cm}^{-1}$ σε χρόνο t μετά την απότομη μείωση της πίεσης, σε διάφορες θερμοκρασίες: (τετράγωνα) 184 K, (ρόμβοι) 189 K, (πάνω τρίγωνα) 195 K, (κάτω τρίγωνα) 201 K, (κύκλοι) 204 K. Οι γραμμές έχουν προκύψει από προσαρμογή με κατάλληλη συνάρτηση [39]. Οι χρόνοι χαλάρωσης παρουσιάζουν έντονη εξάρτηση από τη θερμοκρασία και αρχίζουν να μειώνονται δραστικά περίπου στους 200 K.[39]

2.5.5 Διαφορική θερμοδομετρία σάρωσης – ΔΘΣ (Differential Scanning Calorimetry – DSC)

Η ΔΘΣ μετρά τη θερμοχωρητικότητα ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Οι τυχόν δυναμικές μεταβάσεις, όπως η μετάβαση υάλου, οδηγούν σε αύξηση των βαθμών ελευθερίας του συστήματος και επομένως και της θερμοχωρητικότητας. Οι χαρακτηριστικοί χρόνοι χαλάρωσης που παρατηρούνται, εξαρτώνται από το ρυθμό μεταβολής της θερμοκρασίας, αλλά γενικά είναι της τάξης των δευτερολέπτων, πολύ μεγαλύτεροι από αυτούς που παρατηρούνται με άλλες μεθόδους.

Οι Green *et al.* έκαναν μετρήσεις σε μια πλειάδα διαφορετικών συστημάτων, πρωτεϊνών και πολυπεπτιδίων, σε ξηρή κατάσταση, αλλά και παρουσία νερού [40].



Εικ. 2.11. Εξάρτηση της θερμοκρασίας υάλου (από μετρήσεις DSC) από την υδάτωση για διάφορες πρωτεΐνες, πεπτίδια και άλλα μακρομόρια: (μεγάλοι κύκλοι) πολυ(L-ασπαραγίνη), (μεγάλα τετράγωνα) μετουσιωμένη λεγουμίνη, (μικροί κύκλοι) μετουσιωμένο κολλαγόνο, (μικρά τετράγωνα) κυτόχρωμα (cytochrome) C. Τα μαύρα τετράγωνα δίνουν το T_g μίγματος στυρενίου-πολυστυρενίου συναρτήσει του κλάσματος του στυρενίου, για σύγκριση. Το ένθετο συγκρίνει τις καμπύλες DSC για ενυδατωμένα πολυ(L-ασπαραγίνη), λεγουμίνη και κολλαγόνο (αριστερά προς τα δεξιά) [40].

Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται μια θερμοκρασία όπου υπάρχει ένα «σκαλοπάτι» στη θερμοχωρητικότητα, ανάλογο με αυτό που εμφανίζουν τα συνθετικά μακρομόρια στη θερμοκρασία υάλου. Επιπλέον, βρέθηκε ότι ο ρυθμός θέρμανσης έχει έντονη επίδραση σε αυτή τη θερμοκρασία, υποδεικνύοντας ότι η «μετάβαση» είναι στην πραγματικότητα κινητικό φαινόμενο, όπως η υαλώδης μετάπτωση. Οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων είναι αρκετά μεγάλες, με τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες γενικά να εμφανίζουν μεγαλύτερο Δc_p από τις αντίστοιχες στη φυσική τους μορφή, για την ίδια περιεκτικότητα σε νερό, χωρίς, όμως, σημαντική διαφορά στο T_g . Η περιεκτικότητα σε νερό, αντίθετα, επηρεάζει πολύ και το T_g (εικ. 2.11) και το Δc_p . Τα δείγματα με μεγάλο βαθμό ενυδάτωσης (20% - 40% κ.β. H_2O) έχουν θερμοκρασία υάλου στην περιοχή 200-250 K, κοντά δηλαδή στις θερμοκρασίες που παρατηρήθηκαν με τις άλλες πειραματικές μεθόδους και μεταβολή στη θερμοχωρητικότητα $\Delta c_p \sim 1.0 \text{ J}/(\text{gK})$. Τα πιο ξηρά δείγματα (μέχρι $\sim 5\%$ κ.β. H_2O) παρουσιάζουν πολύ αυξημένο T_g ($\sim 400 \text{ K}$), και κάπως μειωμένη θερμοχωρητικότητα ($\Delta c_p \sim 0.5 \text{ J}/(\text{gK})$). Αυτή φαίνεται ότι είναι μία από τις αιτίες που δεν παρατηρήθηκαν μη αρμονικές κινήσεις σε πολλές ξηρές πρωτεΐνες οι οποίες μελετήθηκαν με μεθόδους που «βλέπουν» χρόνους της τάξης των ps-ns. Οι χαρακτηριστικές κινήσεις πρέπει να είναι πολύ αργές κάτω από τους $\sim 300 \text{ K}$, όπου είχαν γίνει οι περισσότερες μετρήσεις. Αξιοσημείωτη είναι η συμφωνία των αποτελεσμάτων για το υδρόφιλο πολυπεπίδιο πολυ(L-ασπαραγίνη) με τις φυσικές πρωτεΐνες, που υποδεικνύει ότι

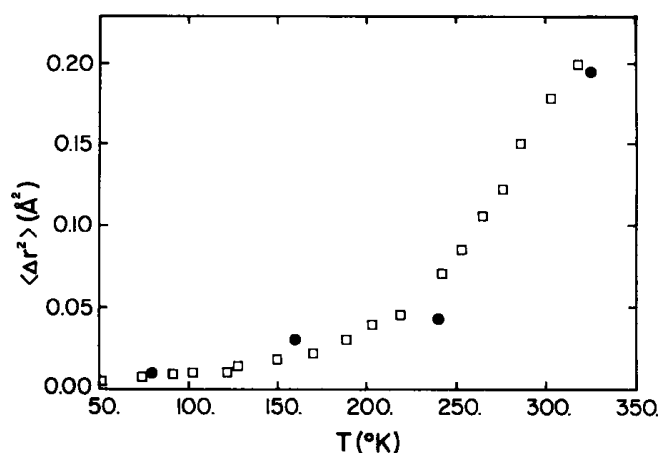
χρειάζονται πολλές μελέτες σε απλούστερα πολυπεπτιδικά συστήματα, ώστε να κατανοηθεί η συμπεριφορά των πιο πολύπλοκων πρωτεϊνών.

Τα αποτελέσματα της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης δείχνουν σαφέστερα από τις προηγούμενες μεθόδους ότι η παρατηρούμενη δυναμική μετάβαση στις πρωτεΐνες είναι στην πραγματικότητα η υαλώδης «μετάπτωση» που είναι γενικό χαρακτηριστικό των μακρομορίων. Η ύπαρξή της ακόμη και χωρίς διαλύτες, αλλά και η μείωση της χαρακτηριστικής θερμοκρασίας με την προσθήκη μικρών μορίων, είναι ενδείξεις ότι πιθανώς αποτελεί εγγενές χαρακτηριστικό των πεπτιδικών συστημάτων. Ο ρόλος των διαλυτών φαίνεται ότι είναι απλώς το αντίστοιχο του πλαστικοποιητή στα συνθετικά μακρομόρια.

2.5.6 Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής

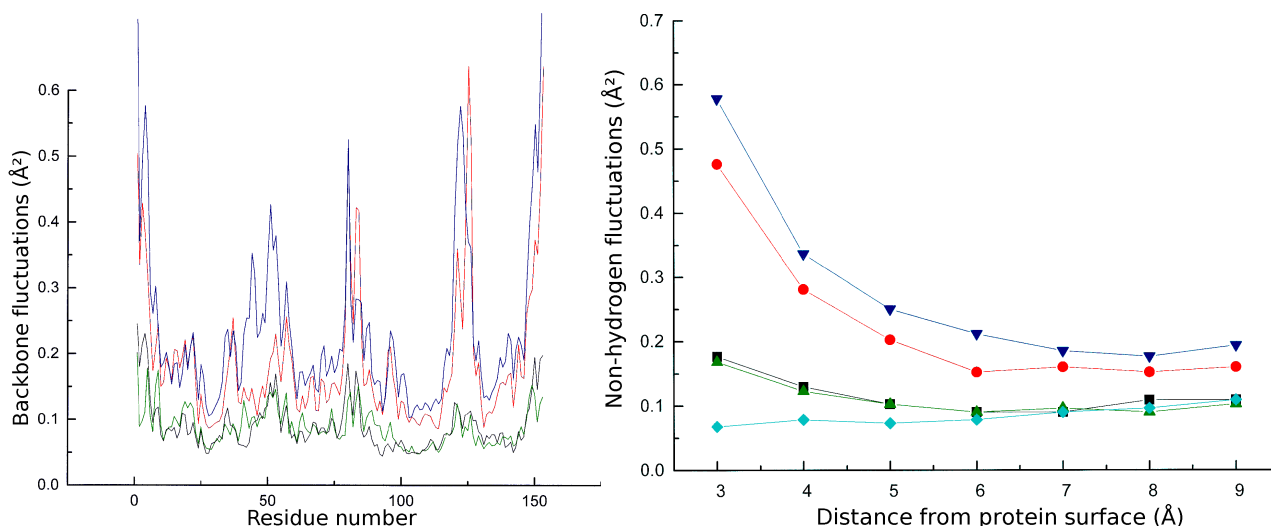
Εκτός από πειραματικά αποτελέσματα σχετικά με τη δυναμική των πεπτιδίων υπάρχουν και προσομοιώσεις πάνω σε αυτά. Οι προσομοιώσεις βασίζονται σε διάφορα μοντέλα για το πολυδιάστατο ενεργειακό «τοπίο» των πρωτεϊνών, δηλαδή την ενέργεια ως συνάρτηση της διαμόρφωσης, και μπορούν να συνδέσουν τους χρόνους χαλάρωσης με τις θερμοδυναμικές μεταβλητές. Δυστυχώς, οι υπολογιστικοί χρόνοι περιορίζονται από τη διαθέσιμη υπολογιστική ισχύ και με τα σημερινά δεδομένα είναι το πολύ της τάξης των ns.

Τα αποτελέσματα της ομάδας του M. Karplus, που έχουν και την ευρύτερη αναγνώριση από την επιστημονική κοινότητα, δείχνουν ότι υπάρχει σύνδεση της δυναμικής των πρωτεϊνών με το διαλύτη. Οι προσομοιώσεις τους σε ενυδατωμένη μυσφαιρίνη έχουν ικανοποιητική συμφωνία με τα αποτελέσματα από τη σκέδαση νετρονίων των Doster *et al.* [24], προβλέποντας σωστή θερμοκρασία μετάβασης (~ 230K), αλλά και πλάτος κινήσεων. (εικ. 2.12) [41].



Εικ. 2.12. Μέσο τετράγωνο των μετατοπίσεων των ατόμων ενυδατωμένης μυοσφαιρίνης συναρτήσει της θερμοκρασίας, από σκέδαση νετρονίων (ανοιχτά σύμβολα) [24] και προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (κλειστά σύμβολα). Η συμφωνία είναι πολύ καλή όσον αφορά το πλάτος των κινήσεων και τη θερμοκρασία όπου αρχίζει να εμφανίζεται η μη αρμονική συμπεριφορά (~230 K). Η εικόνα είναι από την αναφ. [41].

Σε προσομοιώσεις που έγιναν θεωρώντας την πρωτεΐνη και το διαλύτη σε διαφορετικές θερμοκρασίες [42], βρέθηκε ότι η θερμοκρασία του διαλύτη ήταν η παράμετρος που επηρέαζε τη συνολική δυναμική του συστήματος, ενώ η θερμοκρασία της πρωτεΐνης είχε αμελητέα επίδραση. Πιο συγκεκριμένα, κρατώντας τη θερμοκρασία του διαλύτη στους 180 K, κάτω από τη θερμοκρασία μετάβασης, το μέσο τετράγωνο των μετατοπίσεων $\langle u^2 \rangle$ των ατόμων της πρωτεΐνης παρέμενε μικρό ανεξάρτητα με το αν η θερμοκρασία της πρωτεΐνης ήταν πάνω ή κάτω από τη μετάβαση (300 K και 180 K, αντίστοιχα). Αντίθετα, το $\langle u^2 \rangle$ ήταν υψηλό με θερμοκρασία διαλύτη στους 300 K, χωρίς ουσιαστική μεταβολή με τη θερμοκρασία της πρωτεΐνης. Η εικ. 2.13 δείχνει τις τιμές του $\langle u^2 \rangle$ όλων των αμινοξέων της πρωτεΐνης για τους διάφορους συνδυασμούς θερμοκρασίας πρωτεΐνης–διαλύτη, όπως και την εξάρτηση του $\langle u^2 \rangle$ από την απόσταση από την επιφάνεια της πρωτεΐνης. Το εσωτερικό της πρωτεΐνης είναι σχεδόν ακίνητο ακόμα και σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ η δυναμική της επιφάνειάς της ακολουθεί τον διαλύτη. Οι Tarek και Tobias επίσης έδειξαν ότι οι κινήσεις του διαλύτη «παγώνουν» κατά την παρατηρούμενη δυναμική μετάβαση [43]. Οι Hayward *et al.* [44] έδειξαν ότι η θερμοκρασία της μετάβασης εξαρτάται από τη χρονική κλίμακα που την παρατηρούμε, ενώ οι Hansmann *et al.* [45] έδειξαν ότι κάτω από αυτή δεν μπορεί να αλλάξει η διαμόρφωση. Σημαντική είναι και η εργασία των Norberg *et al.* [46] που έδειξε μετάβαση υάλου σε ενυδατωμένο DNA στους ~200 K. Η αύξηση των κινήσεων συνδέθηκε με την ελάττωση του χρόνου ζωής των δεσμών υδρογόνου μεταξύ του μακρομορίου και του υδατικού στρώματος γύρω του.



Εικ. 2.13. (Αριστερά) Μέσο τετράγωνο των μετατοπίσεων $\langle u^2 \rangle$ των αμινοξέων της ενυδατωμένης μυοσφαιρίνης για τους διάφορους συνδυασμούς θερμοκρασίας πρωτεΐνης-διαλύτη: (μαύρο) πρωτεΐνη στους 180 K – διαλύτης στους 180 K, (κόκκινο) 180 K – 300K, (πράσινο) 300 K – 180 K, (μπλε) 300 K – 300 K. Η θερμοκρασία της πρωτεΐνης δεν έχει σχεδόν καμία επίδραση, επομένως η μετάβαση στους ~230 K σχετίζεται με το διαλύτη. (Δεξιά) Εξάρτηση του $\langle u^2 \rangle$ από την απόσταση από την επιφάνεια της πρωτεΐνης. Τα χρώματα είναι ίδια με την αριστερή εικόνα, εκτός από το γαλάζιο που αντιστοιχεί σε ακίνητο διαλύτη. Το εσωτερικό της πρωτεΐνης είναι σχεδόν ακίνητο υπό όλες τις συνθήκες, ενώ η επιφάνεια ακολουθεί τη δυναμική του διαλύτη. Η ακινητοποίηση του διαλύτη «παγώνει» και τις κινήσεις της πρωτεΐνης [42].

Αν και οι προηγούμενες εργασίες δείχνουν ότι η δυναμική μετάβαση των πρωτεϊνών οφείλεται στο διαλύτη, υπάρχουν μερικές που δείχνουν κίνηση του μορίου της πρωτεΐνης ανεξάρτητα από αυτόν. Οι Steinbach *et al.* [47] έδειξαν ότι η ξηρή μυοσφαιρίνη παρουσιάζει μη αρμονικές κινήσεις πάνω από τους ~250 K, αν επιτρέπονται άλματα στις διεδρες γωνίες, διαφορετικά εμφανίζει μόνο αρμονική συμπεριφορά ως και τους 400 K. Αντίθετα, η ενυδατωμένη δείχνει πάντα τη μετάβαση, αν και υπάρχει διαφορά στο μέγεθος των κινήσεων ανάλογα με την ελευθερία στην αλλαγή γωνιών. Οι Baysal *et al.* [48] έκαναν προσομοιώσεις στην πρωτεΐνη αναστολέα τρυψίνης και παρατήρησαν ότι υπάρχει δυναμική μετάβαση στους ~200 K, η οποία δεν μπορεί να περιγραφεί από ένα μοναδικό μηχανισμό χαλάρωσης και συνοδεύεται από αλλαγή της θερμοχωρητικότητας και από αύξηση των διακυμάνσεων των διεδρων γωνιών φ,ψ. Οι πλευρικές αλυσίδες κινούνται σε χρόνους ~ 100 ps, ενώ η κύρια αλυσίδα πολύ πιο αργά, οι περιορισμοί, όμως, των προσομοιώσεων δεν μπορούν να δώσουν συγκεκριμένες τιμές χρόνων. Τα αποτελέσματα υπονοούν ότι υπάρχει μεγάλος αριθμός δευτερευόντων μηχανισμών που πρέπει να ληφθούν υπ' όψη.

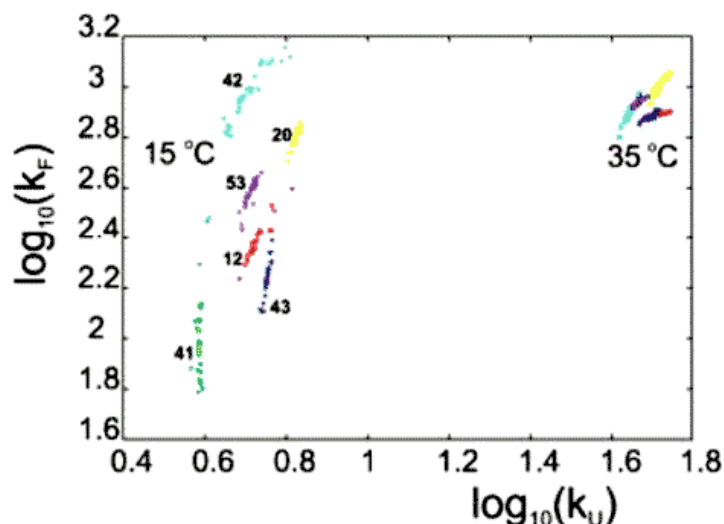
Συνοπτικά, τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων ενυδατωμένων πρωτεϊνών συμφωνούν με τα πειραματικά ως προς τη θερμοκρασία μετάβασης και το πλάτος των μη αρμονικών κινήσεων, υπάρχει, όμως, διάσταση απόψεων σχετικά με την προέλευση της μετάβασης. Η επικρατέστερη

άποψη είναι της ομάδας του M. Karplus ότι οφείλεται αποκλειστικά στο διαλύτη, αν και υπάρχει ένας περιορισμένος αριθμός προσομοιώσεων που υποδηλώνουν ότι υπάρχουν κινήσεις της κύριας αλυσίδας και μάλιστα απουσία διαλύτη.

2.5.7 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός – (Nuclear Magnetic Resonance – NMR)

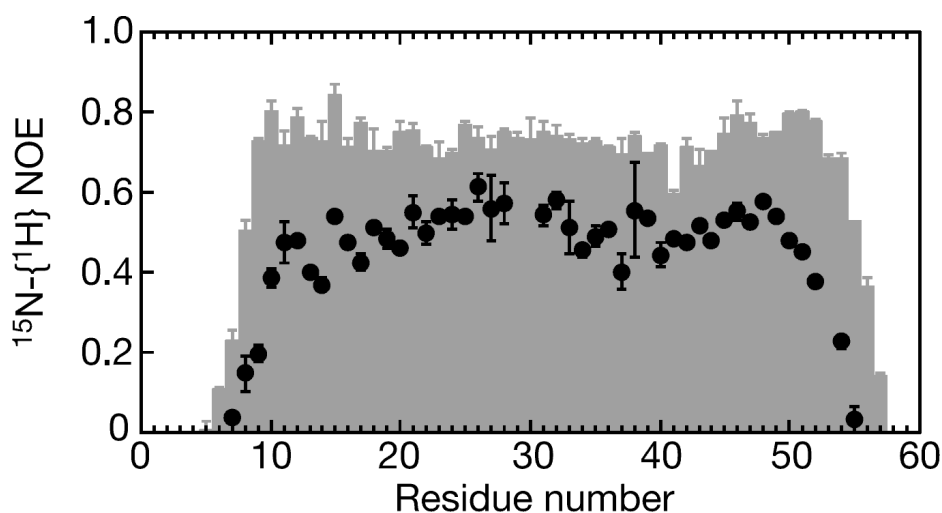
Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) χρησιμοποιείται κυρίως για την εύρεση της δομής των πρωτεϊνών, αλλά και για τη μελέτη της δυναμικής τους. Οι κυριότεροι τρόποι είναι μέσω του χρόνου χαλάρωσης σπιν-πλέγματος (spin-lattice) και του πυρηνικού φαινομένου Overhauser (Nuclear Overhauser Effect – NOE). Η μέθοδος έχει το πολύ μεγάλο πλεονέκτημα ότι μπορούν να μελετηθούν οι κινήσεις συγκεκριμένων ατόμων μέσα στο μόριο, λόγω της διαφορετικής χημικής μετατόπισής τους. Έτσι, είναι δυνατόν να διαχωριστούν οι μηχανισμοί χαλάρωσης της κύριας και των πλευρικών αλυσίδων. Οι χρόνοι που μπορούν να εξαχθούν κυμαίνονται σε μεγάλο εύρος, από 10^{-12} sec ως αρκετά sec.

Η διαδικασία δίπλωσης – αναδίπλωσης ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών έχει μελετηθεί από τον L. E. Kay [49-51]. Κυρίως χρησιμοποιήθηκε ^{15}N -NMR, σε συνδυασμό με ^1H -NMR και ^{13}C -NMR, γιατί, όπως εξηγήθηκε στο Κεφ. 1, «βλέπει» τη συμπεριφορά των πεπτιδικών δεσμών πάνω στην κύρια αλυσίδα. Οι μετρήσεις έδειξαν μεγάλη κινητικότητα της κύριας αλυσίδας, αλλά και σύνδεση της δυναμικής της με τη δυναμική των πλευρικών αλυσίδων, μέσω της μεταφοράς μαγνήτισης από άνθρακες πλευρικών αλυσίδων στην κύρια. Επίσης υπολογίστηκαν οι ρυθμοί μετάβασης από τη φυσική στην αναδιπλωμένη μορφή των πρωτεϊνών. Ενδεικτικά, απεικονίζονται στην εικ. 2.14 οι ρυθμοί που αντιστοιχούν σε μερικά αμινοξέα μιας παραλλαγής της πρωτεΐνης Fyn SH3. Η αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνει κυρίως το ρυθμό αναδίπλωσης, και η ισορροπία μετατοπίζεται προς την αναδιπλωμένη διαμόρφωση (βλέπε και εικ. 2.1). Πρέπει να σημειωθεί ότι οι χρόνοι χαλάρωσης της κύριας αλυσίδας αναμένεται να είναι της τάξης μεγέθους του αντιστρόφου αυτών των ρυθμών, δηλαδή πολύ πιο μεγάλοι από αυτούς που είναι παρατηρήσιμοι με τις περισσότερες μεθόδους που περιγράφηκαν πιο πριν.



Εικ. 2.14. Ρυθμοί δίπλωσης (k_F) και αναδίπλωσης (k_U) για μερικά αμινοξέα (σημειώνονται με αριθμούς) της πρωτεΐνης Fyn SH3 στους 15° και 35°C, όπως προκύπτουν από NMR. Αν $k_F > k_U$ εννοείται η φυσική μορφή, ενώ στην αντίθετη περίπτωση η αναδιπλωμένη. Από τη θερμοκρασία επηρεάζεται πιο πολύ ο χρόνος αναδίπλωσης (βλέπε και εικ. 2.1 και αναφ. [2]) αλλά και στις δύο θερμοκρασίες εννοείται η φυσική μορφή της πρωτεΐνης. Στους 35°C η χαλάρωση ολόκληρου του μακρομορίου γίνεται με τον ίδιο ρυθμό [49].

Κινητικότητα της κύριας αλυσίδας της πρωτεΐνης *engrailed homeodomain* (enHD) έδειξαν και οι μετρήσεις των Mayor *et al.* [2]. Αξιοσημείωτη είναι η αυξημένη ευκινησία των αμινοξέων που είναι κοντά στα άκρα και αντανακλάται στη μειωμένη ένταση NOE (εικ. 2.15).



Εικ. 2.15. Ένταση φαινομένου Overhauser (NOE) για τα αμινοξέα της πρωτεΐνης *engrailed homeodomain* (enHD) (γκρίζες στήλες) και μιας μεταλλαγμένης παραλλαγής της (μαύροι κύκλοι). Η μειωμένη ένταση στη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη δείχνει τη μεγαλύτερη κινητικότητα της κύριας αλυσίδας της. Αξιοσημείωτη είναι η πολύ μικρή ένταση για τα ακραία αμινοξέα, που σημαίνει ότι είναι πολύ πιο ευκίνητα [2].

Η συμπεριφορά αυτή είναι γνωστή στα συνθετικά μακρομόρια και οδηγεί στη μείωση της

θερμοκρασίας υάλου στα μικρά μοριακά βάρη, λόγω του μεγάλου αριθμού ελεύθερων άκρων ανά μονάδα όγκου. Άλλες εργασίες, όπως των Lee *et al.* [52], εστιάζονται στις κινήσεις των πλευρικών αλυσίδων. Η συγκεκριμένη περιλαμβάνει μελέτη της πρωτεΐνης calmodulin σε χρόνους της τάξης των ns, με σκοπό να γίνει σύγκριση με αποτελέσματα σκέδασης νετρονίων. Σε $T > 200$ K παρατηρείται αύξηση των κινήσεων των μεθυλίων, η οποία ποικίλει ανάλογα με το αμινοξύ. Το συμπέρασμα της εργασίας είναι ότι η παρατηρούμενη δυναμική μετάβαση στη σκέδαση νετρονίων ή ακτίνων X οφείλεται μόνο στις πλευρικές αλυσίδες και όχι σε συνολική μετάβαση της πρωτεΐνης.

Η χρήση NMR διαφωτίζει κάπως το τοπίο σε σχέση με τη δυναμική των πρωτεϊνών, αποκαλύπτοντας ότι και οι πλευρικές και η κύρια αλυσίδα κινούνται, αλλά σε πολύ διαφορετικούς χρόνους. Επίσης, η ευκινησία διαφέρει αρκετά ανάλογα με το αμινοξύ, γενικά, όμως, τα άκρα της πεπτιδικής αλυσίδας είναι πιο ευκίνητα. Η αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνει τη χαλάρωση, όπως είναι αναμενόμενο, και ευνοεί την αναδιπλωμένη διαμόρφωση σε σχέση με τη φυσική.

2.5.8 Διηλεκτρική Φασματοσκοπία

Μία από τις σημαντικότερες μεθόδους για τη μελέτη της δυναμικής είναι η διηλεκτρική φασματοσκοπία, καθώς μπορεί να καλύψει πολύ μεγάλο εύρος συχνοτήτων, από mHz ως αρκετά GHz. Η μέθοδος εξετάζει τη δυναμική μέσω των κινήσεων των μόνιμων ηλεκτρικών διπόλων των μορίων και θα αναλυθεί στο Κεφ. 3. Είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για πεπτιδικά συστήματα, τα οποία έχουν μεγάλο αριθμό ηλεκτραρνητικών ατόμων (άζωτο, οξυγόνο) με αποτέλεσμα να έχουν μεγάλη διπολική ροπή και κατά μήκος της κύριας αλυσίδας και στις πλευρικές. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της δυναμικής του υδατικού στρώματος στην επιφάνεια πρωτεϊνών, καθώς το μόριο του νερού έχει μεγάλη διπολική ροπή.

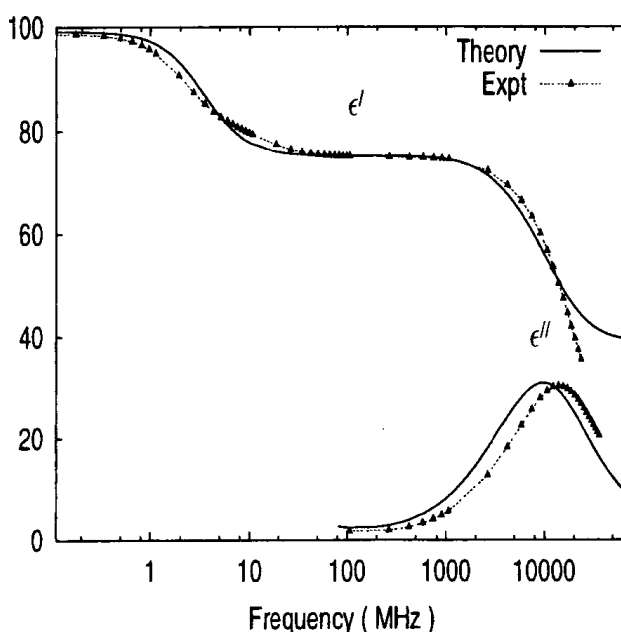
Οι μετρήσεις σε φυσικές πρωτεΐνες είναι κάπως περιορισμένες. Κυρίως έχουν μελετηθεί συνθετικά πεπτίδια, είτε σε διαλύματα είτε σε ξηρή μορφή, και γι' αυτό θα γίνει ξεχωριστή αναφορά σε κάθε μια από αυτές τις κατηγορίες.

2.5.8.1 Πρωτεΐνες

Οι Nandi *et al.* μελέτησαν υδατικά διαλύματα μυοσφαιρίνης, αιμοσφαιρίνης και μιας αλβουμίνης [53]. Στην περιοχή συχνοτήτων 0.1 MHz–100 GHz παρατηρήθηκαν δύο μηχανισμοί χαλάρωσης (εικ. 2.16). Ο πιο γρήγορος (~1 GHz) είχε ένταση περίπου ανεξάρτητη της συγκέντρωσης και χρόνους που αντιστοιχούν στο μηχανισμό χαλάρωσης του καθαρού νερού. Αντίθετα, ο πιο αργός (~1 MHz) είχε έντονη εξάρτηση από τη συγκέντρωση. Ο γρήγορος αποδόθηκε σε κινήσεις μορίων μακριά από την επιφάνεια της πρωτεΐνης τα οποία δεν

αλληλεπιδρούν με αυτή, ενώ ο αργός σε μόρια νερού που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με την πρωτεΐνη. Επομένως, υπάρχει μηχανισμός χαλάρωσης της πρωτεΐνης σε χρόνους μs , δεν είναι όμως βέβαιο ότι δείχνει κίνηση της κύριας αλυσίδας.

Η μελέτη της μυοσφαιρίνης από τους Kamei et al. [54] έδειξε ότι η υδάτωση της επιφάνειας της πρωτεΐνης είναι διαφορετική στη μετουσιωμένη μορφή και ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέτρο του πόσο εκτεταμένη είναι. Εκτός από πρωτεΐνες έχει μελετηθεί και το DNA, με χρήση της μεθόδου θερμικά διεγερμένων ρευμάτων αποπόλωσης (*Thermally stimulated depolarization currents* – TSDC), που έχει πολλές ομοιότητες με τη διηλεκτρική φασματοσκοπία [55]. Οι μετρήσεις αποκάλυψαν ένα μεγάλο αριθμό δευτερευόντων μηχανισμών σε $T < 200 \text{ K}$, με έντονη εξάρτηση από την υγρασία του δείγματος.



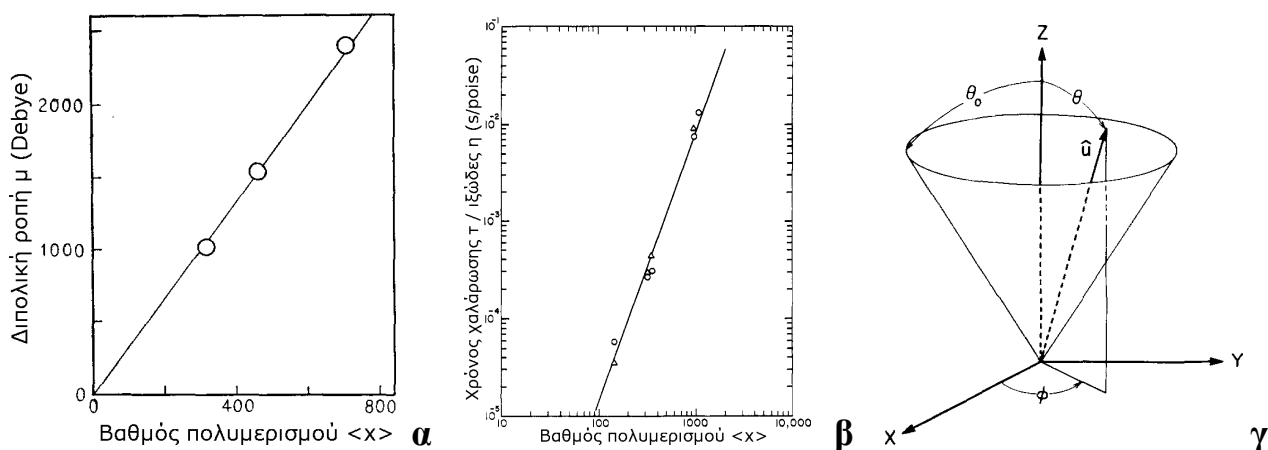
Εικ. 2.16. Πραγματικό (ϵ') και φανταστικό (ϵ'') μέρος της διηλεκτρικής σταθεράς ϵ^* υδατικού διαλύματος μυοσφαιρίνης (170mg/ml) συναρτήσεως της συχνότητας. Τα «σκαλοπάτια» στο ϵ' και τα μέγιστα στο ϵ'' (δείχνεται μόνο το ένα) υποδεικνύουν την ύπαρξη δύο μηχανισμών χαλάρωσης. Ο γρήγορος αντιστοιχεί σε μόρια νερού μακριά από την επιφάνεια της πρωτεΐνης, ενώ ο αργός σε μόρια νερού που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με την πρωτεΐνη. Οι καμπύλες προκύπτουν από θεωρητικό μοντέλο [53].

2.5.8.2 Πεπτίδια με α -ελικοειδή δευτεροταγή δομή – διαλύματα

Ένα από τα κυριότερα συστήματα που μελετήθηκαν είναι το πολυ(γ -βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ) (PBLG) που σχηματίζει σταθερή έλικα και σε διαλύματα και σε ξηρή μορφή. Οι πρώτες μετρήσεις σε αυτό το σύστημα έγιναν από τον Wada, σε διαλύματα διοξάνιου, διχλωροαιθανίου και DMF [56]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διπολική ροπή του μορίου είναι ανάλογη του μοριακού βάρους (εικ. 2.17α) και επομένως είναι σωστή η θεώρησή του ως άκαμπτης

ράβδου. Η διπολική ροπή ανά μονομερές υπολογίστηκε σε ~ 3.5 Debye από αραιά διαλύματα. Σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις, η ενεργός διπολική ροπή μειώνεται. Οι χρόνοι χαλάρωσης σε θερμοκρασία δωματίου ήταν της τάξης των δεκάδων ms και η εξάρτησή τους από το μοριακό βάρος, επομένως και από το μήκος, ήταν περίπου $\tau \sim L^3$, όπως προβλέπεται για την ελεύθερη χαλάρωση λεπτής άκαμπτης ράβδου [57]. Σε μικρότερους χρόνους εμφανίζονται οι κινήσεις της πλευρικής αλυσίδας, όπως δείχνουν οι μετρήσεις των Yagihara *et al.* [58]. Εμφανίζονται δύο μηχανισμοί σε χρόνους $\tau \sim 400$ ps και $\tau \sim 20$ ps που αντιστοιχούν σε περιστροφές γύρω τους απλούς δεσμούς C-C, κοντά στην κύρια αλυσίδα, και του εστερικού δεσμού C-O, αντίστοιχα. Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του Wada για τη χαλάρωση απ' άκρου εις άκρον, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι παρατηρούμενοι μηχανισμοί σε ενυδατωμένες πρωτεΐνες, σε χρόνους ps, οφείλονται κυρίως στις πλευρικές αλυσίδες και όχι στην κύρια. Οι Erenrich *et al.* [59] επίσης μελέτησαν αραιά διαλύματα PBLG και άλλων πεπτιδίων που σχηματίζουν α -έλικα (εικ. 2.17β). Σε αυτή την εργασία έγινε προσεκτικότερη ανάλυση, καθώς έγιναν κατάλληλες διορθώσεις για την πολωσιμότητα του διαλύτη, και τα δείγματα είχαν χαμηλή διασπορά μοριακών βαρών ($M_w/M_n \sim 1.1-1.3$). Η διπολική ροπή ανά μονομερές βρέθηκε ίση με 3.9 ± 0.2 Debye, ίδια σε όλα τα συστήματα. Οι συγγραφείς δίνουν επίσης μια τιμή 3.6 Debye/μονομερές από θεωρητικούς υπολογισμούς. Κάπως μεγαλύτερη τιμή (~ 4.5 Debye) δίνουν οι Applequist *et al.* για την πολυ(L-τυροσίνη) σε κινολίνη [60]. Οι Mashimo *et al.* έκαναν μετρήσεις σε υδατικά διαλύματα πολυ(L-γλουταμινικού οξέος), όπου το πεπτίδιο είχε τυχαία διαμόρφωση λόγω υψηλού pH, και βρήκαν κινήσεις πλευρικών αλυσίδων σε χρόνους ~ 5 ns και των μορίων H₂O σε ~ 10 ps [61].

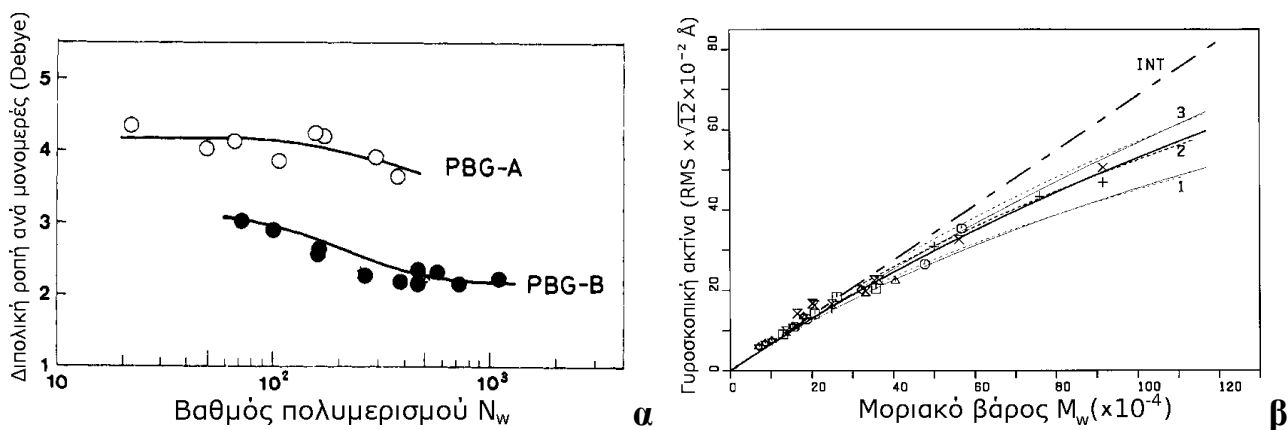
Οι Mori *et al.* [62] εστίασαν το ενδιαφέρον τους στην επίδραση της συγκέντρωσης στη δυναμική διαλυμάτων PBLG. Εκτός από τον μηχανισμό κίνησης απ' άκρου εις άκρον παρατήρησαν και έναν ακόμα πιο αργό. Η συγκέντρωση δεν είχε σημαντική επίδραση όταν ήταν κάτω από μία συγκεκριμένη τιμή, περίπου 1% κ.β., αλλά η αύξησή της επιβράδυνε σημαντικά τους χρόνους χαλάρωσης. Οι συγγραφείς το ερμήνευσαν με βάση τη θεωρία του Doi [63] που πρότεινε ότι τα ραβδοειδή μόρια δεν μπορούν να περιστρέφονται ελεύθερα σε πυκνά διαλύματα, αλλά περιορίζονται από τα γειτονικά τους σε έναν κωνικό «κλωβό», που γίνεται στενότερος με την αύξηση της συγκέντρωσης. Ο άξονας του κώνου (\hat{z}) και της ράβδου (\hat{u}) είναι συνδεδεμένοι μεταξύ τους με ένα δυναμικό σύζευξης και κινούνται σαν «ξυλάκια φαγητού» (*chopstick*) (εικ. 2.17γ). Ο γρήγορος ($\tau \sim \mu$ s) μηχανισμός αντανάκλα την περιστροφή εντός του κώνου, ενώ ο αργός την καταστροφή και δημιουργία νέου κλωβού, σύμφωνα με τη θεωρία των Wang και Pecora για διάχυση της περιστροφικής κίνησης [64].



Εικ. 2.17. (α) Εξάρτηση της διπολικής ροπής του PBLG σε διάλυμα ως συνάρτηση του βαθμού πολυμερισμού. Από την ευθεία προκύπτει η τιμή 3.5 Debye/μονομερές [56]. (β) Χρόνοι χαλάρωσης συναρτήσει του βαθμού πολυμερισμού. Η εξάρτηση είναι της μορφής $\tau \sim L^3$ και αντιστοιχεί σε ελεύθερα περιστρεφόμενη άκαμπτη ράβδος [59]. (γ) «Εγκλωβισμένη» κίνηση της α -έλικας σε πυκνά διαλύματα (η εικ. από την αναφορά [64]).

Ένα ενδιαφέρον σύστημα είναι η «σπασμένη» α -έλικα που μελετήθηκε από τους Matsumoto *et al.* [65], η οποία αποτελείται από δύο αλυσίδες PBLG ενωμένες μεταξύ τους με ένα εύκαμπτο αλκύλιο. Οι διπολικές ροπές, αλλά και οι χρόνοι χαλάρωσης, ταιριάζουν με τις τιμές για διαλύματα PBLG μήκους όσο καθένα από τα δύο τμήματα, και όχι με το διπλάσιο, δείχνοντας ότι τα τμήματα περιστρέφονται ανεξάρτητα. Στην ίδια εργασία παρουσιάστηκαν και αποτελέσματα για μια σειρά πολυπεπτιδίων PBLG. Αν και οι συγγραφείς δεν το αναφέρουν, τα ομοπολυπεπίδια μεγάλου μοριακού βάρους αποκλίνουν από τη συμπεριφορά που αναμένεται για ιδανικά άκαμπτες α -έλικες, δίνοντας ~10% χαμηλότερες διπολικές ροπές ανά μονομερές, πλησιάζοντας τη συμπεριφορά της «σπασμένης» έλικας και υποδεικνύοντας την ύπαρξη σπασμένων ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου (εικ. 2.18α).

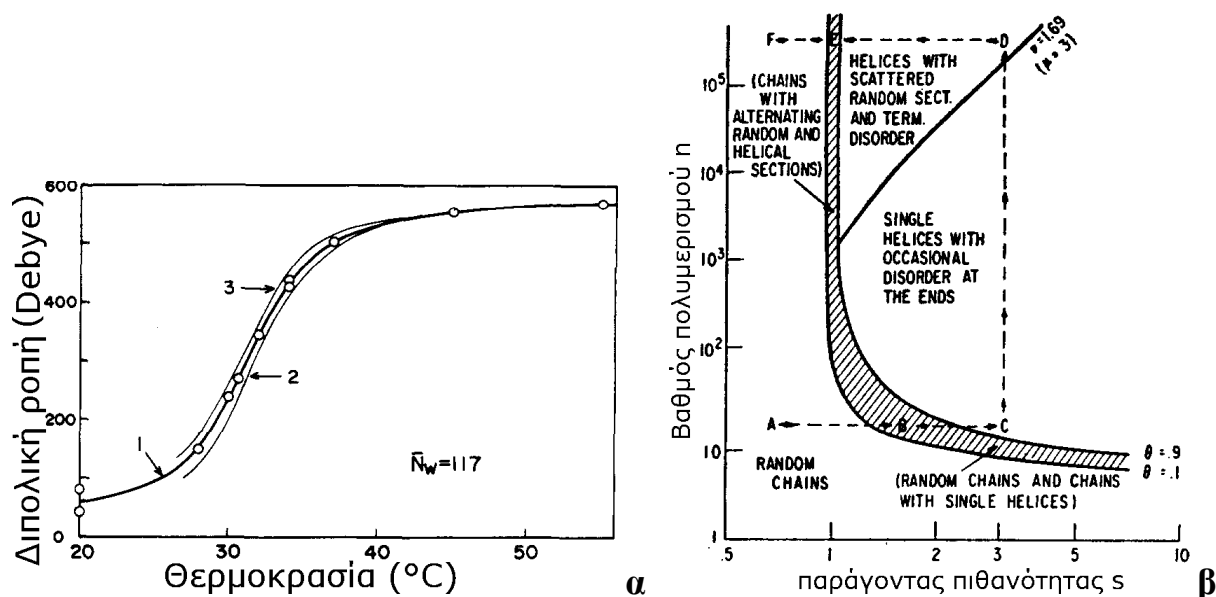
Εντονότερες αποκλίσεις από την ιδανική δευτεροταγή δομή παρατήρησαν οι Muroga *et al.* [66]. Η γυροσκοπική ακτίνα των πεπτιδίων σε αραιά διαλύματα δεν είναι ανάλογη του βαθμού πολυμερισμού, όταν αυτός υπερβαίνει κάποια τιμή (εικ. 2.18β). Οι αποκλίσεις υποδεικνύουν ότι οι α -έλικες έχουν σπασμένους δεσμούς υδρογόνου σε κάποια σημεία. Οι συγγραφείς κάνουν εκτίμηση του μήκους εμμονής της δομής, που είναι περίπου 200 nm, χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο αλυσίδας που αποτελείται από άκαμπτα τμήματα ίσου μήκους συνδεδεμένων με εύκαμπτους δεσμούς.



Εικ. 2.18. (α) Διπολική ροπή ανά μονομερές συναρτήσει του μοριακού βάρους για διαλύματα ομοπολυμερούς PBLG (ανοιχτά σύμβολα) και της «σπασμένης» α -έλικας (κλειστά σύμβολα) [65]. Η τελευταία έχει χαμηλότερη διπολική ροπή που σημαίνει ότι τα τμήματά της περιστρέφονται σχεδόν ανεξάρτητα, αλλά και τα δύο συστήματα παρουσιάζουν αποκλίσεις σε μεγάλα μοριακά βάρη. (β) Γυροσκοπική ακτίνα R_g συναρτήσει του μοριακού βάρους σε διαλύματα PBLG (σύμβολα). Η διακεκομμένη ευθεία είναι η θεωρητική τιμή για ιδανική α -έλικα, και οι καμπύλες που σημειώνονται με 1,2,3 αντιστοιχούν σε α -έλικες με μήκος εμμονής 110, 180, 250 nm, αντίστοιχα (εικ. από την αναφ. [66]).

Η διηλεκτρική φασματοσκοπία έχει χρησιμοποιηθεί και για τη μελέτη της μετάβασης από ραβδοειδή διαμόρφωση σε άμορφη (*rod-to-coil*) [67]. Η πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνη) (PZLL) σε διάλυμα μ-κρεσόλης έχει α -ελικοειδή διαμόρφωση μόνο πάνω από τους (30°-40° C), ενώ κάτω από αυτή έχει τυχαία διαμόρφωση. Στην πρώτη περίπτωση η γυροσκοπική ακτίνα και η διπολική ροπή είναι ανάλογες του μοριακού βάρους, ενώ στη δεύτερη ανάλογες της ρίζας του και επομένως πολύ μικρότερες. Η εικ. 2.19α δείχνει τη μετάβαση μέσω της διπολικής ροπής.

Μία θεωρία σχετική με αυτή τη μετάβαση είναι αυτή των Zimm και Bragg [68]. Το μοντέλο θεωρεί τη διαμόρφωση ως μια αλληλουχία ατόμων οξυγόνου που συμμετέχουν σε δεσμό υδρογόνου προς σχηματισμό έλικας ή όχι. Δίνοντας την τιμή 1 στην πρώτη και την τιμή 0 στη δεύτερη περίπτωση, η διαμόρφωση απεικονίζεται ως 000111010... . Το στατιστικό βάρος μιας συγκεκριμένης διαμόρφωσης υπολογίζεται δίνοντας πιθανότητα s να σχηματιστεί δεσμός υδρογόνου σε ενδιάμεσο σημείο ελικοειδούς τμήματος (...111...), και πιθανότητα σs σε σημείο ανάμεσα σε ελικοειδή και άμορφα τμήματα (...110...). Οι παράμετροι σ και s είναι αυθαίρετοι, αλλά μπορεί να θεωρηθεί ότι εξαρτώνται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία. Το μοντέλο προβλέπει μετάβαση από τυχαία διαμόρφωση σε α -έλικα, όταν αυξηθεί η πιθανότητα s . Κοντά στην περιοχή μετάβασης εναλλάσσονται ελικοειδή τμήματα με άμορφα (σπασμένοι δεσμοί υδρογόνου). Γενικά, παρατηρείται ότι τα άκρα τείνουν να είναι άμορφα, ενώ η αύξηση του μοριακού βάρους ευνοεί την εμφάνιση τμημάτων με τυχαία διαμόρφωση σε ενδιάμεσα σημεία. Η εικ. 2.19β είναι ένα σχηματικό διάγραμμα φάσεων.

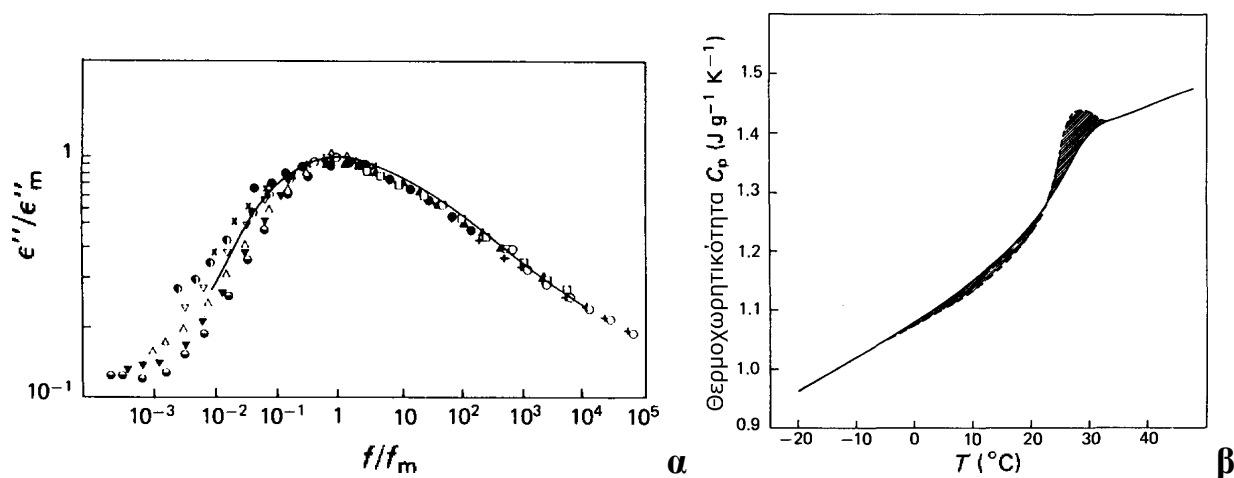


Εικ. 2.19. (α) Ενεργός διπολική ροπή σε διάλυμα PZLL₁₁₇ σε μ-κρεσόλη ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Κάτω από τους ~30 °C το μόριο έχει τυχαία διαμόρφωση, ενώ πάνω από αυτή τη θερμοκρασία γίνεται α-έλικα (εικ. από την αναφ. [67]). (β) «Διάγραμμα φάσεων» πεπτιδίου σύμφωνα με τη θεωρία Zimm-Bragg. Το n είναι ο συνολικός βαθμός πολυμερισμού και το s σχετίζεται με τη δυνατότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου και εξαρτάται από παράγοντες όπως ο διαλύτης και η θερμοκρασία. Στην περίπτωση του διαλύματος PZLL/μ-κρεσόλης ο παράγοντας s αυξάνεται με τη θερμοκρασία. Τυχαία διαμόρφωση εμφανίζεται γενικά στα άκρα των αλυσίδων, αλλά και ενδιάμεσα στα μεγάλα μοριακά βάρη. (εικ. από την αναφ. [68])

2.5.8.3 Ομοπολυπεπτίδια σε ξηρή μορφή

Εκτός από μετρήσεις σε διαλύματα, αραιά και πυκνά, έχουν γίνει πειράματα και σε ξηρά πεπτίδια (τήγματα). Οι Watanabe και Uematsu [69] έκαναν διηλεκτρικές μετρήσεις σε τήγμα PBLG, που είχε α-ελικοειδή διαμόρφωση. Για σύγκριση έγιναν θερμιδομετρικές και μηχανικές μετρήσεις. Στους 20° C περίπου εμφανίστηκε ένας ισχυρός μηχανισμός χαλάρωσης (α-) που συνοδεύτηκε από αύξηση της θερμοχωρητικότητας και μείωση του μέτρου ελαστικότητας. Αυτό δείχνει ότι ο α-μηχανισμός σχετίζεται με τη μετάβαση υάλου του συστήματος. Οι Romero Colomer *et al.* μελέτησαν τον ίδιο μηχανισμό με διηλεκτρική φασματοσκοπία και επιπλέον τη γήρανση του υλικού με DSC κάτω από τη θερμοκρασία που εμφανίζεται αυτός ο μηχανισμός, δηλαδή το T_g , η οποία δείχνει ότι πρόκειται για πραγματική μετάβαση υάλου, όπως στα άμορφα πολυμερή (εικ. 2.20) [70]. Παρόλα αυτά και οι δύο υποστηρίζουν ότι ο μηχανισμός οφείλεται σε κινήσεις μόνο των πλευρικών αλυσίδων, ενώ η κύρια αλυσίδα θεωρείται άκαμπτη λόγω του ότι δεν παρατηρούνται μεταβολές στην α-ελικοειδή δομή μέσω ακτίνων-X στην περιοχή θερμοκρασιών που έγιναν οι μετρήσεις. Η επιβράδυνση των χρόνων χαλάρωσης στο T_g αποδόθηκε στο πλησίασμα των ελίκων με τη μείωση της θερμοκρασίας (που παρατηρείται με σκέδαση ακτίνων-X), οπότε δεν επαρκεί ο χώρος για την κίνηση των πλευρικών αλυσίδων. Οι μηχανικές μετρήσεις έδειξαν επιπλέον ότι το

σύστημα δεν ρέει τουλάχιστον ως τους 420 K, πολύ πάνω από το T_g .

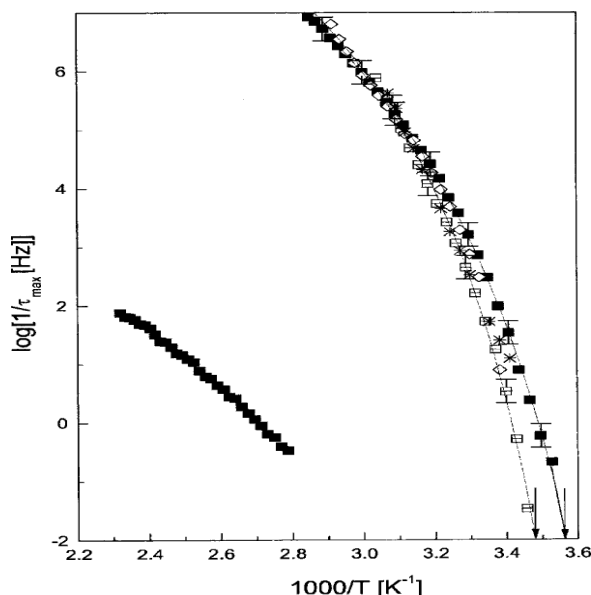


Εικ. 2.20. (α) Υπέρθυση καμπυλών διηλεκτρικών απωλειών (ϵ'') στις θερμοκρασίες 15-65°C. Οι τιμές του άξονα y έχουν διαιρεθεί με τη μέγιστη τιμή του ϵ'' για κάθε θερμοκρασία, ενώ του άξονα x με τη συχνότητα που αντιστοιχεί σε αυτή την τιμή. Το μέγιστο δείχνει την ύπαρξη του α -μηχανισμού ο οποίος μετατοπίζεται προς υψηλότερες συχνότητες (μικρότερους χρόνους) με την αύξηση της θερμοκρασίας. (β) Ειδική θερμοχωρητικότητα συναρτήσει της θερμοκρασίας. Η αλλαγή στους $\sim 25^\circ\text{C}$ σχετίζεται με τον μηχανισμό της διηλεκτρικής φασματοσκοπίας. Η διακεκομμένη καμπύλη έχει ληφθεί μετά από γήρανση στους 10°C για 50 min, ενώ η συνεχής είναι από δείγμα χωρίς γήρανση. (εικόνες από [70])

Το PBLG μπορεί να σχηματίζει μονοκλινή κρυσταλλική ή νηματική παρακρυσταλλική δομή, ανάλογα με το διαλύτη από τον οποίο έχει ληφθεί με εξάτμιση. Η ακριβής διαμόρφωση της έλικας μπορεί επίσης να διαφέρει. Εκτός από τη συνηθισμένη (18 μονομερή / 5 στροφές) α -έλικα, το PBLG μπορεί να σχηματίσει και τη σχετικά ασταθή 7/2 έλικα [69]. Στους $\sim 80^\circ\text{C}$ η δομή μετατρέπεται στην 18/5 α -έλικα και η δυναμική επανέρχεται στις τιμές που αντιστοιχούν σε αυτή τη δομή. Η αλλαγή αυτή δείχνει ότι οι πλευρικές αλυσίδες παίζουν μεγάλο ρόλο στη δυναμική, γι' αυτό και οι περισσότερες εργασίες αποδίδουν τη μετάβαση υάλου σε κινήσεις τους. Δεν μπορεί όμως να αποκλειστεί η χαλάρωση της κύριας αλυσίδας, που φυσικά συνεπάγεται και κινήσεις των πλευρικών. Οι Hartmann *et al.* [71] βρήκαν ότι, εκτός από τον μηχανισμό που αναφέρθηκε και επίσης αποδόθηκε σε κινήσεις πλευρικών αλυσίδων, υπάρχει και ένας πιο αργός και ισχυρότερος, που τον απέδωσαν σε «εγκλωβισμένες» κινήσεις της α -έλικας, η οποία θεωρείται άκαμπτη ράβδος (μοντέλο *chopstick* [63], εικ. 2.17γ), σύμφωνα με τη θεωρία των Wang και Pecora [64], σε αντιστοιχία με τα πυκνά διαλύματα. Η προβλεπόμενη διηλεκτρική ένταση (βλέπε και Κεφ. 3) του αργού μηχανισμού είναι

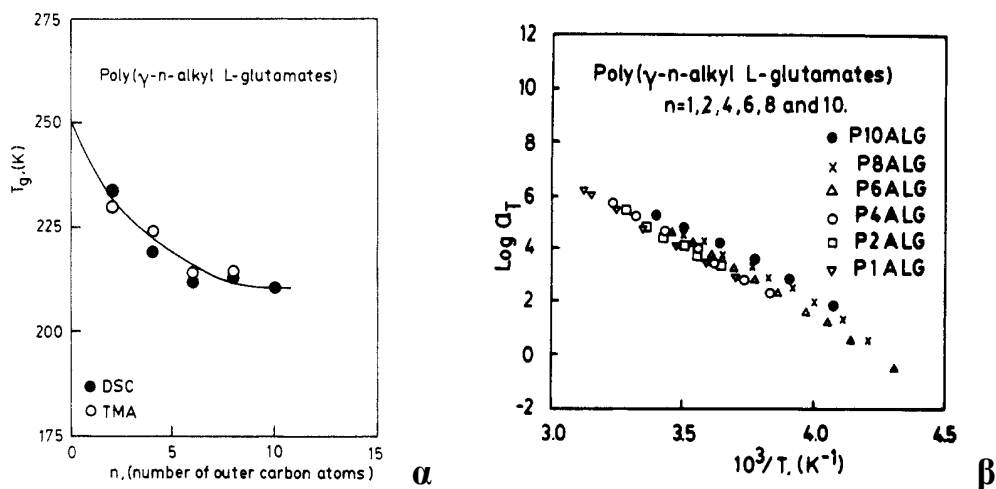
$$\Delta\epsilon_{\text{chopstick}} = \Delta\epsilon_{\text{rod}} \left(1 - \frac{1}{4}(1 + \cos\theta_0)^2 \right) \quad (2.8)$$

όπου $\Delta\varepsilon_{rod}$ είναι η ένταση που αντιστοιχεί σε ελεύθερα περιστρεφόμενη ράβδο (όπως στα αραιά διαλύματα) και θ_0 η γωνία του κώνου. Υπολογισμοί της γωνίας μέσω των εντάσεων έδωσαν τιμή $\sim 2^\circ$.



Εικ. 2.21. Μηχανισμοί χαλάρωσης του τήγματος PBLG (κλειστά σύμβολα). Εκτός από τον α-μηχανισμό (δεξιά – χαμηλότερες θερμοκρασίες) που αποδίδεται σε κινήσεις πλευρικών αλυσίδων, εμφανίζεται και ένας πιο αργός (αριστερά) που αποδίδεται στην «εγκλωβισμένη» κίνηση των άκαμπτων ελίκων-ράβδων (μοντέλο chopstick) [70].

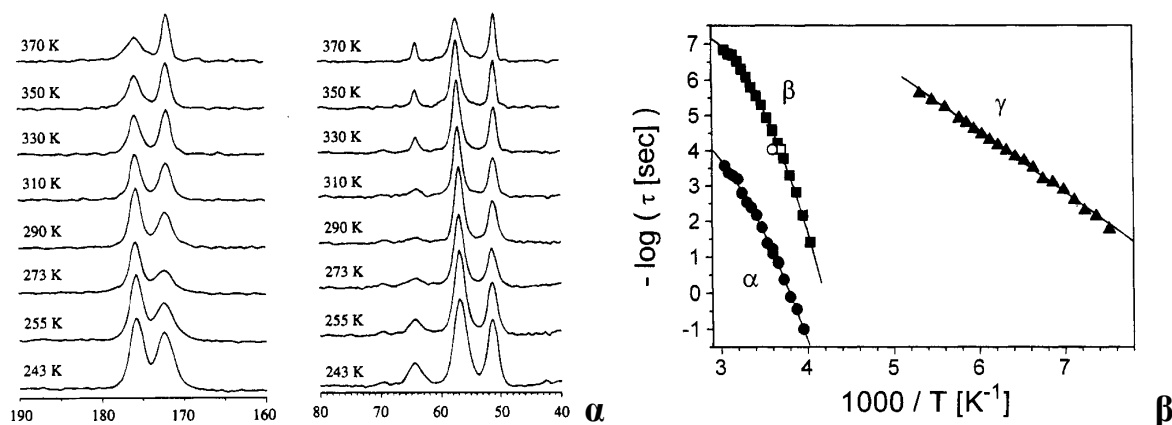
Εκτός από το PBLG, μελετήθηκε και μια σειρά πολυ(η-αλκυλο-L-γλουταμινικού οξέος) από τους Romero Colomer *et al.* [72], όπου το αλκύλιο είχε μήκος από $n=1$ (μεθύλιο) ως $n=16$. Σε όλα τα δείγματα παρατηρήθηκε η μετάβαση υάλου μέσω μετρήσεων πίεσης-όγκου-θερμοκρασίας και θερμιδομετρίας. Το T_g μειώνεται με την αύξηση του μήκους της πλευρικής αλυσίδας, όπως συμβαίνει γενικά στα πολυμερή που έχουν εύκαμπτες πλευρικές αλυσίδες (εικ. 2.22α). Στις διηλεκτρικές μετρήσεις παρατηρήθηκαν τρεις μηχανισμοί. Οι δύο πιο γρήγοροι αποδόθηκαν σε τοπικές κινήσεις των ακραίων τμημάτων των πλευρικών αλυσίδων. Ο πιο αργός είχε VFT εξάρτηση από τη θερμοκρασία και άρχισε να εμφανίζεται στο T_g που προέκυψε από τις άλλες μεθόδους (εικ. 2.22β). Αποδόθηκε σε συνεργατικές κινήσεις των πλευρικών αλυσίδων στις οποίες δεν συμμετέχει η κύρια αλυσίδα. Ο ισχυρισμός βασίστηκε στο ότι οι α-έλικες σχηματίζουν μια παρακρυσταλλική δομή και επομένως δεν μπορεί να αλλάξει η διαμόρφωσή τους. Στην εργασία, αναφέρεται, επιπλέον ότι σε υψηλές θερμοκρασίες αρχίζει να εμφανίζεται ένας νέος μηχανισμός, παρόμοιος με τον αργό μηχανισμό των Hartmann *et al.*, αλλά η περιοχή θερμοκρασιών στην οποία έγιναν οι μετρήσεις δεν ήταν αρκετή για να εξαχθούν συμπεράσματα.



Εικ. 2.22. (α) Εξάρτηση του T_g από το μήκος της πλευρικής αλυσίδας στα πεπτίδια πολυ(n -αλκυλο- L -γλουταμινικό οξύ) (P_nALG). Τα ανοιχτά και κλειστά σύμβολα αντιστοιχούν σε τιμές από μηχανικές και θερμιδομετρικές μετρήσεις. (β) Χρόνοι χαλάρωσης (διαιρεμένοι με μια τιμή αναφοράς) σε διάγραμμα Arrhenius (χρόνοι ως προς αντίστροφο της θερμοκρασίας) των πεπτιδίων P_nALG : (κάτω τρίγωνα) $n=1$, (τετράγωνο) $n=2$, (ανοιχτοί κύκλοι) $n=4$, (πάνω τρίγωνα) $n=6$, (αστερίσκοι) $n=8$, (κλειστοί κύκλοι) $n=10$. Η VFT εξάρτηση από τη θερμοκρασία είναι σχετικά εμφανής. (εικόνες από την αναφ. [72])

Ενδιαφέροντα αποτελέσματα είχε και η μελέτη του στατιστικού συμπολυμερούς πολυ(μεθυλο- L -γλουταμινικό οξύ)-πολυ(δεκαοκτυλο- L -γλουταμινικό οξύ) (PMLG-PODLG) από τους Schmidt *et al.* [73] με τη χρήση DS και NMR. Η α -ελικοειδής διαμόρφωση της κύριας αλυσίδας επιβεβαιώθηκε με NMR και σκέδαση ακτίνων-Χ. Βρέθηκαν τρεις διηλεκτρικά ενεργοί μηχανισμοί χαλάρωσης (εικ. 2.23). Ο πιο γρήγορος (γ -) είχε εξάρτηση τύπου Arrhenius από τη θερμοκρασία και αποδόθηκε σε τοπικές κινήσεις πλευρικών αλυσίδων, ενώ ο αμέσως πιο αργός (β -) έδειξε VFT εξάρτηση και χρόνους πολύ κοντά στον β -μηχανισμό των ομοπολυμερών PMLG και PODLG των Romero Colomer *et al.* Ο πιο αργός (α -) εμφάνισε επίσης VFT εξάρτηση και θεωρήθηκε όμοιος με τον αργό μηχανισμό των Hartmann *et al.*, δηλαδή συνολική κίνηση της άκαμπτης έλικας-ράβδου. Παραδόξως, προέκυψε η ίδια θερμοκρασία υάλου ~ 238 K (εκεί όπου $\tau \sim 100$ s) και από τους δύο μηχανισμούς, που σημαίνει ότι έχουν στενή σχέση μεταξύ τους, αλλά και ότι οι μετρήσεις DSC δεν μπορούν να διαχωρίσουν ποιος έχει σχέση με διαμορφωσιακή χαλάρωση. Η ονομασία του β - μηχανισμού είναι κάπως παράδοξη, γιατί υπονοεί ότι είναι δευτερεύων μηχανισμός, ενώ έχει VFT εξάρτηση, όπως ο τμηματικός (α -) μηχανισμός των συνθετικών πολυμερών. Τα πειράματα NMR είναι αρκετά διαφωτιστικά. Οι εντάσεις των κορυφών που αντιστοιχούν στον άνθρακα του εστερικού δεσμού, καθώς και του μεθυλενίου που συνδέεται στον εστέρα, παρουσιάζουν ελάχιστο στους ~ 270 K, που σημαίνει ότι ο χρόνος χαλάρωσής τους

ικανοποιεί τη σχέση $\omega_d\tau=1$, όπου ω_d είναι η συχνότητα του πεδίου αποσύζευξης (~ 70 kHz). Οι χρόνοι συμπίπτουν με το β -μηχανισμό, ο οποίος γι' αυτό το λόγο αντανακλά κινήσεις τις πλευρικές αλυσίδας.



Εικ. 2.23. (α) Φάσματα ^{13}C -CP/MAS-NMR για τα συμπολυμερή PMLG-PODLG σε διάφορες θερμοκρασίες. Οι κορυφές στα 176, 172, 65, 57, 52 ppm αντιστοιχούν στους άνθρακες του αμιδικού δεσμού, του εστερικού δεσμού, του $-\text{OCH}_2-$ του PODLG, του C_α και του $-\text{OCH}_3$ του PMLG. Τα ελάχιστα της έντασης σε κάποιες θερμοκρασίες δείχνουν ότι η συχνότητα χαλάρωσης γίνεται ίση με τη συχνότητα του πεδίου αποσύζευξης (~70 kHz). (β) Χρόνοι χαλάρωσης στο PMLG-PODLG από $\Delta\Phi$ (κλειστά σύμβολα: (▲) γ -, (■) β - και (●) α -μηχανισμός) και NMR, που προέκυψαν από τα ελάχιστα των εντάσεων στους ~270 K για τους άνθρακες των πλευρικών αλυσίδων και συμπίπτουν με το β -μηχανισμό (ανοιχτά σύμβολα). Από την αριστερή εικόνα θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι στους ~400 K θα γίνει το αντίστοιχο ελάχιστο για τον C_α και τον αμιδικό άνθρακα. Τα σημεία θα συνέπιπταν με τον α -μηχανισμό. Ο γ -μηχανισμός αποδόθηκε σε τοπικές κινήσεις πλευρικών αλυσίδων, αλλά, παραδόξως, και ο « β -μηχανισμός», αν και έχει VFT εξάρτηση όπως ο τμηματικός μηχανισμός όλων των συνθετικών πολυμερών και θα έπρεπε να είχε ονομαστεί α -μηχανισμός. Ο « α -μηχανισμός» θεωρείται ότι αντανακλά κινήσεις της έλικας σύμφωνα με το μοντέλο chorstick (εικόνες από την αναφ. [73]).

Παρόλο που οι άνθρακες της κύριας αλυσίδας δεν κινούνται με τον β -μηχανισμό, οι εντάσεις των κορυφών τους μειώνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας και, αν και το περιορισμένο εύρος θερμοκρασιών δεν το επιτρέπει, φαίνεται ότι λίγο πάνω από τους ~370 K θα παρατηρηθεί ελάχιστη ένταση για αυτούς. Αυτοί οι χρόνοι συμπίπτουν με τον α -μηχανισμό, ωστόσο αυτό δεν το έχουν προσέξει οι συγγραφείς και προτείνουν το μοντέλο της εγκλωβισμένης άκαμπτης ράβδου για τον αργό μηχανισμό. Παρόλα αυτά και οι ίδιοι παρατηρούν ότι η πολύ μικρή εξάρτηση του αργού μηχανισμού από το μοριακό βάρος δεν είναι αναμενόμενη (έπρεπε να είναι $\tau \sim M^3$, ενώ είναι αμελητέα), και αναφέρουν ότι το μοντέλο ίσως χρειάζεται αναθεώρηση.

Συμπερασματικά, οι μετρήσεις στα συνθετικά πεπτιδια δείχνουν ότι η α -ελικοειδής δομή είναι αρκετά δύσκαμπτη, ιδίως στα αραιά διαλύματα, αλλά σε καμία περίπτωση τελείως άκαμπτη. Στα διαλύματα παρατηρήθηκαν οι περιστροφές των πλευρικών αλυσίδων και η περιστροφή της α -

έλικας ως ράβδου, η οποία είναι εντελώς ελεύθερη σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, αλλά περιορίζεται εντός κώνου σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Σε μεγάλα μοριακά βάρη υπήρξαν αποκλίσεις από την ιδανική α -έλικα. Σε ξηρή κατάσταση παρατηρήθηκαν επίσης τοπικές κινήσεις πλευρικών αλυσίδων σε $T < T_g$, ενώ σε $T > T_g$ εμφανίζονται δύο μηχανισμοί με VFT εξάρτηση από τη θερμοκρασία. Ο πιο γρήγορος αποδίδεται σε συνεργατικές κινήσεις πλευρικών αλυσίδων, αν και έχει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τον τμηματικό μηχανισμό των άμορφων πολυμερών. Ο πιο αργός θεωρήθηκε ότι είναι η χαλάρωση της εγκλωβισμένης έλικας, αρκετά, όμως, χαρακτηριστικά. Όπως η αμελητέα εξάρτηση από το μοριακό βάρος, δε συμφωνούν με αυτόν τον χαρακτηρισμό.

2.6 Συμπεράσματα από τις προηγούμενες μελέτες

Σε αυτό το κεφάλαιο έγινε παρουσίαση των κυριότερων αποτελεσμάτων της δυναμικής πεπτιδικών συστημάτων από πειράματα και προσομοιώσεις. Επίσης, αναφέρθηκαν τα συμπεράσματα προηγούμενων εργασιών πάνω σε μερικά από τα ομοπολυπεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Τα κυριότερα αποτελέσματα είναι:

1. Στις ενυδατωμένες πρωτεΐνες παρατηρείται μια δυναμική μετάβαση που σχετίζεται με τη βιολογική δραστηριότητα και έχει χαρακτηριστικά της μετάβασης υάλου. Η χαρακτηριστική της θερμοκρασία παρουσιάζει κάποια εξάρτηση από το είδος του διαλύτη. Η παρουσία της σε ξηρές πρωτεΐνες αμφισβητείται και από πειραματικά δεδομένα και από προσομοιώσεις, γι' αυτό και θεωρείται ότι οφείλεται στον διαλύτη.
2. Τα ομοπολυπεπτίδια συμπεριφέρονται ως άκαμπτοι ράβδοι σε διαλύτες που ευνοούν την α -ελικοειδή δευτεροταγή δομή, αλλά σε μεγάλα μοριακά βάρη αρχίζουν αποκλίσεις που υποδεικνύουν την ύπαρξη σπασμένων ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου.
3. Τα ξηρά ομοπολυπεπτίδια παρουσιάζουν αρκετούς μηχανισμούς χαλάρωσης. Σε χαμηλές θερμοκρασίες εμφανίζονται μηχανισμοί που αποδίδονται σε τοπικές κινήσεις, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες εμφανίζεται ο α -μηχανισμός που σχετίζεται με τη μετάβαση υάλου και αποδίδεται σε συνεργατικές κινήσεις των πλευρικών αλυσίδων. Ένας πιο αργός μηχανισμός, που θεωρείται ότι αντανακλά την κίνηση της α -έλικας – ράβδου μέσα σε «κλωβό» (μοντέλο *chopstick*), εμφανίζεται σε ακόμα πιο υψηλές θερμοκρασίες.

Αν και η ύπαρξη μετάβασης υάλου στα βιολογικά μακρομόρια δεν αμφισβητείται, τουλάχιστον στα ενυδατωμένα – διαλυμένα συστήματα, υπάρχουν αρκετές αντιφάσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων. Ορισμένα από τα προβλήματα είναι ότι:

1. Οι δευτεροταγείς δομές θεωρούνται απολύτως άκαμπτες στις περισσότερες περιπτώσεις, χωρίς να δίνονται επαρκείς εξηγήσεις, με αποτέλεσμα ο α -μηχανισμός στα πολυπεπίδια να αποδίδεται σε κινήσεις πλευρικών αλυσίδων, ενώ έχει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τον τμηματικό μηχανισμό των άμορφων πολυμερών, όπως VFT εξάρτηση από τη θερμοκρασία.
2. Υπάρχει μεγάλος αριθμός μηχανισμών χαλάρωσης σε πολύ διαφορετικές κλίμακες χρόνου και χώρου, από πολύ τοπικές περιστροφές πλευρικών αλυσίδων και κινήσεις μορίων διαλύτη, μέχρι συνεργατικές κινήσεις μεγαλύτερων τμημάτων. Αυτό δεν το λαμβάνουν υπόψη οι περισσότερες εργασίες, με αποτέλεσμα άλλες από αυτές να συσχετίζουν τη δυναμική μετάβαση με κινήσεις με χαρακτηριστικούς χρόνους $\sim ps$, ενώ άλλες μέχρι αρκετά s .
3. Η δυναμική επηρεάζεται από μεγάλο αριθμό παραγόντων εκτός της θερμοκρασίας, όπως πίεση, είδος διαλύτη, κ.ά.

Από τα παραπάνω έγινε φανερό ότι υπάρχουν πολλά αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με τη δυναμική των πεπτιδικών συστημάτων.

1. Η προέλευση της μετάβασης υάλου δεν είναι σαφής. Είναι χαρακτηριστικό των διαλυτών ή είναι ανάλογη των συνθετικών μακρομορίων όπου συμμετέχει και η κύρια αλυσίδα;
2. Ποιες κινήσεις αντανακλούν οι μηχανισμοί χαλάρωσης που παρατηρούνται; Οι μηχανισμοί με VFT εξάρτηση (α - και «αργός») οφείλονται στις πλευρικές αλυσίδες και την κίνηση απ' άκρου εις άκρον, αντίστοιχα, ή έχουν σχέση με τον τμηματικό μηχανισμό των συνθετικών μακρομορίων;
3. Ποια είναι η γενεσιουργός αιτία του α -μηχανισμού και του αργού και ποια η εξάρτησή τους από την πυκνότητα και τη θερμική ενέργεια;

2.7 Στόχος της παρούσας εργασίας

Στην παρούσα εργασία θα γίνει προσπάθεια να απαντηθούν τα πιο πάνω ερωτήματα. Όπως ήδη αναφέρθηκε στο Κεφ.1, περιλαμβάνει μελέτη ομοπολυπεπτιδίων σε ξηρή μορφή τα οποία έχουν διαφορετική δευτεροταγή δομή και διαφορετικές πλευρικές αλυσίδες, ώστε να αποσαφηνισθεί κατά πόσον η μετάβαση υάλου είναι εγγενές χαρακτηριστικό των πεπτιδίων. Επίσης, γίνεται εξέταση της εξάρτησης των μηχανισμών χαλάρωσης από το μοριακό βάρος και υπολογίζονται οι αντίστοιχες διπολικές ροπές, απ' όπου προκύπτει ότι η α -έλικα δεν κινείται ως

ράβδος, αλλά έχει πολλές ατέλειες, δηλαδή σπασμένους ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου, και γίνεται προσπάθεια υπολογισμού του μήκους εμμονής της. Οι μετρήσεις γίνονται συναρτήσει της θερμοκρασίας και της πίεσης, αποκαλύπτοντας ότι η θερμική ενέργεια $k_B T$ και όχι ο όγκος (πυκνότητα), είναι ο καθοριστικός παράγοντας για τη δυναμική αυτών των συστημάτων. Τέλος, εξετάζονται συσταδικά συμπλομερή που αποτελούνται μόνο από πεπτίδια ή και από συνθετικά μακρομόρια, για να μελετηθεί η επίδραση της ύπαρξης ή μη των νανοδομών στις δευτεροταγείς δομές των πεπτιδίων

Αναφορές

- [1] Zipp, A.; Kauzmann, W. *Biochemistry* **12**, 4217 (1973).
- [2] Mayor, U.; Guydosh, N. R.; Johnson, C. M.; Grossmann, J. G.; Sato, S.; Jas, G. S.; Freund, S. M. V.; Alonsok, D. O. V.; Daggett, V.; Fersht, A. R. *Nature* **421**, 863 (2003).
- [3] Mayor, U.; Johnson, C. M.; Daggett, V.; Fersht, A. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13518 (2000).
- [4] Angell, C. A. *Science* **267**, 1924 (1995).
- [5] Yang, W. Y.; Gruebele, M. *Nature* **423**, 197 (2003).
- [6] Muthukumar, M. *Science* **277**, 1225 (1997).
- [7] Stupp, S. T. *Science* **277**, 1242 (1997).
- [8] M. Blochowiak PhD Thesis.
- [9] Turnbull, D.; Cohen, M. *J. Chem. Phys.* **34**, 120 (1961).
- [10] Doolittle, A. K. *J. Appl. Phys.* **22**, 1471 (1951).
- [11] Harmandaris, V. A.; Doxastakis, M.; Mavrantzas, V. G.; Theodorou, D. N. *J. Chem. Phys.* **116**, 436 (2002).
- [12] Vogel, H. *Phys. Z.* **22**, 645 (1921); Fulcher, G. S. *J. Am. Ceram. Soc.* **8**, 339 (1923); Tammann, G.; Hesse, W. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **156**, 245 (1926).
- [13] Ferrer, M.-L.; Lawrence, C.; Demirjian, B. G.; Kivelson, D.; Alba-Simionesco, C.; Tarjus, G. *J. Chem. Phys.* **109**, 8010 (1998).
- [14] Papadopoulos, P.; Peristeraki, D.; Floudas, G.; Koutalas, G.; Hadjichristidis, N. *Macromolecules* **37**, 8116 (2004).
- [15] Adam, G.; Gibbs, J. H. *J. Chem. Phys.* **43**, 139 (1965).
- [16] Richert, R.; Angell, C. A. *J. Chem. Phys.* **108**, 9016 (1998).

- [17] Floudas, G.; Mpoukouvalas, K.; Papadopoulos, P. *J. Chem. Phys.* (submitted).
- [18] Mpoukouvalas, K.; Floudas, G. *Phys. Rev. E* **68**, 031801 (2003).
- [19] Rasmussen, B. F.; Stock, A. M.; Ringe, D.; Petsko G. A. *Nature* **357**, 423 (1992).
- [20] Tilton, R. F.; Dewan, J. C.; Petsko, G. A. *Biochemistry* **31**, 2469 (1992).
- [21] Teeter, M. M.; Yamano, A.; Stec, B.; Mohanty, U. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11242 (2001).
- [22] *Neutron News*, **3** (3), 29 (1992).
- [23] Higgins, J. S.; Benoît, H. C. in *Polymers and neutron scattering* Oxford University Press, Inc., New York 1994.
- [24] Doster, W.; Cusack, S.; Petry, W. *Nature* **337**, 754 (1989).
- [25] Cordone, L.; Ferrand, M.; Vitrano, E.; Zaccai, G. *Biophys. J.* **76**, 1043 (1999).
- [26] Tsai, A. M.; Neumann, D. A.; Bell, L. N. *Biophys. J.* **79**, 2728 (2000).
- [27] Paciaroni, A.; Cinelli, S.; Onori, G. *Biophys. J.* **83**, 1157 (2002).
- [28] 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.* **121**, 1978 (2004).
- [29] Ferrand, M.; Dianoux, A. J.; Petry, W.; Zaccai, G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9668 (1993).
- [30] Weik, M. *Eur. Phys. J. E* **12**, 153 (2003).
- [31] Réat, V.; Dunn, R.; Ferrand, M.; Finney, J. L.; Daniel, R. M.; Smith, J. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9961 (2000).
- [32] Kurkal, V.; Daniel, R. M.; Finney, J. L.; Tehei, M.; Dunn, R. V.; Smith, J. C. *Biophys. J.* **89**, 1282 (2005).
- [33] *Mössbauer Spectroscopy* (Gonser, U. (Ed.)) Springer-Verlag Berlin 1975.
- [34] Parak, F.; Frolov, E. N.; Mössbauer, R. L.; Goldanskii, V. I. *J. Mol. Biol.* **145**, 825 (1981).
- [35] Parak, F.; Formanek, H. *Acta Crystallographica sect. A* **27**, 573 (1971).
- [36] Frauenfelder, H.; Petsko, G. A.; Tsernoglou, D. *Nature (London)* **280**, 558 (1979).
- [37] Dwivedi, A.; Pederson, T.; Debrunner, P. G. *J. de Physique. Colloque* **C2**, 531 (1979).
- [38] Knapp, E. W.; Fischer, S. F.; Parak, F. *J. Phys. Chem.* **86**, 5042 (1982).
- [39] Iben, I. E. T.; Braunstein, D.; Doster, W.; Frauenfelder, H.; Hong, M. K.; Johnson, J. B.; Luck, S.; Ormos, P.; Schulte, A.; Steinback, P. J.; Xie, A.; Young, R. D. *Phys. Rev. Lett.* **62**, 1916 (1989).

- [40] Green, J. L.; Fan, J.; Angell, C. A. *J. Phys. Chem.* **98**, 13780 (1994).
- [41] Smith, J.; Kuczera, K.; Karplus, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1601-1605 (1990).
- [42] Vitkup, D.; Ringe, D.; Petsko, G. A.; Karplus, M. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 34 (2000).
- [43] Tarek, M.; Tobias, D.J. *Biophys. J.* **79**, 3244 (2000); *Phys. Rev. Lett.* **88**, 138101 (2002).
- [44] Hayward, J. A.; Smith, J. C. *Biophys. J.* **82**, 1216 (2002).
- [45] Hansmann, U. H. E.; Onuchic, J. N. *J. Chem. Phys.* **115**, 1601 (2001).
- [46] Norberg, J.; Nilsson, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10173 (1996).
- [47] Steinbach, P. J.; Brooks, B. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 55 (1996).
- [48] Baysal, C.; Atilgan, A. R. *Biophys. J.* **88**, 1570 (2005).
- [49] Kay, L. E. *J. Mag. Res.* **173**, 193 (2005).
- [50] Tugarinov, V.; Hwang, P. M.; Kay, L. E. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 107 (2004).
- [51] Gardner, K.H.; Kay, L.E. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 357 (1998).
- [52] Lee, A. L.; Wand, A. J. *Nature* **411**, 501 (2001).
- [53] Nandi, N.; Bagchi, B. *J. Phys. Chem. A* **102**, 8217 (1998).
- [54] Kamei, T.; Oobatake, M.; Suzuki, M. *Biophys. J.* **82**, 418 (2002).
- [55] Laudát, J.; Laudát, F. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **11**, 1345 (1994).
- [56] Wada, A. *J. Chem. Phys.* **29**, 674 (1958); **30**, 328 (1959); **30**, 324 (1959).
- [57] Perrin, F. *J. Phys. Radium* **5**, 497 (1934).
- [58] Yagihara, S.; Nozaki, R.; Mashimo, S.; Hikichi, K. *Macromolecules* **17**, 2700 (1984).
- [59] Erenrich, E. H.; Scheraga, H. A. *Macromolecules* **5**, 746 (1972).
- [60] Applequist, J.; Mahr, T. G. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 5419 (1966).
- [61] Mashimo, S.; Ota, T.; Shinyashiki, N.; Tanaka, S.; Yagihara, S. *Macromolecules* **22**, 1285 (1989).
- [62] Mori, Y.; Ookubo, N.; Hayakawa, R.; Wada, Y. *J. Polym. Sci.: Polym. Phys. Ed.* **20**, 2111 (1982).
- [63] Doi, M. *J. Polym. Sci.: Polym. Phys. Ed.* **20** 1963 (1982).
- [64] Wang, C. C.; Pecora, R. *J. Chem. Phys.* **72**, 5333 (1980).
- [65] Matsumoto, T.; Nishioka, N.; Teramoto, A.; Fujita, H. *Macromolecules* **7**, 824 (1974).
- [66] Muroga, Y.; Nagasawa, M. *Biopolymers* **45**, 281 (1998).
- [67] Omura, I.; Teramoto, A.; Fujita, H. *Macromolecules* **8**, 284 (1975).
- [68] Zimm, B. H.; Bragg, J. K. *J. Chem. Phys.* **31**, 526 (1959).
- [69] Watanabe, J.; Uematsu, I. *Polymer*, **25**, 1711 (1984).

[70] Romero Colomer, F. J.; Gómez Ribelles, J. L. *Polymer* **30**, 849 (1989).

[71] Hartmann, H.; Kratzmüller, T.; Braun, H.-G.; Kremer, F. *Macromol. Rapid Commun.* **21**, 814 (2000).

[72] Romero Colomer, F. J.; Gómez Ribelles, J. L.; Barrales-Rienda, J. M.; *Macromolecules* **27**, 5004 (1994).

[73] Schmidt, A.; Lehmann, S.; Georgelin, M.; Katana, G.; Mathauer, K.; Kremer, F.; Schmidt-Rohr, K.; Boeffel, C.; Wegner, G.; Knoll, W. *Macromolecules* **28**, 5487 (1995).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Υλικά

Τα συστήματα που μελετήθηκαν χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες: (α) ομοπολυπεπίδια με διαφορετική δευτεροταγή δομή (α -έλικα, β -φύλλα ή μείγμα), απουσία διαλύτη, για να διευκρινιστεί αν η «μετάβαση» υάλου είναι εγγενές χαρακτηριστικό των πεπτιδίων, (β) διαλύματα πεπτιδίων, (γ) ξηρά δείγματα στα οποία εφαρμόστηκε ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο, ώστε να προσδιοριστούν οι παράγοντες που επηρεάζουν το μήκος εμμόνης των δευτεροταγών δομών, και (δ) συμπολυμερή με πεπτιδικές συστάδες, με σκοπό να βρεθεί η επίδραση του θερμοδυναμικού περιορισμού στο είδος των δευτεροταγών δομών και το μήκος εμμόνης τους.

3.1.1 Ολιγοπεπίδια πολυ(γ -βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ) (PBLG)

Η σύνθεση των ολιγοπεπτιδίων PBLG (δομή στην εικ. 3.1) έγινε από τον Harm-Anton Klok στην *École Polytechnique Fédérale de Lausanne* (EPFL) και στο Ινστιτούτο Max-Planck für Polymerforschung (MPI-IP) με τη μέθοδο του πολυμερισμού ανοίγματος δακτυλίου του N-καρβοβενζοξυ-ανυδρίτη του γ -βενζυλο-L-γλουταμινικού οξέος με απαραίτητη n-εξυλαμίνη σε ατμόσφαιρα αργού, όπως περιγράφεται στις εργασίες [1-3]. Χρησιμοποιώντας διάφορες αναλογίες μονομερούς/απαραχητή ελήφθησαν διαφορετικά μοριακά βάρη τα οποία υπολογίστηκαν από $^1\text{H-NMR}$, ενώ η κατανομή τους από Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (*Size Exclusion Chromatography* – SEC). Ο δείκτης πολυδιασποράς $I=M_w/M_n$ ήταν στην περιοχή 1.1-1.5 και τα μοριακά χαρακτηριστικά των πεπτιδίων συνοψίζονται στον Πίνακα 3.1. Τα πεπίδια χρησιμοποιήθηκαν σε μορφή τήγματος, αλλά από τα PBLG₁₄, PBLG₄₅, και PBLG₁₇₅ παρασκευάστηκαν και φιλμ πάχους ~50 μm από εξάτμιση των αντίστοιχων διαλυμάτων σε μ-κρεσόλη και CHCl_3 (εκτός του PBLG₁₇₅) και ξήρανση επί τουλάχιστον 48 h σε κενό. Στα φιλμ που σχηματίστηκαν, οι έλικες ήταν προσανατολισμένες κάθετα στην επιφάνεια [4].

Πίνακας 3.1. Μοριακά χαρακτηριστικά ολιγοπεπτιδίων πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικού οξέος) (PBLG) των οποίων η δομή φαίνεται στην εικ. 3.1. Οι μέσοι κατά αριθμό βαθμοί πολυμερισμού έχουν υπολογιστεί από ¹H-NMR, και από αυτούς τα αντίστοιχα μοριακά βάρη. Οι δείκτες αντιστοιχούν στο μέσο κατά αριθμό βαθμό πολυμερισμού.

Σύστημα	M _n PBLG (g/mol)	N _n , PBLG
PBLG ₇	1630	7
PBLG ₈	1860	8
PBLG ₁₄	3170	14
PBLG ₁₈	4050	18
PBLG ₄₅	9970	45
PBLG ₄₉	10840	49
PBLG ₆₇	14790	67
PBLG ₁₀₉	24000	109
PBLG ₁₄₀	30860	140
PBLG ₁₇₅	38500	175

3.1.2 Ομοπολυπεπτίδια πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνη) (PZLL), πολυ(L-λευκίνη) (PLeu), πολυγλυκίνη (PGly), πολυ(ο-βενζυλο-L-τυροσίνη) (PTyr)

Η σύνθεση αυτών των ομοπολυπεπτιδίων με πολύ στενές κατανομές μοριακών βαρών έγινε από τους Νίκο Χατζηχρηστίδη και Ερμή Ιατρού στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Ο πολυμερισμός των αντίστοιχων N-καρβοξυ-ανυδριτών έγινε υπό συνθήκες υψηλού κενού για να μην υπάρχουν προσμίξεις νερού, ενώ ο απαρχητής ήταν n-εξυλαμίνη [5]. Τα μοριακά χαρακτηριστικά φαίνονται στον πίνακα 3.2.

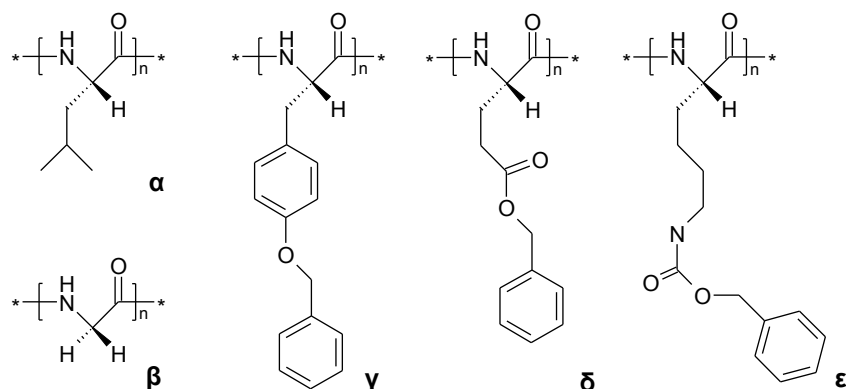
Πίνακας 3.2. Μοριακά χαρακτηριστικά των ομοπολυπεπτιδίων πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνη) (PZLL), πολυ(L-λευκίνη) (PLeu), πολυγλυκίνη (PGly), πολυ(ο-βενζυλο-L-τυροσίνη) (PTyr). Οι δείκτες αντιστοιχούν στο μέσο κατά αριθμό βαθμό πολυμερισμού.

Δείγμα	M _n (g/mol) ⁽¹⁾	M _w /M _n ⁽³⁾
PZLL ₁₃₅	33500	1.06
PLeu ₁₅₂	17200	1.20
PTyr ₇₉	20100	1.15
PG ₃₄₂	19500 ⁽²⁾	-

⁽¹⁾ Οσμωμετρία μεμβράνης σε διάλυμα LiBr 0.1N σε DMF στους 333 K.

⁽²⁾ Από στοιχειομετρική αναλογία μονομερούς/εκκινητή λόγω χαμηλής διαλυτότητας.

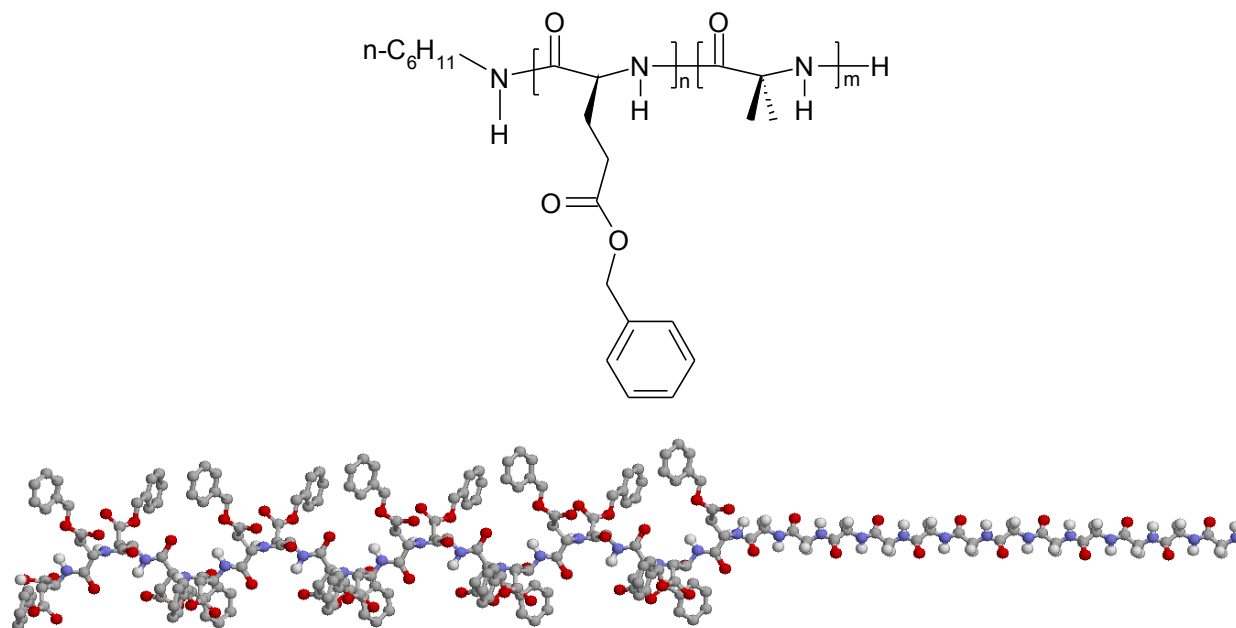
⁽³⁾ Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC) σε διάλυμα LiBr 0.1N σε DMF στους 333 K.



Εικ. 3.1. Ομοπολυπεπίδια που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία: (α) πολυ(L-λευκίνη) (PLeu), (β) πολυγλυκίνη (PGly), (γ) πολυ(ο-βενζυλο-L-τυροσίνη) (PTyr), (δ) πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ) (PBLG), (ε) πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνη) (PZLL).

3.1.3 Διυσταδικά PBLG-*b*-PGly και PZLL-*b*-PBLG και τριυσταδικό συμπολυμερές PZLL-*b*-PBLG-*b*-PZLL

Η σύνθεση αυτών των μοντέλων συμπολυμερών με πολύ στενές κατανομές μοριακών βαρών έγινε επίσης από τους Ν. Χατζηρησιδίδη και Ε. Ιατρού (Π.Α.). Η διαδικασία ήταν παρόμοια με αυτή που περιγράφηκε πιο πάνω [5]. Αρχικά γίνεται πολυμερισμός του Ν-καρβοξυ-ανυδρίτη (NCA) του BLG και στη συνέχεια προστίθεται ο NCA της γλυκίνης ή της πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνης) στην επιθυμητή αναλογία. Στη σύνθεση των PBLG-*b*-PGly δόθηκε προσοχή ώστε το μοριακό βάρος της συστάδας του PBLG να είναι περίπου το ίδιο, όπως δείχνει και ο Πίνακας 3.3 με τα μοριακά χαρακτηριστικά. Στην περίπτωση του τριυσταδικού συμπολυμερούς έγινε πρώτα ο πολυμερισμός της κεντρικής συστάδας, με απαραίτητη 1,6-διαμινο-εξάνιο, ώστε να μπορεί να γίνει προσθήκη της PZLL και στα δύο άκρα. Η εικ. 3.2 δείχνει ένα μοριακό μοντέλο συμπολυμερούς PBLG-*b*-PGly. Οι μετρήσεις στα συμπολυμερή PBLG-*b*-PGly έγιναν και σε τήγματα, αλλά και σε φιλμ από εξάτμιση των αντίστοιχων διαλυμάτων σε μ-κρεσόλη και ξήρανση σε κενό επί μία εβδομάδα. Τα διαλύματα είχαν συγκεντρώσεις ~2% w/w για τα PBLG₁₅-PGly₅, PBLG₁₅-PGly₈ και PBLG₁₅-PGly₁₅, λόγω χαμηλής διαλυτότητας και 5% w/w στα υπόλοιπα, ενώ η ανάδευση έγινε στους 320 K επί 48 h [6].



Εικ. 3.2. (Πάνω) Μοριακή δομή του συσταδικού συμπολυμερούς PBLG-b-PGly. (Κάτω) Μοριακό μοντέλο συμπολυμερούς με τη συστάδα PBLG σε α-ελικοειδή διαμόρφωση και τη συστάδα PGly σε β-φυλλοειδή. Η διαφορά μεγέθους των μονομερών είναι εμφανής.

Πίνακας 3.3. Μοριακά χαρακτηριστικά των δισυσταδικών συμπολυμερών PBLG-b-PGly. Οι δείκτες αντιστοιχούν στο μέσο κατά αριθμό βαθμό πολυμερισμού. Οι δείκτες αντιστοιχούν προσεγγιστικά στο μοριακό βάρος κάθε συστάδας ($\times 10^3$).

Δείγμα	M_n^{PBLG} (1)	$I^{\text{PBLG}} = \frac{M_w}{M_n}$	M_n^{PG}	$I = \frac{M_w}{M_n}$	f_{PBLG} (4)
PBLG ₁₅ -PGly ₁	25300	1.08 ^a	1050 (1)	1.12 ⁽¹⁾	0.97
PBLG ₁₅ -PGly ₂	29800	1.10 ^a	2500 (1)	1.12 ⁽¹⁾	0.94
PBLG ₁₅ -PGly ₃	27500	1.11 ^a	3450 (2)	– (3)	0.91
PBLG ₁₅ -PGly ₅	22400	1.14 ^a	4800 (2)	– (3)	0.86
PBLG ₁₅ -PGly ₈	22800	1.11 ^a	7600 (2)	– (3)	0.79
PBLG ₁₅ -PGly ₁₅	18500	1.13 ^a	11500 (2)	– (3)	0.67

(1) Από SEC (ανιχνευτής LALLS) σε διάλυμα LiBr 0.1N σε DMF στους 333 K.

(2) Από στοιχειομετρική αναλογία μονομερούς/απαρχητή λόγω χαμηλής διαλυτότητας

(3) Δεν προδιορίστηκε από SEC λόγω χαμηλής διαλυτότητας.

(4) Κλάσμα όγκου του PBLG στο συμπολυμερές: $f_{\text{PBLG}} = v_{n,\text{PBLG}} / (v_{n,\text{PBLG}} + v_{n,\text{PGly}})$, όπου $v_{n,\text{PBLG}} = M_{n,\text{PBLG}} / \rho_{\text{PBLG}}$ και $v_{n,\text{PGly}} = M_{n,\text{PGly}} / \rho_{\text{PGly}}$, $\rho_{\text{PGly}} = 1.61 \text{ g/cm}^3$, $\rho_{\text{PBLG}} = 1.278 \text{ g/cm}^3$ (για α-ελικοειδή διαμόρφωση).

Πίνακας 3.4. Μοριακά χαρακτηριστικά του δισυσταδικού PZLL-*b*-PBLG και του τρισυσταδικού συμπολυμερούς PZLL-*b*-PBLG-*b*-PZLL. Οι δείκτες αντιστοιχούν στο μέσο κατά αριθμό βαθμό πολυμερισμού.

Δείγμα	M_n^{PZLL} (1)	$I^{PBLG} = M_w/M_n$ (2)	$M_n^{ολικό}$ (1)	$I = M_w/M_n$ (2)	f_{PBLG} (3)
PZLL ₁₃₇ -PBLG ₃₈₀	36000	1.08	120000	1.06	0.70
PZLL ₆₀ -PBLG ₂₇₀ -PZLL ₆₀	16000 ⁽⁴⁾	1.07	90000	1.07	0.73

(1) Οσμωμετρία μεμβράνης.

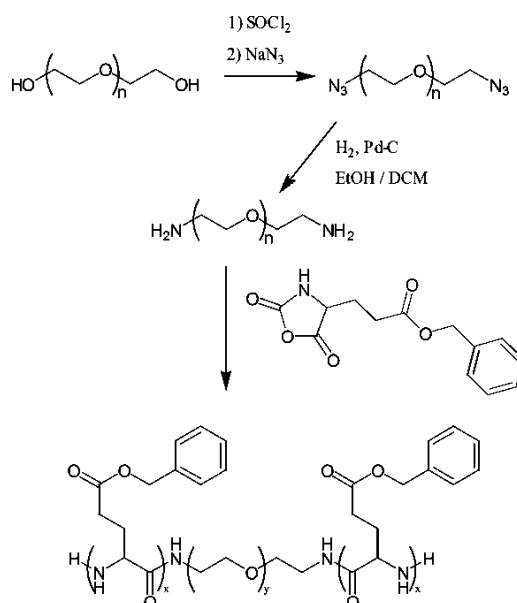
(2) Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών.

(3) Κλάσμα όγκου του PBLG στο συμπολυμερές: $f_{PBLG} = v_{n,PBLG} / (v_{n,PBLG} + v_{n,PZLL})$, όπου $v_{n,PBLG} = M_{n,PBLG} / \rho_{PBLG}$, και $v_{n,PZLL} = M_{n,PZLL} / \rho_{PZLL}$, $\rho_{PBLG} = 1.278 \text{ g/cm}^3$, $\rho_{PZLL} = 1.26 \text{ g/cm}^3$ (για α -ελικοειδή διαμόρφωση).

(4) Μία συστάδα PZLL.

3.1.4 Τρισυσταδικά συμπολυμερή πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ)-*b*-πολυ(αιθυλενογλυκόλη)-*b*-πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ) (PBLG-PEG-PBLG)

Η σύνθεση έγινε από τον Harm-Anton Klok (MPI-P). Η συνθετική διαδικασία απεικονίζεται σχηματικά στην εικ. 3.3. Τα άκρα της πολυαιθυλενογλυκόλης (Sigma Aldrich Chemie GmbH) μετατράπηκαν σε αμινομάδες, ώστε να δράσουν ως απαρχητές του πολυμερισμού του NCA του BLG, που προστέθηκε στη συνέχεια. Ο δείκτης πολυδιασποράς ήταν στην περιοχή 1.3-1.6 [1-3].



Εικ. 3.3. Σύνθεση των συμπολυμερών PBLG-*b*-PEG-*b*-PBLG. Τα υδροξύλια του PEG μετατρέπονται σε αμινομάδες και λειτουργούν ως απαρχητής για τον πολυμερισμό του καρβοξυανυδρίτη του BLG.

Πίνακας 3.5. Μοριακά χαρακτηριστικά των τρισταδιακών συμπολυμερών πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ)-b-πολυ(αιθυλενογλυκόλη)-b-πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ) (PBLG-PEG-PBLG). Οι δείκτες αντιστοιχούν στο μέσο κατά αριθμό βαθμό πολυμερισμού.

Σύστημα	M_n PEG ⁽¹⁾ (g/mol)	$N_{n,PEG}$ ⁽¹⁾	M_n PBLG ⁽²⁾ (g/mol)	$N_{n,PBLG}$ ⁽²⁾	f_{PBLG} ⁽³⁾
PBLG ₅ -PEG ₂₁ -PBLG ₅	940	21	1100	5	0.67
PBLG ₉ -PEG ₂₁ -PBLG ₉	940	21	2000	9	0.79
PBLG ₂₂ -PEG ₂₁ -PBLG ₂₂	940	21	4800	22	0.90
PBLG ₅₄ -PEG ₂₁ -PBLG ₅₄	940	21	11800	54	0.96
PBLG ₉₆ -PEG ₂₁ -PBLG ₉₆	940	21	21000	96	0.98
PBLG ₄ -PEG ₉₀ -PBLG ₄	3980	90	880	4	0.28
PBLG ₈ -PEG ₉₀ -PBLG ₈	3980	90	1750	8	0.44
PBLG ₁₇ -PEG ₉₀ -PBLG ₁₇	3980	90	3720	17	0.62
PBLG ₅₈ -PEG ₉₀ -PBLG ₅₈	3980	90	12700	58	0.85
PBLG ₁₀₅ -PEG ₉₀ -PBLG ₁₀₅	3980	90	23000	105	0.91
PBLG ₄ -PEG ₁₃₈ -PBLG ₄	6090	138	880	4	0.20
PBLG ₉ -PEG ₁₃₈ -PBLG ₉	6090	138	1970	9	0.36
PBLG ₁₆ -PEG ₁₃₈ -PBLG ₁₆	6090	138	3500	16	0.50

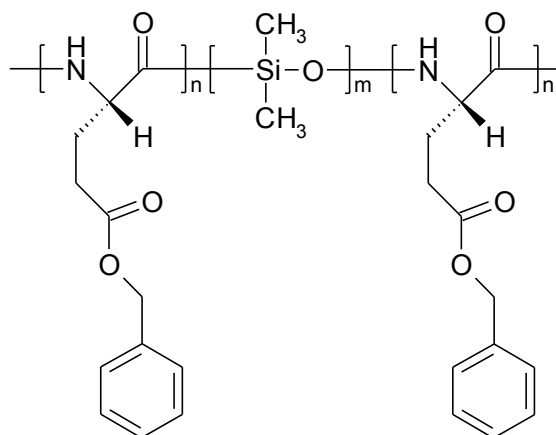
(1) Συστάδα PEG, σύμφωνα με ¹H-NMR.

(2) Σύμφωνα με ¹H-NMR. Η τιμή αντιστοιχεί σε μία από τις δύο συστάδες PBLG του τρισταδιακού συμπολυμερούς.

(3) Κλάσμα όγκου του PBLG στο συμπολυμερές: $f_{PBLG} = v_{n,PBLG} / (v_{n,PBLG} + v_{n,PEG})$, όπου $v_{n,PBLG} = 2 * M_{n,PBLG} / \rho_{PBLG}$, και $v_{n,PEG} = M_{n,PEG} / \rho_{PEG}$, $\rho_{PEG} = 1.12 \text{ g/cm}^3$, $\rho_{PBLG} = 1.278 \text{ g/cm}^3$ (για α-ελικοειδή διαμόρφωση).

3.1.5 Τρισταδιακά συμπολυμερή πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ)-b-πολυ(διμεθυλο-σιλοξάνιο)-b-πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ) (PBLG-b-PDMS-b-PBLG)

Η σύνθεση έγινε επίσης από τον Harm-Anton Klok (EPFL) με διαδικασία ανάλογη με αυτή των τρισταδιακών συμπολυμερών PBLG-PEG-PBLG. Για την μεσαία συστάδα χρησιμοποιήθηκε εμπορικά διαθέσιμο α,ω-διαμινο-πολυ(διμεθυλοσιλοξάνιο), που ήταν και ο απαρχητής για τον πολυμερισμό του NCA του BLG [2,3,7].



Εικ. 3.4. Μοριακή δομή των τρισταδιακών συμπολυμερών PBLG-b-PDMS-b-PDMS.

Πίνακας 3.6. Μοριακά χαρακτηριστικά των τρισταδικών συμπολυμερών πολυ(γ-βενζύλο-L-γλουταμινικό οξύ)-b-πολυ(διμεθυλοσιλοξάνιο)-b-πολυ(γ-βενζύλο-L-γλουταμινικό οξύ) (PBLG-b-PDMS-b-PBLG). Οι δείκτες αντιστοιχούν στον στόχο για το βαθμό πολυμερισμού.

Δείγμα	$M_{n,PDMS}^{(1)}$	$M_n^{(2)}$	$M_w^{(2)}$	$I=M_w/M_n^{(2)}$	$M_n^{(3)}$	$f_{PBLG}^{(4)}$
PBLG ₅ -PDMS ₂₄ -PBLG ₅	1800	3280	3990	1.22	4000	0.49
PBLG ₅₀ -PDMS ₂₇₁ -PBLG ₅₀	20000	38200	48600	1.27	55100	0.57
PBLG ₅₀ -PDMS ₂₄ -PBLG ₅₀	1800	34500	47500	1.38	32400	0.93
PBLG ₁₀₀ -PDMS ₂₄ -PBLG ₁₀₀	1800	44650	54270	1.22	60000	0.96

⁽¹⁾ Μοριακό βάρος του μακρο-απαρχητή PDMS (τιμή προμηθευτή).

⁽²⁾ Μοριακά βάρη και δείκτης πολυδιασποράς συμπολυμερούς, υπολογισμένα από μετρήσεις GPC σε DMF.

⁽³⁾ Μέσο κατά αριθμό μοριακό βάρος συμπολυμερούς από φάσμα ¹H-NMR από μετρήσεις σε CDCl₃.

⁽⁴⁾ Κλάσμα όγκου PBLG: $f_{PBLG} = v_{PBLG} / (v_{PBLG} + v_{PDMS})$, όπου $v_{PBLG} = M_{n,PBLG} / \rho_{PBLG}$ και $v_{PDMS} = M_{n,PDMS} / \rho_{PDMS}$ ($\rho_{PBLG} = 1.278 \text{ gcm}^{-3}$, $\rho_{PDMS} = 0.98 \text{ gcm}^{-3}$, M_n από NMR).

3.1.6 Διαλύματα PBLG σε μ-κρεσόλη

Η μ-κρεσόλη είναι γνωστό ότι ευνοεί το σχηματισμό σταθερής α-έλικας του PBLG [8]. Για την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα PBLG₄₅ και PBLG₁₇₅ του πίνακα 3.1. Η σύσταση των διαλυμάτων απεικονίζεται στον πίνακα 3.7. Τα διαλύματα με συγκεντρώσεις PBLG 2-50% w/w έγιναν με ανάμιξη του PBLG και του διαλύτη, ανάδευση επί 24 h και απευθείας χρήση. Τα δείγματα 80 και 90% w/w δημιουργήθηκαν με διάλυση του PBLG σε μείγμα μ-κρεσόλης/CHCl₃ 10% w/w σε κατάλληλη αναλογία και εξάτμιση στον αέρα επί 24 h ώστε να απομακρυνθεί το CHCl₃, καθώς δεν σχηματίζεται ρευστό διάλυμα και δεν ήταν δυνατόν να επιτευχθεί ακριβής και ομοιόμορφη συγκέντρωση με απευθείας ανάμιξη τόσο μικρής ποσότητας μ-κρεσόλης και PBLG.

Πίνακας 3.7. Χαρακτηριστικά διαλυμάτων PBLG/μ-κρεσόλης. Τα χαρακτηριστικά των ξηρών PBLG έχουν δειχθεί στον πίνακα 3.1.1.

Δείγμα	Συγκέντρωση PBLG % w/w	$f_{PBLG}^{(1)}$
PBLG ₄₅ 2%	2.0	0.016
PBLG ₄₅ 5%	5.0	0.041
PBLG ₄₅ 10%	10	0.082
PBLG ₄₅ 20%	20	0.17
PBLG ₄₅ 50%	50	0.45
PBLG ₄₅ 80%	80	0.76
PBLG ₄₅ 90%	90	0.88
PBLG ₁₇₅ 10%	10	0.082

⁽¹⁾ Κλάσμα όγκου PBLG: $f_{PBLG} = v_{PBLG} / (v_{PBLG} + v_{cresol})$, όπου $v_{PBLG} = w_{PBLG} / \rho_{PBLG}$ και $v_{cresol} = (1 - w_{PBLG}) / \rho_{cresol}$, w_{PBLG} η συγκέντρωση w/w του PBLG ($\rho_{PBLG} = 1.278 \text{ gcm}^{-3}$, $\rho_{cresol} = 1.03 \text{ gcm}^{-3}$).

3.1.7 Προσανατολισμένα με ηλεκτρικό πεδίο δείγματα PBLG

Χρησιμοποιήθηκαν τα ομοπολυπεπίδια PBLG₄₅ και PBLG₁₇₅ του πίνακα 3.1. Τα δείγματα πιέστηκαν ανάμεσα σε δύο μπρούντζινα ηλεκτρόδια διαμέτρου 20 mm και είχαν πάχος ~50 μm. Ανάμεσα στα ηλεκτρόδια εφαρμόστηκε υψηλή συνεχής τάση 50-220 V σε διάφορες θερμοκρασίες και χρονικές διάρκειες, όπως δείχνει ο πίνακας 3.8, και στη συνέχεια έγινε γρήγορη ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου.

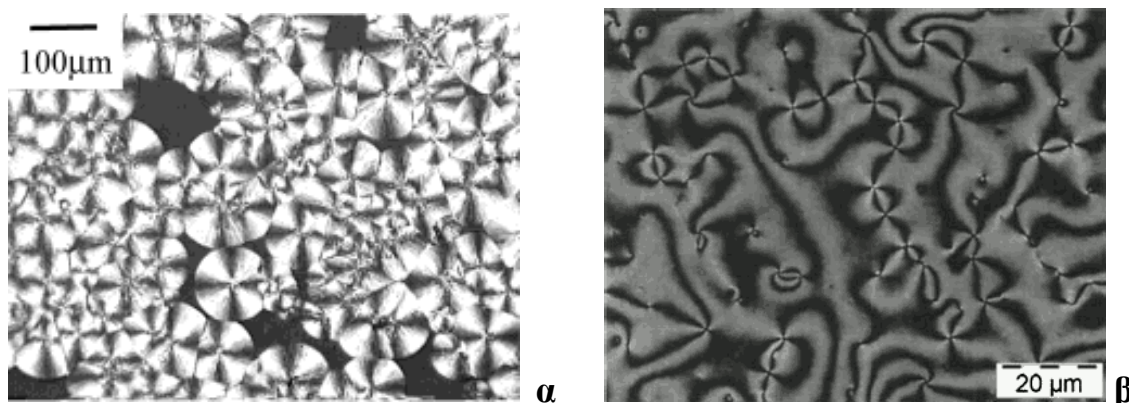
Πίνακας 3.8. Προσανατολισμένα με ηλεκτρικό πεδίο δείγματα PBLG και αντίστοιχες συνθήκες.

Δείγμα	Πάχος δείγματος (μm)	Τάση (V)	Ηλεκτρικό πεδίο (10 ⁶ V/m)	Χρόνος εφαρμογής πεδίου (h)	Θερμοκρασία (K)
PBLG ₄₅ 30m50V	55	50	0.9	0.5	390
PBLG ₄₅ 6h50V	50	50	1.0	6	390
PBLG ₄₅ 6h200V	55	220	4.0	6	390
PBLG ₄₅ 12h50V	50	50	1.0	12	390
PBLG ₄₅ 24h50V	55	50	0.9	24	390
PBLG ₄₅ 100h50V	50	50	1.0	100	390
PBLG ₄₅ 200h50V	57	50	0.9	200	390
PBLG ₄₅ 12h50V170C	50	50	1.0	12	430
PBLG ₄₅ 24h50V170C	70	70	1.0	24	430
PBLG ₁₇₅ 24h50V	70	50	0.7	24	400

3.2 Πειραματικές μέθοδοι χαρακτηρισμού της δομής

3.2.1 Πολωτική οπτική μικροσκοπία (Polarizing Optical Microscopy – POM)

Η πολωτική οπτική μικροσκοπία εξετάζει τη δομή του υλικού σε διαστάσεις > 1 μm μέσω της διπλοθλαστικότητας. Μπροστά και πίσω από το δείγμα υπάρχουν πολωτές κάθετοι μεταξύ τους, ώστε να μην περνάει φως όταν δεν έχει τοποθετηθεί δείγμα. Τα άμορφα υλικά είναι ισότροπα και δεν στρέφουν το επίπεδο του πολωμένου φωτός, γι' αυτό δεν εμφανίζουν τίποτα στο μικροσκόπιο, ενώ οι κρύσταλλοι και οι υγροί κρύσταλλοι δείχνουν χαρακτηριστικές εικόνες (εικ. 3.5). Χρησιμοποιήθηκε ένα πολωτικό οπτικό μικροσκόπιο Zeiss Axioskop 2 σε συνδυασμό με συσκευή θέρμανσης Linkam (THMS 600) και ένα ρυθμιστή θερμοκρασίας TP93 με δυνατότητα ρυθμού ψύξης-θέρμανσης 0.1-90 K/min.



Εικ. 3.5. (α) Φωτογραφία κρυσταλλικών δομών με σφαιρικό σχήμα (σφαιρόλιθοι) πολυ(L-γαλακτικού οξέος) από πολωτικό μικροσκόπιο, όπου φαίνεται η χαρακτηριστική εικόνα του «σταυρού της Μάλτας» (εικ. από [9]). (β) Εικόνα δείγματος επταμερούς αιθυλο-εξυλο-φλουορενίου, που σχηματίζει νηματική υγροκρυσταλλική φάση, η οποία παρουσιάζει χαρακτηριστικές ασυνέχειες του προσανατολισμού (εικ. από [10]).

3.2.2 Φασματοσκοπία υπερόθρου (Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy – FTIR)

Η χρήση της μεθόδου για τη μελέτη της μοριακής δομής περιγράφηκε στο Κεφ. 1. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ένα φασματόμετρο Nicolet Magna IR 850 με ανιχνευτή θεϊκής τριγλυκίνης, εφοδιασμένο με μονάδα ελέγχου της θερμοκρασίας. Ο χώρος του δείγματος και του ανιχνευτή καθαρίστηκαν με ξηρό αέρα πριν και κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Τα φιλμ των δειγμάτων ετοιμάστηκαν από διαλύματα 20% w/v των πεπτιδίων σε DMF με περιστροφική επίστρωση (*spin coating*) πάνω σε επιφάνειες πυριτίου (*silicon wafer*). Οι μετρήσεις έγιναν από θερμοκρασία δωματίου μέχρι και τους 433 K.

3.2.3 Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance – NMR)

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφ. 1, η φασματοσκοπία NMR είναι μια από τις βασικότερες μεθόδους εύρεσης της δευτεροταγούς δομής. Τα φάσματα NMR που παρουσιάζονται προέρχονται από μετρήσεις ^{13}C -NMR στερεάς κατάστασης, που έγιναν από τον Δρ. I. Schnell στο MPI-P. Χρησιμοποιήθηκε η μεταφορά πόλωσης από τους πυρήνες ^1H (*cross-polarization*), ενώ το δείγμα περιστρεφόταν υπό τη «μαγική γωνία» με συχνότητα 12.5 (συμπολυμερή PBLG-*b*-PGly) ή 25 kHz (υπόλοιπα δείγματα) (*cross-polarization magic-angle spinning – CPMAS*). Το φασματόμετρο ήταν τύπου Bruker με συχνότητες Larmor 700.13 και 176.05 MHz για το ^1H και ^{13}C , αντίστοιχα, ενώ το σήμα συλλέχτηκε από 10-50 χιλιάδες βήματα (*transients*) του πειράματος, ανάλογα με την ποιότητα του σήματος. Η περιγραφή της χρήσης του ^{13}C -NMR στερεάς κατάστασης για το χαρακτηρισμό της δομής πεπτιδίων, καθώς και οι τιμές της χημικής μετατόπισης για διάφορα αμινοξέα και δευτεροταγείς δομές, παρουσιάστηκαν στο Κεφ. 1. Επίσης, ^1H -NMR διαλυμάτων πεπτιδίων

χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των μέσων κατά αριθμό μοριακών βαρών.

3.2.4 Σκέδαση ακτίνων-X

Τα γενικά χαρακτηριστικά της μεθόδου και η εφαρμογή της στη μελέτη της δομής πρωτεϊνών και πεπτιδίων έχουν αναφερθεί ήδη στο Κεφ. 1. Σε όλα τα δείγματα έγιναν μετρήσεις με τη μέθοδο σκόνης, αλλά σε ορισμένα έγιναν και δισδιάστατες μετρήσεις από προσανατολισμένες ίνες. Οι ίνες ετοιμάζονται πιέζοντας το πολυμερές να περάσει μέσα από μία μικρή οπή ($\varnothing \sim 0.7$ mm), ώστε οι αλυσίδες να προσανατολιστούν προς την κατεύθυνση του εφελκυσμού. Η διαφορά των ινών από τους μονοκρυστάλλους είναι ότι οι δύο πλεγματικοί άξονες που είναι κάθετοι στον άξονα της ίνας δεν συμπίπτουν σε όλο τον όγκο του υλικού, αλλά κατανέμονται σε όλες τις κατευθύνσεις. Γι' αυτό και η εικόνα σκέδασης δεν αλλάζει με περιστροφή της ίνας γύρω από τον άξονά της. Η μέθοδος είναι το ενδιάμεσο των μεθόδων σκόνης και μονοκρυστάλλου.

Η πειραματική διάταξη φαίνεται στην εικ. 3.6. Η δέσμη ακτίνων-X προσπίπτει κάθετα στην ίνα και πίσω της σχηματίζεται η δισδιάστατη εικόνα σκέδασης. Αν το δείγμα δεν είναι προσανατολισμένο η σκεδαζόμενη ένταση μεταβάλλεται μόνο ακτινικά και όχι αζιμουθιακά, σχηματίζοντας ομόκεντρους κύκλους. Για κάθε διάνυσμα \vec{G} του αντιστρόφου χώρου υπάρχουν και όλα όσα προκύπτουν με περιστροφή του γύρω από τον άξονα της ίνας, επιτρέποντας τον προσδιορισμό μόνο της γωνίας ω που σχηματίζει με τον άξονα της ίνας. Επίσης για κάθε \vec{G} υπάρχει και το $-\vec{G}$, δίνοντας συνολικά τέσσερις συμμετρικές ανακλάσεις από κάθε διάνυσμα του αντιστρόφου πλέγματος. Για τα κυματανύσματα \vec{k} και \vec{k}' της προσπίπτουσας και σκεδαζόμενης δέσμης, αντίστοιχα, ισχύει $\vec{k}' - \vec{k} = \vec{G}$. Στη συγκεκριμένη διάταξη έχουμε

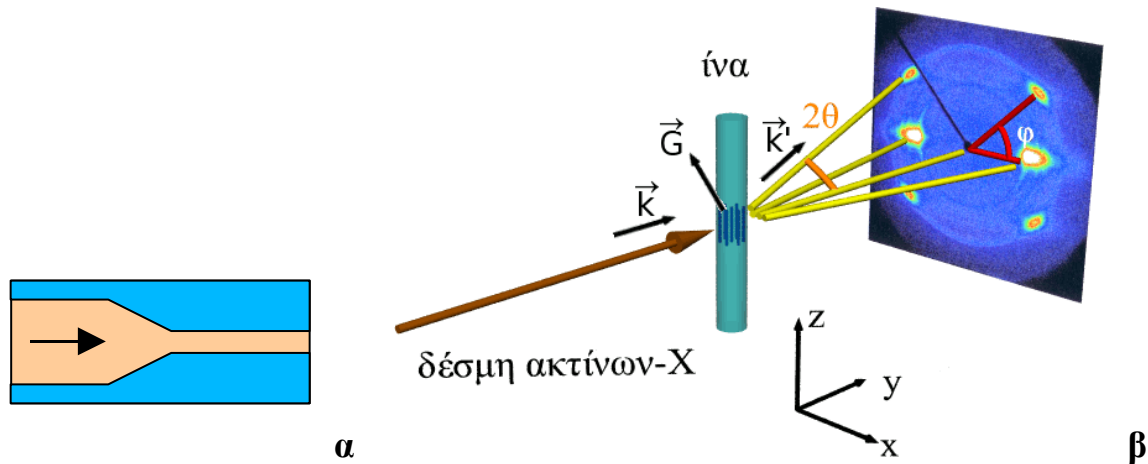
$$\begin{aligned} \vec{k} &= k\hat{y} \\ \vec{k}' &= k \sin 2\vartheta \cos \varphi \hat{x} + k \cos 2\vartheta \hat{y} + k \sin 2\vartheta \sin \varphi \hat{z} \end{aligned} \quad (3.1)$$

Επειδή η σκέδαση είναι ελαστική ισχύει $|\vec{k}| = |\vec{k}'| = 2\pi/\lambda$. Επιπλέον για το \vec{G} ισχύει

$$|\vec{G}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \vartheta = 2k \sin \vartheta, \quad \cos \omega = \frac{|\vec{G} \cdot \hat{z}|}{|\vec{G}|} = \cos \vartheta \sin \varphi \quad (3.2)$$

όπου φ η αζιμουθιακή γωνία στην εικόνα σκέδασης. Από τις παραπάνω σχέσεις προκύπτει ότι: (α) οι δομές με περιοδικότητα (\vec{G}) κάθετα στην ίνα, δίνουν «ισημερινές» ανακλάσεις με $\varphi=0$, από τις οποίες μπορεί να υπολογιστεί η απόσταση μεταξύ των αλυσίδων, (β) τα διανύσματα \vec{G} που είναι ακριβώς παράλληλα προς τον άξονα της ίνας δεν δίνουν ανακλάσεις, γιατί $\omega=0$ που σημαίνει

ότι πρέπει να αντιστοιχούν σε $\vartheta=0$ (εξ. 3.2), το οποίο προσεγγιστικά ισχύει αν η γωνία σκέδασης ϑ είναι πολύ μικρή, (γ) ανακλάσεις με παραπλήσιο $|\vec{G}|$ συνήθως είναι δύσκολο να ξεχωρίσουν με τη μέθοδο σκόνης, αλλά με αυτή τη μέθοδο μπορούν, γιατί αντιστοιχούν σε διαφορετική γωνία φ .

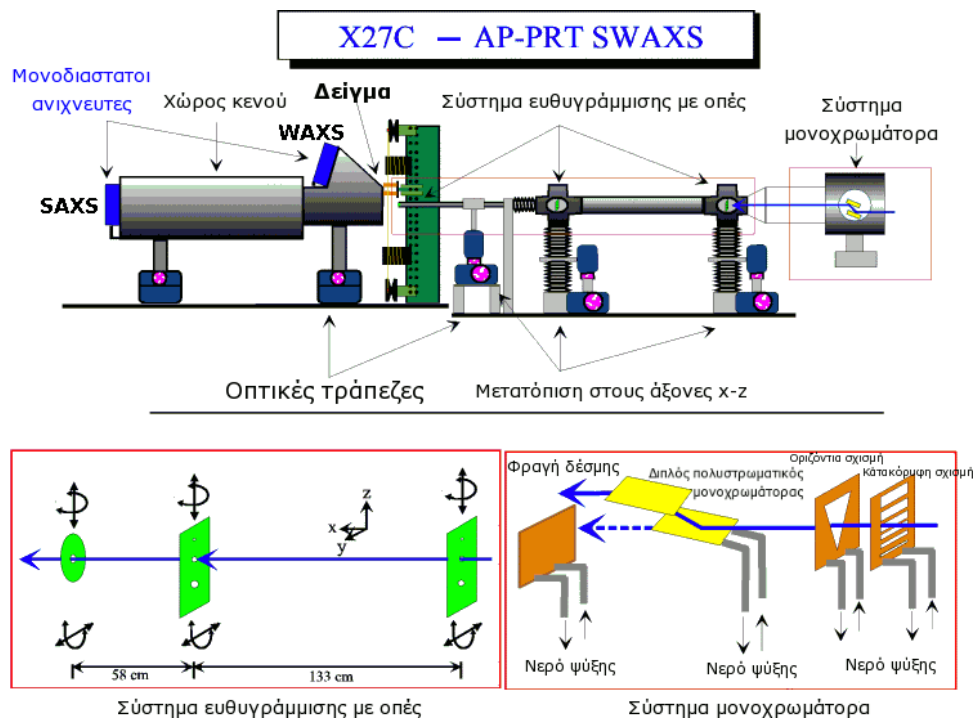


Εικ. 3.6. (α) Διάταξη εφελκυσμού για την παραγωγή προσανατολισμένων ινών μακρομορίων. Το δείγμα πιέζεται να περάσει μέσα από μια μικρή κυλινδρική οπή. (β) Διάταξη διδιάστατων μετρήσεων ακτίνων X από προσανατολισμένες ίνες. Η ίνα τοποθετείται κάθετα στη δέσμη ακτίνων X και παράλληλα προς τον ανιχνευτή.

Οι μετρήσεις έγιναν σε μικρές ($2\vartheta \approx 0.1-2^\circ$) και ευρείες γωνίες ($2\vartheta > 2^\circ$) (Small- and Wide-Angle X-ray Scattering – SAXS, WAXS). Για τις ευρείες γωνίες (WAXS) χρησιμοποιήθηκε ένα περιθλασίμετρο ϑ - ϑ της Siemens (μοντέλο D500T) και η ακτινοβολία Cu K α από μια γεννήτρια Kristalloflex 710H της Siemens που δουλεύει στα 35 kV και 30 mA. Μπροστά από τον ανιχνευτή τοποθετήθηκε μονοχρωμάτορας γραφίτη ($\lambda = 0.154$ nm). Οι μετρήσεις έγιναν σε γωνίες 2ϑ 0.1° - 40° σε βήματα 0.01° στην περιοχή θερμοκρασιών 433–303 K (με ψύξη). Για τα προσανατολισμένα δείγματα χρησιμοποιήθηκε ένας ευθυγραμμιστής δέσμης με οπές (pinhole collimator) και διδιάστατος ανιχνευτής Bruker 1024×1024 pixel. Στις μετρήσεις σε μικρές γωνίες (SAXS) χρησιμοποιήθηκε ίδιος ευθυγραμμιστής και ανιχνευτής με πηγή ακτίνων X περιστρεφόμενης ανόδου στα 18 kW, ενώ η απόσταση δείγματος-ανιχνευτή ήταν 1.46 m και η διάρκεια των μετρήσεων ~ 4 h.

Εκτός από τα πειράματα με συμβατικές πηγές ακτίνων X, έγιναν ταυτόχρονες μετρήσεις SAXS και WAXS (SWAXS) με ακτινοβολία συγχρότρου στη γραμμή X27C του National Synchrotron Light Source (NSLS) του Brookhaven National Laboratory (Upton, NY). Η διάταξη απεικονίζεται στην εικ. 3.7. Χρησιμοποιήθηκαν μονοδιάστατοι ανιχνευτές σύρματος. Οι μετρήσεις

στα συμπολυμερή PBLG-*b*-PEG-*b*-PBLG έγιναν με $\lambda = 0.1366$ nm και αποστάσεις δείγματος-ανιχνευτή 0.87 και 0.15 m στο SAXS και WAXS, αντίστοιχα. Μία σειρά πειραμάτων έγινε θερμαίνοντας αρχικά τα δείγματα στους 453 K, ώστε να διαγραφεί το θερμικό παρελθόν, και στη συνέχεια ψύχοντάς τα με ρυθμό 2 K/min ως τους 313 K και θερμαίνοντας ξανά ως τους 413 K με τον ίδιο ρυθμό, παίρνοντας μετρήσεις SAXS/WAXS ανά 1 min. Με δεύτερη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε η κινητική της μεταβολής φάσεων του δείγματος, μεταβάλλοντας απότομα τη θερμοκρασία από 453 σε 313 K με τη χρήση μονάδας για «άλματα» θερμοκρασίας με διπλό κελί για το δείγμα, και παίρνοντας μετρήσεις ανά 1 min στους 313 K. Στα συμπολυμερή PBLG-*b*-PDMS-*b*-PBLG χρησιμοποιήθηκε $\lambda=0.1371$ nm και αποστάσεις 2.173 και 0.203 m, για SAXS και WAXS, αντίστοιχα. Οι μετρήσεις έγιναν κρατώντας τη θερμοκρασία σταθερή στους 433, 413, 393, 363, 333, 303 K (με τη σειρά που έγιναν).



Εικ. 3.7. Διάταξη της γραμμής X27C του National Synchrotron Light Source (NSLS) του Brookhaven National Laboratory, όπου έγιναν ταυτόχρονες μετρήσεις SAXS και WAXS (SWAXS). Η δέσμη ($\sim 10^{12}$ φωτόνια/s) περνάει από μονοχρωμάτορα και σύστημα ευθυγράμμισης πριν φτάσει στο δείγμα, ενώ η σκεδαζόμενη ένταση μετράται με δύο μονοδιάστατους ανιχνευτές.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται συναρτήσει του μέτρου του κυματανόσματος

$$q = 4\pi/\lambda \sin(2\vartheta/2) \tag{3.3}$$

3.2.5 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης και Σάρωσης (Transmission Electron Microscopy – TEM, Scanning Electron Microscopy – SEM)

Η μέθοδος εκμεταλλεύεται τη διαφορά ηλεκτρονιακής πυκνότητας των συστάδων για την εύρεση της δομής των συμπολυμερών. Τα δείγματα για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κόπηκαν με μικροτόμο σε χαμηλή θερμοκρασία (*cryo-ultramicrotome*) σε πάχος ~ 60 nm. Μελετήθηκαν τα συστήματα PBLG-*b*-PGly, στα οποία έγινε επεξεργασία με RuO₄ και οξικό ουρανύλιο (UO₂(CH₂COO)₂) (*staining*) που επικάθονται στους αρωματικούς δακτυλίους του PBLG, για να αυξηθεί η αντίθεση, καθώς και τα PBLG-*b*-PDMS-*b*-PBLG, που χρησιμοποιήθηκαν χωρίς επεξεργασία. Οι μετρήσεις TEM έγιναν σε ένα LEO EM 912 (*omega in-column spectrometer*), ενώ οι μετρήσεις STEM σε ένα FEI Tecnai F20 με ανιχνευτή που χρησιμοποιεί μήκος σκέδασης 200 mm (*high angular annular dark field detector – HAADF*). Οι μετρήσεις έγιναν από τον Δρ. I. Lieberwirth (MPI-P).

3.2.6 Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης – ΔΘΣ (Differential Scanning Calorimetry – DSC)

Η ΔΘΣ χρησιμοποιήθηκε κυρίως για τη μελέτη της μετάβασης υάλου (Κεφ. 2), αλλά μπορεί να δώσει πληροφορίες και για τη δομή, γιατί παρατηρεί τις θερμοδυναμικές μεταβάσεις πρώτης τάξης, όπως η κρυστάλλωση ή η αλλαγή υγροκρυσταλλικής φάσης. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ένα θερμιδόμετρο Mettler Toledo Star DSC με δυνατότητα προγραμματισμού κύκλων θερμοκρασίας στην περιοχή 113–673 K. Ο ρυθμός μεταβολή της θερμοκρασίας ήταν 10 K/min, ενώ πραγματοποιήθηκαν δύο κύκλοι ψύξης-θέρμανσης για να επιβεβαιωθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Οι θερμοχωρητικότητες και οι άλλες παράμετροι που έχουν εξαχθεί προέρχονται από τη δεύτερη σάρωση με θέρμανση, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά.

3.2.7 Θερμοδυναμικές μετρήσεις Πίεσης-Όγκου-Θερμοκρασίας (Pressure-Volume-Temperature – PVT)

Οι μετρήσεις έγιναν από τον A. Best (MPI-P) με ένα διαστολόμετρο Gnomix υψηλής πίεσης, στην περιοχή θερμοκρασιών 303–453 K και πιέσεων 10–200 MPa. Στο Κεφ. 2 αναφέρθηκε ότι η μέθοδος μπορεί να παρατηρήσει θερμοδυναμικές μεταβάσεις, άρα και μεταβολές της δομής, και τη «μετάβαση» υάλου, όπως και η ΔΘΣ. Στα πειραματικά αποτελέσματα έγινε δισδιάστατη προσαρμογή (*fit*) με την εμπειρική συνάρτηση Tait [11]

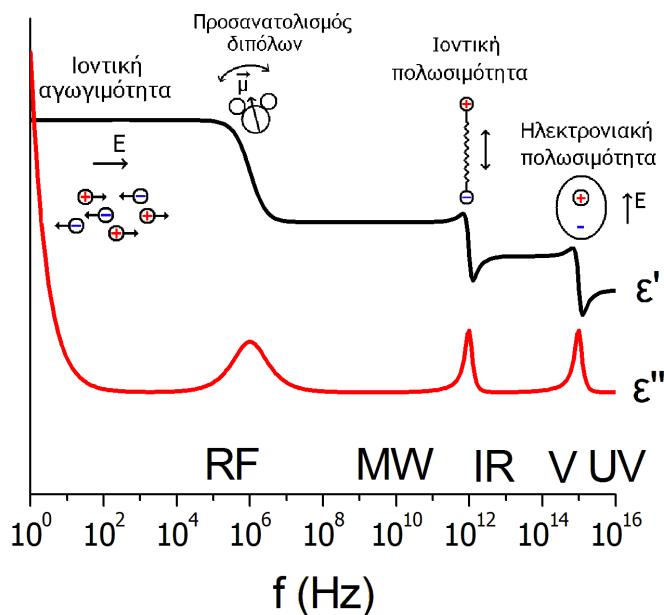
$$\begin{aligned}
 V(P, T) &= V(0, T) \left(1 - 0.0894 \ln(1 + P/B(T)) \right), \\
 V(0, T) &= a_0 + a_1 T + a_2 T^2 \\
 B(T) &= B_0 \exp(-B_1 T)
 \end{aligned}
 \tag{3.4}$$

όπου a_0 ο όγκος σε $T=0, P=0$, a_1 ο συντελεστής διαστολής σε $T=0, P=0$, a_2 παράμετρος που περιγράφει τη μη γραμμικότητα της διαστολής και B_0 και B_1 παράμετροι που περιγράφουν την εξάρτηση του μέτρου συμπιεστότητας όγκου από τη θερμοκρασία. Με τη χρήση της Εξ. 3.4 μπορούν να εκφραστούν μεγέθη, όπως οι χρόνοι χαλάρωσης, συναρτήσει του όγκου του συστήματος. Η προσαρμογή στις περιοχές $T > T_g$ και $T < T_g$ έγινε ξεχωριστά, με διαφορετικές παραμέτρους.

3.3 Πειραματικές μέθοδοι μελέτης της δυναμικής

3.3.1 Διηλεκτρική Φασματοσκοπία ($\Delta\Phi$)

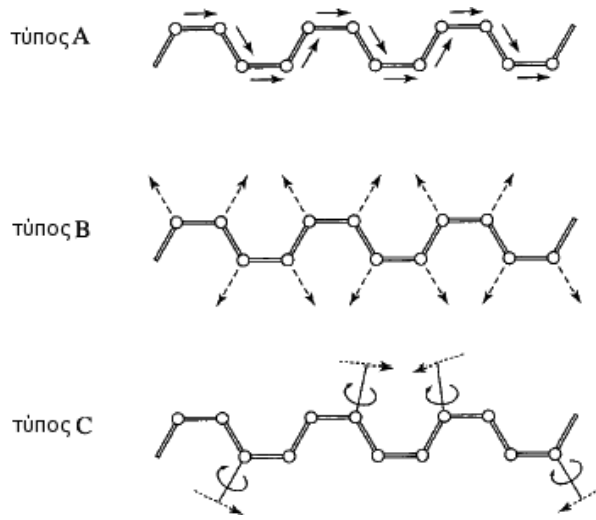
Στο Κεφ. 2 παρουσιάστηκαν αποτελέσματα της βιβλιογραφίας πάνω στη δυναμική πρωτεϊνών και πεπτιδίων, όπου έγινε φανερό ότι οι διάφορες μέθοδοι καλύπτουν πολύ διαφορετικές περιοχές χρόνων χαλάρωσης. Η διηλεκτρική φασματοσκοπία έχει το πλεονέκτημα ότι καλύπτει εύκολα μεγάλη περιοχή συχνοτήτων με σχετικά απλή πειραματική διάταξη. Η μέθοδος μελετά τις κινήσεις των μορίων μέσω των μόνιμων ηλεκτρικών διπόλων που υπάρχουν σε αυτά. Όπως δείχνει η εικ. 3.8, η απόκριση ενός υλικού σε ηλεκτρικό πεδίο διαφέρει πολύ, ανάλογα με τη συχνότητά του: σε υψηλές συχνότητες (οπτική περιοχή – υπέρυθρο) εμφανίζεται η *ηλεκτρονιακή πολωσιμότητα* (μετατόπιση ηλεκτρονιακού φορτίου μέσα στα άτομα), σε κάπως χαμηλότερες η *ατομική πολωσιμότητα* (μετατόπιση ιόντων από τις θέσεις ισορροπίας τους) και σε πολύ χαμηλότερες η *μοριακή πολωσιμότητα*. Οι δύο πρώτες οφείλονται σε δίπολα επαγόμενα από το ηλεκτρικό πεδίο, ενώ η τελευταία σχετίζεται με τον προσανατολισμό μόνιμων διπόλων πάνω στα μόρια. Τα πεπτίδια περιέχουν πολλούς πολικούς δεσμούς, ιδιαίτερα τον πεπτιδικό, γι' αυτό και η διηλεκτρική φασματοσκοπία ενδείκνυται για τη μελέτη της δυναμικής τους. Οι μετρήσεις στην παρούσα εργασία έγιναν στην περιοχή συχνοτήτων $10^{-2} - 10^6$ Hz, όπου γίνεται ο προσανατολισμός των μόνιμων διπόλων και μπορεί να μελετηθεί η δυναμική των μορίων.



Εικ. 3.8. Σχηματικό διάγραμμα της ηλεκτρικής διαπερατότητας (ϵ') και των διηλεκτρικών απωλειών (ϵ'') ενός υλικού σε όλο το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα. Η ηλεκτρονική πόλωση που οφείλεται στη μετατόπιση του ηλεκτρονιακού νέφους από το ηλεκτρικό πεδίο εμφανίζεται στην περιοχή του ορατού και του υπεριώδους, η ιοντική πολωσιμότητα που οφείλεται στη μετατόπιση από τη θέση ισορροπίας των ιόντων εμφανίζεται στο υπέρυθρο, ενώ σε πολύ χαμηλότερες συχνότητες γίνεται ο προσανατολισμός των μόνιμων διπόλων και η διάχυση των ιόντων.

Ταξινόμηση πολυμερών κατά Stockmayer

Ανάλογα με την αρχιτεκτονική τους και τα ηλεκτρικά δίπολα, τα πολυμερή ταξινομήθηκαν από τον W. H. Stockmayer σε τρεις κατηγορίες [12]: ο τύπος A έχει δίπολα παράλληλα προς την κύρια αλυσίδα, ο τύπος B έχει δίπολα πάνω στην κύρια αλυσίδα, αλλά με κατεύθυνση κάθετη σε αυτή, ενώ ο τύπος C έχει δίπολα σε ευκίνητες πλευρικές αλυσίδες που μπορούν να κινούνται ανεξάρτητα από την κύρια. Στα πολυμερή τύπου A το διάνυσμα \vec{R} που συνδέει τα άκρα της αλυσίδας και η συνολική διπολική ροπή $\vec{\mu}$ είναι παράλληλα, ενώ στα τύπου B είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους, $\langle \vec{R} \cdot \vec{\mu} \rangle = 0$. Αυτό σημαίνει ότι η χαλάρωση απ' άκρου εις άκρον είναι διηλεκτρικά ενεργή μόνο στα πρώτα. Το αντίθετο ισχύει για τον τμηματικό μηχανισμό, που αντανακλά χαλάρωση λίγων μονομερών, και ο οποίος εμφανίζεται μόνο αν υπάρχει συνιστώσα της διπολικής ροπής κάθετη στην αλυσίδα. Σε μακρομόρια με πολύπλοκη αρχιτεκτονική μπορούν να συνυπάρχουν δίπολα όλων των ειδών. Τα πεπτιδία με α -ελικοειδή δευτεροταγή δομή είναι ιδανική περίπτωση πολυμερούς τύπου A, γιατί έχουν μεγάλη διπολική ροπή κατά μήκος της έλικας ~ 3.5 Debye/μονομερές (Κεφ. 2), η οποία μπορεί να χρησιμεύσει στην εύρεση του μήκους εμμονής της δομής.



Εικ. 3.9. Οι τρεις τύποι πολυμερών στην ταξινόμηση του Stockmayer: ο τύπος A έχει διπολική ροπή κατά μήκος της κύριας αλυσίδας, ο τύπος B έχει δίπολα πάνω στην κύρια αλυσίδα, αλλά με διεύθυνση κάθετα σε αυτή, ενώ ο τύπος C έχει δίπολα στις πλευρικές αλυσίδες. Τα α-ελικοειδή πεπτίδια είναι συστήματα τύπου A με διπολική ροπή ~ 3.5 Debye/μονομερές (εικ. από [12]).

Στατικό ηλεκτρικό πεδίο

Η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σε ένα υλικό επάγει διπολική ροπή, που είναι το άθροισμα όλων των παραγόντων που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Η πόλωση δίνεται από τη σχέση

$$\vec{P} = \frac{1}{V} \sum \vec{\mu}_i + \vec{P}_\infty = N \langle \vec{\mu} \rangle + \vec{P}_\infty \quad (3.5)$$

όπου $\vec{\mu}_i$ τα μόνιμα ηλεκτρικά δίπολα, N η αριθμητική πυκνότητά τους και \vec{P}_∞ η συνολική ηλεκτρονιακή και ατομική πόλωση, που δεν θα εξεταστούν περαιτέρω. Η διηλεκτρική συνάρτηση ϵ^* ορίζεται από τη σχέση

$$\vec{P} = (\epsilon^* - 1) \epsilon_0 \vec{E} \quad (3.6)$$

και γενικά είναι μιγαδική συνάρτηση. Υποθέτοντας ότι τα δίπολα είναι μεμονωμένα, ώστε το τοπικό πεδίο να είναι ίσο με το εξωτερικά εφαρμοζόμενο, η ενέργεια ενός διπόλου είναι

$U = -\vec{\mu} \cdot \vec{E}$ και η μέση διπολική ροπή

$$\langle \vec{\mu} \rangle = \frac{\int \vec{\mu} \exp\left(\frac{\vec{\mu} \cdot \vec{E}}{k_B T}\right) d\Omega}{\int \exp\left(\frac{\vec{\mu} \cdot \vec{E}}{k_B T}\right) d\Omega} \quad (3.7)$$

όπου οι ολοκληρώσεις γίνονται σε όλες τις στοιχειώδεις στερεές γωνίες $d\Omega$. Σε ισότροπο

μέσο ενδιαφέρει μόνο η συνιστώσα της διπολικής ροπής που είναι παράλληλη με το εξωτερικό πεδίο, οπότε μπορεί να γίνει η απλοποίηση $U = -\mu E \cos \vartheta$, με ϑ τη γωνία μεταξύ των $\vec{\mu}$ και \vec{E} .

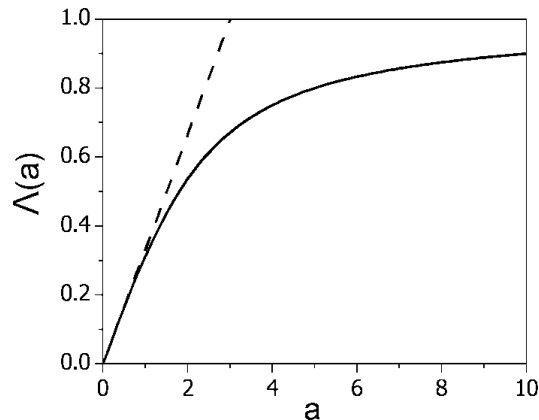
Θέτοντας $a = \mu E/k_B T$ και $x = \mu E \cos \vartheta/k_B T$ προκύπτει $\langle \mu \rangle = \mu \langle \cos \vartheta \rangle$, όπου

$$\langle \cos \vartheta \rangle = \frac{1}{a} \frac{\int_{-a}^a x \exp(x) dx}{\int_{-a}^a \exp(x) dx} = \frac{\exp(a) + \exp(-a)}{\exp(a) - \exp(-a)} - \frac{1}{a} = \Lambda(a) \quad (3.8)$$

η συνάρτηση Langevin, που έχει το ανάπτυγμα Taylor $\Lambda(a) = \frac{1}{3}a - \frac{1}{45}a^3 + \frac{2}{495}a^5 - \dots$ (εικ.

3.10). Για μικρές τιμές του ηλεκτρικού πεδίου ($E \ll k_B T/\mu$, για $\mu \sim 1$ Debye και $k_B T \sim 2.5$ kJ/mol δίνει $E \ll 10^6$ V/m) η διπολική ροπή δίνεται από τη γραμμική σχέση

$$\langle \vec{\mu} \rangle \cong \frac{\mu^2}{3k_B T} \vec{E} \quad (3.9)$$



Εικ. 3.10. Εξάρτηση της συνάρτησης Langevin $\Lambda(a) = \langle \cos \vartheta \rangle$ (Εξ. 3.8), όπου $a = \mu E/k_B T$ (συνεχής καμπύλη). Η διακεκομμένη γραμμή είναι η γραμμική προσέγγιση $\Lambda(a) = a/3$ για $a \ll 1$.

Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόστηκε στα πειράματα αυτής της εργασίας ήταν $\sim 10^4$ V/m, δηλαδή εντός της γραμμικής περιοχής, με εξαίρεση τα προσανατολισμένα δείγματα PBLG (Πίνακας 3.8). Από τις εξισώσεις 3.5, 3.6 και 3.9 παίρνουμε τη σχέση

$$\varepsilon_s - \varepsilon_\infty = \frac{1}{3\varepsilon_0} \frac{N\mu^2}{k_B T}, \quad \varepsilon_\infty = 1 + \frac{P_\infty}{\varepsilon_0 E} \quad (3.10)$$

όπου ε_s και ε_∞ τα όρια της διηλεκτρικής συνάρτησης σε χαμηλές (στατικό πεδίο) και υψηλές συχνότητες, αντίστοιχα.

Στην πιο πάνω ανάλυση έγινε η υπόθεση ότι τα δίπολα είναι μεμονωμένα, κάτι που απέχει πολύ από την πραγματικότητα. Ο Onsager, λαμβάνοντας υπόψη την πολωσιμότητα του περιβάλλοντος υλικού και υποθέτοντας σφαιρικό σχήμα των μορίων, κατέληξε στη σχέση [13]

$$\varepsilon_s - \varepsilon_\infty = \frac{1}{3\varepsilon_0} F \frac{N\mu^2}{k_B T}, \quad F = \frac{\varepsilon_s (\varepsilon_\infty + 2)^2}{3(2\varepsilon_s + \varepsilon_\infty)} \quad (3.11)$$

όπου F ο παράγοντας τοπικού πεδίου. Η πιο πάνω σχέση ισχύει για πολλά συστήματα, αλλά παρουσιάζει αποκλίσεις όταν τα δίπολα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Σε αυτή την περίπτωση εφαρμόζεται η εξίσωση Kirkwood-Fröhlich [14]

$$\varepsilon_s - \varepsilon_\infty = \frac{1}{3\varepsilon_0} gF \frac{N\mu^2}{k_B T} \quad (3.12)$$

όπου g ο παράγοντας συσχέτισης που ισούται με $g = 1 + z \langle \cos \gamma \rangle$, όπου z ο αριθμός των πλησιέστερων γειτόνων και γ η γωνία μεταξύ γειτονικών διπόλων. Συνήθως το g είναι δύσκολο να μετρηθεί και υπολογίζεται μόνο η ενεργός διπολική ροπή

$$\mu_{eff} = (g\mu^2)^{1/2} \quad (3.13)$$

Σε μόρια που το σχήμα τους απέχει πολύ από το σφαιρικό δεν ισχύουν οι πιο πάνω εξισώσεις. Ο Buckingham υπολόγισε την αντίστοιχη σχέση για ραβδοειδή μόρια μεγάλου μήκους (τροποποιήθηκε από τους Applequist και Mahr) [15,16], όπως είναι τα πεπτίδια με α -ελικοειδή δομή που έχουν διπολική ροπή κατά μήκος του άξονά τους (Κεφ. 1).

$$\frac{N\mu^2 fg}{3\varepsilon_0 k_B T} = \frac{(2\varepsilon_s + 1)(\varepsilon_s - n^2)}{2\varepsilon_s + n^2} - \frac{(2\varepsilon_\infty + 1)(\varepsilon_\infty - n^2)}{2\varepsilon_\infty + n^2} = \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)(4\varepsilon_s \varepsilon_\infty + 2n^2(\varepsilon_s + \varepsilon_\infty) + 3n^2 - 2n^4)}{(2\varepsilon_s + n^2)(2\varepsilon_\infty + n^2)} \quad (3.14)$$

όπου f και g είναι δύο παράγοντες που σχετίζονται με το σχήμα του μορίου και στο όριο της λεπτής ράβδου άπειρου μήκους με μεγάλη διπολική ροπή είναι $f \rightarrow 2/3$, $g \rightarrow 1$.

Εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο

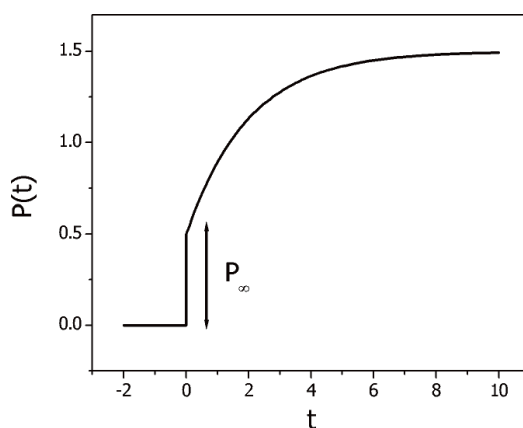
Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, οι διάφοροι μηχανισμοί πόλωσης έχουν διαφορετικούς χαρακτηριστικούς χρόνους, με πιο αργούς αυτούς που σχετίζονται με τον προσανατολισμό των μόνιμων διπόλων, γιατί απαιτούν την κίνηση ολόκληρων μορίων ή και περιοχών με πολλά μόρια. Οι κινήσεις αυτές προκαλούν απώλειες ενέργειας όταν εφαρμόζεται εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο, γι' αυτό και οι χρόνοι τους μπορούν να βρεθούν από τη συχνότητα όπου εμφανίζονται οι υψηλότερες απώλειες.

Η πόλωση που δημιουργείται από ένα χρονικά μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο $E(t)$ στα

πλαίσια της γραμμικής απόκρισης δίνεται από τη σχέση

$$P(t) = P_{\infty} + \varepsilon_0 \int_{-\infty}^t \varepsilon(t-t') \frac{dE(t')}{dt'} dt' \quad (3.15)$$

όπου $\varepsilon(t)$ η χρονοεξαρτώμενη διηλεκτρική συνάρτηση και \bar{P}_{∞} η συνολική επαγόμενη πόλωση. Στην περίπτωση όπου ηλεκτρικό πεδίο E εφαρμόζεται σε $t=0$, ενώ προηγουμένως $E=0$, έχουμε $P(t) = P_{\infty} + E\varepsilon_0\varepsilon(t)$ (εικ. 3.11).



Εικ. 3.11. Πόλωση ενός υλικού ως συνάρτηση του χρόνου, μετά από την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου E σε χρόνο $t=0$. Η ηλεκτρονιακή και ιοντική πόλωση (\bar{P}_{∞}) επάγονται σχεδόν ακαριαία, ενώ η πόλωση από προσανατολισμό των μόνιμων διπόλων πλησιάζει ασυμπτωτικά την τελική της τιμή.

Η διηλεκτρική συνάρτηση μπορεί να εκφραστεί ισοδύναμα και στο πεδίο συχνοτήτων (*frequency domain*). Αν το ηλεκτρικό πεδίο είναι ημιτονοειδής συνάρτηση του χρόνου $E(t, \omega) = E_0 \exp(-i\omega t)$ ($\omega = 2\pi f$), η σχέση 3.15 γίνεται

$$P(t, \omega) = \varepsilon_0 (\varepsilon^*(\omega) - 1) E(t, \omega), \quad \varepsilon^*(\omega) = \varepsilon'(\omega) - i\varepsilon''(\omega) \quad (3.16)$$

Η διηλεκτρική συνάρτηση στο πεδίο συχνοτήτων $\varepsilon^*(\omega)$ είναι μιγαδική και σχετίζεται με την αντίστοιχη του πεδίου χρόνων (*time domain*) μέσω της εξίσωσης

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon'(\omega) - i\varepsilon''(\omega) = \varepsilon_{\infty} - \int_0^{\infty} \frac{d\varepsilon(t)}{dt} \exp(-i\omega t) dt \quad (3.17)$$

Το πραγματικό (ε') και φανταστικό (ε'') μέρος αντιστοιχούν στην ενέργεια που αποθηκεύεται προσωρινά στο σύστημα (όπως στους ιδανικούς πυκνωτές) και τις απώλειες σε θερμότητα. Η θέση όπου εμφανίζεται το μέγιστο των διηλεκτρικών απωλειών ε'' αντιστοιχεί σε μηχανισμό χαλάρωσης που περιλαμβάνει κίνηση μόνιμων διπόλων, δηλαδή είναι διηλεκτρικά ενεργός, ενώ στην ίδια θέση

εμφανίζεται «σκαλοπάτι» στο ϵ' . Τα ϵ' και ϵ'' δεν είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους, αλλά συνδέονται με τις εξισώσεις Kramers-Krönig [17],

$$\begin{aligned}\epsilon'(\omega) - \epsilon_\infty &= \frac{2}{\pi} \int_0^\infty \frac{\xi \epsilon''(\xi)}{\xi^2 - \omega^2} d\xi \\ \epsilon''(\omega) &= \frac{2}{\pi} \int_0^\infty \frac{\xi (\epsilon'(\xi) - \epsilon_\infty)}{\xi^2 - \omega^2} d\xi + \frac{\sigma}{\epsilon_0 \omega}\end{aligned}\quad (3.18)$$

επομένως δίνουν την ίδια πληροφορία, εκτός από το ότι το ϵ'' μπορεί να περιέχει έναν όρο $\sim \omega^{-1}$, ο οποίος δεν έχει αντίστοιχο στο ϵ' και σχετίζεται με την ιοντική αγωγιμότητα. Η μεταβολή του ϵ' , $\Delta\epsilon = \epsilon_s - \epsilon_\infty$, δίνεται από τις εξισώσεις 3.11, 3.12 ή 3.14, ανάλογα με την περίπτωση.

Η απόκριση ενός συστήματος σε μια διαταραχή μπορεί να εκφραστεί είτε μέσω της αντίστοιχης διαπερατότητας, στη συγκεκριμένη περίπτωση τη διηλεκτρική συνάρτηση, είτε του αντίστοιχου μέτρου. Το ηλεκτρικό μέτρο $M^*(\omega)$ συνδέεται με τη συνάρτηση $\epsilon^*(\omega)$ μέσω της σχέσης $M^*(\omega) \epsilon^*(\omega) = 1$ και έχει χρησιμοποιηθεί και αυτό στην ανάλυση, όπως θα παρουσιαστεί πιο κάτω. Το θεώρημα διακύμανσης – απορρόφησης (*Fluctuation Dissipation Theorem – FDT*) [17] εγγυάται ότι τα μακροσκοπικά μεγέθη $\epsilon^*(\omega)$, $M^*(\omega)$ αντανακλούν τις μικροσκοπικές

ιδιότητες του υλικού, συγκεκριμένα τη συνάρτηση συσχέτισης $\Phi(t) = \frac{\langle \vec{\mu}(t) \cdot \vec{\mu}(0) \rangle}{\langle \vec{\mu}^2 \rangle}$. Ισχύουν οι ακόλουθες σχέσεις μεταξύ της $\Phi(t)$ και της διηλεκτρικής συνάρτησης στα πεδία χρόνων και συχνοτήτων αντίστοιχα:

$$\begin{aligned}\Phi(t) &= \frac{\epsilon(t) - \epsilon(\infty)}{\epsilon(0) - \epsilon(\infty)} \\ \frac{\epsilon^*(\omega) - \epsilon_\infty}{\epsilon_s - \epsilon_\infty} &= 1 - i\omega \int_0^\infty \Phi(t) \exp(-i\omega t) dt\end{aligned}\quad (3.19)$$

Μηχανισμοί χαλάρωσης – κατανομή χαρακτηριστικών χρόνων

Η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου θέτει το σύστημα ελαφρώς εκτός ισορροπίας με σκοπό να βρεθεί ο ρυθμός επαναφοράς του. Η απλούστερη περίπτωση είναι ο ρυθμός μείωσης της πόλωσης να είναι ανάλογος της τιμής της, δηλαδή η ύπαρξη μοναδικού χρόνου χαλάρωσης:

$$\frac{d\vec{P}(t)}{dt} = -\frac{1}{\tau_D} \vec{P}(t) \quad (3.20)$$

που οδηγεί σε εκθετική μορφή της συνάρτησης συσχέτισης $\Phi(t) = \exp(-t/\tau_D)$. Η αντίστοιχη διηλεκτρική συνάρτηση στο πεδίο των χρόνων έχει τη μορφή (από εξ. 3.19)

$$\varepsilon(t) = \varepsilon(\infty) + A \exp(-t/\tau_D) \quad (3.21)$$

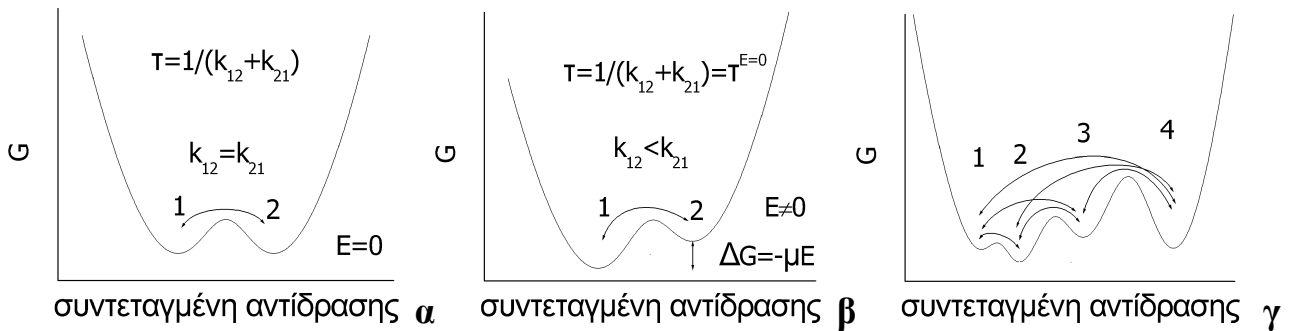
ενώ στο πεδίο συχνοτήτων

$$\begin{aligned} \varepsilon^*(\omega) &= \varepsilon_\infty + (\varepsilon_S - \varepsilon_\infty) \left(1 - i\omega \int_0^\infty \exp(-t/\tau_D) \exp(-i\omega t) dt \right) \\ &= \varepsilon_\infty + (\varepsilon_S - \varepsilon_\infty) \left(1 - \frac{i\omega\tau_D}{1+i\omega\tau_D} \right) \\ &= \varepsilon_\infty + (\varepsilon_S - \varepsilon_\infty) \frac{1}{1+i\omega\tau_D} \\ \varepsilon^*(\omega) &= \varepsilon_\infty + \frac{\Delta\varepsilon}{1+i\omega\tau_D}, \quad \varepsilon'(\omega) = \varepsilon_\infty + \Delta\varepsilon \frac{1}{1+\omega^2\tau_D^2}, \quad \varepsilon''(\omega) = \Delta\varepsilon \frac{\omega\tau_D}{1+\omega^2\tau_D^2} \end{aligned} \quad (3.22)$$

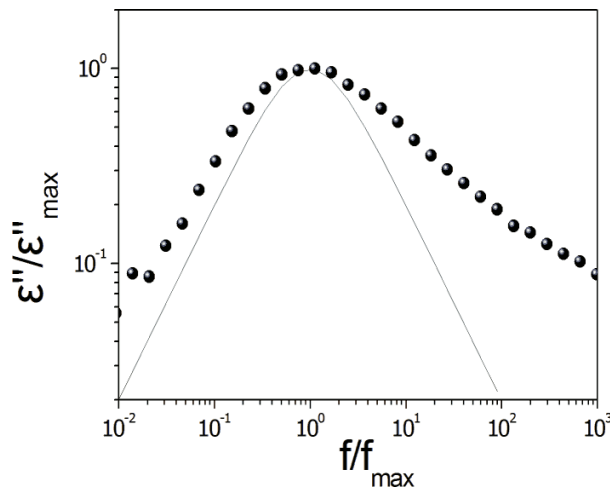
Η περίπτωση ονομάζεται χαλάρωση Debye και μπορεί να ερμηνευτεί μέσω μοντέλου δύο καταστάσεων (εικ. 3.12). Τα ενεργειακά διαγράμματα κατά κανόνα είναι πιο πολύπλοκα, με αποτέλεσμα σπάνια να παρατηρείται χαλάρωση Debye και να υπάρχει ευρεία κατανομή των χρόνων χαλάρωσης. Η εικ. 3.13 δείχνει τις διηλεκτρικές απώλειες (ε'') ενός υλικού και την καμπύλη Debye για σύγκριση. Στην καμπύλη $\Phi(t)$ μπορεί να γίνει προσαρμογή με τη συνάρτηση Kohlrausch-Williams-Watts [18]

$$\Phi(t) = \exp\left(-\left(t/\tau\right)^{\beta_{KWW}}\right) \quad (3.23)$$

όπου η παράμετρος β_{KWW} παίρνει τιμές από 0 ως 1 (συνάρτηση Debye) και δείχνει την κατανομή των χρόνων χαλάρωσης.



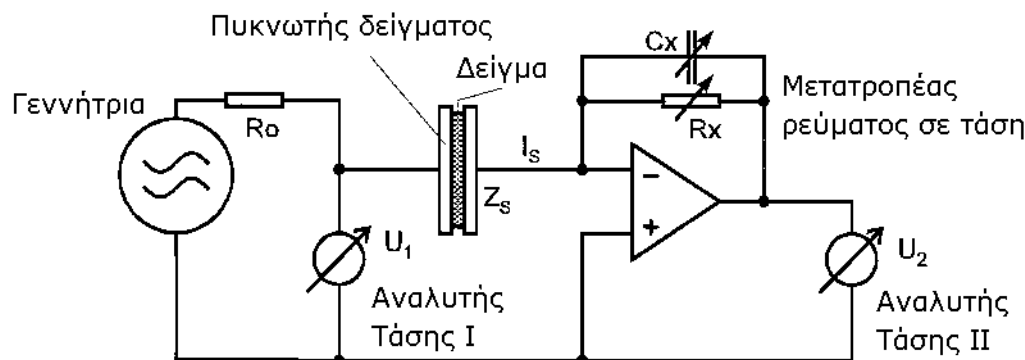
Εικ. 3.12. (α) Μοντέλο δύο καταστάσεων για τη χαλάρωση Debye. Ο μοναδικός χρόνος χαλάρωσης εξαρτάται από το φράγμα δυναμικού μεταξύ των δύο καταστάσεων. (β) Η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου θέτει το σύστημα εκτός ισορροπίας ώστε να μπορεί να μελετηθεί η χαλάρωση μέσω της αλλαγής των πληθυσμών 1 και 2 που διαφέρουν στη διπολική ροπή. (γ) Σε πολύπλοκα ενεργειακά διαγράμματα υπάρχουν πολλά τοπικά ελάχιστα και πολλές μεταβάσεις, επομένως και μια ευρεία κατανομή χρόνων χαλάρωσης.



Εικ. 3.13. Διηλεκτρικές απώλειες ϵ'' σε δείγμα διμερούς αιθυλο-εξυλο-φλουορενίου [9] σε $T=268\text{ K}$ (κύκλοι) και φανταστικό μέρος της συνάρτησης Debye (συνεχής γραμμή). Η ευρεία καμπύλη από το υλικό δείχνει ότι δεν υπάρχει μοναδικός χρόνος χαλάρωσης, αλλά κατανομή γύρω από μια κεντρική τιμή, η οποία επιπλέον είναι ασύμμετρη.

Πειραματική διάταξη

Για τη μέτρηση της διηλεκτρικής συνάρτησης χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα BDS της Novocontrol αποτελούμενο από ένα διηλεκτρικό μετατροπέα ευρείας ζώνης (*Broadband Dielectric Converter – BDC*) και έναν αναλυτή Solartron SI1260, στην περιοχή συχνοτήτων $10^{-2} - 10^6\text{ Hz}$. Τα δείγματα πιέστηκαν ανάμεσα σε δύο μεταλλικά ηλεκτρόδια διαμέτρου 20 mm σχηματίζοντας φιλμ πάχους $\sim 50\text{ }\mu\text{m}$. Η εικόνα 3.14 δείχνει τη διάταξη για τη μέτρηση της σύνθετης αντίστασης του πυκνωτή με διηλεκτρικό το υλικό προς μελέτη.



Εικ. 3.14. Διάταξη μέτρησης της σύνθετης αντίστασης του πυκνωτή με διηλεκτρικό το υλικό προς μελέτη. Ο αναλυτής τάσης I μετράει την τάση στα άκρα του δείγματος, ενώ ο αναλυτής τάσης II σε συνδυασμό με το μετατροπέα ρεύματος σε τάση μετρά το ρεύμα που περνά από το δείγμα. Και οι δύο αναλυτές μετρούν και τη φάση εκτός από το πλάτος των τάσεων, ώστε να υπολογιστεί η μιγαδική σύνθετη αντίσταση. Η διάταξη είναι κατάλληλη για σχετικά χαμηλές συχνότητες ως ~ 100 kHz, λόγω των περιορισμών του μετατροπέα ρεύματος. Τα R_x , C_x παίρνουν διάφορες τιμές που ρυθμίζονται από τον μετατροπέα BDC ώστε να δίνουν σύνθετη αντίσταση παρόμοια με του δείγματος για μεγαλύτερη ακρίβεια.

Οι αναλυτές τάσης εκτός από το πλάτος της τάσης και του ρεύματος στο δείγμα, προσδιορίζουν και τη φάση μεταξύ τους οπότε λαμβάνεται η μιγαδική σύνθετη αντίσταση

$$Z^* \equiv Z' - iZ'' = \frac{U_1}{I_s} = -\frac{U_1}{U_2} Z_x \quad (3.24)$$

όπου Z_x η σύνθετη αντίσταση των παράλληλα συνδεδεμένων R_x και C_x . Η διηλεκτρική συνάρτηση $\varepsilon^*(\omega)$ υπολογίζεται από την εξίσωση

$$\varepsilon^*(\omega) = \frac{1}{i\omega C_0 Z^*(\omega)} \Rightarrow \varepsilon' = \frac{Z''}{\omega C_0 |Z|^2}, \varepsilon'' = \frac{Z'}{\omega C_0 |Z|^2} \quad (3.25)$$

όπου C_0 η χωρητικότητα του πυκνωτή χωρίς διηλεκτρικό, που υπολογίζεται από τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του. Από το $\varepsilon^*(\omega)$ υπολογίζεται το ηλεκτρικό μέτρο και η μιγαδική αγωγιμότητα

$$M^*(\omega) \equiv M' + iM'' = \frac{1}{\varepsilon^*(\omega)} \Rightarrow M' = \frac{\varepsilon'}{\varepsilon'^2 + \varepsilon''^2}, M'' = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'^2 + \varepsilon''^2} \quad (3.26)$$

$$\sigma^*(\omega) \equiv \sigma' - i\sigma'' = i\omega\varepsilon_0\varepsilon^*(\omega) \Rightarrow \sigma' = \omega\varepsilon_0\varepsilon'', \sigma'' = \omega\varepsilon_0\varepsilon' \quad (3.27)$$

Αν το υλικό είναι ωμικός αγωγός, τότε $Z = R$ και $\varepsilon' = 0$, $\varepsilon'' = 1/\omega RC_0$, δηλαδή η ιοντική αγωγιμότητα εμφανίζεται μόνο στο φανταστικό μέρος.

Για τις μετρήσεις που έγιναν συναρτήσει μόνο της θερμοκρασίας χρησιμοποιήθηκε ένας κρουστάτης της Novocontrol που ρυθμίζει τη θερμοκρασία με ρεύμα αερίου αζώτου στην περιοχή 113–573 K με ακρίβεια ± 0.01 K. Στις μετρήσεις συναρτήσει της πίεσης και της θερμοκρασίας χρησιμοποιήθηκε ένα υδραυλικό σύστημα που εξασκεί υδροστατική πίεση στο δείγμα μέσω λαδιού σιλικόνης. Τα δείγματα φτιάχτηκαν με τρόπο ανάλογο με αυτών της θερμοκρασίας και κατόπιν μονώθηκαν με ταινία Teflon και εποξειδική κόλλα, ώστε να μην εισχωρεί το λάδι. Το σύστημα έχει τη δυνατότητα εξάσκησης πίεσης 0.1–300 MPa στην περιοχή θερμοκρασιών 293–523 K. Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις με πίεση συνδυάστηκαν με τις μετρήσεις πίεσης-όγκου-θερμοκρασίας ώστε να μπορούν να εκφραστούν οι χρόνοι χαλάρωσης συναρτήσει των τριών παραμέτρων P, V, T .

Ανάλυση μετρήσεων

Η εικ. 3.15α δείχνει τις καμπύλες ϵ' και ϵ'' συναρτήσει της συχνότητας για ένα υλικό. Παρατηρείται ένας μοριακός μηχανισμός χαλάρωσης (τοπικό μέγιστο ϵ'' και σκαλοπάτι ϵ'), συγκεκριμένα ο τμηματικός μηχανισμός, σε συχνότητα $\sim 10^7$ Hz, σε χαμηλότερες συχνότητες η ιοντική αγωγιμότητα ($\epsilon'' \sim \sigma/\omega\epsilon_0$) και σε ακόμα χαμηλότερες η πόλωση των ηλεκτροδίων λόγω συσσώρευσης φορτίων σε αυτά. Από την ανάλυση εξαιρέθηκε η περιοχή όπου εμφανίζεται η πόλωση των ηλεκτροδίων.

Οι μηχανισμοί χαλάρωσης σπάνια περιγράφονται ικανοποιητικά από τη συνάρτηση Debye, γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε η εμπειρική συνάρτηση των Havriliak και Negami [19]

$$\frac{\epsilon^*(\omega, T, P) - \epsilon_\infty(T, P)}{\Delta\epsilon(T, P)} = \frac{1}{\left(1 + (i\omega\tau_{HN})^\alpha\right)^\gamma} \quad (3.28)$$

όπου $\Delta\epsilon$ είναι η διηλεκτρική ισχύς του υπό εξέταση μηχανισμού, τ_{HN} είναι ο χαρακτηριστικός χρόνος της συνάρτησης, ενώ οι παράμετροι α και γ περιγράφουν τη συμμετρική και ασύμμετρη διεύρυνση της κατανομής χρόνων χαλάρωσης, αντίστοιχα. Οι τιμές των α και γ για τα δεδομένα της εικ. 3.13 είναι 0.96 και 0.48, αντίστοιχα ($\alpha=\gamma=1$ αντιστοιχούν στη συνάρτηση Debye). Οι χρόνοι χαλάρωσης που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία αντιστοιχούν στις μέγιστες απώλειες ϵ'' (Εξ. 3.32) και σχετίζονται με τις παραμέτρους της συνάρτησης HN μέσω της σχέσης

$$\tau_{\max} = \tau_{HN} \left[\frac{\sin\left(\frac{\alpha\gamma\pi}{2(1+\gamma)}\right)}{\sin\left(\frac{\alpha\pi}{2(1+\gamma)}\right)} \right]^{1/\alpha} \quad (3.29)$$

ενώ η παράμετρος $\beta_{κωω}$ της αντίστοιχης συνάρτησης συσχέτισης συνδέεται με τις παραμέτρους α, γ μέσω της προσεγγιστικής σχέσης $\alpha\gamma = \beta_{κωω}^{1.23}$ [20].

Λόγω της συνύπαρξης πολλών μηχανισμών χαλάρωσης και ιοντικής αγωγιμότητας, η προσαρμογή (*fit*) στα πειραματικά δεδομένα έγινε με άθροισμα τόσων συναρτήσεων HN όσοι και οι μηχανισμοί συν τη συνεισφορά της αγωγιμότητας. Η προσαρμογή έγινε με το λογισμικό Origin της OriginLab. Κυρίως χρησιμοποιήθηκε το ε'' και το φανταστικό μέρος της HN (Εξ. 3.32), αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε και η παράγωγος του πραγματικού μέρους ε' [21]

$$\varepsilon''_{der} = -\pi/2(\partial\varepsilon'/\partial \ln \omega), \quad \omega = 2\pi f \quad (3.30)$$

που δίνει ένα παρόμοιο φάσμα με το ε'' , χωρίς ιοντική αγωγιμότητα και με στενότερες κορυφές, επιτρέποντας την εξαγωγή ακριβέστερων αποτελεσμάτων [16]. Η προσαρμογή έγινε με την αντίστοιχη παράγωγο του πραγματικού μέρους της συνάρτησης HN (Εξ. 3.28), και βρέθηκε να δίνει της ίδιες τιμές $\Delta\varepsilon, \tau_{HN}, \alpha, \gamma$ (μέσα στο πειραματικό σφάλμα) με την ανάλυση του ε'' στις περιπτώσεις καλά διαχωρισμένων μηχανισμών και πολύ μικρότερα σφάλματα, όταν υπάρχει επικάλυψη ή αγωγιμότητα.

$$\varepsilon'_{HN} = \Delta\varepsilon \frac{\cos \vartheta}{\left(1 + 2(\omega\tau)^\alpha \cos(\alpha\pi/2) + (\omega\tau)^{2\alpha}\right)^{\gamma/2}} \quad (3.31)$$

$$\varepsilon''_{HN} = \Delta\varepsilon \frac{\sin \vartheta}{\left(1 + 2(\omega\tau)^\alpha \cos(\alpha\pi/2) + (\omega\tau)^{2\alpha}\right)^{\gamma/2}} \quad (3.32)$$

$$\varepsilon''_{der} = -\frac{\pi}{2} \Delta\varepsilon \frac{\alpha\gamma(\omega\tau)^\alpha \left(\cos\left(\vartheta - \frac{\alpha\pi}{2}\right) + \cos\vartheta(\omega\tau)^\alpha\right)}{\left(1 + 2(\omega\tau)^\alpha \cos(\alpha\pi/2) + (\omega\tau)^{2\alpha}\right)^{(1+\gamma/2)}} \quad (3.33)$$

όπου

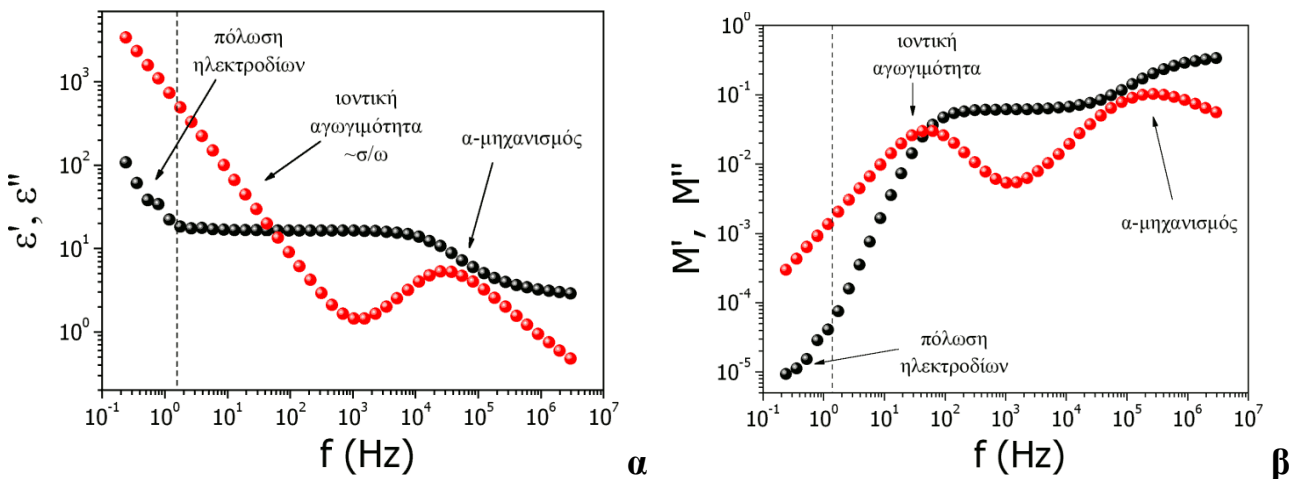
$$\vartheta = \gamma \operatorname{atan} \left(\frac{(\omega\tau)^\alpha \sin(\alpha\pi/2)}{1 + (\omega\tau)^\alpha \cos(\alpha\pi/2)} \right) \quad (3.34)$$

Σε αρκετές περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση το ηλεκτρικό μέτρο αντί της διαπερατότητας. Αυτή η ανάλυση απαιτείται όταν συγκρίνονται αποτελέσματα $\Delta\Phi$ με αντίστοιχα ρεολογίας. Τα αντίστοιχα M' και M'' της εικ. 3.15α φαίνονται στην εικ. 3.15β. Οι μηχανισμοί

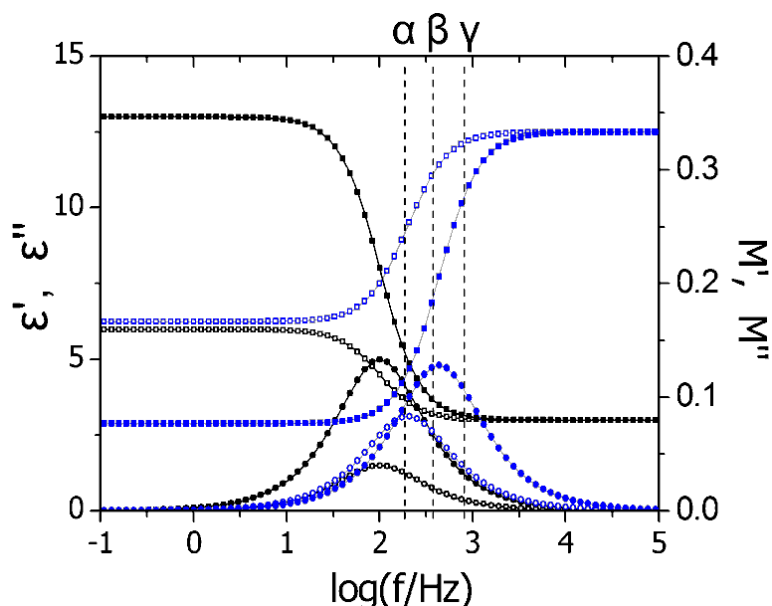
χαλάρωσης εμφανίζονται ως μέγιστα του M'' , αλλά σε λίγο διαφορετική θέση από το ε'' . Η συνάρτηση HN ισχύει μόνο προσεγγιστικά και οι θέσεις των μεγίστων στο M'' και ε'' συνδέονται μέσω της επίσης προσεγγιστικής σχέσης

$$\tau_{M''} \sim \tau_{\varepsilon''} \left(1 + \frac{\Delta\varepsilon}{\varepsilon_{\infty}} \right)^{-1/\beta_{κιν}} \quad (3.35)$$

δηλαδή στο M'' εμφανίζεται σε μεγαλύτερες συχνότητες (εικ. 3.16). Το πλεονέκτημα της αναπαράστασης μέσω του $M^*(\omega)$ είναι ότι η συνεισφορά της αγωγιμότητας εμφανίζεται ως μέγιστο του M'' όπου τέμνονται οι καμπύλες M' και M'' , και επομένως μπορεί να εξαχθεί ο χαρακτηριστικός χρόνος της κίνησης των ιόντων. Επιπλέον, τυχόν ασυμμετρία γύρω από το μέγιστο είναι ένδειξη μοριακού μηχανισμού «κρυμμένου» κάτω από την αγωγιμότητα [17].



Εικ. 3.15. (α) Πραγματικό (ε' , μαύρα σημεία) και φανταστικό (ε'' , κόκκινα σημεία) μέρος της διηλεκτρικής συνάρτησης $\varepsilon^*(\omega)$ της μ-κρεσόλης στους 228 K. Σε υψηλές συχνότητες εμφανίζεται μοριακός μηχανισμός χαλάρωσης (κορυφή στο ε'' , σκαλοπάτι στο ε'), σε χαμηλότερες η ιοντική αγωγιμότητα ($\varepsilon'' \sim 1/\omega$, $\varepsilon' = \text{σταθερό}$) και σε ακόμα πιο χαμηλές η πόλωση των ηλεκτροδίων (απότομη αύξηση ε' , μικρή μείωση της κλίσης του ε'') που προκαλεί προβλήματα στην ανάλυση, γι' αυτό και η περιοχή συχνοτήτων όπου εμφανίζεται (αριστερά της διακεκομμένης γραμμής) εξαιρείται από την προσαρμογή. (β) Πραγματικό (M' , μαύρα σημεία) και φανταστικό (M'' , κόκκινα σημεία) μέρος του ηλεκτρικού μέτρου της μ-κρεσόλης στους 228 K. Ο μοριακός μηχανισμός εμφανίζεται ως κορυφή του M'' και σκαλοπάτι του M' , σε αναλογία με τα ε'' και ε' , αλλά η αγωγιμότητα εμφανίζεται ως κορυφή του M'' στο σημείο όπου M' και M'' τέμνονται. Σε χαμηλές συχνότητες τα M' και M'' έχουν εξάρτηση $\sim \omega^2$ και $\sim \omega^1$, αντίστοιχα. Από το σημείο τομής μπορεί να εξαχθεί ο χαρακτηριστικός χρόνος κίνησης των ιόντων.



Εικ. 3.16. Μετατόπιση των μεγίστων του M'' σε σχέση με το ε'' . Οι καμπύλες προέρχονται από προσομοίωση με συνάρτηση Debye (Εξ. 3.22) με παραμέτρους $\varepsilon_\infty=3$, $\tau=10^{-2}$ s και $\Delta\varepsilon=3$ (ανοιχτά σημεία) ή $\Delta\varepsilon=10$ (κλειστά σημεία). Τα μαύρα και μπλε σημεία αντιστοιχούν στο ε'' και το M'' , ενώ τα τετράγωνα και οι κύκλοι στο πραγματικό και φανταστικό μέρος των μεγεθών. Οι κατακόρυφες διακεκομμένες γραμμές που σημειώνονται με α , β , γ δείχνουν τη θέση των μεγίστων του ε'' , του M'' για $\Delta\varepsilon=3$ και του M'' για $\Delta\varepsilon=10$, αντίστοιχα. Η μετατόπιση αυξάνεται με την αύξηση του λόγου $\Delta\varepsilon/\varepsilon_\infty$.

3.3.2 Ρεολογία

Σε ορισμένα δείγματα έγιναν ρεολογικές μετρήσεις με σκοπό να βρεθεί η σχέση των διηλεκτρικά ενεργών μηχανισμών με τις μηχανικά ενεργές κινήσεις του μορίου. Οι μετρήσεις έγιναν στο MPI-P στο εργαστήριο του T. Pakula. Οι ιξωδοελαστικές ιδιότητες μετρήθηκαν με ένα ρεομετρικό σύστημα (Advanced Rheometric Expansion System – ARES) σε ταλαντωτικό τρόπο λειτουργίας, όπου το δείγμα ήταν τοποθετημένο μεταξύ δύο παραλλήλων πλακών (εικ. 3.17α). Στο δείγμα ασκείται διατμητική τάση σ και προκαλείται παραμόρφωση γ , οπότε μπορεί να υπολογιστεί το μέτρο διάτμησης $G=\sigma/\gamma$. Στη συγκεκριμένη διάταξη η παραμόρφωση είναι ανάλογη της γωνίας θ και της απόστασης r από τον άξονα περιστροφής, ενώ η τάση είναι περίπου ανάλογη της ροπής M :

$$\gamma = \frac{\theta r}{h} \quad \dot{\gamma} = \frac{r}{h} \frac{d\theta}{dt} = \frac{\Omega r}{h} \quad \sigma = \frac{M}{2\pi R^3} \left(3 + \frac{d \ln M}{d \ln \dot{\gamma}_R} \right) \quad (3.36)$$

όπου h το πάχος του δείγματος. Ο ρυθμός παραμόρφωσης $\dot{\gamma}$ δεν είναι ομοιόμορφος σε όλη τη μάζα του υλικού, αλλά μπορεί να γίνει διόρθωση. Η τιμή $\dot{\gamma}_R$ αναφέρεται σε $r=R$. Στον ταλαντωτικό τρόπο λειτουργίας η γωνία θ , και επομένως και τα μεγέθη γ , $\dot{\gamma}$, M , σ , και $\Omega=d\theta/dt$ που εξαρτώνται από αυτή, μεταβάλλεται ημιτονοειδώς με το χρόνο.

$$\theta = \theta_0 \sin \omega t \Rightarrow \gamma = \frac{\theta_0 r}{h} \sin \omega t = \gamma_0 \sin \omega t \quad (3.37)$$

$$\sigma = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta)$$

$$\gamma^* = \gamma_0 e^{i\omega t}, \sigma^* = \sigma_0 e^{i(\omega t + \delta)} \quad (3.38)$$

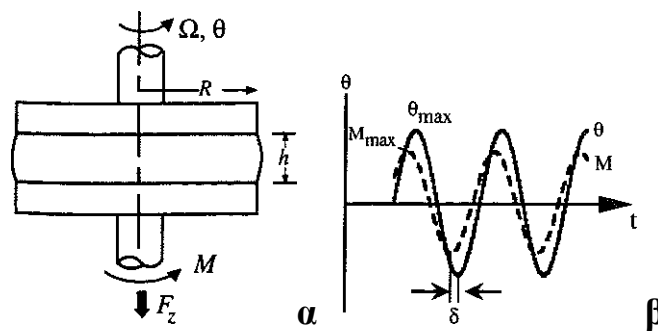
όπου δ η διαφορά φάσης τάσης-παραμόρφωσης. Το μέτρο διάτμησης $G^*(\omega)$ που προκύπτει είναι μιγαδικό

$$G^* = G' + iG'' = \sigma^*/\gamma^* = \sigma_0/\gamma_0 e^{i\delta}, \quad |G^*| = K \theta_{\max}/M_{\max}, G''/G' = \tan \delta \quad (3.39)$$

όπου K σταθερά που εξαρτάται από τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της διάταξης. Από τη ρεολογία μπορεί επίσης να υπολογιστεί το δυναμικό ιξώδες $\eta^*(\omega)$:

$$\eta^* = \eta' + i\eta'' = \sigma^*/\dot{\gamma}^*, \quad \eta' = G''/\omega, \eta'' = G'/\omega \quad (3.40)$$

Για ένα ιδανικό ελαστικό στερεό το $|G^*(\omega)|$ είναι ανεξάρτητο του ω και $G''=\eta''=0$, ενώ για ένα ιδανικό (Νευτώνειο) ρευστό το ιξώδες $|\eta^*(\omega)|$ είναι σταθερό και $G'=0$. Σε ένα ιξωδοελαστικό υλικό το μέτρο διάτμησης και το ιξώδες είναι μιγαδικά. Πρέπει να σημειωθεί ότι για να ισχύουν οι πιο πάνω εξισώσεις ο ρυθμός διάτμησης $\dot{\gamma}$ πρέπει να είναι μικρός, διαφορετικά εμφανίζονται μη γραμμικά φαινόμενα.



Εικ. 3.17. (α) Πειραματική διάταξη ρεολογικών μετρήσεων τύπου παραλλήλων πλακών. Στον ταλαντωτικό τρόπο λειτουργίας η γωνία θ μεταβάλλεται περιοδικά με το χρόνο, $\theta = \theta_0 \sin \omega t$, όπως και τα μεγέθη γ , M , σ , και $\Omega = d\theta/dt$ που εξαρτώνται από αυτή. (β) Η τάση (διακεκομμένη γραμμή, δείχνεται η ροπή M που είναι περίπου ανάλογη της τάσης σ) και η παραμόρφωση (συνεχής γραμμή, γωνία στροφής θ που είναι ανάλογη της παραμόρφωσης γ) έχουν γενικά διαφορά φάσης δ μεταξύ τους. Από την ανάλυση προκύπτει το μιγαδικό μέτρο διάτμησης $G^* = \sigma^*/\dot{\gamma}^* = G' + iG''$, με $\tan \delta = G''/G'$.

Η εικ. 3.18 δείχνει την εξάρτηση των G' και G'' για ένα πολυμερές. Οι καμπύλες

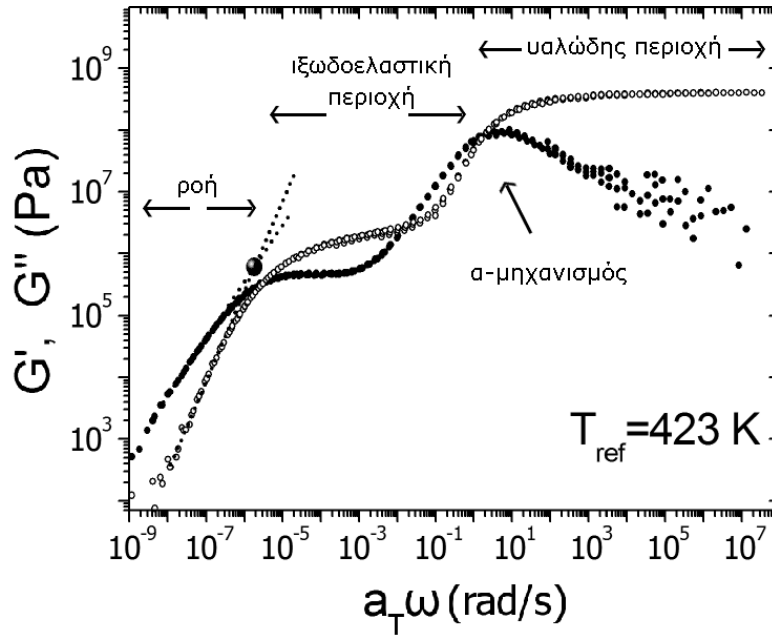
προέρχονται από υπέρθεση πειραματικών αποτελεσμάτων σε διαφορετικές θερμοκρασίες, λόγω του περιορισμένου εύρους συχνοτήτων της πειραματικής διάταξης (~ 4 δεκάδες). Η εικόνα είναι τυπική για τήγματα πολυμερών και μπορεί να χωριστεί σε τρεις περιοχές: (α) στην υαλώδη περιοχή σε υψηλές συχνότητες (εδώ πάνω από ~ 10 rad/s) όπου $|G^*| \geq 10^9$ Pa και $G' > G''$, δηλαδή το υλικό πλησιάζει τη συμπεριφορά ελαστικού στερεού, το όριο της οποίας είναι η συχνότητα όπου εμφανίζεται ο τμηματικός (α -) μηχανισμός χαλάρωσης, (β) σε χαμηλότερες συχνότητες υπάρχει μία περιοχή σταθερού $G' \sim 10^6$ Pa όπου το υλικό έχει ιξωδοελαστική συμπεριφορά (*rubbery plateau*) και (γ) σε πολύ χαμηλές συχνότητες όπου $G' < G''$ και $G' \sim \omega^2$ και $G'' \sim \omega^1$ το σύστημα εμφανίζει ιξώδη ροή. Το σημείο που εμφανίζεται η ροή σχετίζεται με τη χαλάρωση απ' άκρου εις άκρον (*end-to-end*) του μακρομορίου και εξαρτάται ισχυρά από το μοριακό βάρος, σε αντίθεση με τον α -μηχανισμό που είναι σχεδόν ανεξάρτητος. Η μορφή του $G^*(\omega)$ στην περιοχή ροής εξηγείται ως εξής: θεωρώντας ότι στο πεδίο χρόνων το $G(t)$ έχει εκθετική μορφή $G(t) = G_0 e^{-t/\tau}$ (ανάλογο με τη συνάρτηση Debye του $\varepsilon^*(\omega)$) και μετασχηματίζοντας στο πεδίο συχνοτήτων μέσω της σχέσης

$$G^*(\omega) = i\omega \int_0^{\infty} G(t) e^{-i\omega t} dt \quad \text{αποδεικνύεται ότι} \quad G' = G_0 \frac{\omega^2 \tau^2}{1 + \omega^2 \tau^2}, \quad G'' = G_0 \frac{\omega \tau}{1 + \omega^2 \tau^2}, \quad \text{δηλαδή για}$$

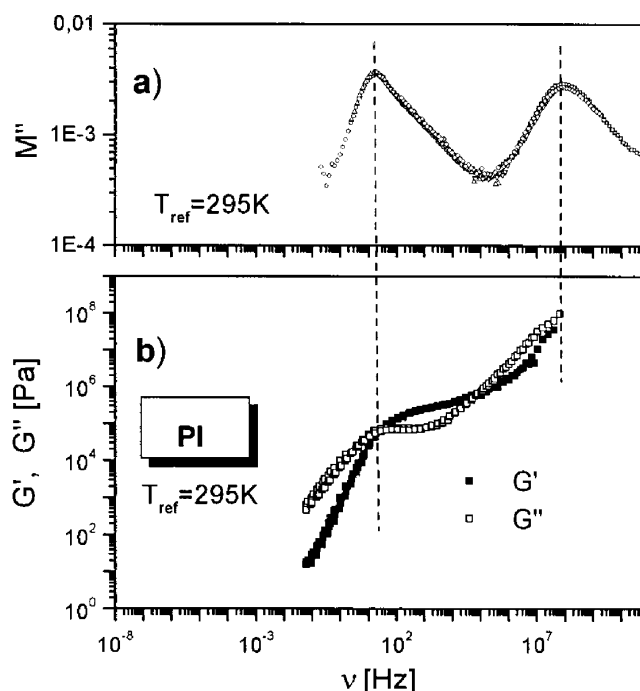
$\omega \tau \ll 1$ (συχνότητα μικρότερη από το $1/\tau$ του πιο αργού μηχανισμού) ισχύει $G' \sim \omega^2$ και $G'' \sim \omega^1$ [22,23].

Το μιγαδικό μέτρο διάτμησης $G^*(\omega, T)$ μπορεί να συγκριθεί με το ηλεκτρικό μέτρο $M^*(\omega, T)$ με το οποίο έχει αρκετές ομοιότητες. Η εικ. 3.19 δείχνει το ηλεκτρικό και το διατμητικό μέτρο για ένα δείγμα *cis*-πολυϊσοπρενίου [24]. Ο τμηματικός μηχανισμός εμφανίζεται ως κορυφή στα M'' και G'' και σκαλοπάτι στα M' και G' , ενώ η ροή του συστήματος, που εμφανίζεται στο σημείο όπου τέμνονται τα G' και G'' κάτω από το οποίο η εξάρτησή τους είναι $\sim \omega^2$ και $\sim \omega^1$, αντίστοιχα, συμπίπτει με την περιοχή όπου εμφανίζεται ο αργός μηχανισμός χαλάρωσης απ' άκρου εις άκρον στις διηλεκτρικές μετρήσεις.

Τα δείγματα που μετρήθηκαν είχαν διάμετρο 6 mm και πάχος 1 mm. Έγιναν πειράματα με μεταβολή του ρυθμού διάτμησης $\dot{\gamma}$ ώστε να βρεθούν τα όρια της γραμμικής περιοχής, μετρήσεις με μεταβολή της θερμοκρασίας κρατώντας σταθερή τη συχνότητα σε $\omega = 10$ rad/s, και μετρήσεις συναρτήσεως της συχνότητας περιστροφής σε επιλεγμένες θερμοκρασίες στην περιοχή 293–473 K. Επιπλέον έγιναν ταυτόχρονες διηλεκτρικές μετρήσεις με την εφαρμογή διάφορων ρυθμών διάτμησης.



Εικ. 3.18. Πραγματικό (G' , ανοιχτά σημεία) και φανταστικό (G'' , κλειστά σημεία) μέρος του μέτρου διάτμησης δείγματος bisphenol-A polycarbonate (BPA-PC). Οι καμπύλες (master curves) προέρχονται από υπέρθεση μετρήσεων σε διάφορες θερμοκρασίες γύρω από τη θερμοκρασία αναφοράς $T_{ref}=423 \text{ K}$. Διακρίνονται τρεις περιοχές: (α) η υαλώδης περιοχή όπου $|G^*| \geq 10^9 \text{ Pa}$ και $G' > G''$, (β) η ιξωδοελαστική περιοχή με σταθερό $G' \sim 10^6 \text{ Pa}$, και (γ) η περιοχή ιξώδους ροής όπου $G' < G''$ και $G' \sim \omega^2$ και $G'' \sim \omega^1$. Το όριο της υαλώδους περιοχής είναι η συχνότητα όπου εμφανίζεται ο τμηματικός (α -) μηχανισμός (εικ. από [25]).



Εικ. 3.19. Σύγκριση του ηλεκτρικού (πάνω, δείχνεται μόνο το φανταστικό μέρος M'') και διατμητικού μέτρου (κάτω, το πραγματικό G' και το φανταστικό G'' μέρος αντιστοιχούν στα κλειστά και ανοιχτά σύμβολα) σε δείγμα *cis*-πολυϊσοπρενίου. Οι καμπύλες (master curves) προέρχονται από υπέρθεση πολλών πειραματικών αποτελεσμάτων ως προς τις αντίστοιχες σε $T_{ref}=295$ K. Ο μηχανισμός στα $\sim 10^8$ Hz είναι ο τμηματικός και εμφανίζεται ως κορυφή στα M'' και G'' και σκαλοπάτι στα M' (δεν δείχνεται) και G'' , ενώ ο αργός μηχανισμός στα 10^2 Hz αντιστοιχεί στη χαλάρωση απ' άκρου εις άκρου και τη ροή του συστήματος (σε χαμηλότερες συχνότητες $G' \sim \omega^2$ και $G'' \sim \omega^1$, αντίστοιχα με την ιοντική αγωγιμότητα στο ηλεκτρικό μέτρο (εικ. 3.17β)) (εικ. από [24]).

Αναφορές

- [1] Floudas, G.; Papadopoulos, P.; Klok, H.-A.; Vandermeulen, G. W. M.; Rodriguez-Hernandez, J. *Macromolecules* **36**, 3673 (2003).
- [2] Klok, H.-A.; Langenwalter, J. F.; Lecommandoux, S. *Macromolecules* **33**, 7819 (2000).
- [3] Lecommandoux, S.; Achard, M. F.; Langenwalter, J. F.; Klok, H.-A. *Macromolecules* **34**, 9100 (2001).
- [4] McKinnon, A. J.; Tobolsky, A. V. *J. Phys. Chem.* **70**, 1453 (1966).
- [5] Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *Biomacromolecules* **5**, 1653 (2004).
- [6] Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *Biomacromolecules* **6**, 2352 (2005).
- [7] Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Lieberwirth, I.; Nguyen, T. Q.; Klok, H.-A. *Biomacromolecules* 2005 (submitted).
- [8] Block, H. in *Poly(γ -benzyl-L-glutamate) and other glutamic acid containing polymers*;

Gordon and Breach Science Publishers: New York 1983.

[9] Nam, J. Y.; Ray, S. S.; Okamoto, M. *Macromolecules* **36**, 7126 (2003).

[10] Papadopoulos P.; Floudas, G.; Chi, C.; Wegner, G. *J. Chem. Phys.* **120**, 2368 (2004).

[11] Tait, P. G. *Physics and Chemistry of the Voyage of H. M. S. Challenger*; HMSO: London, 1888; Vol. 2, Part 4.

[12] (a) Stockmayer, W. H. *Pure Appl. Chem.* **15**, 539 (1967). (b) Watanabe, H. *Macromol. Rapid Commun.* **22**, 127 (2001).

[13] Onsager, L. *J. Am. Chem. Soc.* **58**, 1486 (1938).

[14] McCrum, B. G.; Read, B. E.; Williams, G. in *Anelastic and Dielectric Effects in Polymeric Solids* (Dover, New York, 1991).

[15] Buckingham, A. D. *Australian J. Chem.* **6**, 93, 323 (1953).

[16] Applequist, J.; Mahr, T.G. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 5419 (1966).

[17] *Broadband Dielectric Spectroscopy*; Kremer, F., Schönhals, A., Eds.; Springer: New York, 2003.

[18] (a) Kohlrausch, R. *Pogg. Ann. Phys.* **12**, 393 (1847). (b) Williams, G.; Watts, D. C. *Trans. Faraday Soc.* **66**, 80 (1970). (c) Williams, G.; Watts, D. C.; Dev, S. B.; North, A. M. *Trans. Faraday Soc.* **67**, 1323 (1971).

[19] Havriliak, S.; Negami, S. *Polymer* **8**, 161 (1967).

[20] Alvarez, F.; Alegría, A.; Colmenero, J. *Phys. Rev. B* **44**, 7306 (1991).

[21] Steeman, P. A. M.; van Turnhout, J. *Macromolecules* **27**, 5421 (1994).

[22] Macosko, C. W. in *Rheology: Principles, Measurements and Applications*; John Wiley & Sons Inc., New York 1994.

[23] Doi, M.; Edwards, S. F. in *The theory of Polymer Dynamics*; Oxford University Press Inc., New York 1986.

[24] Gohr, K.; Pakula, T.; Tsutsumi, K.; Schärftl, W. *Macromolecules* **32**, 7156 (1999).

[25] Mpoukouvalas, K.; Gomopoulos, N.; Floudas, G. 2005 (*in preparation*).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΥΤΟ-ΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΥΑΛΩΔΟΥΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

4.1 Εισαγωγή

Η βιολογική δράση των πρωτεϊνών και άλλων βιοπολυμερών εξαρτάται από την εσωτερική δυναμική τους σε διάφορες κλίμακες μηκών και χρόνου. Ειδικότερα, η δυναμική μετάβαση που χαρακτηρίζεται ως μετάβαση υάλου, η οποία έχει παρατηρηθεί με διάφορες μεθόδους που αναφέρθηκαν στο Κεφ. 2 [1-8], εμποδίζει τη βιολογική δράση των πρωτεϊνών [1,2]. Παρόλο που η ύπαρξή της δεν αμφισβητείται, υπάρχει ασυμφωνία σχετικά με την προέλευσή της. Πολλές εργασίες προτείνουν ότι είναι χαρακτηριστικό των μικρών μορίων διαλυτών που συνυπάρχουν με τα πεπτιδικά μακρομόρια [1,2], άλλες ότι οφείλεται σε κινήσεις πλευρικών αλυσίδων στις οποίες δεν συμμετέχει η κύρια [9-14], ενώ άλλες θεωρούν ότι αντανακλά «πάγωμα» της συνολικής δυναμικής των πρωτεϊνών [3].

Σε αυτό το κεφάλαιο θα παρουσιαστούν αποτελέσματα της δυναμικής ομοπολυμερών πεπτιδίων παρουσία και απουσία διαλύτη με σκοπό να διασαφηνιστεί η προέλευση της δυναμικής μετάβασης υάλου. Γι' αυτό το σκοπό επιλέχθηκαν συστήματα με αρκετά διαφορετικές πλευρικές αλυσίδες: πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ) (PBLG), πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνη) (PZLL), πολυγλυκίνη (PGly), πολυ(L-λευκίνη) (Pleu) και πολυ(ο-βενζυλο-L-τυροσίνη) (PTyr), ώστε να διερευνηθεί το κατά πόσον η μετάβαση αποτελεί γενικό χαρακτηριστικό των πεπτιδίων. Για να διερευνηθεί η προέλευση της μετάπτωσης, δηλαδή κατά πόσον οφείλεται στην έλλειψη ικανής θερμικής ενέργειας ή στην έλλειψη ελεύθερου όγκου, έγιναν μετρήσεις συναρτήσεων της θερμοκρασίας και της πίεσης [15], δείχνοντας ότι η θερμική ενέργεια, σε αντίθεση με τον ελεύθερο όγκο, είναι η παράμετρος που ελέγχει τη μετάβαση. Αποδείχθηκε ότι η «μετάβαση» υάλου είναι ενδογενές χαρακτηριστικό των πεπτιδίων, που σχετίζεται με τη χαλάρωση ή το σπάσιμο δεσμών

υδρογόνου σε σημεία που θα ονομάζονται «ατέλειες» [16,17].

4.2 Ομοπολυπεπτίδια πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικού οξέος) (PBLG) διαφόρων μοριακών βαρών

Είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες ότι τα πεπτίδια PBLG σχηματίζουν δύο δευτεροταγείς δομές: α -έλικες και β -φύλλα [18,19]. Ειδικότερα, η α -έλικα θεωρείται ότι συμπεριφέρεται ως άκαμπτη ράβδος και έχει χρησιμοποιηθεί σαν μοντέλο ραβδοειδούς πολυμερούς [20-22]. Παράλληλα προς τον άξονα της έλικας, υπάρχει μεγάλη ηλεκτρική διπολική ροπή, γι' αυτό και έχουν γίνει διηλεκτρικές μετρήσεις σε τήγματα και σε διαλύματα, από τα οποία προσδιορίστηκε ότι η διπολική ροπή είναι ~ 3.5 Debye/μονομερές [23-25]. Παρά την αντίληψη ότι η δομή είναι άκαμπτη, υπάρχουν πειραματικά δεδομένα σε διαλύματα [26-28], αλλά και θεωρητικές προβλέψεις [29], που δείχνουν κάποια ευκαμψία. Σχετικά με τη μετάβαση υάλου, τα πειραματικά δεδομένα είναι πιο συγκεκριμένα: στα τήγματα βρέθηκε ένας μηχανισμός χαλάρωσης, που σχετίζεται με τη μετάβαση υάλου και που στη βιβλιογραφία αποδίδεται σε κινήσεις πλευρικών αλυσίδων, και ένας πιο αργός που θεωρείται ότι αντανάκλα την κίνηση της α -έλικας – ράβδου μέσα σε κώνο [9-14]. Αντίθετα, από προσομοιώσεις το T_g αποδίδεται στο πάγωμα των βαθμών ελευθερίας κίνησης του διαλύτη [1,2]. Παρά το σημαντικό αριθμό εργασιών, δεν υπάρχει πλήρης κατανόηση των μηχανισμών χαλάρωσης, καθώς δεν έγιναν μελέτες συναρτήσεως του μοριακού βάρους των πεπτιδίων, των διαφορετικών αμινοξέων και των αντίστοιχων δευτεροταγών δομών.

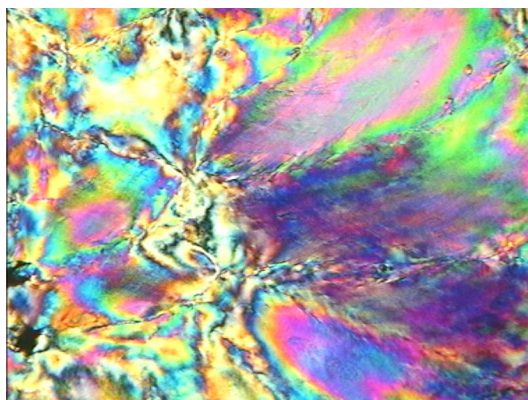
Σε αυτό το τμήμα θα παρουσιαστούν πειραματικά αποτελέσματα για τη δομή (από μετρήσεις POM, ΔΘΣ, PVT, WAXS, NMR και FTIR) και τη δυναμική (ΔΦ και ρεολογία) της σειράς πεπτιδίων PBLG του Πίνακα 3.1. Βρέθηκε εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής από το μοριακό βάρος, πολλαπλοί διηλεκτρικοί ενεργοί μηχανισμοί χαλάρωσης σε μικρότερες και μεγαλύτερες θερμοκρασίες από το σημείο υάλου, ενώ η εξάρτηση της δυναμικής από το μοριακό βάρος δείχνει την ύπαρξη ατελειών στην α -έλικα, και την ύπαρξη τελείως άμορφων τμημάτων που είναι υπεύθυνα για την «υαλώδη μετάπτωση». Επίσης μελετήθηκε ο μηχανισμός υάλου σε διαλύματα PBLG/μ-κρεσόλης (Πίνακας 3.7) και δείχθηκε ότι ο μηχανισμός αυτός είναι χαρακτηριστικό των πεπτιδίων και όχι του διαλύτη.

4.2.1 Δομή των πεπτιδίων PBLG

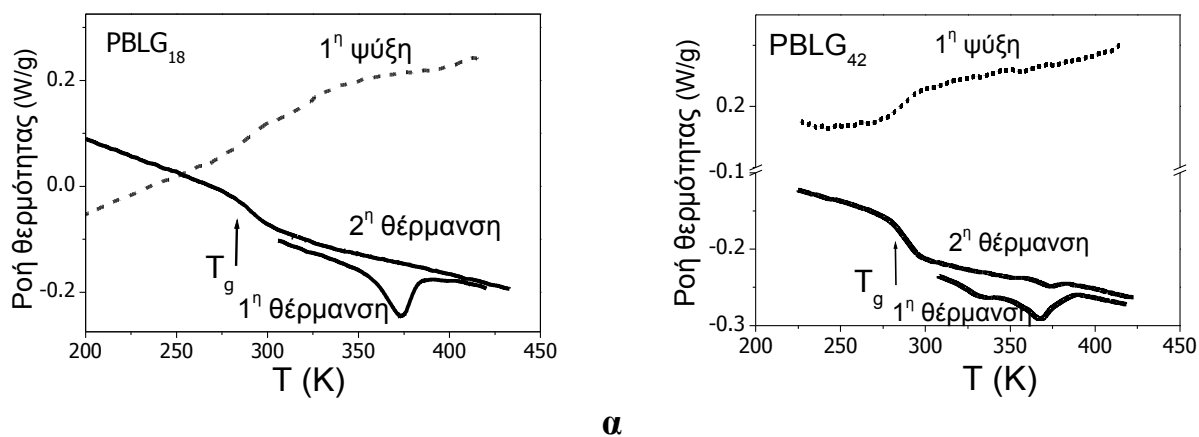
Από τις δύο δευτεροταγείς δομές του PBLG η πιο συχνά απαντώμενη είναι η α -έλικα, που

λόγω της δυσκαμψίας δίνει στο σύστημα χαρακτηριστικά υγρού κρυστάλλου. Η εικόνα από πολωτικό μικροσκόπιο (εικ. 4.1) είναι χαρακτηριστική νηματικής υγροκρυσταλλικής φάσης, όπου υπάρχει τάξη στον προσανατολισμό, αλλά όχι και στη μετατόπιση. Επίσης, σε μονοδιάσπαρτα δείγματα έχει παρατηρηθεί και ο σχηματισμός σμηκτικής φάσης [30].

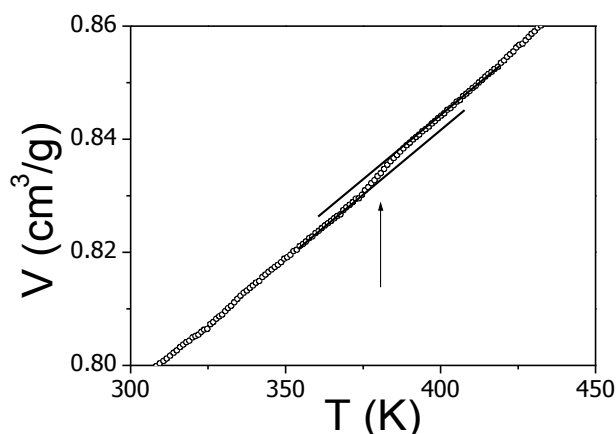
Η έλικα που σχηματίζει το PBLG είναι συνήθως η α -έλικα με 18 αμινοξέα ανά 5 στροφές (18/5 έλικα, 3.6 μονομερή/στροφή), έχει αναφερθεί, όμως, και ο σχηματισμός μιας μετασταθούς 7/2 έλικας όταν το δείγμα ετοιμάζεται με εξάτμιση (*casting*) με αργό ρυθμό από ορισμένους διαλύτες (π.χ. CHCl_3), η οποία μετατρέπεται μη αντιστρεπτά στην 18/5 α -έλικα με θέρμανση [31]. Οι καμπύλες της $\Delta\Theta\Sigma$ (εικ. 4.2), αλλά και η μεταβολή του ειδικού όγκου συναρτήσει της θερμοκρασίας (εικ. 4.3), δείχνουν μια μετάβαση πρώτης τάξης στους ~ 370 K κατά την πρώτη θέρμανση, με $\Delta H \sim 10$ J/g και $\Delta V \sim 2.5 \times 10^{-3}$ cm³/g, που ανανακλά τη μετατροπή της έλικας από 7/2 σε 18/5. Οι μετρήσεις $\Delta\Theta\Sigma$ δείχνουν επίσης μια «μετάβαση» υάλου στους ~ 285 K ως μια αλλαγή της ειδικής θερμότητας $\Delta c_p \sim 0.4$ J/gK, η οποία θα αναλυθεί περαιτέρω στο επόμενο τμήμα.



Εικ. 4.1. Εικόνα πολωτικού μικροσκοπίου από δείγμα PBLG_{18} σε $T=303$ K, χαρακτηριστική νηματικής υγροκρυσταλλικής φάσης. Η εικόνα δεν αλλάζει ως τους 433 K όπου μελετήθηκε.



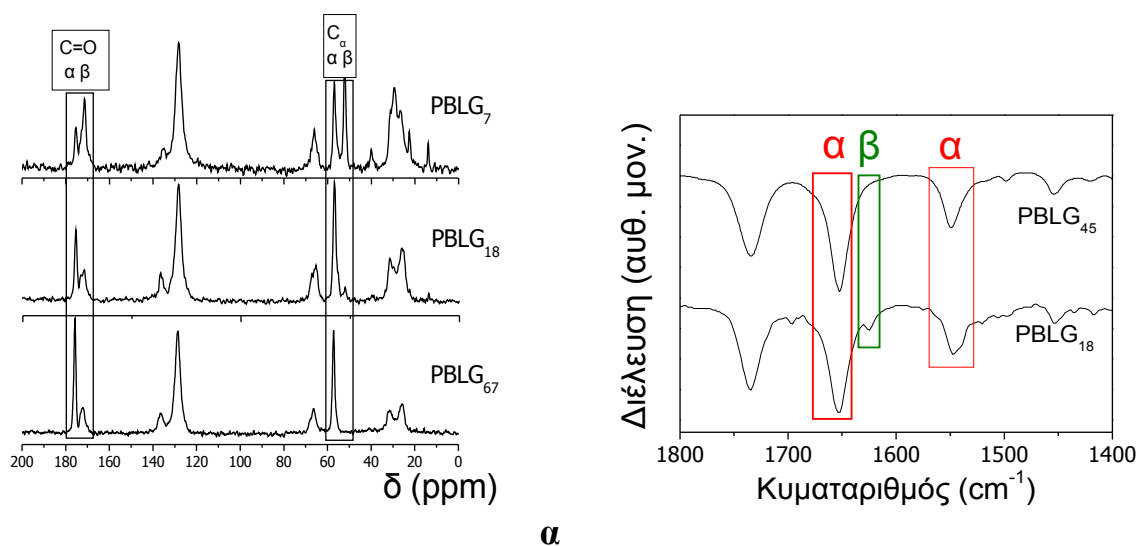
Εικ. 4.2. Καμπύλες $\Delta\theta\Sigma$ για δείγματα (α) $PBLG_{18}$ και (β) $PBLG_{45}$. Στην πρώτη θέρμανση παρατηρείται μια μη αντιστρεπτή μετάβαση πρώτης τάξης στους ~ 370 K που δείχνει την μετατροπή της 7/2 έλικας στη 18/5 α -έλικα ($\Delta H \sim 10$ J/g). Στους ~ 280 K εμφανίζεται σε όλες τις καμπύλες ένα σκαλοπάτι στη θερμοχωρητικότητα που δείχνει την ύπαρξη μιας «μετάβασης υάλου». Είναι σημαντικό ότι αυτή η μετάβαση συμβαίνει απουσία διαλύτη.



Εικ. 4.3. Ειδικός όγκος $V=1/\rho$ δείγματος $PBLG_{45}$ συναρτήσει της θερμοκρασίας σε $P=10$ MPa (πρώτη θέρμανση). Στους ~ 380 K παρατηρείται αλλαγή του όγκου ($\Delta V \sim 2.5 \times 10^{-3}$ cm³/g) όπως σε θερμοδυναμικές μεταβάσεις πρώτης τάξης (αλλαγή της έλικας από 7/2 σε 18/5), σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της $\Delta\theta\Sigma$.

Τα φάσματα ^{13}C -NMR στερεάς κατάστασης (εικ. 4.4α) δείχνουν την ύπαρξη δύο δευτεροταγών δομών (α -έλικες και β -φύλλα) μέσω των διαφορετικών χημικών μετατοπίσεων των ανθράκων C_α και $C=O$ (Πίνακας 1.2). Η χημική μετατόπιση είναι ευαίσθητη στο τοπικό περιβάλλον των πυρήνων, στη συγκεκριμένη περίπτωση των διεδρων γωνιών φ, ψ και των ενδομοριακών ή διαμοριακών δεσμών υδρογόνου. Πιο σαφείς πληροφορίες δίνει η κορυφή του C_α ($\delta=57.1$ και 52.2

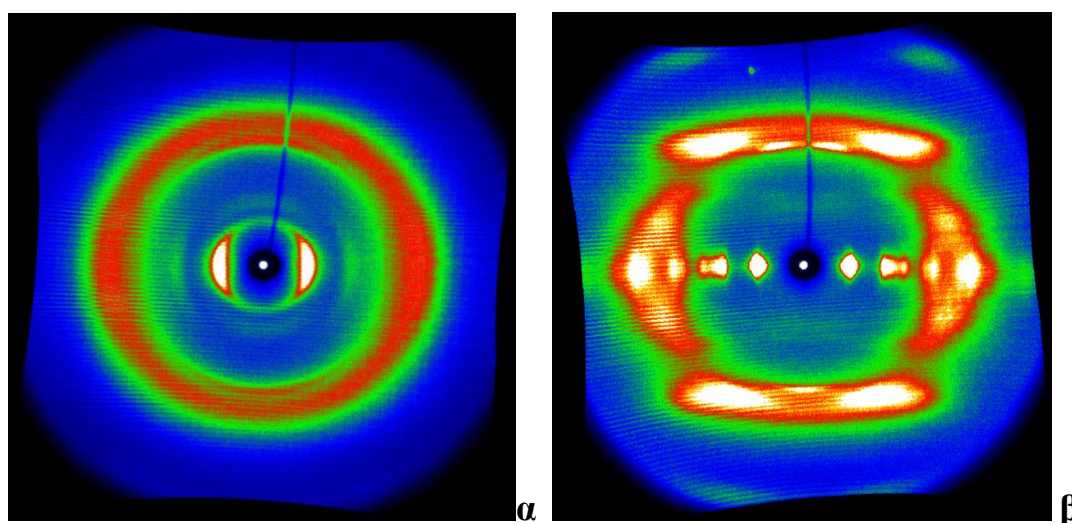
ppm για α -έλικες και β -φύλλα, αντίστοιχα), γιατί η κορυφή του C=O ($\delta=175.9$ και 171.5 , για α -έλικες και β -φύλλα, αντίστοιχα) αλληλοεπικαλύπτεται με την κορυφή του εστερικού δεσμού της πλευρικής αλυσίδας ($\delta=172.5$ ppm). Στο PBLG₇ συνυπάρχουν α -έλικες και β -φύλλα σε περίπου ίσα ποσοστά. Το μικρό μήκος κανονικά δεν επιτρέπει σχηματισμό α -έλικας (σχηματίζονται μόνο τρεις δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των αμινοξέων 1-5, 2-6 και 3-7), και επομένως η ύπαρξή τους οφείλεται στην πολυδιασπορά. Με την αύξηση του μήκους του πεπτιδίου μειώνεται σταδιακά το ποσοστό β -φύλλων (PBLG₁₈), ενώ για βαθμούς πολυμερισμού μεγαλύτερων του ~ 18 υπάρχουν πρακτικά μόνο α -έλικες. Τα φάσματα FTIR στα ίδια πεπτίδια (εικ. 4.4β) συμφωνούν με τα αποτελέσματα του ¹³C-NMR. Στο PBLG₁₈ εμφανίζεται ασθενής απορρόφηση στα 1630 cm^{-1} που αντιστοιχεί στα β -φύλλα (Πίνακας 1.3), και η οποία εξαφανίζεται στο PBLG₄₅, όπου παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές για την α -έλικα ζώνες στα 1550 και 1655 cm^{-1} .



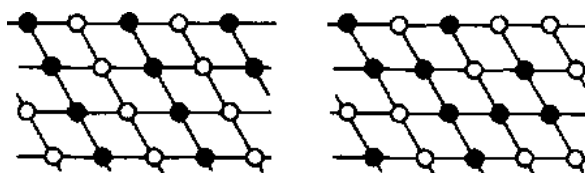
Εικ. 4.4. (α) Φάσματα ¹³C-NMR στερεάς κατάστασης, για τα δείγματα (πάνω προς κάτω): PBLG₇, PBLG₁₈ και PBLG₆₇. Σημειώνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στους άνθρακες C_α και C=O για τις δύο δευτεροταγείς δομές (α -έλικες και β -φύλλα). Οι κορυφές του πεπτιδικού C=O αλληλοεπικαλύπτονται με τις κορυφές του εστερικού C=O. Στο PBLG₇ συνυπάρχουν σε περίπου ίσο ποσοστό α -έλικες και β -φύλλα, στο PBLG₁₈ υπάρχουν κυρίως έλικες και μικρό ποσοστό φύλλων, ενώ στο PBLG₆₇ υπάρχουν αποκλειστικά α -έλικες. (β) Φάσματα FTIR των PBLG₁₈ (κάτω) και PBLG₄₅ (πάνω). Οι ζώνες απορρόφησης στα 1655 και 1550 cm^{-1} αντιστοιχούν στις δονήσεις των δεσμών C=O και N-H στην α -έλικα, ενώ στα 1630 cm^{-1} εμφανίζεται η δόνηση C=O στα β -φύλλα (Πίνακας 1.3). Το PBLG₁₈ περιέχει μικρό ποσοστό φύλλων τα οποία απουσιάζουν τελείως στο PBLG₄₅, σε συμφωνία με τα δεδομένα ¹³C-NMR.

Η σκέδαση ακτίνων-X (WAXS) από προσανατολισμένα δείγματα (τμήμα 3.2.4) μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση της δευτεροταγούς δομής. Η εικ. 4.5 δείχνει τη σκέδαση από προσανατολισμένη ίνα PBLG₄₅ πριν και μετά την ανόπτηση (σε T=373 K, για 2 μέρες). Το

πρώτο δείγμα δείχνει ισχυρές ισημερινές ανακλάσεις και κάποιες ασθενείς μεσημβρινές. Η ανόπτηση βελτιώνει σημαντικά τον προσανατολισμό με αποτέλεσμα οι ισημερινές ανακλάσεις να γίνονται στενότερες. Η θέση τους αντιστοιχεί σε εξαγωνικό δισδιάστατο πλέγμα, που σχηματίζεται από τις α -έλικες που μπορούν να θεωρηθούν κύλινδροι παράλληλοι με τον άξονα της ίνας. Οι μεσημβρινές ευρείες ανακλάσεις σε σχετικά μεγάλες γωνίες αντιστοιχούν στο βήμα της έλικας (0.54 nm/στροφή), ενώ η έλλειψη μεσημβρινών ανακλάσεων σε μικρότερες γωνίες δείχνει ότι δεν υπάρχει τάξη για μετατόπιση παράλληλα προς τον άξονα της ίνας. Η δομή που προκύπτει είναι νηματική παρακρυσταλλική και είναι γνωστή ως μορφή C (εξαγωνική κυψελίδα με $a=1.5$ nm, $b=1.45$ nm, $c=0.15$ nm * $\langle x \rangle$ και $\gamma=118-120^\circ$, όπου $\langle x \rangle$ ο βαθμός πολυμερισμού). Έχει αναφερθεί και η ύπαρξη της πιο καλά οργανωμένης μορφής B με $a=1.59$ nm, $b=1.3$ nm και $\gamma=114^\circ$, αλλά η ανάλυση στη δική μας περίπτωση δίνει $a=1.55$ nm, $b=1.43$ nm και $\gamma=118^\circ$, τα οποία συμφωνούν με τις παραμέτρους της μορφής C. Ο σχηματισμός της μορφής C αποδίδεται στην τυχαία τοποθέτηση αντιπαράλληλων α -ελίκων στο πλέγμα, σε αντίθεση με τη μορφή B, όπου υπάρχει τάξη και στον παράλληλο ή αντιπαράλληλο προσανατολισμό (εικ. 4.6) [32-35].

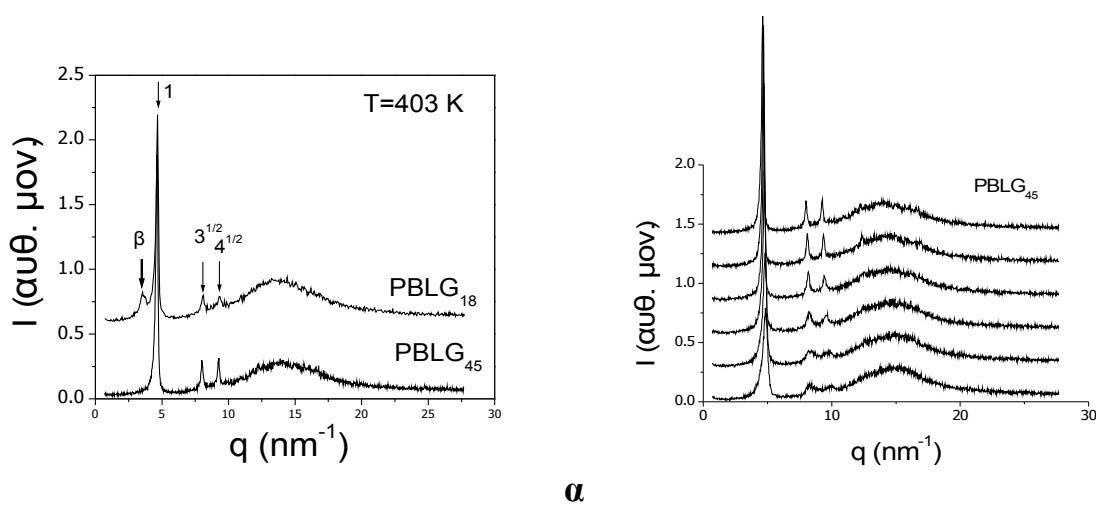


Εικ. 4.5. (α) Δισδιάστατη εικόνα σκέδασης από εφελκυσμένη ίνα PBLG₄₅ στους 353 K. Οι ισημερινές ανακλάσεις δείχνουν προσανατολιστική τάξη. (β) Σκέδαση μετά από ανόπτηση στους 373 K για 2 μέρες. Όλες οι ανακλάσεις έχουν γίνει πολύ στενότερες, υποδεικνύοντας την αύξηση της προσανατολιστικής τάξης. Οι ισημερινές αντιστοιχούν σε εξαγωνικό πλέγμα των παράλληλα προς τον άξονα της ίνας τοποθετημένων α -ελίκων, ενώ οι μεσημβρινές στο βήμα της έλικας (0.54 nm/στροφή). Η έλλειψη μεσημβρινών ανακλάσεων σε μικρές γωνίες δείχνει απουσία τάξης κατά μήκος της ίνας, επομένως η δομή είναι νηματική.



Εικ. 4.6. Κάτοψη του πλέγματος των α -ελίκων στο PBLG μορφής B (αριστερά) και C (δεξιά). Τα ανοιχτά και κλειστά σημεία αντιστοιχούν σε έλικες με το N-άκρο προς τα πάνω και προς τα κάτω. Στη μορφή B υπάρχει τάξη και επομένως μικρότερη ενέργεια λόγω δυνάμεων μεταξύ των διπόλων, ενώ στη μορφή C που παρατηρείται εδώ δεν υπάρχει τάξη με αποτέλεσμα παραμορφώσεις του πλέγματος και μικρότερο μήκος συνοχής (εικ. από [31]).

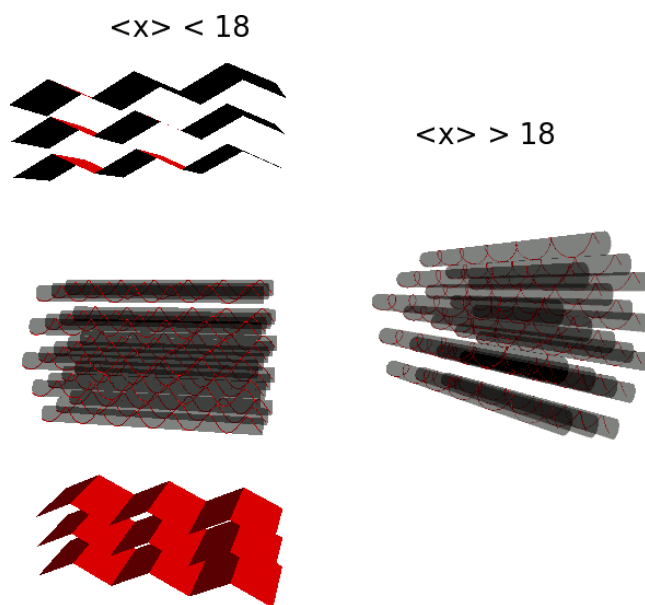
Η επίδραση του μήκους του πεπτιδίου στη δομή εξετάζεται στην εικ. 4.7 όπου συγκρίνονται οι εικόνες σκέδασης (μέθοδος σκόνης) από δύο δείγματα PBLG στους 403 K. Το PBLG₁₈ περιέχει και τις δύο δομές σε συμφωνία με το NMR και το FTIR. Η ασθενής ανάκλαση στα 3.5 nm⁻¹ αντιστοιχεί στην απόσταση $d=1.78$ nm μεταξύ των πεπτιδικών αλυσίδων αντιπαράλληλων β -φύλλων, οι ανακλάσεις σε μεγαλύτερο κυματόνυσμα, με σχετικές θέσεις 1:3^{1/2}:4^{1/2}, είναι οι ισημερινές ανακλάσεις της εικ. 4.5 και αντιστοιχούν στο εξαγωνικό πλέγμα των α -ελίκων που απέχουν μεταξύ τους 1.58 nm, ενώ η ευρεία άμορφη «άλως» προέρχεται κυρίως από τις μακριές άμορφες πλευρικές αλυσίδες. Η κορυφή που αντιστοιχεί στα β -φύλλα απουσιάζει από την καμπύλη του PBLG₄₅, το οποίο περιέχει μόνο έλικες σε συμφωνία με τις προηγούμενες μεθόδους. Στην τελευταία περίπτωση το εύρος των ανακλάσεων είναι μικρότερο και η ένταση των ανακλάσεων ανώτερης τάξης μεγαλύτερη, δείχνοντας μεγαλύτερο πλευρικό μήκος συνοχής των ελίκων, που υπολογίζεται από τη σχέση $\zeta=2\pi/w$, όπου w το εύρος FWHM της ανάκλασης σε μονάδες κυματόνυσματος. Το πλευρικό μήκος συνοχής για τις α -έλικες και τα β -φύλλα είναι περίπου 20 και 5 nm, αντίστοιχα.



Εικ. 4.7. (α) Σκεδαζόμενη ένταση (μέθοδος σκόνης) από τα δείγματα PBLG₁₈ και PBLG₄₅ στους 403 K. Το πρώτο περιέχει β-φύλλα (ανάκλαση στα 3.5 nm⁻¹) και εξαγωνικά οργανωμένες α-έλικες (ανακλάσεις με σχετικές θέσεις 1:3^{1/2}:4^{1/2}), ενώ το δεύτερο μόνο α-έλικες. (β) Μεταβολή σκεδαζόμενης έντασης με τη θερμοκρασία (πάνω προς τα κάτω): 433, 413, 393, 363, 333, 303 K. Το εύρος των κορυφών μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, δείχνοντας αύξηση του πλευρικού μήκους συνοχής των ελίκων από ~20 nm (303 K) σε ~35 nm (433K).

Βάσει των πειραματικών αποτελεσμάτων από ¹³C-NMR, NMR και WAXS, τα πεπτίδια χαμηλού βαθμού πολυμερισμού $\langle x \rangle$ ($\langle x \rangle < 18$) περιέχουν και τις δύο δευτεροταγείς δομές, αλλά τα β-φύλλα αποσταθεροποιούνται σε μεγαλύτερα πεπτίδια, όπου ευνοείται ο σχηματισμός α-έλικας. Επιπλέον, οι δύο δομές έχουν πολύ διαφορετικό μήκος συνοχής, με τα β-φύλλα να έχουν πολύ μικρότερο από τις α-έλικες. Η εικόνα της στατικής δομής που σχηματίζεται με τα μέχρι τώρα δεδομένα παρουσιάζεται σχηματικά στην εικ. 4.8, όπου οι δευτεροταγείς δομές απεικονίζονται ιδανικές. Από τις μεθόδους διερεύνησης της δομής που παρουσιάστηκαν δεν μπορούν εύκολα να προκύψουν πληροφορίες για το μήκος εμμονής των δομών, δηλαδή για την περιοδικότητα κατά μήκος της αλυσίδας. Το NMR είναι ευαίσθητο κυρίως στο πολύ τοπικό περιβάλλον μέχρι λίγα αμινοξέα πιο μακριά (εκτός αν γίνουν πειράματα χαλάρωσης σπιν-πλέγματος), όπως επίσης και το FTIR. Και οι δύο μέθοδοι θα μπορούσαν να αποκαλύψουν την ύπαρξη άμορφων τμημάτων, χωρίς όμως να διευκρινίσουν αν βρίσκονται στα άκρα (όπου υπάρχουν έτσι και αλλιώς) ή στο εσωτερικό. Από πειράματα WAXS μπορεί να εξαχθεί μόνο το μήκος συνοχής του πλέγματος το οποίο ουσιαστικά δε σχετίζεται με το μήκος εμμονής, αν και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν οι μεσημβρινές ανακλάσεις από το βήμα της έλικας. Αυτή η περίπτωση απαιτεί πολύ καλά προσανατολισμένα δείγματα (μονοκρυστάλλους), ώστε η διεύρυνση να προέρχεται μόνο από τις ατέλειες στις δομές, κάτι που σε τήγματα είναι σχεδόν ανέφικτο, ενώ υπάρχει και επικάλυψη με

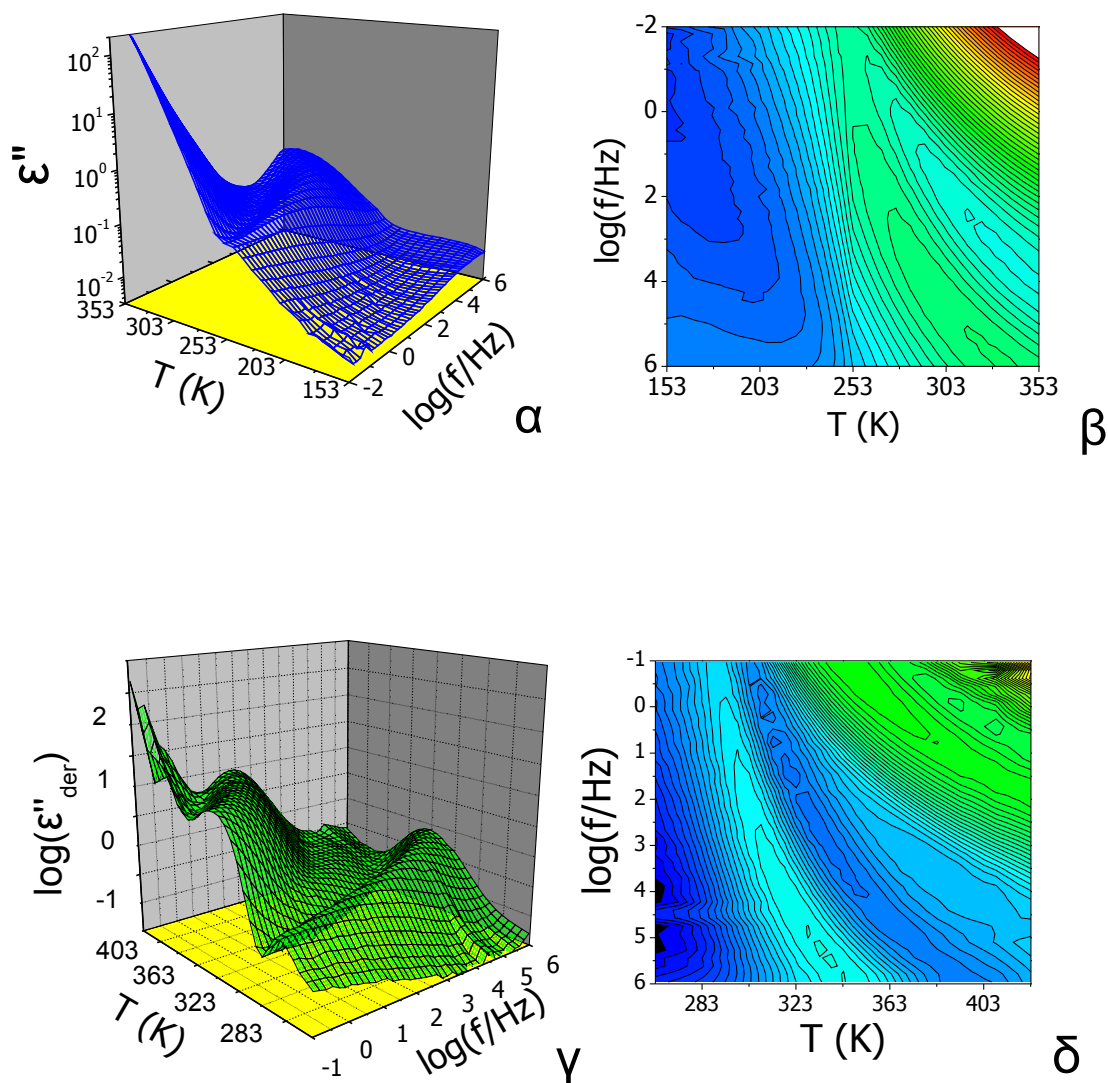
άλλες ανακλάσεις (πλευρικές αλυσίδες, άμορφα τμήματα στα άκρα, κλπ.). Αντίθετα, η ΔΦ είναι πολύ πιο ευαίσθητη, γιατί μπορεί να χρησιμοποιήσει τη μεγάλη διπολική ροπή κατά μήκος των ελίκων, που είναι ανάλογη του μήκους τους (δες και Κεφ. 5).



Εικ. 4.8. Σχηματική δομή του PBLG βασισμένη στα «στατικά» αποτελέσματα της αυτο-οργάνωσης από NMR, FTIR και WAXS. Τα πεπτίδια με βαθμό πολυμερισμού $\langle x \rangle < 18$ περιέχουν εξαγωνικά οργανωμένες α -έλικες και β -φύλλα, ενώ για $\langle x \rangle > 18$ σταθεροποιούνται οι α -έλικες.

4.2.1 Δυναμική των πεπτιδίων PBLG

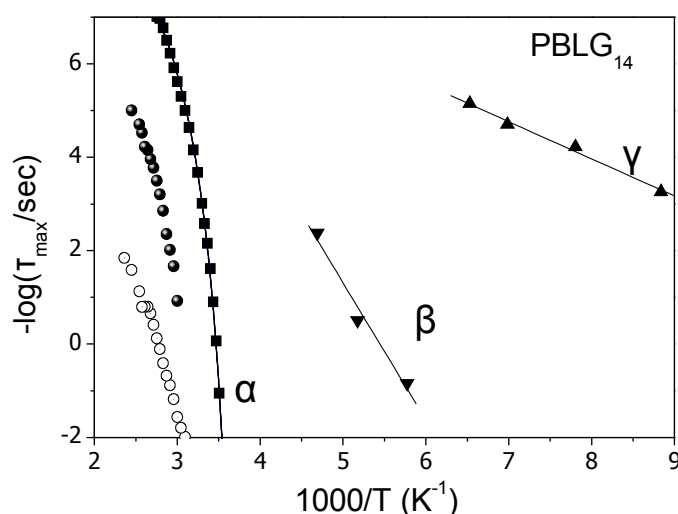
Όπως αναφέρθηκε στο Κεφ. 1, τα πεπτίδια περιέχουν πολλά μόνιμα ηλεκτρικά δίπολα και στις πλευρικές, αλλά και στην κύρια αλυσίδα. Ειδικότερα το PBLG έχει δίπολο στον εστερικό δεσμό της πλευρικής αλυσίδας και κατά μήκος της κύριας αλυσίδας, το οποίο βρέθηκε, από μετρήσεις σε αραιά διαλύματα με διαλύτες που ευνοούν το σχηματισμό α -έλικας, να είναι ~ 3.5 Debye/μονομερές [21-23]. Η ιδανική α -έλικα PBLG, επομένως, είναι συνδυασμός πολυμερών τύπου A και C, κατά Stockmayer. Η εικ. 4.9α-β δείχνει τις διηλεκτρικές απώλειες (ϵ'') δείγματος PBLG₁₈, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας και της συχνότητας, σε τρισδιάστατη αναπαράσταση. Η χαρακτηριστική κορυφή οφείλεται σε έναν κύριο μηχανισμό (α -μηχανισμός), ενώ η αύξηση του ϵ'' σε χαμηλές συχνότητες και υψηλές θερμοκρασίες οφείλεται στην ιοντική αγωγιμότητα. Η αναπαράσταση με ισοϋψείς (ίδιο ϵ'') καμπύλες δείχνει ότι κοντά στην αγωγιμότητα υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί, όπως επίσης και σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η εικ. 4.9γ-δ δείχνει την εξάρτηση της παραγώγου ϵ''_{der} (Εξ. 3.30), όπου φαίνονται ακόμα καλύτερα δύο μηχανισμοί σε υψηλές θερμοκρασίες.



Εικ. 4.9. (α) Τρισδιάστατη αναπαράσταση της εξάρτησης των διηλεκτρικών απωλειών του $PBLG_{18}$ από τη θερμοκρασία και τη συχνότητα. Διακρίνεται ένας μηχανισμός (α-) και η συνεισφορά της αγωγιμότητας. (β) Τα ίδια δεδομένα σε ισοϋψείς καμπύλες (ίδιο ϵ''). Διακρίνεται ένας μηχανισμός σε χαμηλές θερμοκρασίες και ένας μηχανισμός κρυμμένος κοντά στην αγωγιμότητα. (γ)-(δ) Τα αντίστοιχα διαγράμματα για την παράγωγο ϵ''_{der} (Εξ. 3.30) που μοιάζει με το ϵ'' , αλλά δεν έχει συνεισφορά της αγωγιμότητας. Εκτός από τον α-μηχανισμό διακρίνονται και δύο άλλοι σε υψηλές θερμοκρασίες ($\sim 10^1$ και $\sim 10^4$ Hz σε 400 K).

Από την ανάλυση των φασμάτων της $\Delta\Phi$ συναρτήσει της θερμοκρασίας (Κεφ. 3, Εξ. 3.28 – 3.33) προέκυψαν οι χρόνοι χαλάρωσης, όπως δείχνει η εικ. 4.10. Υπάρχουν συνολικά πέντε διηλεκτρικά ενεργοί μηχανισμοί. Κάτω από το θερμιδομετρικό T_g υπάρχουν δύο μηχανισμοί (γ- και β-μηχανισμός) με θερμοκρασιακή εξάρτηση τύπου Arrhenius (Εξ. 2.1), που είναι αντίστοιχοι των

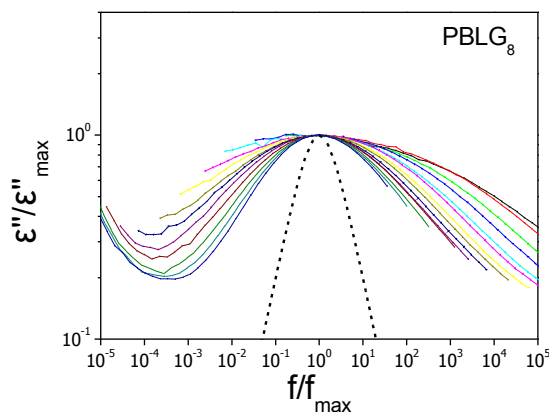
μηχανισμών σε χαμηλές θερμοκρασίες σε συστήματα πολυ(γ-μεθυλο-L-γλουταμινικού οξέος) και πολυ(γ-στεαρυλο-L-γλουταμινικού οξέος). Ο γ-μηχανισμός έχει ενέργεια ενεργοποίησης $E_{act} = 20.6$ kJ/mol (0.21 eV) και μικρή ένταση ($T\Delta\varepsilon \sim 20$ K) και αντιστοιχεί σε πολύ τοπικές κινήσεις των πλευρικών αλυσίδων, ενώ ο β-μηχανισμός έχει μεγαλύτερη $E_{act} = 50$ kJ/mol (0.52 eV), δείχνοντας ότι αντανακλά κινήσεις με μεγαλύτερες ενεργειακές απαιτήσεις σε σχέση με τον γ-. Η προέλευση του β-μηχανισμού, ο οποίος εμφανίζεται μόνο στην πρώτη θέρμανση, μπορεί να ποικίλει: (α) μπορεί να σχετίζεται με παρόμοιο μηχανισμό στα υαλώδη πολυαμίδια, δηλαδή με ίχνη νερού που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τους πεπτιδικούς δεσμούς. Εδώ, πρέπει να αναφέρουμε ότι όλα τα δείγματα είχαν ξηρανθεί επί 24 h σε κενό πριν από τις μετρήσεις. Εναλλακτικά, (β) μπορεί να οφείλεται σε κινήσεις πλευρικών αλυσίδων που είναι ευαίσθητες στην αλλαγή περιβάλλοντος όταν η έλικα μετατρέπεται από 7/2 σε 18/5. Η τελευταία περίπτωση είναι πιο πιθανή, καθώς τα δεδομένα PVT (εικ. 4.11) δείχνουν ότι αλλάζει η οργάνωση των πλευρικών αλυσίδων κατά τη μετάβαση.



Εικ. 4.10. Χαρακτηριστικοί χρόνοι των πέντε μηχανισμών χαλάρωσης του $PBLG_{14}$. Σημειώνεται η θέση του θερμομετρικού σημείου υάλου (T_g). Οι δύο μηχανισμοί στις χαμηλές θερμοκρασίες (γ- και β-, πάνω και κάτω τρίγωνα, αντίστοιχα) δείχνουν τοπικές κινήσεις, ο α-μηχανισμός (τετράγωνα) σχετίζεται με τη μετάβαση υάλου, ενώ ο ενδιάμεσος (κλειστοί κύκλοι) και ο «αργός» (ανοιχτοί κύκλοι) αντιστοιχούν σε κινήσεις μεγαλύτερων τμημάτων της κύριας αλυσίδας, που θα συζητηθούν στο επόμενο κεφάλαιο (Κεφ. 5).

Πάνω από το T_g της ΔΘΣ παρατηρούνται τρεις μηχανισμοί, που θα ονομάζονται α-, ενδιάμεσος και «αργός» μηχανισμός, σε σειρά αυξανόμενου χαρακτηριστικού χρόνου. Όλοι περιγράφονται από την εξίσωση VFT (Εξ. 2.6) [36], οι παράμετροι της οποίας για τον α-μηχανισμό συγκεντρώνονται στον Πίνακα 4.1. Πρέπει να σημειωθεί ότι η παράμετρος T_0 συμπίπτει στους τρεις

μηχανισμούς, υπονοώντας ότι έχουν κοινή προέλευση. Η εικ. 4.11 δείχνει μια υπέρθεση φασμάτων διηλεκτρικών απωλειών του PBLG₈ γύρω από τον α-μηχανισμό.



Εικ. 4.11. Υπέρθεση καμπυλών των διηλεκτρικών απωλειών του PBLG₈ στην περιοχή 273 < T < 318 K, γύρω από το μέγιστο του α-μηχανισμού, όπου φαίνεται ότι η αρχή υπέρθεσης χρόνων-θερμοκρασίας δεν ισχύει, δείχνοντας ότι το σύστημα είναι θερμορρολογικά πολύπλοκο. Επίσης, οι καμπύλες είναι πολύ φαρδύτερες από τη συνάρτηση Debye (Εξ. 3.22, διακεκομμένη γραμμή) με εύρος που εξαρτάται έντονα από τη θερμοκρασία (η παράμετρος β_{KWW} κυμαίνεται από 0.28 στο T_g ως 0.4 σε T_g + 30 K).

Πίνακας 4.1. Παράμετροι της εξίσωσης VFT (4.2) για τον α-μηχανισμό. Η παράμετρος τ₀ κρατήθηκε σταθερή σε όλα τα δείγματα.

Δείγμα	-log(τ ₀ /s)	D _T	T ₀ (K)
PBLG ₇	12.5	9.2	213.3
PBLG ₈	12.5	7.8	225.0
PBLG ₁₄	12.5	6.9	232.6
PBLG ₁₈	12.5	7.4	230.8
PBLG ₄₅	12.5	7.0	232.8
PBLG ₆₇	12.5	6.9	236.6
PBLG ₉₃	12.5	7.1	233.4
PBLG ₁₄₀	12.5	6.6	237.8
PBLG ₁₇₅	12.5	7.1	234.0

Τα χαρακτηριστικά του α-μηχανισμού του PBLG είναι:

- α) Έχει VFT εξάρτηση των χρόνων χαλάρωσης από τη θερμοκρασία.
- β) Η έντασή του είναι ~ 1.2, και μειώνεται ελαφρώς με την αύξηση του μοριακού βάρους,
- γ) Δεν μπορεί να περιγραφεί από τη συνάρτηση Debye (εικ. 4.11), δηλαδή έχει ευρεία κατανομή χρόνων χαλάρωσης, η οποία εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Η παράμετρος α της εξίσωσης Havriliak-Negami (3.28) κυμαίνεται από 0.2 στο T_g ως 0.5 σε T=1.3T_g.

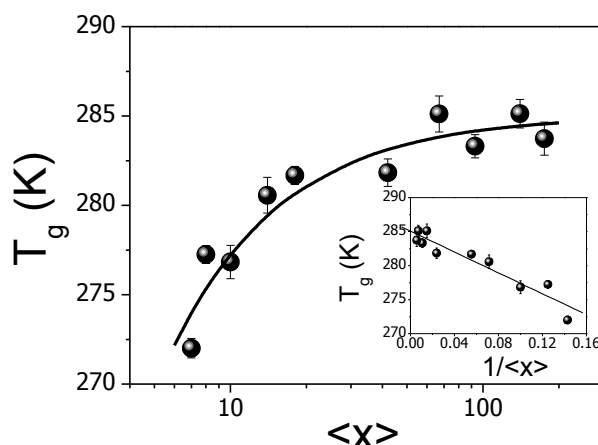
δ) Είναι σαφώς διαχωρισμένος από τους δευτερεύοντες μηχανισμούς (εικ. 4.10), όπως σε όλα τα υαλώδη συστήματα.

Ο α -μηχανισμός είναι χαρακτηριστικός όλων των άμορφων συστημάτων, είτε πολυμερών είτε μικρών μορίων, αλλά πρόσφατα βρέθηκε και σε συστήματα με υψηλή προσανατολιστική τάξη, όπως είναι υγροί κρύσταλλοι και συμπολυμερή σε σχήμα «βούρτσας» (*hairy-rod*) [37,38]. Παρόλα αυτά διαπιστώθηκε ότι και στις δύο περιπτώσεις ο α -μηχανισμός προερχόταν από κινήσεις των λιγότερο προσανατολισμένων περιοχών. Στους υγρούς κρυστάλλους πλευρικών αλυσίδων ο μηχανισμός αντανάκλα συνεργατική δυναμική της κύριας και των πλευρικών αλυσίδων, ενώ στα *hairy-rod* συνδέεται με το «ξεπάγωμα» της δυναμικής της ράβδου. Επιπλέον, στα πολυαμίδια, όπως το Nylon 6, βρέθηκε να σχετίζεται με κινήσεις της κύριας αλυσίδας που περιλαμβάνουν την καταστροφή δεσμών υδρογόνου στις άμορφες περιοχές [39].

Η προέλευση του α -μηχανισμού μπορεί να διευκρινιστεί μέσω (α) μετρήσεων σε σειρά πεπτιδίων διαφορετικού βαθμού πολυμερισμού και (β) μελέτης της επίδρασης της πίεσης, η οποία θα παρουσιαστεί στο τμήμα 4.5. Από τα στοιχεία του Πίνακα 4.1 προκύπτει ότι ο α -μηχανισμός έχει εξάρτηση από το βαθμό πολυμερισμού, δείχνοντας τη σημασία των ελεύθερων άκρων στη δυναμική. Το σημείο υάλου, που ορίζεται ως η θερμοκρασία όπου $\tau_{\alpha}=100$ s, έχει εξάρτηση τύπου Fox-Flory ($T_g = T_g^{\infty} - K/\bar{M}_n$), αντίστοιχη αυτής που παρατηρείται σε άμορφα πολυμερή (εικ 4.12):

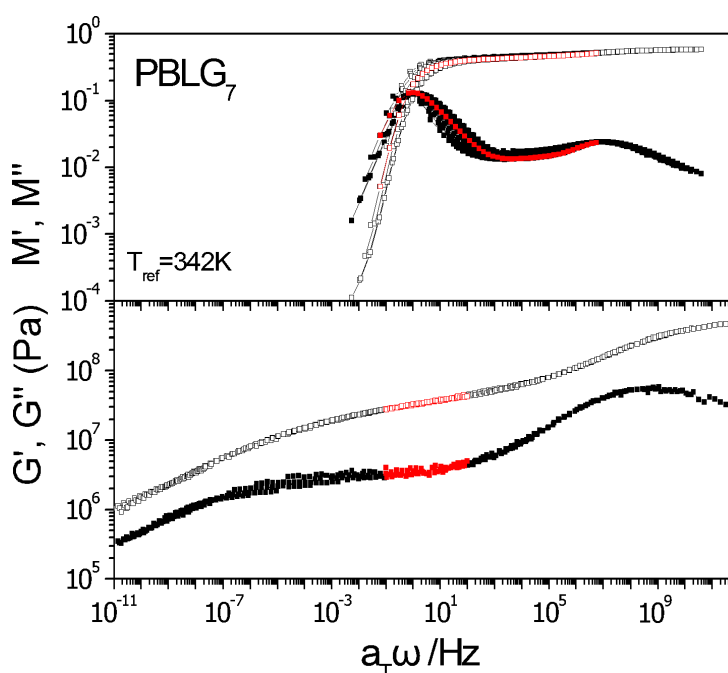
$$T_g (K) = 285.1 - 77/\langle x \rangle \quad (4.1)$$

Στο ένθετο της εικ. 4.12 οι τιμές του T_g έχουν επίσης παρασταθεί γραφικά συναρτήσει του $1/\langle x \rangle$, ώστε να φανεί η γραμμική εξάρτηση.



Εικ. 4.12. Εξάρτηση του σημείου υάλου, που ορίζεται ως η θερμοκρασία όπου $\tau_a=100$ s, από το βαθμό πολυμερισμού. Η εξάρτηση είναι τύπου Fox-Flory: T_g (K) = 285.1 – 77/⟨x⟩, όπως σε άμορφα πολυμερή. Το ένθετο δείχνει τα ίδια δεδομένα συναρτήσει του 1/⟨x⟩, ώστε να φανεί η γραμμική εξάρτηση.

Ενδιαφέρουσα είναι η σύγκριση του ηλεκτρικού μέτρου M^* από τη $\Delta\Phi$ με το διατμητικό G^* από τη ρεολογία. Η εικ. 4.13 δείχνει υπερθέσεις των M' , M'' , G' και G'' του PBLG₇ γύρω από την ίδια θερμοκρασία αναφοράς. Ενώ η θέση του α -μηχανισμού συμπίπτει και στις δύο αναπαραστάσεις, ο ενδιάμεσος και ο «αργός» μηχανισμός της $\Delta\Phi$ δεν έχουν ανάλογο στο διατμητικό μέτρο, αλλά στη θέση τους εμφανίζεται μία ευρεία περιοχή περίπου σταθερού G' και G'' , δείχνοντας ότι σε αυτή την κλίμακα χρόνου το σύστημα έχει ελαστική απόκριση. Επιπλέον, σε ολόκληρη την περιοχή συχνοτήτων ισχύει $G' > G''$, δηλαδή η συμπεριφορά πλησιάζει τα ελαστικά στερεά, και ο α -μηχανισμός συνοδεύεται από μείωση του μηχανικού μέτρου κατά μόλις μία δεκάδα, σε αντίθεση με τα άμορφα πολυμερή, για τα οποία μια τυπική τιμή είναι τρεις δεκάδες (εικ. 3.19). Η απουσία ροής μέχρι τους 473 K (~ 200 K πάνω από το T_g) είναι ισχυρή ένδειξη ύπαρξης συσσωματωμάτων, δηλαδή διαπλοκών μεταξύ αλυσίδων οι οποίες μπορούν να υπάρχουν στις περιοχές με σπασμένους δεσμούς υδρογόνου.



Εικ. 4.13. Σύγκριση υπερθέσεων του ηλεκτρικού και του μηχανικού μέτρου για το PBLG₇ γύρω από τη θερμοκρασία $T_{ref} = 342$ K (κόκκινα σημεία). Η θέση του α -μηχανισμού πρακτικά συμπίπτει στις δύο αναπαραστάσεις, αλλά ο ενδιάμεσος και ο «αργός» μηχανισμός της $\Delta\Phi$ δεν εμφανίζονται στη ρεολογία. Επιπλέον το σύστημα δεν ρέει σε όλες τις θερμοκρασίες μέχρι 473 K και τις κλίμακες χρόνου, ενώ και ο α -μηχανισμός συνοδεύεται από μείωση του μηχανικού μέτρου κατά μία μόνο δεκάδα, σε αντίθεση με τα άμορφα πολυμερή (βλέπε και εικ. 3.19). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι σχηματίζονται συσσωματώματα και διαπλοκές των αλυσίδων στα σημεία όπου υπάρχουν ατέλειες.

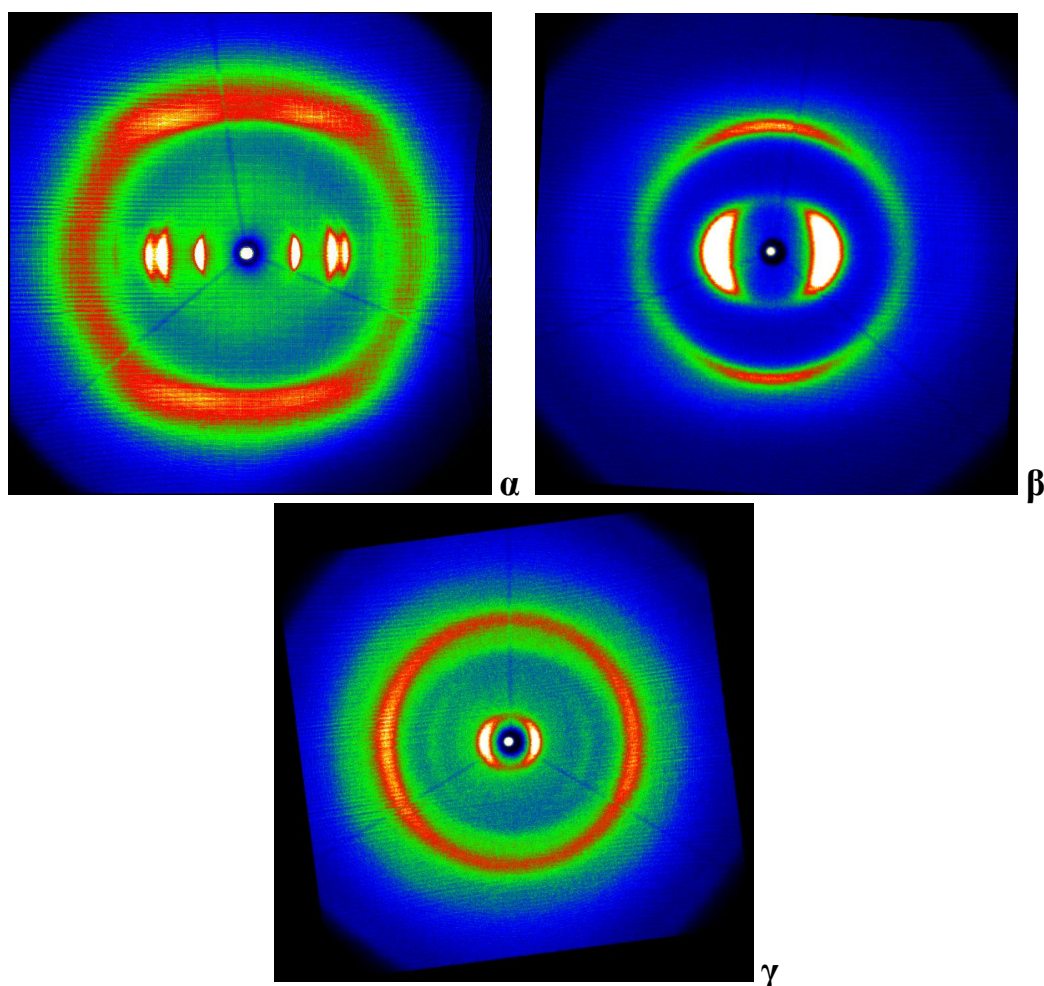
Συμπερασματικά, ο α -μηχανισμός έχει χαρακτηριστικά των μηχανισμών που συνδέονται με την υαλοποίηση ενός συστήματος, όπως η εξάρτηση VFT και η αύξηση της θερμοχωρητικότητας στην αντίστοιχη θερμοκρασία, φαίνεται, όμως, ότι η αντίστοιχη χαλάρωση δεν περιλαμβάνει όλο το σύστημα, καθώς οι μηχανικές μετρήσεις δείχνουν ότι η μείωση του μηχανικού μέτρου που τον συνοδεύει είναι μόνο ~ 1 δεκάδα (εικ. 4.13). Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το σύστημα έχει γενικά προσανατολιστική τάξη, αλλά και σημαντικό αριθμό ατελειών, που έχουν περίπου ομοιόμορφη κατανομή. Οι μεταβολές της διαμόρφωσης που ξεκινούν από τις ατέλειες εξηγούν τη VFT εξάρτηση, καθώς είναι ενδο-μοριακά συνεργατικές (τουλάχιστον), ενώ η εξάρτηση από το βαθμό πολυμερισμού δικαιολογείται από το ότι τα ελεύθερα άκρα συνεισφέρουν σημαντικά στη δημιουργία ατελειών. Η ενεργός διπολική ροπή που αντιστοιχεί στον α -μηχανισμό υπολογίστηκε από την εξίσωση Kirkwood-Fröhlich (Εξ 3.12 και 3.13) και βρέθηκε ότι είναι ~ 0.95 Debye.

4.3 Ομοπολυπεπίδια πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνης) (PZLL), πολυ(L-λευκίνης) (PLeu), πολυγλυκίνης (PGly) και πολυ(ο-βενζυλο-L-τυροσίνης) (PTyr)

Η γενίκευση των παραπάνω αποτελεσμάτων της δυναμικής απαιτεί μελέτη και άλλων ομοπολυπεπτιδίων με διαφορετικές δευτεροταγείς δομές και πλευρικούς υποκαταστάτες. Γι' αυτό το σκοπό μελετήσαμε τη δυναμική μετάβαση υάλου σε μια σειρά άλλων πρότυπων ομοπολυπεπτιδίων (δηλ. με στενές κατανομές μοριακών βαρών). Σε αυτά τα συστήματα έγινε μελέτη της δομής με WAXS (σκόνης και προσανατολισμένων δειγμάτων) και ¹³C-NMR και της δυναμικής με ΔΘΣ και ΔΦ.

4.3.1 Μελέτη της δομής

Η δισδιάστατη εικόνα σκέδασης από προσανατολισμένες ίνες PZLL₁₃₅, PLeu₁₅₂ και PTyr₇₉ φαίνεται στην εικ. 4.14.

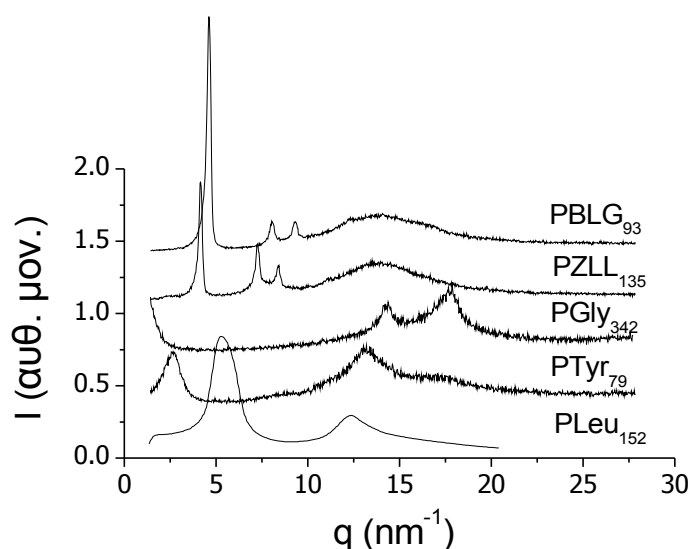


Εικ. 4.14. Δισδιάστατες εικόνες σκέδασης από εφελκυσμένες ίνες: (α) ίνα PZLL₁₃₅ μετρημένη σε $T_{meas}=373$ K, που φτιάχτηκε με εφελκυσμό σε $T_{extr}=353$ K και στην οποία έγινε ανόπτηση σε $T_{ann}=373$ K. Ο προσανατολισμός είναι πολύ καλός και οι ανακλάσεις αντιστοιχούν σε εξαγωνικά οργανωμένες α -έλικες, όπως του PBLG (εικ. 4.5). (β) ίνα PLeu₁₅₂ ($T_{extr}=453$ K, $T_{ann}=393$ K, $T_{meas}=433$ K), όπου ο προσανατολισμός είναι πιο ασθενής, όπως φαίνεται από τα φαρδιά τόξα των ανακλάσεων. Παρόλο που δεν υπάρχουν ισημερινές ανακλάσεις ανώτερης τάξης, οι μεσημβρινές είναι ένδειξη ελικοειδούς δομής, όπως στο PBLG και την PZLL. (γ) ίνα PTyr₇₉ ($T_{extr}=453$ K, $T_{ann}=393$ K, $T_{meas}=303$ K). Διακρίνονται τρεις ισημερινές ανακλάσεις και καμία μεσημβρινή, υποδεικνύοντας ότι η δομή της PTyr δεν είναι ελικοειδής, αλλά και οι κύριες αλυσίδες και οι πλευρικές οργανώνονται κάθετα στον άξονα της ίνας, όπως συμβαίνει σε β -φύλλα (βλέπε και εικ. 1.6δ).

Η εικόνα από την PZLL₁₃₅ είναι παρόμοια με του PBLG (εικ. 4.5), με ισημερινές ανακλάσεις που δείχνουν ότι και αυτό το σύστημα αποτελείται από εξαγωνικά οργανωμένες α -έλικες και μεσημβρινές που αντιστοιχούν στο βήμα της έλικας και τις πλευρικές αλυσίδες που προσανατολίζονται κάθετα στην έλικα. Οι ανακλάσεις από την PLeu₁₅₂ είναι πολύ φαρδιές, που σημαίνει ότι δεν έγινε αρκετά καλός προσανατολισμός, αλλά η ύπαρξη και ισημερινών και μεσημβρινών ανακλάσεων είναι συμβατή με ελικοειδή δομή. Στα β -φύλλα (εικ. 1.6δ) οι κύριες και οι πλευρικές αλυσίδες έχουν περιοδική οργάνωση κάθετα στον προσανατολισμό των κύριων

αλυσίδων, με αποτέλεσμα να δίνουν ισημερινές ανακλάσεις. Αυτή ακριβώς είναι η εικόνα από την P Tyr₇₉. Η ισχυρή ανάκλαση σε μικρή γωνία αντιστοιχεί στην απόσταση μεταξύ β-φύλλων που χωρίζονται από τις μακριές πλευρικές αλυσίδες, ενώ οι άλλες οφείλονται στην οργάνωση των πλευρικών αλυσίδων.

Η εξάρτηση της σκεδαζόμενης έντασης από τη μέθοδο σκόνης συναρτήσε του κυματανύσματος, όπου φαίνεται καλύτερα η θέση των ανακλάσεων, παρουσιάζεται στην εικ. 4.15.



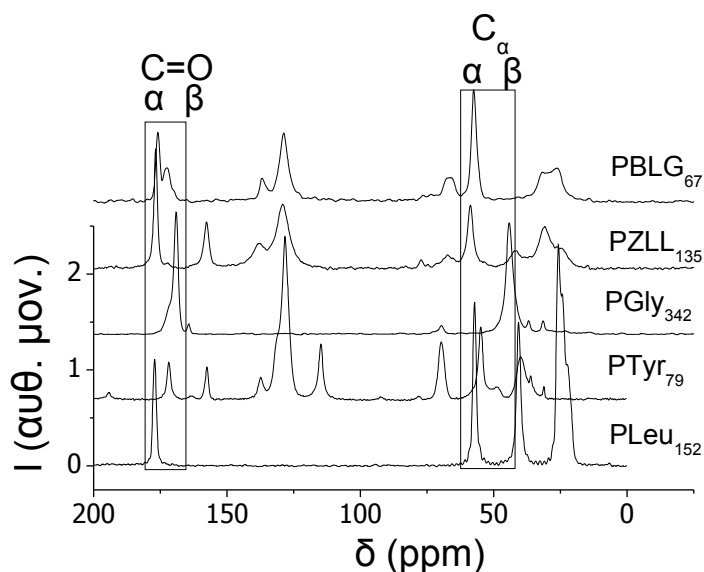
Εικ. 4.15. Σκεδαζόμενη ένταση ακτίνων-Χ συναρτήσε του κυματανύσματος q για τα δείγματα (από πάνω προς τα κάτω) PBLG₉₃, PZLL₁₃₅, PGly₃₄₂, PTyr₇₉ και PLeu₁₅₂ στους 433 K. Η σχετικές θέσεις των ανακλάσεων στην PZLL είναι $1:3^{1/2}:4^{1/2}:7^{1/2}$, που αντιστοιχεί σε δισδιάστατο εξαγωνικό πλέγμα, όπως στο PBLG, ενώ η «άλως» στα $\sim 15 \text{ nm}^{-1}$ αντιστοιχεί στις πλευρικές αλυσίδες. Η PGly δείχνει δύο ανακλάσεις που αντιστοιχούν σε β-φύλλα [40]. Η PTyr έχει μία ισχυρή ανάκλαση στα $\sim 2.6 \text{ nm}^{-1}$ που αντιστοιχεί σε αποστάσεις μεταξύ β-φύλλων και φαρδιές και ασθενείς στα $\sim 9, 11, 13$ και 17 nm^{-1} που προέρχονται από τις πλευρικές αλυσίδες. Η PLeu εμφανίζει μια ασύμμετρη κορυφή στα $\sim 5 \text{ nm}^{-1}$ που αντιστοιχεί σε πλάγιο δισδιάστατο πλέγμα των ελίκων και μια φαρδιά κορυφή στα $\sim 12 \text{ nm}^{-1}$ από τις πλευρικές αλυσίδες και το βήμα της έλικας.

Η PZLL έχει πολλές ομοιότητες με το PBLG, σχηματίζοντας εξαγωνικό πλέγμα των α-ελίκων, όπως προκύπτει από τις κορυφές με σχετικές θέσεις $1:3^{1/2}:4^{1/2}:7^{1/2}$. Η απόσταση μεταξύ των ελίκων είναι 1.75 nm και το μήκος συνοχής της δομής ~ 45 nm, ανεξάρτητο από τη θερμοκρασία, σε αντίθεση με το PBLG. Η PLeu, που επίσης φαίνεται να σχηματίζει ελικοειδή δομή, δείχνει μια φαρδιά ασύμμετρη ανάκλαση σε $q \sim 5 \text{ nm}^{-1}$ ($d \sim 1.26$ nm) (η ισημερινή ανάκλαση της εικ. 4.14β), η οποία μπορεί να αναλυθεί σε δύο με $q=4.63 \text{ nm}^{-1}$ και $q=5.45 \text{ nm}^{-1}$ που αντιστοιχούν σε πλάγιο πλέγμα. Από την πρώτη, που είναι και η στενότερη, το μήκος συνοχής εκτιμάται σε μόλις 6 nm. Η κορυφή στα $\sim 12 \text{ nm}^{-1}$ (μεσημβρινή) είναι συνεισφορά του βήματος της έλικας (0.54 nm/στροφή)

και των πλευρικών αλυσίδων. Η PGly δίνει ανακλάσεις στα 14.3 και 17.6 nm⁻¹ ($d=0.44$ και 0.36 nm, αντίστοιχα) που συμφωνούν με υπάρχοντα κρυσταλλογραφικά δεδομένα για β-φυλλοειδή δομή πολυγλυκίνης (PGly I) [40]. Πρέπει να σημειωθεί ότι μπορεί να σχηματιστεί και ελικοειδής δομή πολυγλυκίνης από συγκεκριμένους διαλύτες (PGly II), η οποία, όμως, δεν παρατηρείται εδώ. Η PTyp εμφανίζει πιο πολύπλοκη εικόνα. Η κύρια ανάκλαση εμφανίζεται σε πολύ μικρό $q=2.61$ nm⁻¹, που αντιστοιχεί σε $d=2.4$ nm, ίσο περίπου με το διπλάσιο του μήκους της πλευρικής αλυσίδας, συμφωνώντας με το μοντέλο που προτείνουν τα προσανατολισμένα δείγματα. Ανάλογη ανάκλαση σε γωνία μικρότερη από τις α-έλικες έδωσαν και τα β-φύλλα στο PBLG (εικ. 4.7a). Το μήκος συνοχής της β-φυλλοειδούς δομής είναι χαμηλό, περίπου 5 nm. Η κορυφή σε $q \sim 13$ nm⁻¹ βρίσκεται πολύ κοντά στη θέση των ανακλάσεων της PGly, που επίσης σχηματίζει β-φύλλα, και αντιστοιχεί στην απόσταση μεταξύ πεπτιδικών αλυσίδων εντός του ίδιου β-φύλλου. Οι πιο ασθενείς ανακλάσεις στα $\sim 9, 11$ και 17 nm⁻¹ οφείλονται στην οργάνωση των πλευρικών αλυσίδων.

Τα παραπάνω δείγματα μελετήθηκαν επίσης με ¹³C-NMR στερεάς κατάστασης. Εδώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ο C_α και ο C=O του πεπτιδικού δεσμού, γιατί δεν υπάρχει αλληλοεπικάλυψη με κορυφές των πλευρικών αλυσίδων, όπως στο PBLG. Η εικ. 4.16 δείχνει τα φάσματα των τεσσάρων αυτών ομοπολυπεπτιδίων και του PBLG για σύγκριση. Η θέση των κορυφών της PZLL ($\delta_{C_{\alpha}}=58.7, \delta_{C=O}=176.7$ ppm) και της PLeu ($\delta_{C_{\alpha}}=57.2, \delta_{C=O}=177.1$ ppm) δείχνει σαφώς ότι περιέχουν αποκλειστικά α-έλικες, ενώ η PGly έχει πολύ μετατοπισμένες προς τα δεξιά (υψηλό πεδίο) κορυφές ($\delta_{C_{\alpha}} = 44.3, \delta_{C=O} = 169.3$ ppm), ένδειξη β-φυλλοειδούς δομής. Η PTyp εμφανίζει πολλές κορυφές λόγω του μεγάλου αριθμού ανθράκων της πλευρικής αλυσίδας. Η θέση της κορυφής του C=O είναι αρκετά μετατοπισμένη προς υψηλό πεδίο ($\delta_{C=O} = 171.8$ ppm) και αντιστοιχεί σε β-φύλλα, όπως και η κορυφή του C_α ($\delta_{C_{\alpha}} = 54.9$ ppm). Η τελευταία έχει αρκετά έντονο υπόβαθρο και μία ασθενή κορυφή στα δεξιά που δείχνει ότι ένα ποσοστό είναι άμορφο.

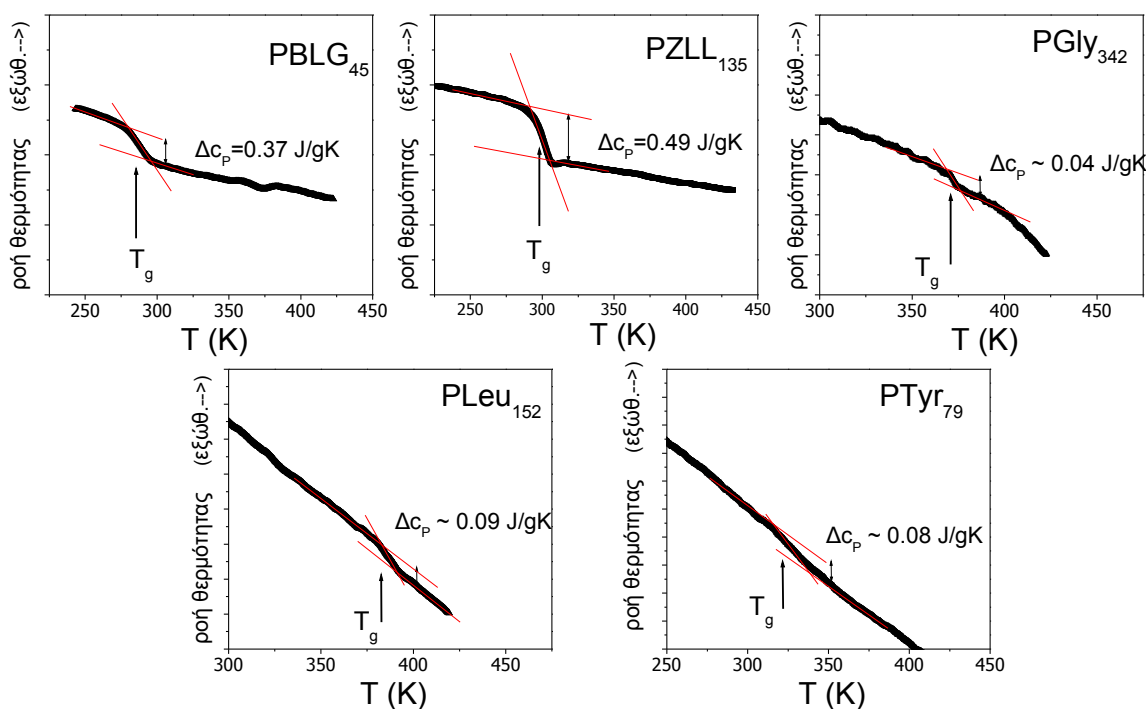
Τα αποτελέσματα των διαφορετικών μεθόδων διερεύνησης της δομής είναι συνεπή μεταξύ τους. Συμπερασματικά, η δευτεροταγής δομή των τεσσάρων ομοπολυπεπτιδίων που μελετήθηκαν σε αυτό το τμήμα είναι α-έλικες στην PZLL και την PLeu, και β-φύλλα στην PGly και την PTyp, με την τελευταία να περιέχει και ποσοστό άμορφων αλυσίδων.



Εικ. 4.16. Φάσματα ^{13}C CP-NMR από τα τέσσερα ομοπολυπεπτιδία PZLL, PGly, PTyr και PLeu και ένα δείγμα PBLG για σύγκριση. Οι θέσεις των κορυφών του C=O και του C_α στην PZLL και την PLeu είναι συμβατές με α -ελικοειδή δομή (Πίνακας 1.3), ενώ της PGly και της PTyr με β -φύλλα. Η τελευταία πρέπει να περιέχει και σημαντικό ποσοστό άμορφων τμημάτων, λόγω του υποβάθρου στην κορυφή του C_α .

4.3.2 Μελέτη της δυναμικής

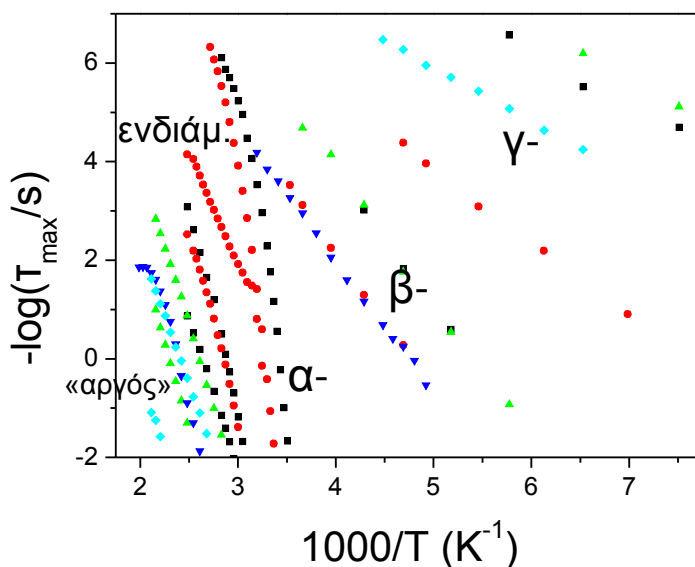
Για τη διερεύνηση της ύπαρξης δυναμικής «μετάβασης» υάλου στα ομοπολυπεπτιδία, συναρτήθηκε της δευτεροταγούς δομής, χρησιμοποιήθηκε ΔΘΣ. Η εικόνα 4.17 δείχνει τις καμπύλες ροής θερμότητας κατά τον δεύτερο κύκλο θέρμανσης. Σε όλα τα συστήματα παρατηρείται «σκαλοπάτι» της θερμοχωρητικότητας που αντιστοιχεί στη μετάβαση υάλου: $T_g = 286, 299, 375, 380,$ και 340 K για τα PBLG₄₅, PZLL₁₃₅, PGly₃₄₂, PLeu₁₅₂ και PTyr₇₉, αντίστοιχα. Στην PGly και την PLeu η μετάβαση δεν είναι δυνατόν να έχει σχέση με πλευρικές αλυσίδες, δείχνοντας ότι είναι εγγενές χαρακτηριστικό των πεπτιδίων. Οι πλευρικές αλυσίδες, από την άλλη, επιδρούν στο σημείο υάλου και τη μεταβολή της θερμοχωρητικότητας Δc_p . Το PBLG και η PZLL με μακρές και εύκαμπτες πλευρικές αλυσίδες έχουν το χαμηλότερο σημείο υάλου και μεγάλη τιμή Δc_p (0.37 και 0.49 J/gK, αντίστοιχα), ενώ η PGly και η PLeu πολύ χαμηλότερες τιμές Δc_p (0.04 και 0.09 J/gK, αντίστοιχα). Η PTyr έχει μια ενδιάμεση τιμή T_g , αλλά χαμηλό Δc_p (~0.08 J/gK), αν και έχει μακρές πλευρικές αλυσίδες, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στην σφιχτή οργάνωση των αλυσίδων με δύο αρωματικούς δακτυλίους μέσα στα β -φύλλα. Σε κάθε περίπτωση, η ύπαρξη «μετάβασης» υάλου σε όλα αυτά τα συστήματα με τόσο διαφορετικές δομές σε ξηρή μορφή δείχνει ότι είναι γενικό χαρακτηριστικό των πεπτιδίων και δεν οφείλεται στις πλευρικές αλυσίδες ή σε διαλύτες.



Εικ. 4.17. Καμπύλες $\Delta\Theta\Sigma$ από τον δεύτερο κύκλο θέρμανσης για τα ομοπολυπεπτίδια $PBLG_{45}$, $PZLL_{135}$, $PGly_{342}$, $PLeu_{152}$ και $PTyr_{79}$. Σε όλα παρατηρείται «σκαλοπάτι» της θερμοχωρητικότητας, ένδειξη «μετάβασης» υάλου, σε θερμοκρασία 286, 298, 375, 380, και 340 K, αντίστοιχα. Στην $PGly$ και την $PLeu$ με τις πολύ μικρές πλευρικές ομάδες η «μετάβαση» μπορεί να αποδοθεί μόνο στην κύρια αλυσίδα, δείχνοντας ότι είναι εγγενές χαρακτηριστικό των πεπτιδίων. Οι πλευρικές αλυσίδες επηρεάζουν το σημείο υάλου και την αντίστοιχη μεταβολή της θερμοχωρητικότητας.

Στα ίδια δείγματα έγινε και μελέτη με χρήση $\Delta\Phi$, όπου παρατηρήθηκαν διηλεκτρικά ενεργοί μηχανισμοί πάνω και κάτω από το T_g . Οι αντίστοιχοι χρόνοι χαλάρωσης έχουν παρασταθεί γραφικά στη εικ. 4.18. Η $PZLL$ παρουσιάζει πέντε μηχανισμούς χαλάρωσης, δύο σε $T < T_g$ ($=296.3$ K) με θερμοκρασιακή εξάρτηση τύπου Arrhenius και τρεις σε $T > T_g$ με VFT εξάρτηση, οι οποίοι φαίνεται να είναι εντελώς ανάλογοι των α -, ενδιάμεσου και «αργού» του $PBLG$. Η $PGly$ έχει έναν α -μηχανισμό σε υψηλές θερμοκρασίες με $T_g=382$ K και έναν β -μηχανισμό σε χαμηλότερες θερμοκρασίες που αντανακλά πολύ τοπικές κινήσεις μικρών τμημάτων της κύριας αλυσίδας. Η $PLeu$ επίσης έχει α -μηχανισμό σε υψηλές θερμοκρασίες με $T_g=362$ K, έναν γρήγορο β -μηχανισμό σε χαμηλές που οφείλεται σε κινήσεις πλευρικών αλυσίδων, και έναν πολύ αργό μηχανισμό σε $T \gg T_g$. Τέλος, η $PTyr$ εμφανίζει δύο Arrhenius μηχανισμούς σε χαμηλές θερμοκρασίες, οι οποίοι είναι πολύ κοντά στους αντίστοιχους του $PBLG$, και δύο μηχανισμούς πάνω από το T_g που

βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους. Από αυτούς ο πρώτος είναι ο τμηματικός (α -) μηχανισμός με $T_g = 346$ K, σε συμφωνία με τις μετρήσεις DSC, ενώ ο άλλος πρέπει να είναι η κίνηση των άμορφων τμημάτων που παρατηρούνται στο NMR, δηλαδή αντίστοιχος του ενδιάμεσου μηχανισμού του PBLG.



Εικ. 4.18. Χαρακτηριστικοί χρόνοι των μηχανισμών χαλάρωσης των ομοπολυπεπτιδίων $PBLG_{45}$ (τετράγωνα), $PZLL_{135}$ (κύκλοι), $PGly_{342}$ (κάτω τρίγωνα), $PTyr_{79}$ (πάνω τρίγωνα) και $PLeu_{152}$ (ρόμβοι). Παρατηρούνται Arrhenius μηχανισμοί χαλάρωσης σε χαμηλές θερμοκρασίες που οφείλονται σε τοπικές κινήσεις, ο α -μηχανισμός με VFT εξάρτηση, ενώ το PBLG, η PZLL, η PLeu και η PTyr εμφανίζουν και πιο αργούς που αντανακλούν κινήσεις άμορφων τμημάτων ή ατελειών.

Η συμφωνία των σημείων υάλου από τη $\Delta\Theta\Sigma$ και τη $\Delta\Phi$ είναι πολύ καλή, και μόνον η PLeu παρουσιάζει κάποια απόκλιση. Οι α -μηχανισμοί έχουν όλοι VFT εξάρτηση από τη θερμοκρασία, ενώ με τη συνάρτηση Arrhenius (2.1) δεν μπορεί να γίνει ικανοποιητική προσαρμογή, εκτός ίσως από την PLeu. Οι παράμετροι της εξίσωσης για τα πέντε συστήματα συγκεντρώνονται στον Πίνακα 4.2. Η εξάρτηση φαίνεται καλύτερα στην εικ. 4.19, όπου συγκρίνονται οι χρόνοι του α -μηχανισμού όλων των πεπτιδίων συναρτήσει του T_g/T (διάγραμμα «ευθραυστότητας»). Η κλίση στο T_g δίνει την παράμετρο «ευθραυστότητας» (*fragility index*)

$$m = d \log \tau / d(T_g/T) \quad (4.2)$$

που εκφράζει τη μεταβολή των χαρακτηριστικών χρόνων με τη θερμοκρασία. Το PBLG και η PZLL είναι τα πιο «εύθραυστα» (*fragile*) συστήματα, ενώ τα υπόλοιπα έχουν πολύ μικρότερη

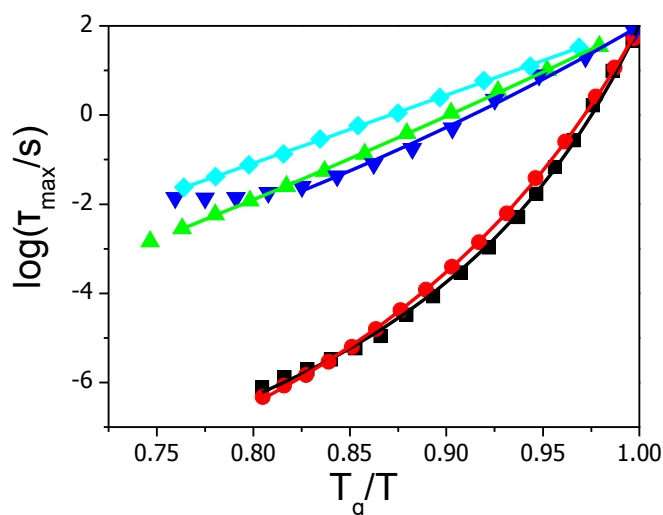
τιμή m . Αυτό δεν φαίνεται να σχετίζεται με τη δευτεροταγή δομή, δεδομένου ότι και η PLeu σχηματίζει α -έλικες, αλλά μάλλον με την ευκινησία των πλευρικών αλυσίδων και το Δc_p .

Πίνακας 4.2. Παράμετροι της εξίσωσης VFT, δείκτης «ευθραυστότητας» (fragility index) $m = d \log \tau / d(T_g/T)$, εντάσεις και διπολικές ροπές για τον α -μηχανισμό των πέντε διαφορετικών ομοπολυπεπτιδίων.

Δείγμα	$-\log(\tau_0/s)$	D_T	T_0 (K)	m	$\Delta \varepsilon^{(1)}$	$\mu_{eff}(\text{Debye})^{(2)}$
PBLG ₄₅	12.5	7.0	232.8	90	1.1	1.0
PZLL ₁₃₅	13.0	8.1	240.0	79	4.0	2.0
PGly ₃₄₂	10.9	26	202	25	4.0	1.0
PLeu ₁₅₂	10.4	72	101	16	0.28	0.55
PTyr ₇₉	10.0	36	157	21	0.8	1.3

⁽¹⁾ Σε $T = T_g + 30$ K

⁽²⁾ Υπολογισμένο από την εξίσωση Kirkwood-Fröhlich (3.12 και 3.13) σε $T = T_g + 30$ K, θεωρώντας ότι η αριθμητική πυκνότητα των διπόλων είναι ίση με των μονομερών.



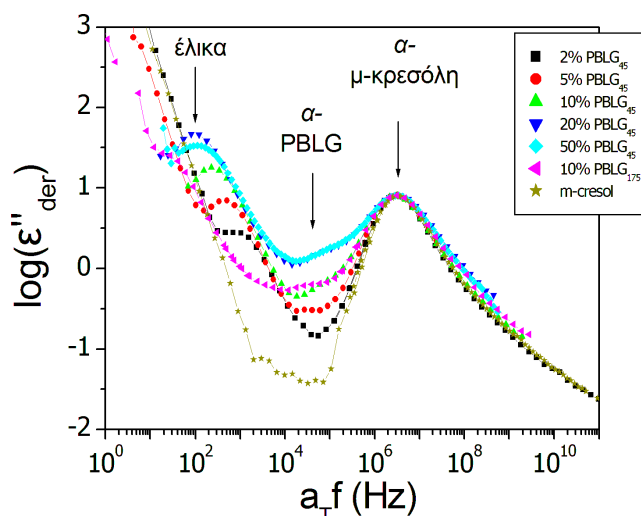
Εικ. 4.19. Διάγραμμα «ευθραυστότητας» (fragility plot) – χρόνοι χαλάρωσης α -μηχανισμού συναρτήσει του T_g/T . Τα σύμβολα είναι ίδια με της εικ. 4.18. Σε όλες τις περιπτώσεις η εξάρτηση των χρόνων είναι τύπου VFT. Το PBLG και η PZLL είναι τα πιο «εύθραυστα» (fragile) συστήματα.

Οι εντάσεις του α -μηχανισμού και οι αντίστοιχες ενεργές διπολικές ροπές παρουσιάζονται επίσης στον Πίνακα 4.2. Η διπολική ροπή έχει συνεισφορά τόσο από την κύρια όσο και από την πλευρική αλυσίδα, αλλά εξαρτάται επίσης από τον αριθμό των μονομερών που έχουν δυνατότητα να κινηθούν.

4.4 Διαλύματα PBLG σε μ-κρεσόλη

Στα προηγούμενα τμήματα αποδείχθηκε ότι η «μετάβαση» υάλου είναι ένα εγγενές χαρακτηριστικό των πεπτιδίων, αφού παρατηρείται απουσία διαλύτη σε συστήματα με διαφορετικές δευτεροταγείς δομές και πλευρικούς υποκαταστάτες. Επειδή, όμως, πολλές προηγούμενες μελέτες συνδέουν αυτή τη μετάβαση με τις κινήσεις μικρών μορίων (Κεφ. 2) [1,2,41-49], έχει σημασία να εξεταστεί η δυναμική πεπτιδίων σε διαλύματα για να βρεθεί αν είναι συζευγμένη με τη δυναμική του διαλύτη. Για το σκοπό αυτό έγιναν μετρήσεις συναρτήσεως της θερμοκρασίας σε μια σειρά πεπτιδίων PBLG σε μ-κρεσόλη (Πίνακας 3.9), που είναι γνωστό ότι ευνοεί το σχηματισμό α -έλικας [19].

Σε συγκεντρώσεις έως ~ 50 % w/w παρατηρούνται τρεις μηχανισμοί χαλάρωσης, όπως δείχνει η εικ. 4.20. Ο πιο γρήγορος μηχανισμός αντιστοιχεί στη μετάβαση υάλου της μ-κρεσόλης με διπολική ροπή $\mu_{\text{eff}}=2.5$ Debye. Ο ενδιάμεσος, με έντονη εξάρτηση της έντασης από τη συγκέντρωση, προέρχεται από το πεπτίδιο (α -μηχανισμός του PBLG). Η διπολική ροπή που υπολογίζεται για τον α -μηχανισμό του πεπτιδίου είναι σχεδόν σταθερή σε όλη την περιοχή, από το ξηρό δείγμα μέχρι τα πιο αραιά διαλύματα (όπου $\mu_{\text{PBLG}} \sim 0.85$ Debye), αν και οι χρόνοι του γίνονται μικρότεροι εξαιτίας του διαλύτη. Τέλος, ο αργότερος μηχανισμός είναι αυτός που είχε ήδη παρατηρηθεί σε προηγούμενες μελέτες (τμήμα 2.5.7.2) και αντιστοιχεί σε διπολική ροπή ανάλογη του μοριακού βάρους, $\mu_{\text{slow}} \sim 4.2$ Debye * $\langle x \rangle$, ανεξάρτητη της συγκέντρωσης στα πιο αραιά διαλύματα (μέχρι 20% w/w). Η προέλευση αυτού του μηχανισμού θα αναφερθεί στο Κεφ. 5. Στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (80 και 90% w/w) παρατηρούνται οι ίδιοι μηχανισμοί με το ξηρό PBLG και δεν εμφανίζεται πλέον ο α -μηχανισμός της μ-κρεσόλης, αυξάνεται, όμως, σημαντικά η ένταση του β -μηχανισμού του PBLG ($\Delta\epsilon \sim 0.05$ στο ξηρό και $\Delta\epsilon \sim 0.15$ στο 80% w/w) δείχνοντας ότι αυτή είναι η κίνηση που είναι συζευγμένη με τον διαλύτη και όχι ο τμηματικός (α -) μηχανισμός.

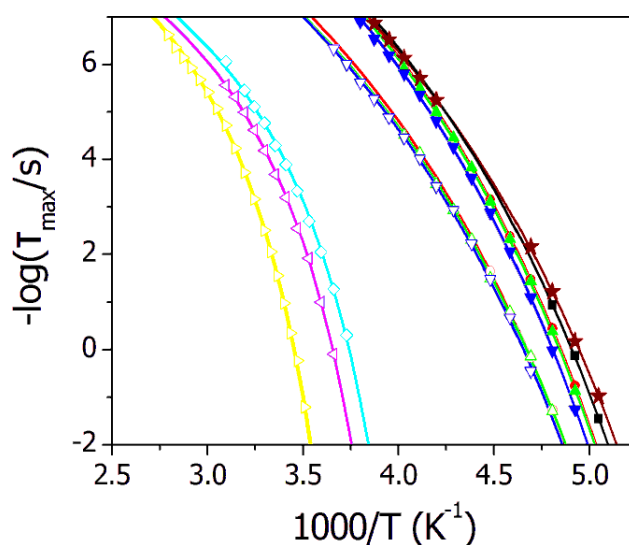


Εικ. 4.20. Υπέρθεση φασμάτων ε''_{der} για τα διαλύματα με συγκέντρωση $\leq 50\%$ w/w και την καθαρή μ -κρεσόλη, γύρω από το μέγιστο της μ -κρεσόλης σε $T_{ref}=243$ K: (τετράγωνα) $PBLG_{45}$ 2% w/w, (κύκλοι) $PBLG_{45}$ 5% w/w, (πάνω τρίγωνα) $PBLG_{45}$ 10% w/w, (κάτω τρίγωνα) $PBLG_{45}$ 20% w/w, (ρόμβοι) $PBLG_{45}$ 50% w/w, (αριστερά τρίγωνα) $PBLG_{175}$ 10% w/w, (αστέρια) μ -κρεσόλη. Παρατηρούνται τρεις μηχανισμοί χαλάρωσης: ο α -μηχανισμός της μ -κρεσόλης, ένας λίγο πιο αργός με έντονη εξάρτηση της έντασης από τη συγκέντρωση που οφείλεται στο πεπτιδίο και ο πιο αργός που είναι η κίνηση απ' άκρου εις άκρον του πεπτιδίου.

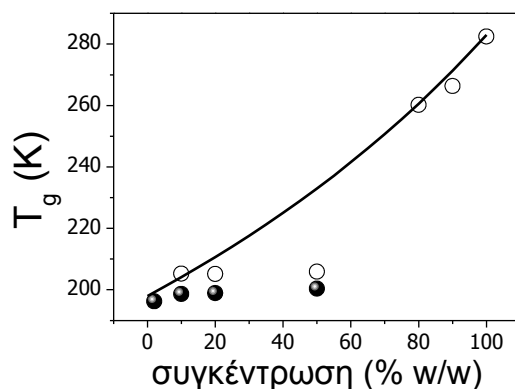
Τα αποτελέσματα για τους χρόνους χαλάρωσης των α -μηχανισμών δίνονται στην εικ. 4.21. Τα σημεία υάλου του διαλύτη και του πεπτιδίου υπολογίζονται από τους αντίστοιχους α -μηχανισμούς (σε $\tau \sim 100$ s) και παριστάνονται γραφικά συναρτήσει της συγκέντρωσης στην εικ. 4.22. Η εμπειρική εξίσωση Fox-Flory

$$\frac{1}{T_g^{mix}} = \frac{w_{PBLG}}{T_g^{PBLG}} + \frac{1-w_{PBLG}}{T_g^{cresol}} \quad (4.3)$$

όπου w_{PBLG} το κλάσμα βάρους του PBLG, δεν μπορεί να περιγράψει ικανοποιητικά τα σημεία, καθώς η συμπεριφορά αλλάζει απότομα για $w > 50$ % w/w. Η διπολική ροπή που υπολογίζεται για τον α -μηχανισμό του πεπτιδίου είναι σχεδόν σταθερή σε όλη την περιοχή, από το ξηρό δείγμα μέχρι τα πιο αραιά διαλύματα (όπου $\mu_{PBLG} \sim 0.85$ Debye), αν και οι χρόνοι του γίνονται μικρότεροι λόγω του διαλύτη.



Εικ. 4.21. Χρόνοι χαλάρωσης των α-μηχανισμών που σχετίζονται με τη μετάβαση υάλου του πεπτιδίου (ανοιχτά σύμβολα) και του διαλύτη (κλειστά σύμβολα) για όλα τα διαλύματα του PBLG₄₅ και τα καθαρά συστατικά: (αστέρια) μ-κρεσόλη, (τετράγωνα) 2%, (κύκλοι) 10%, (πάνω τρίγωνα) 20%, (κάτω τρίγωνα) 50%, (ρόμβοι) 80%, (αριστερά τρίγωνα) 90%, (δεξιά τρίγωνα) PBLG₄₅. Οι γραμμές προέρχονται από προσαρμογή με τη εξίσωση VFT (2.6).



Εικ. 4.22. Σημεία υάλου του πεπτιδίου (ανοιχτά σύμβολα) και του διαλύτη (κλειστά σύμβολα) στα διαλύματα του PBLG₄₅ συναρτήσει της συγκέντρωσης. Η καμπύλη είναι προσαρμογή με τη εξίσωση Fox-Flory (4.3).

Συμπερασματικά, η μελέτη των διαλυμάτων έδειξε ότι το πεπτιδίδια διατηρεί ξεχωριστή δυναμική από το διαλύτη, ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Επομένως είναι λανθασμένη η θεώρηση ότι η παρατηρούμενη μετάβαση υάλου οφείλεται στα μικρότερα μόρια (Κεφ. 2) [1,2,41-49]. Επιπλέον, στα δείγματα με μικρές ποσότητες διαλύτη (80 και 90 % w/w) αποδείχθηκε ότι οι τοπικές κινήσεις είναι αυτές που συνδέονται με τη δυναμική του διαλύτη και όχι οι κινήσεις της κύριας αλυσίδας. Η δράση του διαλύτη είναι απλώς η «πλαστικοποίηση», δηλαδή η μείωση του σημείου υάλου του πεπτιδίου, όπως στα συνθετικά συστήματα.

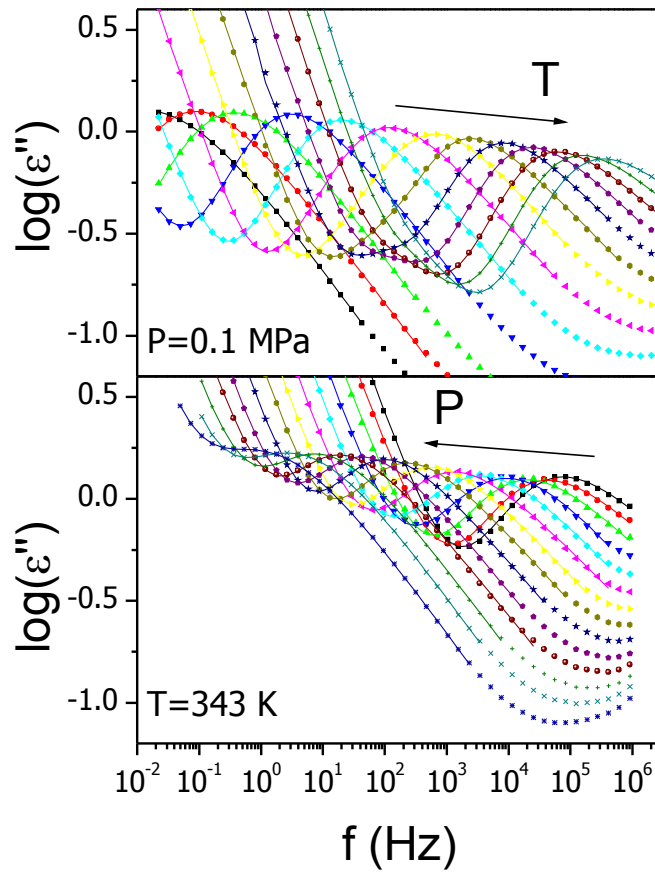
4.5 Επίδραση της πίεσης στη δυναμική των πεπτιδίων

Τα προηγούμενα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μετάβαση υάλου είναι χαρακτηριστική μετάβαση όλων των πεπτιδίων, ανεξάρτητα από την ύπαρξη διαλύτη και το είδος της δευτεροταγούς δομής, και ότι σχετίζεται με τη δυναμική άμορφων κομματιών της αλυσίδας. Η επίδραση εξωτερικής πίεσης βοηθάει στην κατανόηση της ακριβούς προέλευσης της μετάβασης και στον προσδιορισμό της θερμοδυναμικής παραμέτρου (ελεύθερος όγκος V , θερμική ενέργεια $k_B T$) με τη μεγαλύτερη συνεισφορά στο «πάγωμα» των βαθμών ελευθερίας στο T_g [15,50-59].

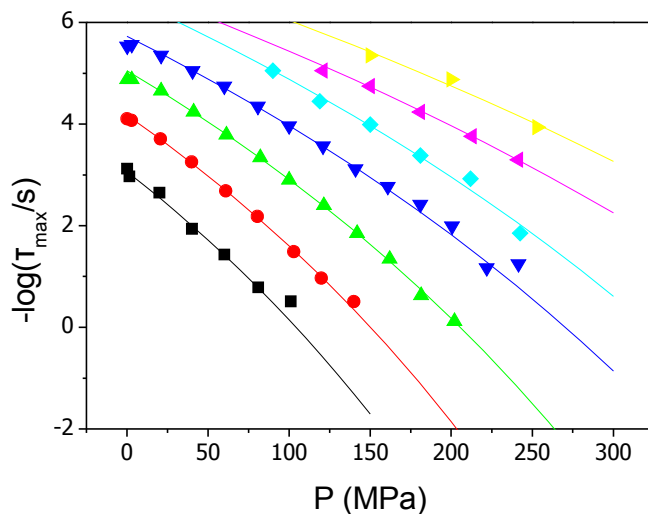
Τα δείγματα που μελετήθηκαν με πίεση ήταν τα PBLG₇, PBLG₁₄, PBLG₄₅, PZLL₁₃₅ και PGly₃₄₂. Η αύξηση της πίεσης σε ένα σύστημα επιβραδύνει τους χρόνους χαλάρωσης όλων των μηχανισμών. Η εικ. 4.23 δείχνει καμπύλες των διηλεκτρικών απωλειών (ϵ'') της PZLL₁₃₅ υπό ισοβαρείς και ισόθερμες συνθήκες, σε $P=0.1$ MPa και $T=343$ K, αντίστοιχα. Οι κορυφές που παρατηρούνται αντιστοιχούν στον τμηματικό (α -) μηχανισμό που σχετίζεται με τη μετάβαση υάλου. Οι χρόνοι υπό ισόθερμες και ισοβαρείς συνθήκες για το PBLG₄₅ απεικονίζονται, αντίστοιχα, στις εικ. 4.24 και 4.25. Στους χρόνους χαλάρωσης του α -μηχανισμού έγινε προσαρμογή με τις δύο μορφές της εξίσωσης VFT για ισοβαρείς και ισόθερμες συνθήκες (2.6 και 4.4, αντίστοιχα) για να εξαχθεί η εξάρτηση του σημείου υάλου T_g από την πίεση και του P_g από τη θερμοκρασία, αντίστοιχα:

$$\tau_{\max} = \tau_0 \exp\left(\frac{D_p P}{P_0 - P}\right) \quad (4.4)$$

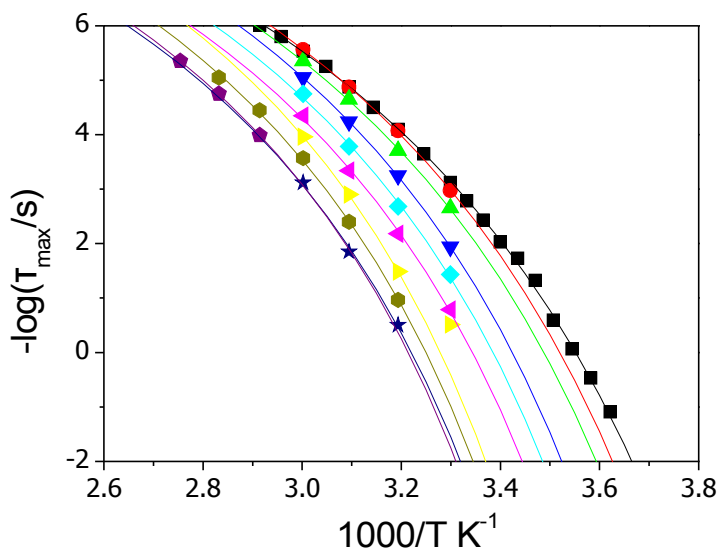
όπου P_0 η «ιδανική» πίεση υάλου, τ_0 ο χρόνος για $P=0$ και D_p μια αδιάστατη παράμετρος [60].



Εικ. 4.23. Διηλεκτρικές απώλειες (ϵ'') της $PZLL_{135}$ σε (πάνω) ισοβαρείς συνθήκες ($P=0.1$ MPa) για διάφορες θερμοκρασίες στην περιοχή $297 < T < 353$ K και (κάτω) ισόθερμες συνθήκες ($T=343$ K) για πιέσεις $2 < P < 260$ MPa.



Εικ. 4.24. Χρόνοι χαλάρωσης του α -μηχανισμού του $PBLG_{45}$ συναρτήσει της πίεσης για διάφορες θερμοκρασίες: (τετράγωνα) 303 K, (κύκλοι) 313 K, (πάνω τρίγωνα) 323 K, (κάτω τρίγωνα) 333 K, (ρόμβοι) 343 K, (αριστερά τρίγωνα) 353 K, (δεξιά τρίγωνα) 363 K. Οι τιμές σε 0.1 MPa προέρχονται από τις μετρήσεις συναρτήσει τις θερμοκρασίας. Οι καμπύλες είναι προσαρμογή με την εξίσωση VFT για την πίεση (4.4).

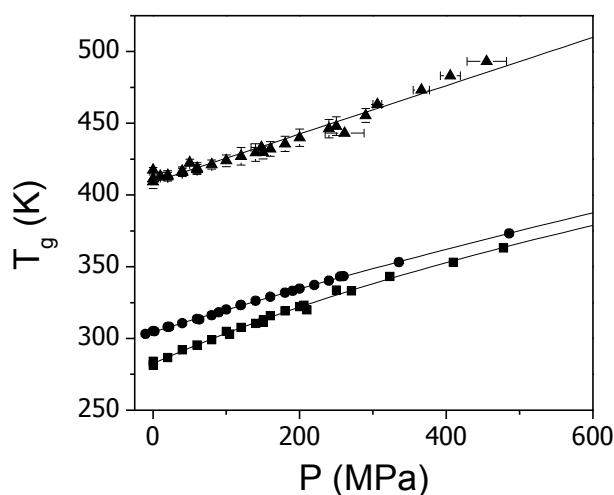


Εικ. 4.25. Οι χρόνοι της εικ. 4.24 συναρτήσει της αντίστροφης θερμοκρασίας για διάφορες πιέσεις: (κύκλοι) 0.1 MPa, (πάνω τρίγωνα) 20 MPa, (κάτω τρίγωνα) 40 MPa, (ρόμβοι) 60 MPa, (αριστερά τρίγωνα) 80 MPa, (δεξιά τρίγωνα) 100 MPa, (εξάγωνα) 120 MPa, (αστέρια) 140 MPa και (πεντάγωνα) 150 MPa. Τα τετράγωνα είναι από τις μετρήσεις συναρτήσει της θερμοκρασίας, ενώ οι καμπύλες προσαρμογή με την εξίσωση VFT (2.6).

Η εικ. 4.26 συγκεντρώνει τις τιμές του T_g και του P_g για τα τρία δείγματα που μελετήθηκαν. Τα σημεία για $P < 300$ MPa προέρχονται από τις τιμές του T_g , ενώ τα άλλα από του P_g . Οι καμπύλες προέρχονται από προσαρμογή με την εμπειρική εξίσωση [61]

$$T_g(P) = T_g(0) \left(1 + \frac{b}{a} P \right)^{1/b} \quad (4.5)$$

όπου $T_g(0)$ η θερμοκρασία υάλου σε ατμοσφαιρική πίεση και a , b σταθερές που δίνονται στον Πίνακα 4.3. Τα σημεία χωρίζουν το επίπεδο T - P σε δύο περιοχές: την υαλώδη περιοχή ($T < T_g(P)$) και την περιοχή τήγματος.



Εικ. 4.26. Εξάρτηση της θερμοκρασίας υάλου (ορισμένης σε $\tau=1$ s) από την πίεση για τα $PBLG_{45}$ (τετράγωνα), $PZLL_{135}$ (κύκλοι) και $PGly_{342}$ (τρίγωνα). Οι γραμμές προέρχονται από προσαρμογή με την εμπειρική εξίσωση 4.5, οι παράμετροι της οποίας δίνονται στον Πίνακα 4.3. Τα άλλα δύο δείγματα $PBLG$ (δεν δείχνονται) έχουν σχεδόν ίδιες τιμές με το $PBLG_{45}$, εκτός από μια μικρή διαφορά λόγω μοριακού βάρους.

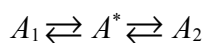
Πίνακας 4.3. Παράμετροι της εξ. 4.5 για την εξάρτηση $T_g(P)$. Δίνεται επίσης η αρχική κλίση dT_g/dP .

Δείγμα	$T_g(0)$ (K) ⁽¹⁾	a (MPa)	b	$(dT_g/dP)_{P \rightarrow 0}$ (K/MPa)
$PBLG_{45}$	283	1240	3.2	0.23
$PZLL_{135}$	305	1930	2.0	0.16
$PGly_{342}$	409	2430	1.0	0.17

⁽¹⁾Ορίζεται σε $\tau=1$ s.

Η εξάρτηση των χρόνων χαλάρωσης από την πίεση σχετίζεται με τον όγκο που απαιτείται

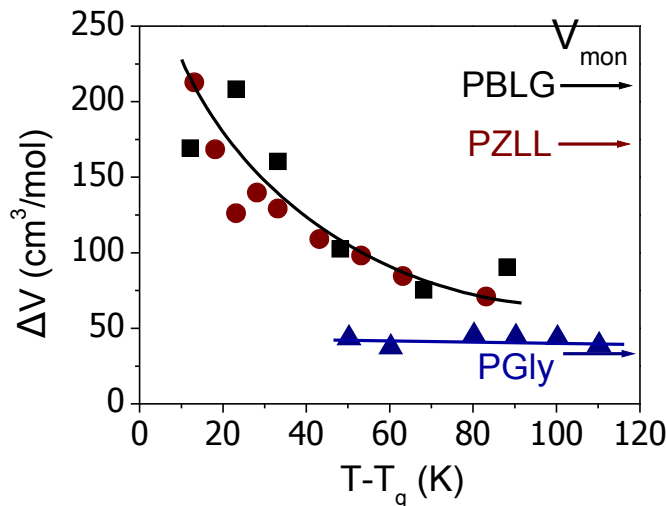
για την αντίστοιχη κίνηση. Σύμφωνα με τη θεωρία μεταβατικής κατάστασης των Eyring *et al.* [62], η χαλάρωση μεταξύ δύο καταστάσεων A_1 και A_2 γίνεται μέσω μιας ενεργοποιημένης κατάστασης A^*



Από τις δύο ισορροπίες και χρησιμοποιώντας τη συνθήκη για τα χημικά δυναμικά $\mu_A = \mu_{A^*}$ αποδεικνύεται ότι η διαφορά του όγκου μεταξύ της ενεργοποιημένης και των μη ενεργοποιημένων καταστάσεων $\Delta V = V_{A^*}(T,P) - V_A(T,P)$ ισούται με

$$\Delta V = N_A k_B T \left(\frac{\partial \ln \tau}{\partial P} \right)_T \quad (4.6)$$

Ο όγκος ΔV ονομάζεται φαινομενικός όγκος ενεργοποίησης. Σε μερικά υλικά η εξάρτηση του $\log \tau(P)$ είναι γραμμική οπότε ορίζεται μοναδική τιμή του ΔV . Σε άλλα, όμως, συστήματα, όπως και σε αυτά που εξετάζονται εδώ, η εξάρτηση δεν είναι γραμμική (εικ. 4.24), γι' αυτό και το ΔV ορίστηκε από την αρχική κλίση των καμπυλών $\log \tau(P)$ σε $P=0$. Οι τιμές του για τα PBLG₄₅, PZLL₁₃₅ και PGly₃₄₂ παρουσιάζονται στην εικ. 4.27 (τα αποτελέσματα για τα PBLG₇ και PBLG₁₄ είναι πρακτικά ίδια με του PBLG₄₅).

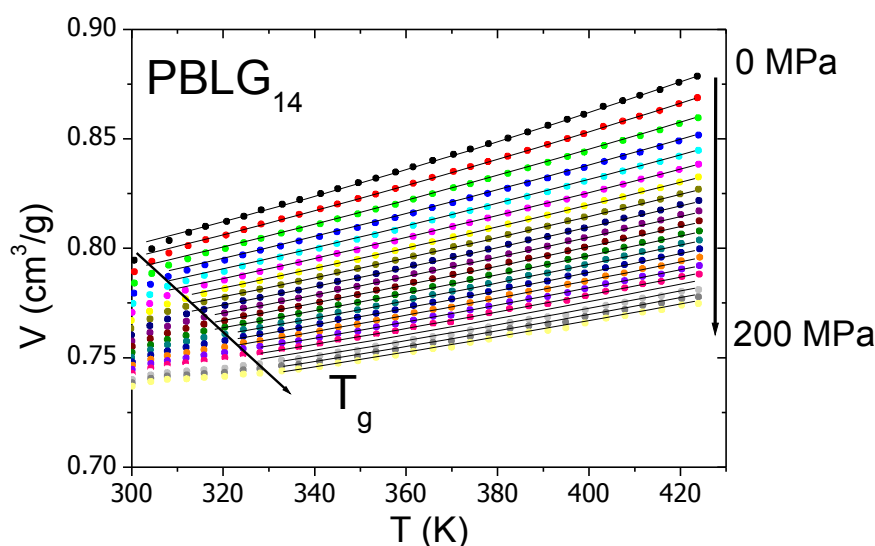


Εικ. 4.27. Φαινομενικός όγκος ενεργοποίησης (Εξ. 4.8) συναρτήσει της διαφοράς της θερμοκρασίας από το T_g για τα δείγματα PBLG₄₅ (τετράγωνα), PZLL₁₃₅ (κύκλοι) και PGly₃₄₂ (τρίγωνα). Οι γραμμές είναι οδηγοί για το μάτι. Σημειώνονται οι όγκοι των αντίστοιχων μονομερών $V_{mon} = MW/\rho$.

Η τιμή του ΔV , όπως έχει δειχθεί στη βιβλιογραφία για διάφορα πολυμερή, αυξάνεται κοντά στο T_g και μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, παίρνοντας τελικά μία τιμή που είναι συγκρίσιμη με τον όγκο του μονομερούς [38,55-59,63,64]. Αυτό ακριβώς παρατηρείται και στα

πεπτίδια που μελετήθηκαν. Το PBLG και η PZLL έχουν μεγαλύτερες τιμές ΔV από την PGly που έχει πολύ μικρότερο μονομερές ($V_{\text{mon}}=170, 205$ και $35 \text{ cm}^3/\text{mol}$, αντίστοιχα), και οι οποίες αυξάνονται ισχυρά κοντά στο T_g . Πρέπει να σημειωθεί ότι η δευτεροταγής δομή δεν φαίνεται να παίζει ιδιαίτερο ρόλο σε αυτό, γιατί και το PBLG₇ με μεγάλο ποσοστό β -φύλλων έχει την ίδια συμπεριφορά με τα μεγαλύτερα μοριακά βάρη που έχουν αποκλειστικά α -έλικες.

Στο Κεφ. 2 αναφέρθηκε ήδη ότι η «μετάβαση» υάλου μπορεί να παρατηρηθεί και μέσω της αλλαγής του συντελεστή διαστολής στις θερμοδυναμικές μετρήσεις πίεσης-όγκου-θερμοκρασίας (PVT). Η εικ. 4.28 δείχνει την εξάρτηση του ειδικού όγκου $V=1/\rho$ του PBLG₁₄ από τη θερμοκρασία για διάφορες πιέσεις. Στα δεδομένα με $T > T_g(P)$ έχει γίνει προσαρμογή με την εξίσωση Tait (3.4) της οποίας οι παράμετροι συγκεντρώνονται στον Πίνακα 4.4.



Εικ. 4.28. Εξάρτηση του ειδικού όγκου $V=1/\rho$ από τη θερμοκρασία για πιέσεις στην περιοχή $0 < P < 200$ MPa σε βήματα 10 MPa. Το T_g εμφανίζεται ως αλλαγή της κλίσης – συντελεστή διαστολής και η εξάρτησή του από την πίεση σημειώνεται με βέλος. Στα δεδομένα για $T > T_g(P)$ έχει γίνει προσαρμογή με την εξίσωση Tait (3.4). Οι παράμετροι συγκεντρώνονται στον πίνακα 4.4.

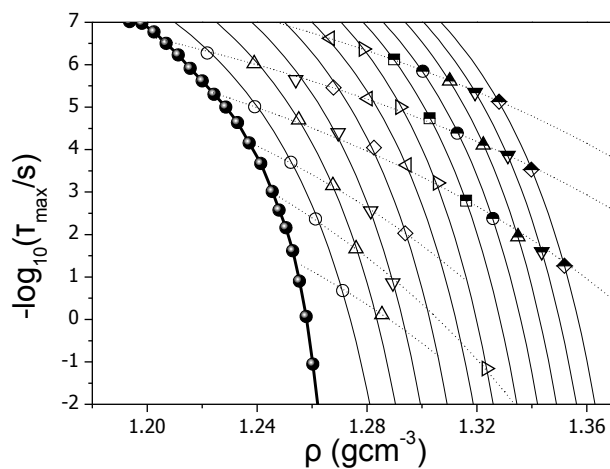
Πίνακας 4.4. Παράμετροι της εξίσωσης Tait (3.4) για τα δείγματα που έγιναν μετρήσεις PVT.

Δείγμα	a_0 (cm ³ /g)	a_1 (cm ³ /gK)	a_2 (cm ³ /gK ²)	B_0 (MPa)	B_1 (K ⁻¹)
PBLG ₁₄	0.710	7.85×10^{-5}	7.6×10^{-7}	441	4.3×10^{-3}
PGly ₃₄₂	0.563	1.50×10^{-4}	0	2360	2.5×10^{-3}

Η χρήση των δεδομένων PVT επιτρέπει να εκφραστούν οι χρόνοι χαλάρωσης συναρτήσει του όγκου (ή της πυκνότητας) του συστήματος. Η αναπαράσταση αυτή έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να ελέγξει άμεσα την ισχύ των θεωριών του ελεύθερου όγκου. Η απλούστερη από αυτές τις θεωρίες προβλέπει ότι οι χρόνοι χαλάρωσης σε συνθήκες (T,P) που αντιστοιχούν σε ίσο όγκο V πρέπει να είναι ίσοι. Κάτι τέτοιο απέχει πολύ από την πραγματικότητα, όπως δείχνει η εικ. 4.29 για τον α -μηχανισμό του PBLG₄₅. Οι χρόνοι χαλάρωσης για συγκεκριμένο όγκο μεταβάλλονται κατά πολλές δεκάδες με την αλλαγή της θερμοκρασίας, που σημαίνει ότι η θερμική ενέργεια $k_B T$ παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη δυναμική. Οι καμπύλες στην εικ 4.29 είναι προσαρμογή με την τροποποιημένη συνάρτηση VFT για την αναπαράσταση της πυκνότητας [60]

$$\tau_{\max} = \tau_0 \exp\left(\frac{D_\rho \rho}{\rho_0 - \rho}\right) \quad (4.7)$$

όπου D_ρ αδιάστατη παράμετρος και ρ_0 η πυκνότητα του «ιδανικού» γυαλιού. Η τιμή της D_ρ ήταν 4.61 και 1.15 για τα ισοβαρή και ισόθερμα δεδομένα της εικ. 4.29, αντίστοιχα.



Εικ. 4.29. Χρόνοι χαλάρωσης του α -μηχανισμού του PBLG₄₅ συναρτήσει της πυκνότητας του συστήματος. Οι συνεχείς και διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν σε ισοβαρείς και ισόθερμες συνθήκες και προέρχονται από προσαρμογή με τη μορφή της εξίσωσης VFT για την πυκνότητα. Τα δεδομένα είναι τα ίδια με των εικ. 4.24 και 4.25.

Η μείωση της θερμοκρασίας, εκτός από το ότι ελαττώνει τη θερμική ενέργεια $k_B T$, οδηγεί και σε μείωση του όγκου, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να εξεταστεί άμεσα η συνεισφορά των δύο παραγόντων. Η σύγκριση μπορεί να γίνει μέσω των φαινομενικών ενεργειών ενεργοποίησης υπό σταθερό όγκο και υπό σταθερή πίεση (ενθαλπία ενεργοποίησης):

$$\begin{aligned} E_V^*(T, V) &= -RT^2 \left(\frac{\partial \ln \tau}{\partial T} \right)_V \\ H^*(T, V) &= -RT^2 \left(\frac{\partial \ln \tau}{\partial T} \right)_P \end{aligned} \quad (4.8)$$

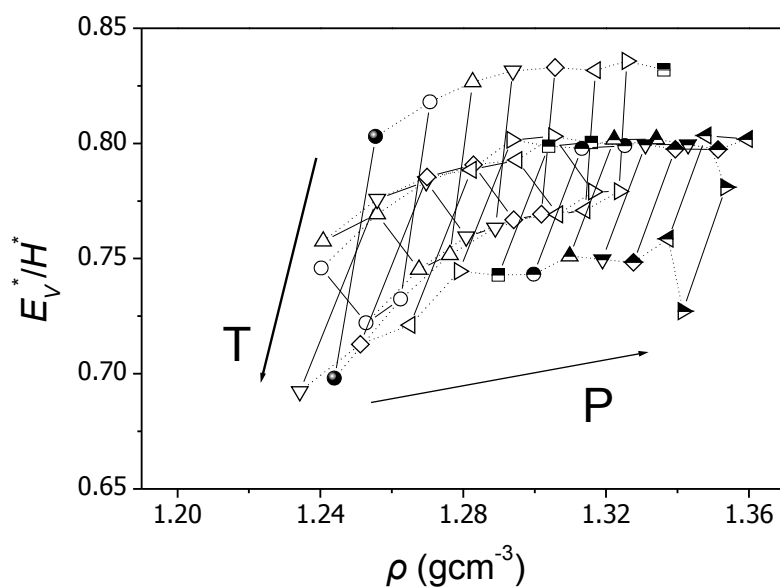
Η τιμή του λόγου E_V^*/H^* κυμαίνεται από 0 ως 1. Η απλή μορφή της θεωρίας ελεύθερου όγκου προβλέπει ότι ο χρόνος εξαρτάται μόνο από τον όγκο, και επομένως ο λόγος πρέπει να έχει τιμή μηδέν. Αντίθετα, αν τα θερμικά φαινόμενα κυριαρχούν, η τιμή του λόγου πλησιάζει τη μονάδα. Η αναπαράσταση των χρόνων, συναρτήσει της πυκνότητας, επιτρέπει τον εύκολο υπολογισμό του από τις κλίσεις των καμπυλών των ισοβαρών και ισόθερμων δεδομένων στο σημείο τομής τους:

$$\begin{aligned} \frac{E_V^*}{H^*} &= \frac{\left(\frac{\partial \log \tau}{\partial T} \right)_V}{\left(\frac{\partial \log \tau}{\partial T} \right)_P} \\ &= \frac{\left(\frac{\partial \log \tau}{\partial T} \right)_P + \left(\frac{\partial \log \tau}{\partial P} \right)_T \left(\frac{\partial P}{\partial T} \right)_P}{\left(\frac{\partial \log \tau}{\partial T} \right)_P} \\ &= 1 - \frac{\left(\frac{\partial \log \tau}{\partial P} \right)_T \left(\frac{\partial P}{\partial \rho} \right)_T}{\left(\frac{\partial \log \tau}{\partial T} \right)_P \left(\frac{\partial T}{\partial \rho} \right)_P} \\ &= 1 - \frac{\left(\frac{\partial \log \tau}{\partial \rho} \right)_T}{\left(\frac{\partial \log \tau}{\partial \rho} \right)_P} \end{aligned} \quad (4.9)$$

Ο λόγος E_V^*/H^* για το PBLG₄₅ έχει παρασταθεί γραφικά συναρτήσει της πυκνότητας στην εικ. 4.30, όπου φαίνεται ότι παίρνει τιμές από 0.70–0.85, ανάλογα με τις συνθήκες (T, P). Η συμπεριφορά των άλλων δύο δειγμάτων PBLG είναι εντελώς ανάλογη. Για να μπορεί να γίνει σύγκριση ανάμεσα στα διαφορετικά πεπτίδια, υπολογίστηκε ο λόγος σε $T \sim T_g + 30$ K και $P = 0.1$ MPa, όπου παίρνει τιμές 0.78, 0.83 και 0.80 για τα PBLG₄₅, PZLL₁₃₅ και PGly₃₄₂. Η υψηλή τιμή δείχνει ότι η θερμοκρασία παίζει τον κυρίαρχο ρόλο στη δυναμική του α -μηχανισμού, και επομένως η υαλοποίηση αυτών των συστημάτων οφείλεται κυρίως στη μείωση της θερμικής ενέργειας, παρά στην έλλειψη ελεύθερου όγκου. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τη θεώρηση ότι ο α -μηχανισμός

προέρχεται από περιοχές με σπασμένους δεσμούς υδρογόνου, γιατί η ισχύς των δεσμών εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία, παρά από τον όγκο. Οι παραπλήσιες τιμές για τα πεπτίδια με διαφορετική δευτεροταγή δομή και μέγεθος μονομερών υπονοεί ότι η θερμοκρασία επηρεάζει τους διαμοριακούς και τους ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου με τον ίδιο τρόπο.

Ανάλογη ανάλυση έγινε και για τους υπόλοιπους μηχανισμούς χαλάρωσης. Από τους μηχανισμούς κάτω από το σημείο υάλου μελετήθηκε μόνο ο β -μηχανισμός της PGly₃₄₂, ο οποίος είχε $\Delta V=20 \text{ cm}^3/\text{mol}$ και λόγο $E_V^*/H^* = 0.90$, δείχνοντας ότι πρόκειται για πολύ τοπικό μηχανισμό με αμελητέα εξάρτηση από τον όγκο, όπως αναμένεται. Οι ενδιάμεσοι και οι «αργοί» μηχανισμοί των δειγμάτων PBLG και της PZLL₁₃₅ έχουν παρόμοιο λόγο ενεργειών ενεργοποίησης με τον αντίστοιχο α -μηχανισμό (όλες οι τιμές είναι ~ 0.8), αλλά κάπως μικρότερες τιμές όγκου ενεργοποίησης $\Delta V \sim 50 \text{ cm}^3/\text{mol}$, σχεδόν ανεξάρτητες από τη θερμοκρασία. Η χαμηλή τιμή του ΔV για τον «αργό» μηχανισμό είναι ισχυρή ένδειξη ότι δεν οφείλεται σε περιστροφή απ' άκρου εις άκρον της αλυσίδας, που θα απαιτούσε μεγάλο όγκο, αλλά σε μια πιο τοπική κίνηση (Κεφ. 5).



Εικ. 4.30. Εξάρτηση του λόγου E_V^*/H^* των φαινομενικών ενεργειών ενεργοποίησης υπό σταθερό όγκο και υπό σταθερή πίεση από τη θερμοκρασία και την πίεση στην περιοχή $297 < T < 373 \text{ K}$ και $0.1 < P < 260 \text{ MPa}$. Παρουσιάζεται μόνο μια ελαφρά μείωση με την αύξηση της θερμοκρασίας.

4.6 Συμπεράσματα

Σε αυτό το κεφάλαιο μελετήθηκε η προέλευση του φαινομένου της μετάβασης υάλου ομοπολυπεπτιδίων διαφορετικής δομής και βαθμού πολυμερισμού, απουσία και παρουσία διαλυτών. Τα κυριότερα αποτελέσματα είναι:

1. Τα πεπτίδια PBLG μικρού βαθμού-πολυμερισμού $\langle x \rangle < 18$ σχηματίζουν β -φύλλα, ενώ τα μεγαλύτερα α -έλικες. Από τα υπόλοιπα συστήματα, η PZLL και η PLeu σχηματίζουν α -έλικες, ενώ η PGly και η PTyr β -φύλλα.
2. Σε όλα τα συστήματα εμφανίζεται «μετάβαση» υάλου, βάσει των θερμοδυναμικών δεδομένων DSC και PVT, ανεξαρτήτως δομής, υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για εγγενές χαρακτηριστικό των πεπτιδίων.
3. Η εξάρτηση του σημείου υάλου από το μοριακό βάρος είναι τύπου Fox-Flory, όπως στα άμορφα πολυμερή, δείχνοντας τη σημασία των άκρων της αλυσίδας στη δυναμική και ότι η «μετάβαση» υάλου δεν οφείλεται σε κινήσεις πλευρικών αλυσίδων.
4. Υπάρχουν πολλαπλοί διηλεκτρικά ενεργοί μηχανισμοί σε $T > T_g$ και $T < T_g$. Ένας από αυτούς «παγώνει» στο σημείο υάλου και ονομάζεται α -μηχανισμός. Τα χαρακτηριστικά του είναι: (α) δεν έχει Arrhenius εξάρτηση από τη θερμοκρασία (Εξ. 4.1), (β) δεν μπορεί να περιγραφεί από τη συνάρτηση Debye (Εξ. 3.22), δηλαδή έχει ευρεία κατανομή χρόνων χαλάρωσης, (γ) είναι διαχωρισμένος από τους δευτερεύοντες μηχανισμούς και (δ) οφείλεται στην ύπαρξη ατελειών της δευτεροταγούς δομής, καθώς και στη δυναμική των ελεύθερων άκρων.
5. Η «μετάβαση» υάλου εμφανίζεται και απουσία διαλύτη. Στα διαλύματα παρατηρούνται δύο T_g , του διαλύτη και του πεπτιδίου.
6. Οι μετρήσεις συναρτήσεως της πίεσης έδειξαν ότι η «μετάβαση» υάλου οφείλεται στην μείωση της θερμικής ενέργειας, παρά στην έλλειψη ελεύθερου όγκου. Αυτό είναι συμβατό με τα προηγούμενα αποτελέσματα, καθώς η χαλάρωση οφείλεται στο σπάσιμο δεσμών υδρογόνου, η ισχύς των οποίων εξαρτάται από τη θερμοκρασία.

Αναφορές

- [1] Vitkup, D.; Melamud, E.; Moulton, J.; Sander, C. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 34 (2000).

- [2] Rasmussen, B. F.; Stock, A. M.; Ringe, D.; Petsko, G. A. *Nature (London)* **357**, 423 (1992).
- [3] Doster, W.; Cusack, S.; Petry, W. *Nature (London)* **337**, 754 (1989).
- [4] Tilton, R. F.; Dewan, J. C.; Petsko, G. A. *Biochemistry* **31**, 2469 (1992).
- [5] Keller, H.; Debrunner, P. G. *Phys. Rev. Lett.* **45**, 68 (1980).
- [6] Iben, I. E. T.; Braunstein, D.; Doster, W.; Frauenfelder, H.; Hong, M. K.; Johnson, J. B.; Luck, S.; Ormos, P.; Schulte, A.; Steinback, P. J.; Xie, A.; Young, R. D. *Phys. Rev. Lett.* **62**, 1916 (1989).
- [7] Smith, J.; Kuczera, K.; Karplus, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1601 (1990).
- [8] Norberg, J.; Nilsson, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10173 (1996).
- [9] Romero Colomer, F.; Gomes Ribelles, J. L. *Polymer* **30**, 849 (1989).
- [10] Romero Colomer, F. J.; Gomez Ribelles, J. L.; Barrales-Rienda, J. M. *Macromolecules* **27**, 5004 (1994).
- [11] Romero Colomer, F.; Gomes Ribelles, J. L.; Lloveros Macia, J.; Guerra Munoz, S. *Polymer* **32**, 1642 (1991).
- [12] Watanabe, J.; Uematsu, I. *Polymer* **25**, 1711 (1984).
- [13] Schmidt, A.; Lehmann, S.; Georgelin, M.; Katana, G.; Mathauer, K.; Kremer, F.; Schmidt-Rohr, K.; Boeffel, C.; Wegner, G.; Knoll, W. *Macromolecules* **28**, 5487 (1995).
- [14] Hartmann, L.; Kratzmuller, T.; Braun, H.-G.; Kremer, F. *Macromol. Rapid Commun.* **21**, 814 (2000).
- [15] Williams, G. *Trans. Faraday Soc.* **62**, 1321 (1966).
- [16] Walton, A. G.; Blackwell, J. in *Biopolymers*; Academic Press: New York 1973.
- [17] Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Klok, H.-A.; Schnell, I.; Pakula, T. *Biomacromolecules* **5**, 81 (2004).
- [18] Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Klok, H.-A.; Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *J. Chem. Phys.* **123** (2005).
- [19] Block, H. in *Poly(γ -benzyl-L-glutamate) and other glutamic acid containing polymers*; Gordon and Breach Science Publishers: New York 1983.
- [20] Jaworek, T.; Neher, D.; Wegner, G.; Wieringa, R. H.; Schouten, A. J. *Science* **279**, 57 (1998).
- [21] Yu, S. M.; Soto, C. M.; Tirrell, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 6552 (2000).
- [22] Worley, C. G.; Linton, R. W.; Samulski, E. T. *Langmuir* **11**, 3805 (1995).

- [23] Wada, A. *J. Chem. Phys.* **29**, 674 (1958); **30**, 328 (1959); **30**, 324 (1959).
- [24] Mori, Y.; Ookubo, N.; Hayakawa, R.; Wada, Y. *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* **20**, 211 (1982).
- [25] Moscicki, J. K.; Williams, G. *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* **21**, 197 (1983); **21**, 213 (1983).
- [26] Flory, P. J. *Macromolecules* **11**, 1126 (1978).
- [27] Flory P. J.; Frost, R. S. *Macromolecules* **11**, 1134 (1978).
- [28] Muroga, Y.; Nagasawa, M. *Biopolymers* **45**, 281 (1998).
- [29] Zimm, B. H.; Bragg, J. K. *J. Chem. Phys.* **31**, 526 (1959).
- [30] Yu, S. M., Soto, C. M.; Tirrell, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 6552 (2000).
- [31] Watanabe, J.; Uematsu, I. *Polymer*, **25**, 1711 (1984).
- [32] Elliott, A.; Fraser, R. D. B.; MacRae, T. P. *J. Mol. Biol.* **11**, 821 (1965).
- [33] Watanabe, J.; Imai, K.; Gehani, R.; Uematsu, I. *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* **19**, 653 (1981).
- [34] McKinnon, A. J.; Tobolsky, A. V. *J. Phys. Chem.* **72**, 1157 (1968).
- [35] Komoto, T.; Kim, K. Y.; Kawai, T. *Makromol. Chem.* **179**, 373 (1978).
- [36] Vogel, H. *Phys. Z.* **22**, 645 (1921); Fulcher, G. S. *J. Am. Ceram. Soc.* **8**, 339 (1923); Tammann, G.; Hesse, W. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **156**, 245 (1926).
- [37] Mierzwa, M.; Floudas, G.; Wewerka A. *Phys. Rev. E.* **64**, 31703 (2001).
- [38] Mierzwa, M.; Floudas, G.; Neidhofer, M.; Graf, R.; Spiess, H. W.; Meyer, W. H.; Wegner, G. *J. Chem. Phys.* **117**, 6289 (2002).
- [39] McCrum, N. G.; Read, B. E.; Williams, G. in *Anelastic and Dielectric Effects in Polymeric Solids; Dover Publ. Inc.: New York*, 1991.
- [40] Lotz, B. *J. Mol. Biol.* **87**, 169 (1974).
- [41] Teeter, M. M.; Yamano, A.; Stec, B.; Mohanty, U. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11242 (2001).
- [42] Cordone, L.; Ferrand, M.; Vitrano, E.; Zaccai, G. *Biophys. J.* **76**, 1043 (1999).
- [43] Tsai, A. M.; Neumann, D. A.; Bell, L. N. *Biophys. J.* **79**, 2728 (2000).
- [44] Paciaroni, A.; Cinelli, S.; Onori, G. *Biophys. J.* **83**, 1157 (2002).
- [45] 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.* **121**, 1978 (2004).
- [46] Ferrand, M.; Dianoux, A. J.; Petry, W.; Zaccai, G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9668

(1993).

[47] Weik, M. *Eur. Phys. J. E* **12**, 153 (2003).

[48] Kamei, T.; Oobatake, M.; Suzuki, M. *Biophys. J.* **82**, 418 (2002).

[49] Laudát, J.; Laudát, F. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **11**, 1345 (1994).

[50] Ferrer, M. L.; Lawrence, C.; Demirjian, B. G.; Kivelson, D.; Alba-Simionesco, C.; Tarjus, G. *J. Chem. Phys.* **109**, 8010 (1998).

[51] Paluch, M.; Roland, C. M.; Casalini, R.; Meier, G.; Patkowski, A. *J. Chem. Phys.* **118**, 4578 (2003).

[52] Paluch, M.; Casalini, R.; Roland, C. M. *Phys. Rev. B* **66**, 092202 (2002).

[53] Paluch, M.; Roland, C. M.; Pawlus, S.; Zioo, J.; Ngai, K. L. *Phys. Rev. Lett.* **91**, 115701 (2003).

[54] Floudas, G. *Prog. Polym. Sci.* **29**, 1143 (2004).

[55] Mpoukouvalas, K.; Floudas, G. *Phys. Rev. E* **68**, 031801 (2003).

[56] Floudas, G.; Mierzwa, M.; Schönhals, A. *Phys. Rev. E* **67**, 031705 (2003).

[57] Mierzwa, M.; Floudas, G.; Štěpánek, P.; Wegner, G. *Phys. Rev. B* **62**, 14012 (2000).

[58] Gitsas, A.; Floudas, G.; Wegner, G. *Phys. Rev. E* **69**, 041802 (2004).

[59] Papadopoulos, P.; Peristeraki, D.; Floudas, G.; Koutalas, G.; N. Hadjichristidis, N. *Macromolecules* **37**, 8116 (2004).

[60] Paluch, M.; Patkowski, A.; Fischer, E. W. *Phys. Rev. Lett.* **85**, 2140 (2000).

[61] Andersson, S. P.; Andersson, O. *Macromolecules* **31**, 2999 (1998).

[62] Glasstone, Laidler, Eyring *Theory of rate processes*, McGraw Hill 1941.

[63] Floudas, G.; Gravalides, C.; Reisinger, T.; Wegner, G. *J. Chem. Phys.* **111**, 9847 (1999).

[64] Floudas, G. in *Broadband Dielectric Spectroscopy*; Kremer, F., Schönhals, A., Eds.; Springer: New York, 2003 (Chapter 8).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΗΚΟΣ ΕΜΜΟΝΗΣ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΩΝ ΔΟΜΩΝ

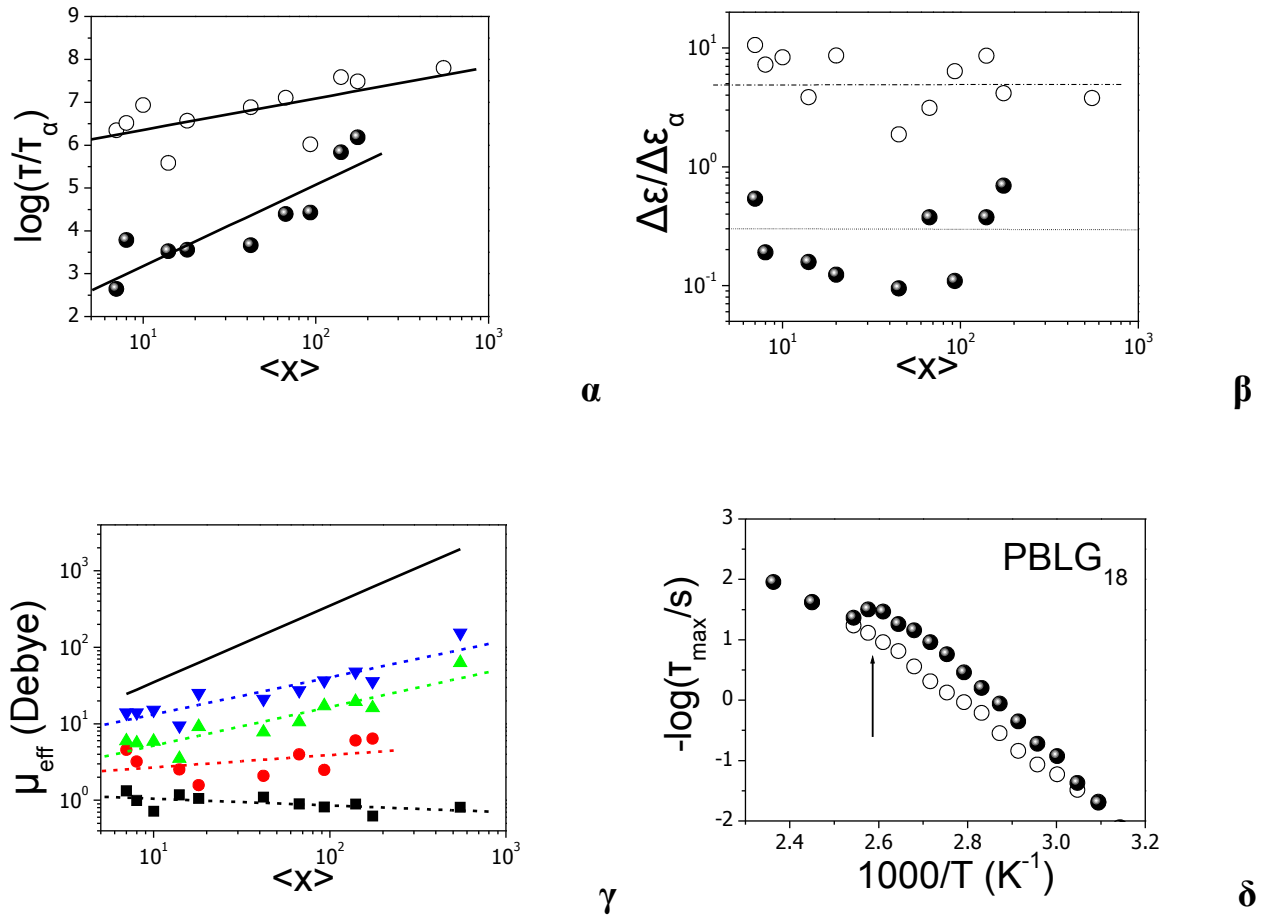
5.1 Εισαγωγή

Στο Κεφ. 4 αποδείχθηκε η ύπαρξη της «μετάβασης» υάλου στα πεπτίδια, ανεξάρτητα από την ύπαρξη διαλύτη, τη δευτεροταγή δομή και το είδος του αμινοξέος. Στα συστήματα αυτά παρατηρείται τμηματικός (α -) μηχανισμός ανάλογος με αυτόν των άμορφων συνθετικών πολυμερών, που αποδίδεται σε ατέλειες, δηλαδή σπασμένους δεσμούς υδρογόνου. Εκτός από αυτόν παρατηρούνται και άλλοι, πιο αργοί, μηχανισμοί πάνω από το σημείο υάλου. Οι μηχανισμοί αυτοί φαίνεται ότι οφείλονται σε κινήσεις μεγαλύτερων τμημάτων των αλυσίδων και μπορούν να δώσουν πληροφορίες για το μήκος εμμόνης, οι οποίες δεν μπορούν να ληφθούν από τις στατικές μετρήσεις. Σε αυτό το κεφάλαιο θα γίνει διερεύνηση της προέλευσης αυτών των μηχανισμών, εκτίμηση του μήκους εμμόνης της α -έλικας και μελέτη της επίδρασης διαλύτη και ηλεκτρικού πεδίου σε αυτό. Επίσης, θα μελετηθεί η σχέση της κίνησης των ιόντων με τους πιο αργούς μηχανισμούς.

5.2 Μηχανισμοί χαλάρωσης πάνω από το σημείο υάλου

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο Κεφ. 4, στα περισσότερα ομοπολυπεπτίδια, εκτός του α -μηχανισμού, υπάρχουν και άλλοι πιο αργοί μηχανισμοί. Η εικ. 5.1 συγκρίνει τους χρόνους, τις εντάσεις και τις αντίστοιχες διπολικές ροπές του ενδιάμεσου και του «αργού» μηχανισμού της σειράς πεπτιδίων PBLG. Λόγω της εξάρτησης του α -μηχανισμού από το βαθμό πολυμερισμού, οι χρόνοι και οι εντάσεις των δύο πιο αργών μηχανισμών έχουν διαιρεθεί με τους αντίστοιχους του α -μηχανισμού. Η εξάρτηση των χρόνων του ενδιάμεσου και του «αργού» μηχανισμού διαφέρει πολύ: ο πρώτος έχει έντονη εξάρτηση από το μήκος του πεπτιδίου, $\tau_i \sim \langle x \rangle^{1.9}$, ενώ ο δεύτερος πολύ ασθενέστερη, $\tau_s \sim \langle x \rangle^{0.7}$. Ο ενδιάμεσος μηχανισμός επίσης είναι πολύ ασθενής ($\Delta\epsilon_i/\Delta\epsilon_\alpha \sim 0.3$), ενώ ο πιο αργός παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ένταση από όλους τους μηχανισμούς ($\Delta\epsilon_s/\Delta\epsilon_\alpha \sim 5$). Από τους δύο, μόνο ο πιο αργός είχε παρατηρηθεί προηγουμένως και είχε αποδοθεί στην εγκλωβισμένη εντός κώνου κίνηση των α -ελίκων που θεωρήθηκαν άκαμπτες (μοντέλο *chopstick*)

[1-4]. Ο ενδιάμεσος μηχανισμός της PZLL είναι ασθενής, $\Delta\epsilon \sim 0.4$, όπως και στο PBLG, ενώ ο «αργός» είναι πιο ισχυρός, ($\Delta\epsilon \sim 5.0$), όπως και της P Tyr ($\Delta\epsilon \sim 4.5$) και της PLeu ($\Delta\epsilon \sim 3.6$).



Εικ. 5.1. (α) Χρόνοι του ενδιάμεσου (κλειστά σύμβολα) και του «αργού» μηχανισμού (ανοιχτά σύμβολα) της σειράς ομοπολυπεπτιδίων PBLG στους 338 K, διαιρεμένοι με το χρόνο του α-μηχανισμού, συναρτήσει του βαθμού πολυμερισμού. Το μεγάλο μοριακό βάρος είναι από δεδομένα των Hartmann et al. [4]. Ο ενδιάμεσος παρουσιάζει ισχυρή εξάρτηση $\tau_i \sim \langle x \rangle^{1.9}$, ενώ ο πιο αργός $\tau_s \sim \langle x \rangle^{0.7}$. Να σημειωθεί ότι για άκαμπτη έλικα αναμένεται $\tau_{chopstick} \sim \langle x \rangle^3$. (β) Σχετικές εντάσεις των δύο μηχανισμών. Ο ενδιάμεσος είναι πολύ ασθενής (~ 5% της συνολικής έντασης), ενώ ο αργός πολύ ισχυρός. (γ) Ενεργός διπολική ροπή που αντιστοιχεί στον α- (τετράγωνα), τον ενδιάμεσο (κύκλοι) και τον «αργό» μηχανισμό (πάνω τρίγωνα, από εξ. Kirkwood-Fröhlich 3.12, κάτω τρίγωνα, από εξ. Buckingham 3.14). Για τον πρώτο η αριθμητική πυκνότητα των διπόλων θεωρήθηκε ίση με των μονομερών, ενώ για τους άλλους δύο ίση με των αλυσίδων. Η συνεχής ευθεία γραμμή είναι η θεωρητική τιμή για ιδανική α-έλικα ($3.5 \text{ Debye} \cdot \langle x \rangle$), ενώ οι διακεκομμένες είναι γραμμική προσαρμογή στα σημεία. Οι αποκλίσεις των χρόνων και των διπολικών ροπών του αργού μηχανισμού είναι πολύ έντονες, ανεξάρτητα του τρόπου υπολογισμού, δείχνοντας ότι η έλικα δεν είναι άκαμπτη. (δ) Χρόνοι του «αργού» μηχανισμού κατά την 1η θέρμανση (κλειστά σημεία) και την 1η ψύξη. Στην πρώτη θέρμανση παρατηρείται μία περιοχή στους ~ 380 K επιβράδυνσης με την αύξηση της θερμοκρασίας που εξηγείται μόνο με δραματική αλλαγή του μήκους εμμονής της δομής που συνοδεύει την αλλαγή της έλικας από 7/2 σε 18/5. Με την ψύξη δεν επανέρχεται στις αρχικές τιμές.

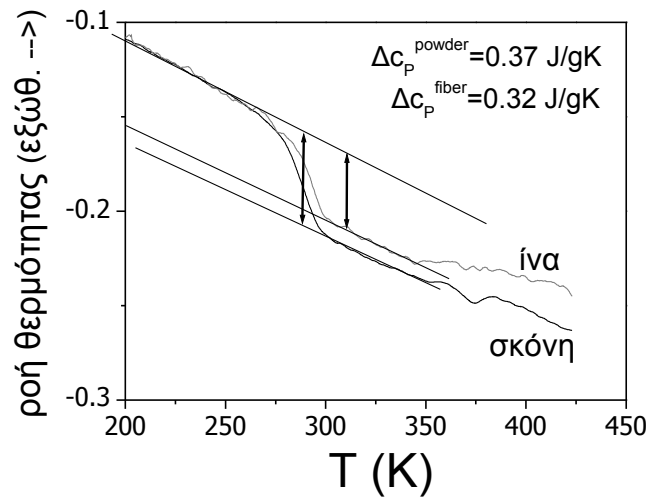
Ο ενδιάμεσος μηχανισμός μπορεί να αποδοθεί στην κίνηση άμορφων τμημάτων των αλυσίδων, καθώς η εξάρτηση των χρόνων του είναι όμοια με τον μηχανισμό απ' άκρου εις άκρον άμορφων πολυμερών χωρίς διαπλοκές ($\tau \sim \langle x \rangle^2$). Αυτά τα άμορφα τμήματα πρέπει να αποτελούν πολύ μικρό ποσοστό, γιατί η ένταση του μηχανισμού είναι ~5% της συνολικής, γεγονός που δικαιολογεί την απουσία τους από την ανάλυση της δομής. Τα άμορφα τμήματα θα προκαλούσαν διεύρυνση των ανακλάσεων στο WAXS, αλλά και στο NMR και το FTIR. Τέτοιου είδους ανάλυση, όμως, αποκλείεται λόγω του μικρού ποσοστού.

Ο «αργός» μηχανισμός έχει χαρακτηριστικά που δεν ταιριάζουν με το μοντέλο της άκαμπτης ράβδου για την α -έλικα. Οι χρόνοι χαλάρωσης παρουσιάζουν ασθενή μόνο εξάρτηση από το βαθμό πολυμερισμού, σε αντίθεση με την ισχυρή εξάρτηση $\tau \sim \langle x \rangle^3$ της περιστροφής των ελίκων σε αραιά διαλύματα και της πρόβλεψης του μοντέλου *chopstick* (Κεφ. 2) [1]. Αυτό υπονοεί ότι οι α -έλικες δεν είναι άκαμπτες, αλλά έχουν ατέλειες, δηλαδή χαλαρωμένους ή σπασμένους δεσμούς υδρογόνου, με αποτέλεσμα τμήματά τους, αποτελούμενα από λίγα αμινοξέα, να κινούνται ανεξάρτητα. Αποκλίσεις από την ιδανική δομή έχουν ήδη παρατηρηθεί σε αραιά διαλύματα πεπτιδίων μικρών και μεγάλων μοριακών βαρών (Κεφ. 2) [5,6]. Στην πρώτη περίπτωση βρέθηκε ότι η γυροσκοπική ακτίνα είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την αντίστοιχη ιδανική έλικα, και υποδηλώνει ότι τα άκρα παίρνουν μια πιο εκτεταμένη διαμόρφωση. Στη δεύτερη περίπτωση η γυροσκοπική ακτίνα ήταν μικρότερη, και αυτό δείχνει ότι τα μεγάλα πεπτιδία έχουν πιο εύκαμπτες αλυσίδες, δίνοντας μια εικόνα «σπασμένης» έλικας σε αρκετά σημεία με ξετυλιγμένα τα άκρα.

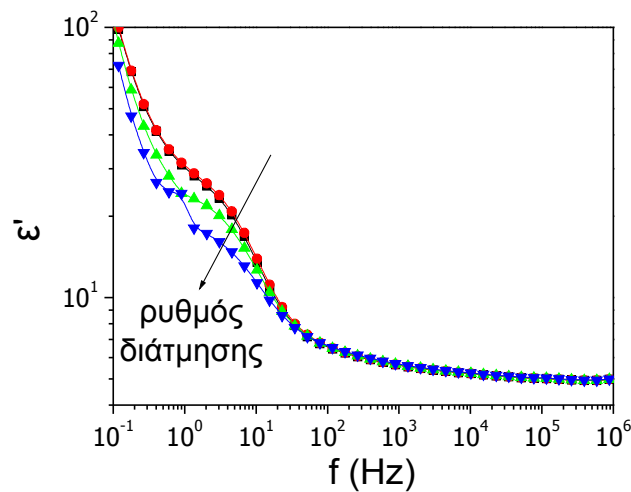
Οι μηχανικές μετρήσεις, που αναφέρθηκαν ήδη στο Κεφ. 4, δείχνουν ότι δεν εμφανίζεται ροή του συστήματος μέχρι τους 473 K (εικ. 4.14). Επομένως, ο «αργός» μηχανισμός δεν μπορεί να αποδοθεί σε χαλάρωση απ' άκρου εις άκρον, αλλά σε κινήσεις μικρότερων τμημάτων της αλυσίδας. Ο υπολογισμός της διπολικής ροπής που αντιστοιχεί στον «αργό» μηχανισμό, μπορεί να δια φωτίσει περισσότερο την κατάσταση. Στους υπολογισμούς η αριθμητική πυκνότητα των διπόλων θεωρήθηκε ίση με την αριθμητική πυκνότητα των αλυσίδων και όχι των μονομερών, όπως για τον α -μηχανισμό. Η ιδανική και ελεύθερα περιστρεφόμενη α -έλικα έπρεπε να δίνει διπολική ροπή ανάλογη του μήκους του πεπτιδίου (~ 3.5 Debye/μονομερές), όπως στα αραιά διαλύματα [7], ενώ σε στερεά μορφή η ροπή έπρεπε να είναι μικρότερη, λόγω του περιορισμού της κίνησης από τις γειτονικές έλικες, αλλά με όμοια εξάρτηση από το βαθμό πολυμερισμού. Η εικ. 5.1α δείχνει μία πολύ διαφορετική εξάρτηση από την αναμενόμενη. Για όλα τα δείγματα η υπολογισμένη διπολική ροπή είναι πολύ μικρότερη από τη θεωρητική και, επιπλέον, η εξάρτηση από το βαθμό

πολυμερισμού είναι ασθενέστερη, $\mu_{eff} \sim \langle x \rangle^{0.5}$. Λεπτομερέστερη ανάλυση θα γίνει στο τμήμα 5.3, όπου θα γίνει προσπάθεια εξαγωγής ποσοτικών αποτελεσμάτων για το μήκος εμμόνης. Πρέπει να τονιστεί ότι η (στατική) αντιπαράλληλη τοποθέτηση των ελίκων στο εξαγωνικό πλέγμα δεν επηρεάζει τα (δυναμικά) αποτελέσματα, γιατί στη $\Delta\Phi$ φαίνονται μόνο οι αλλαγές από τη θέση ισορροπίας. Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η δομή της έλικας είναι «σπασμένη», όπως και στα διαλύματα, με πολύ περισσότερες, όμως, ατέλειες, καθώς παρατηρούνται αποκλίσεις για όλα τα μοριακά βάρη.

Πολύ σημαντική ένδειξη ότι η δομή περιέχει ατέλειες είναι η παράξενη συμπεριφορά του αργού μηχανισμού κατά την πρώτη θέρμανση (εικ. 5.1δ). Σε $T \sim 380$ K, όπου συμβαίνει η αλλαγή της έλικας 7/2 σε 18/5 [8], ο μηχανισμός επιβραδύνεται, δείχνοντας ελάττωση των ατελειών κατά την αναδιαμόρφωση της έλικας. Κατά την ψύξη, όπως και σε επόμενη θέρμανση, οι χρόνοι παραμένουν το ίδιο αργοί. Διαφορά παρατηρείται και στη μεταβολή της θερμοχωρητικότητας κατά τη «μετάβαση» υάλου, Δc_p , ανάμεσα στην ίνα που έχει παραχθεί με εφελκυσμό και στο πεπτίδιο σε μορφή σκόνης (εικ. 5.2). Η ίνα έχει μειωμένο Δc_p (0.32 J/gK έναντι 0.37 J/gK της σκόνης), δείχνοντας ότι η «μετάβαση» υάλου οφείλεται στις ατέλειες, που μειώνονται λόγω εφελκυσμού. Η διάτμηση, αντίθετα, οδηγεί σε αύξηση των ατελειών και μείωση του μήκους εμμόνης, που αντανακλάται σε μείωση της έντασης του «αργού» μηχανισμού (εικ. 5.3). Αν και συνήθως οι πολυμερικές αλυσίδες οργανώνονται καλύτερα με τη διάτμηση, όπως και με τον εφελκυσμό, η ανομοιομορφία του ρυθμού διάτμησης στο δείγμα και το γεγονός ότι η διάτμηση δεν γίνεται παράλληλα προς τον άξονα των ελίκων προκαλούν «σπασίματα» στις έλικες.



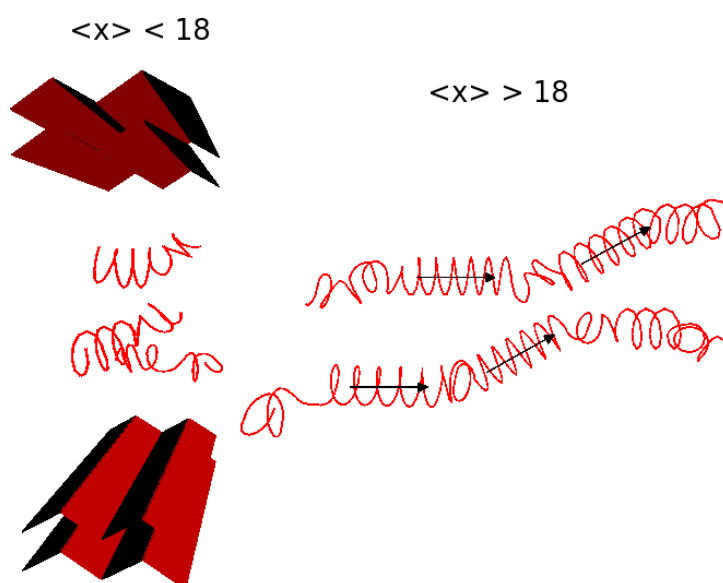
Εικ. 5.2. Καμπύλες ροής θερμότητας από ΔΘΣ για PBLG₄₅ σε σκόνη (μαύρη γραμμή) και εφελκυσμένη ίνα από το ίδιο υλικό (γκρι γραμμή). Η μείωση της μεταβολής της θερμοχωρητικότητας Δc_p είναι εμφανής.



Εικ. 5.3. Πραγματικό μέρος της διηλεκτρικής συνάρτησης (ϵ') δείγματος PBLG₄₉ στους 393 K, για διάφορους ρυθμούς διάτμησης: (τετράγωνα) $\dot{\gamma}=10^{-3} \text{ s}^{-1}$, (κύκλοι) $\dot{\gamma}=10^{-2} \text{ s}^{-1}$, (πάνω τρίγωνα) $\dot{\gamma}=0.1 \text{ s}^{-1}$, (κάτω τρίγωνα) $\dot{\gamma}=0.2 \text{ s}^{-1}$. Το ρεόμετρο εργαζόταν σε ταλαντωτικό τρόπο λειτουργίας με $f=10 \text{ Hz}$. Η ένταση του αργού μηχανισμού μειώνεται με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης, αντανακλώντας την αύξηση του αριθμού σπασμένων δεσμών υδρογόνου και μείωση του μήκους εμμόνης της α -έλικας.

Η εικόνα για τη δομή των α -ελίκων δεν μπορεί να είναι στατική, αλλά έχει δυναμικό χαρακτήρα. Η χαλάρωση στα άμορφα τμήματα, δηλαδή τους βρόχους στα άκρα ή τις ατέλειες στο εσωτερικό, οδηγεί σε αλλαγές της διαμόρφωσης ολόκληρης της αλυσίδας, με αποτέλεσμα οι ατέλειες να διαδίδονται κατά μήκος της και να αλλάζει η θέση και το μήκος των ελικοειδών

τμημάτων. Ο δυναμικός χαρακτήρας εξηγεί και την ύπαρξη του α -μηχανισμού, ο οποίος δεν θα έπρεπε να εμφανίζεται αν η δομή ήταν ιδανική. Η τελική εικόνα («δυναμική δομή») των πεπτιδίων PBLG, βασισμένη στα αποτελέσματα της διερεύνησης της δομής και της δυναμικής, παρουσιάζεται σχηματικά στην εικ. 5.4. Για $\langle x \rangle < 18$ συνυπάρχουν β -φύλλα με σχεδόν άμορφες αλυσίδες, ενώ $\langle x \rangle > 18$ το σύστημα αποτελείται από έλικες χαμηλού μήκους εμμόνης, με ατέλειες που «διαδίδονται» κατά μήκος της αλυσίδας.



Εικ. 5.4. Σχηματική αναπαράσταση της τελικής εικόνας για τη δομή του PBLG βάσει των στατικών και δυναμικών μετρήσεων (βλέπε και εικ. 4.8). Τα μικρά πεπτιδία (αριστερά) αποτελούνται από β -φύλλα και σχεδόν άμορφες αλυσίδες που διαπλέκονται μεταξύ τους, ενώ τα πιο μακριά έχουν «σπασμένες» α -έλικες με ζετυλιγμένα άκρα. Τα βέλη δείχνουν τη διπολική ροπή των ελικοειδών τμημάτων. Οι ατέλειες έχουν δυναμικό χαρακτήρα και διαδίδονται κατά μήκος της αλυσίδας.

Στα υπόλοιπα ομοπολυπεπτιδία παρατηρήθηκε επίσης ένας πιο αργός μηχανισμός με παρόμοια ένταση με αυτόν του PBLG, με εξαίρεση την PGly (εικ. 4.19). Στην PZLL παρατηρήθηκε επιπλέον ο ασθενής ενδιάμεσος μηχανισμός. Επομένως, είναι βέβαιο ότι για αυτό το σύστημα η προέλευση αυτών των μηχανισμών είναι ίδια με του PBLG. Στην PLeu, αν και δεν έγινε μελέτη πολλών μοριακών βαρών, η σχετικά μικρή διαφορά των χρόνων χαλάρωσης του α - και του «αργού» μηχανισμού δείχνει ότι ο τελευταίος δεν μπορεί να είναι χαλάρωση απ' άκρου εις άκρον, αλλά οφείλεται και εδώ στη διάχυση ατελειών. Η «δυναμική δομή» όλων των συστημάτων είναι παρόμοια με του PBLG, με τη διαφορά ότι η PGly και η PΤγρ σχηματίζουν β -φύλλα αντί για α -έλικες.

5.3 Εκτίμηση του μήκους εμμόνης των α-ελίκων

Στο προηγούμενο τμήμα έγινε αναφορά στον «αργό» μηχανισμό της σειράς ομοπολυπεπτιδίων PBLG, όπου διαπιστώθηκε ότι δεν είναι κίνηση της α-έλικας απ' άκρου εις άκρον, αλλά οφείλεται σε διάχυση ατελειών και κίνηση τμημάτων αποτελούμενων από λίγα αμινοξέα.

Το μοντέλο *chopstick* της διάχυσης της περιστροφικής κίνησης της άκαμπτης έλικας εντός κώνου προβλέπει ένταση για τον αργό μηχανισμό [4]

$$\Delta\epsilon_{chopstick} = \Delta\epsilon_{rod} \left(1 - \frac{1}{4} (1 + \cos\theta_0)^2 \right) \quad (5.1)$$

όπου $\Delta\epsilon_{rod}$ η αντίστοιχη ένταση για ελεύθερα περιστρεφόμενη έλικα, και θ_0 η γωνία του κώνου στον οποίο περιορίζεται η κίνηση. Το $\Delta\epsilon_{rod}$ έχει ισχυρή εξάρτηση από το βαθμό πολυμερισμού,

$$\Delta\epsilon_{rod} = \frac{N\mu^2}{3\epsilon_0 kT} = \frac{N_A \rho}{3\epsilon_0 kT \langle x \rangle M_m} \mu^2 \quad (5.2)$$

όπου N η αριθμητική πυκνότητα των ελίκων, ρ η πυκνότητα μάζας, $\langle x \rangle$ ο μέσος βαθμός πολυμερισμού, M_m το μοριακό βάρος του μονομερούς και μ η συνολική διπολική ροπή της έλικας. Η εξίσωση ισχύει με την προϋπόθεση ότι η κίνηση κάθε έλικας είναι ανεξάρτητη από τις γειτονικές (ο παράγοντας Kirkwood-Fröhlich είναι $g=1$). Επίσης, λόγω του μεγάλου μεγέθους της έλικας, δεν λαμβάνεται υπόψη ο παράγοντας τοπικού πεδίου. Η εξ. 5.2 μπορεί να ξαναγραφεί

$$\Delta\epsilon_{rod} = \frac{N_A \rho}{3\epsilon_0 kT \langle x \rangle M_m} (\mu_m \langle x \rangle)^2 = \frac{N_A \rho}{3\epsilon_0 kT M_m} \mu_m^2 \langle x \rangle \quad (5.3)$$

όπου μ_m η διπολική ροπή ανά μονομερές. Από την εξ. 5.3 προκύπτει ότι για ιδανική έλικα το $\Delta\epsilon_{rod}$ πρέπει να είναι ανάλογο του $\langle x \rangle$. Η παρατηρούμενη ανεξαρτησία του $\Delta\epsilon$ του «αργού» μηχανισμού θα απαιτούσε αντίστοιχη δραστική μείωση του θ_0 , κάτι που δεν μπορεί να δικαιολογηθεί εύκολα.

Το μοντέλο *chopstick* απορρίπτεται, πάντως, κυρίως λόγω της μη συμφωνίας των χρόνων χαλάρωσης με τα πειραματικά δεδομένα, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω. Η σχεδόν πλήρης ανεξαρτησία των εντάσεων και των χρόνων από το βαθμό πολυμερισμού είναι ένδειξη ότι το μήκος εμμόνης της έλικας είναι περίπου ανεξάρτητο του μοριακού βάρους, και γι' αυτό το λόγο προτείνουμε το μοντέλο της «σπασμένης» έλικας της εικ. 5.5 [9]. Υποθέτουμε ότι η έλικα αποτελείται από N_p «ιδανικά» ελικοειδή τμήματα μήκους ξ (το μήκος εμμόνης) που μπορούν να περιστρέφονται σε κώνο γωνίας θ . Η περιστροφή κάθε τμήματος είναι ανεξάρτητη από τα άλλα,

αλλά οι άξονες των κόνων είναι παράλληλοι. Αυτό είναι μια λογική υπόθεση, καθώς οι μετρήσεις ακτίνων X δείχνουν ότι οι α -έλικες είναι εξαγωνικά οργανωμένες, επομένως τοπικά υπάρχει προσανατολισμός. Η διπολική ροπή κάθε τμήματος υποθέτουμε ότι είναι $\mu_p=3.4$ Debye*($\xi/0.15$ nm), δεδομένου ότι το μήκος της α -έλικας είναι 0.15 nm/μονομερές. Η ολική διπολική ροπή είναι

$$\vec{\mu} = \sum_{i=1}^{N_p} \vec{\mu}_{p_i} = \mu_p \sum_{i=1}^{N_p} (\hat{x} \sin \theta \cos \phi_i + \hat{y} \sin \theta \sin \phi_i + \hat{z} \cos \theta) \quad (5.4)$$

όπου ϕ_i είναι η γωνία περιστροφής γύρω από τον άξονα του κόνου i . Η μέση τιμή $\langle \vec{\mu} \rangle$ και το μέσο τετράγωνο $\langle \vec{\mu}^2 \rangle$ της διπολικής ροπής είναι, αντίστοιχα,

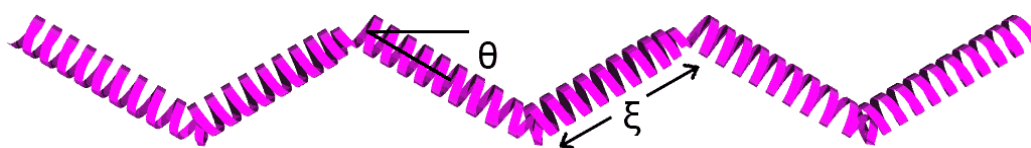
$$\begin{aligned} \langle \vec{\mu} \rangle &= \mu_p \left\langle \sum_{i=1}^{N_p} (\hat{x} \sin \theta \cos \phi_i + \hat{y} \sin \theta \sin \phi_i + \hat{z} \cos \theta) \right\rangle \\ &= \hat{z} \mu_p N_p \cos \theta \end{aligned} \quad (5.5)$$

$$\begin{aligned} \langle \vec{\mu}^2 \rangle &= \mu_p^2 \left\langle \sum_{i,j=1}^{N_p} (\sin^2 \theta \cos \phi_i \cos \phi_j + \sin^2 \theta \sin \phi_i \sin \phi_j + \cos^2 \theta) \right\rangle \\ &= \mu_p^2 \left[\sin^2 \theta \left(\sum_{i,j=1}^{N_p} \delta_{ij} \cos^2 \phi_i + \sum_{i,j=1}^{N_p} \delta_{ij} \sin^2 \phi_i \right) + N_p^2 \cos^2 \theta \right] \\ &= \mu_p^2 (N_p \sin^2 \theta + N_p^2 \cos^2 \theta) \end{aligned} \quad (5.6)$$

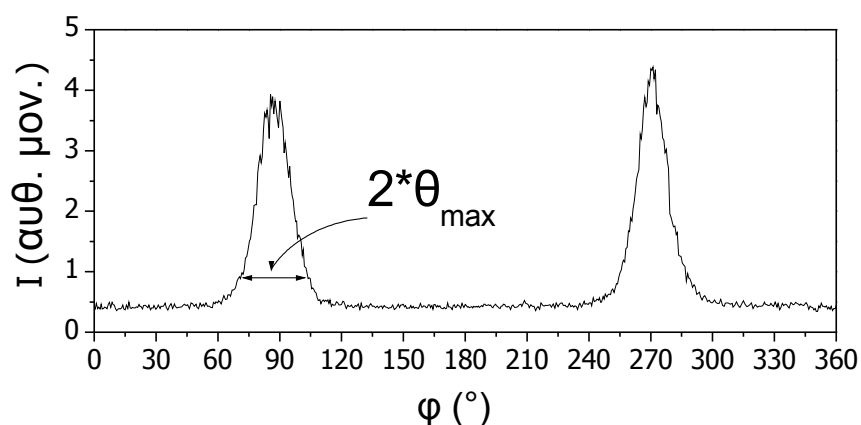
Το θεώρημα διακύμανσης-απορρόφησης και η θεωρία γραμμικής απόκρισης [10] υποδεικνύουν ότι στους υπολογισμούς της διηλεκτρικής έντασης το μ^2 πρέπει να αντικατασταθεί από την ποσότητα $\langle \vec{\mu}^2 \rangle - \langle \vec{\mu} \rangle^2$, οπότε η εξ. 5.2 δίνει

$$\begin{aligned} \Delta \epsilon &= \frac{N N_p (\langle \vec{\mu}^2 \rangle - \langle \vec{\mu} \rangle^2)}{3 \epsilon_0 k T} \\ &= \frac{N_A \rho}{3 \epsilon_0 k T M_m} (3.4 \text{ Debye})^2 (\xi / 0.15 \text{ nm}) \sin^2 \theta \end{aligned} \quad (5.7)$$

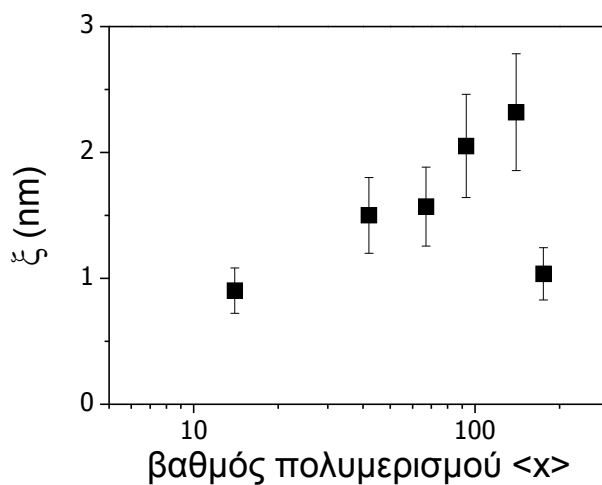
Από την τελευταία εξίσωση προκύπτει ότι το $\Delta \epsilon$ είναι ανεξάρτητο του $\langle x \rangle$, σύμφωνα και με τα πειραματικά αποτελέσματα. Η μόνη παράμετρος που απαιτείται για τον υπολογισμό του ξ είναι η γωνία θ . Η σκέδαση ακτίνων X από προσανατολισμένες ίνες (εικ. 4.15α) μπορεί να δώσει ένα ανώτατο όριο $\theta_{\max} \sim 0.25$ rad (εικ. 5.6), από το οποίο μπορεί να υπολογιστεί μία ελάχιστη τιμή για το ξ , που έχει παρασταθεί γραφικά στην εικ. 5.7 για τη σειρά ομοπολυπεπτιδίων PBLG. Θεωρώντας ότι η τιμή της γωνίας θ είναι ίδια στην PZLL και την PLeu, που επίσης σχηματίζουν α -έλικες, προκύπτουν μήκη εμμόνης $\xi_{\text{PZLL}} \sim 2.5$ nm και $\xi_{\text{PLeu}} \sim 2.2$ nm, αντίστοιχα.



Εικ. 5.5. Μοντέλο της «σπασμένης» έλικας, που αποτελείται από «ιδανικά» ελικοειδή τμήματα ίσου μήκους ξ (μήκος εμμόνης). Κάθε τμήμα μπορεί να περιστρέφεται ανεξάρτητα από τα άλλα σε κώνο γωνίας θ , με μόνο περιορισμό ότι οι άξονες των κώνων είναι παράλληλοι.



Εικ. 5.6. Σκεδαζόμενη ένταση από εφεκυσμένη ίνα PZLL₁₃₅ (εικ. 4.15α) συναρτήσει της αζιμουθιακής γωνίας φ για κοματάνυσμα $q=4.15 \text{ nm}^{-1}$, που αντιστοιχεί στην απόσταση μεταξύ των ελίκων. Σε τέλεια προσανατολισμένο σύστημα με ιδανικές α -έλικες οι ανακλάσεις έπρεπε να είναι πολύ στενές. Το εύρος τους χρησιμοποιείται εδώ για να ληφθεί μια ανώτατη τιμή της γωνίας θ του μοντέλου της εικ. 5.5, που είναι $\theta_{\text{max}} \sim 0.25 \text{ rad}$.

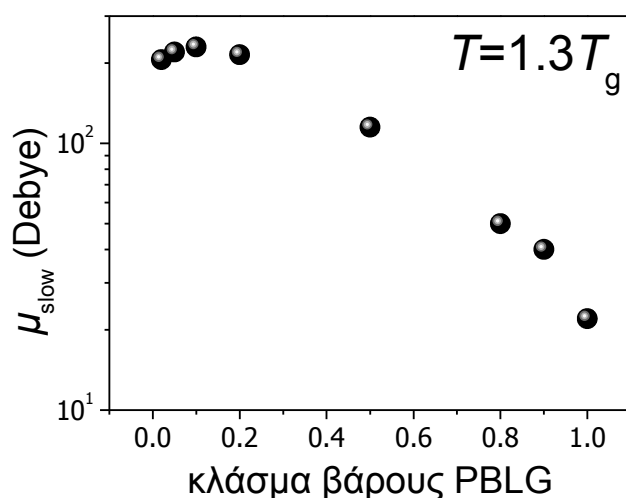


Εικ. 5.7. Μήκος εμμόνης της α -έλικας για τη σειρά ομοπολυπεπτιδίων PBLG, υπολογισμένο από την εξ. 5.7. Η τιμή του είναι $\sim 2 \text{ nm}$.

Ενδιαφέρουσα είναι η μελέτη του μήκους εμμόνης της α -έλικας στα διαλύματα PBLG/ μ -κρεσόλης (Κεφ. 4). Στα δείγματα αυτά υπολογίστηκε η ενεργός διπολική ροπή (εικ. 5.8), που βρίσκεται (συγκρίνοντας τις εξ. 5.2 και 5.7) ότι σχετίζεται με το μήκος εμμόνης μέσω της σχέσης

$$\mu_{slow} = (3.4 Debye) \sin \theta \left(\langle x \rangle \xi / 0.15 nm \right)^{1/2} \quad (5.8)$$

Ποσοτικοί προσδιορισμοί του ξ είναι δύσκολο να γίνουν, γιατί η γωνία θ , πολύ πιθανόν, αυξάνεται σημαντικά με την προσθήκη διαλύτη, μέχρι η περιστροφή να γίνει τελείως ελεύθερη σε αραιά διαλύματα. Σε κάθε περίπτωση, η εξάρτηση του μ_{slow} από τη συγκέντρωση δείχνει ότι ακόμα και μικρά ποσοστά διαλύτη αυξάνουν σημαντικά το μήκος εμμόνης.



Εικ. 5.8. Εξάρτηση της ενεργής διπολικής ροπής του «αργού» μηχανισμού στα διαλύματα PBLG/ μ -κρεσόλης (Κεφ. 4), που σχετίζεται με το μήκος εμμόνης μέσω της εξ. 5.8. Η προσθήκη ακόμα και μικρής ποσότητας διαλύτη αυξάνει δραστικά το μήκος εμμόνης.

5.4 Προσανατολισμός α -ελίκων από ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα α -ελικοειδή πεπτίδια έχουν μεγάλη διπολική ροπή παράλληλα προς τον άξονα της έλικας, $\mu_{helix} \sim 3.5 Debye * \langle x \rangle$, όπου $\langle x \rangle$ είναι ο βαθμός πολυμερισμού. Όταν η διπολική ροπή μ_{helix} βρεθεί σε ηλεκτρικό πεδίο \vec{E} υπό γωνία θ , θα εμφανιστεί μηχανική ροπή $\tau = \mu E \sin \theta$ που τείνει να προσανατολίσει το μόριο παράλληλα προς τη διεύθυνση του εξωτερικού πεδίου. Η θερμική ενέργεια, από την άλλη, έχει την τάση να αποπροσανατολίζει τα μόρια, γι' αυτό

και απαιτείται ισχυρό πεδίο ($\mu E \gg k_B T$) ώστε να επιτευχθεί προσανατολισμός. Έχουν αναφερθεί ήδη κάποια αποτελέσματα της εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου σε διαλύματα PBLG, όπως των Worley *et al.* [11] που δημιούργησαν προσανατολισμένο στρώμα PBLG σε μεταλλικό υπόστρωμα, δεν έχει διερευνηθεί, όμως, η επίδρασή του στο μήκος εμμόνης της έλικας. Γι' αυτό το σκοπό παρασκευάστηκαν φιλμ ξηρού PBLG, στα οποία εφαρμόστηκε ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο ($E \geq 10^6$ V/m, $\mu E \gg k_B T$) σε διάφορες χρονικές διάρκειες και θερμοκρασίες (Πίνακας 3.8). Για τη μελέτη του προσανατολισμού των ελίκων χρησιμοποιήθηκε σκέδαση ακτίνων-X σε δύο διαστάσεις, ενώ η ΔΦ εφαρμόστηκε για την εύρεση πιθανών αλλαγών του μήκους εμμόνης.

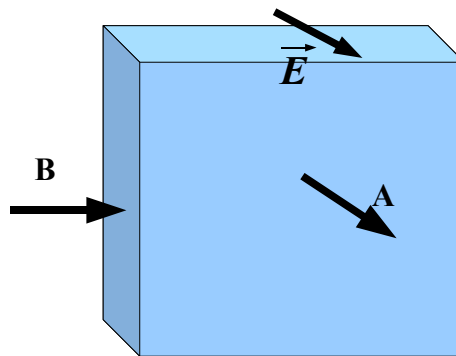
Μια εκτίμηση του χρόνου που απαιτείται για τον προσανατολισμό των μορίων μπορεί να γίνει από τον μηχανισμό χαλάρωσης απ' άκρου εις άκρον. Στο ξηρό PBLG, όμως, δεν παρατηρήθηκε αυτός ο μηχανισμός, καθώς οι έλικες είναι «σπασμένες», γι' αυτό χρησιμοποιούμε την εξίσωση του Perrin [12] για τη χαλάρωση ραβδοειδούς ελλειψοειδούς σε μέσο ιξώδους η :

$$\tau = \frac{\pi \eta L^3}{6 k_B T \left(\ln(L/b) - \frac{1}{2} \right)} \quad (5.9)$$

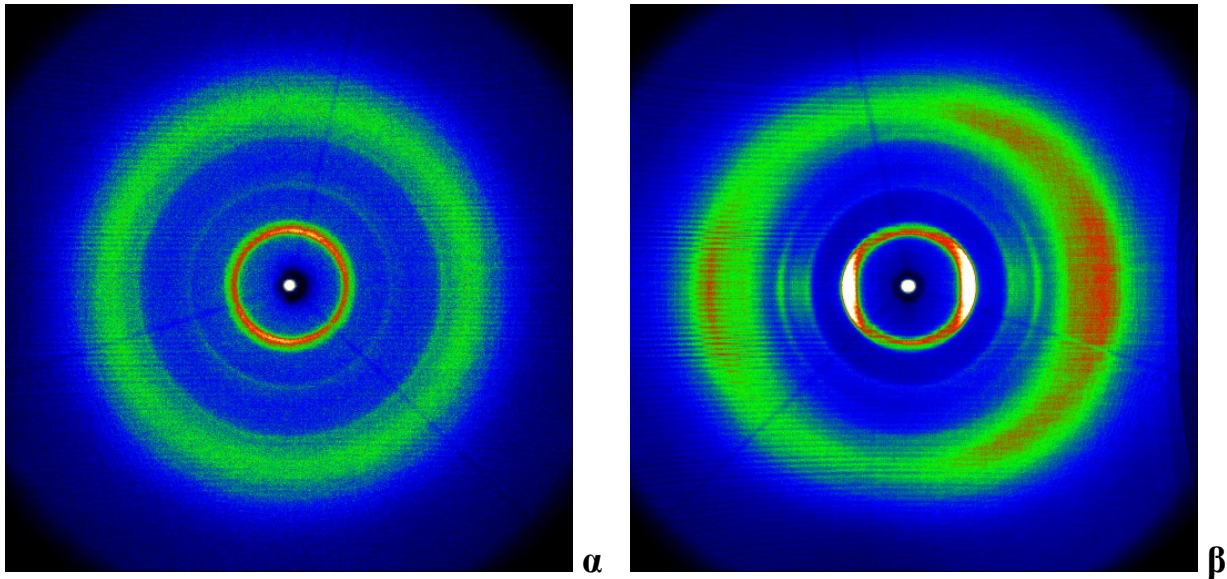
όπου L το μήκος της ράβδου και b ο μικρός ημιάξονας. Ένα επιπλέον πρόβλημα είναι ότι το PBLG δεν ρέει στην κλίμακα χρόνου των ρεολογικών μετρήσεων ως τουλάχιστον τους 430 K, οπότε δεν μπορεί να υπολογιστεί το στατικό ιξώδες η_0 . Από τις μετρήσεις στο PBLG₄₅ (που δίνουν την υπέρθεση της εικ. 4.10) το φανταστικό μέρος του μέτρου ελαστικότητας είναι $G'' \sim 10^6$ Pa ακόμα και σε $\omega \sim 10^{-2}$ rad/s στους 400 K, οπότε μία ελάχιστη τιμή του ιξώδους είναι $\eta' = G''/\omega \sim 10^8$ Pa·s. Από την εξ. 5.9 θέτοντας $L = 0.15 \text{ nm} \cdot 45 = 6.8 \text{ nm}$ και $b \sim 1.5 \text{ nm}$ προκύπτει $\tau \sim 1 \text{ h}$, ο οποίος στην πραγματικότητα μπορεί να είναι ακόμα μεγαλύτερος, γι' αυτό οι χρόνοι εφαρμογής του πεδίου ήταν μέχρι 200 h. Πάντως το ισχυρό πεδίο, όπως αυτό που εφαρμόστηκε εδώ, μπορεί να επιταχύνει τη διαδικασία. Για $L = \xi \sim 2 \text{ nm}$, προκύπτει μικρότερος χρόνος, $\tau \sim 2 \text{ min}$.

Οι μετρήσεις ακτίνων X σε δύο διαστάσεις έγιναν σε δύο διαφορετικές τοποθετήσεις του δείγματος σε σχέση με τη δέσμη (εικ. 5.9): στη θέση A η δέσμη είναι κάθετη στην επιφάνεια του φιλμ (και παράλληλη με το πεδίο), ενώ στη θέση B η δέσμη πέφτει από το πλάι. Η εικ. 5.10 δείχνει χαρακτηριστικές εικόνες περίθλασης από δείγματα στα οποία έχει γίνει μόνο ανόπτηση ($E=0$). Η εμφάνιση στην τοποθέτηση A των ανακλάσεων που αντιστοιχούν στο εξαγωνικό πλέγμα των ελίκων δείχνει ότι οι άξονες των ελίκων είναι προσανατολισμένοι παράλληλα προς την επιφάνεια του φιλμ. Επειδή τα δείγματα φτιάχτηκαν από σκόνη, δεν περιμένουμε να υπάρχει γενικός προσανατολισμός των ελίκων, αλλά μόνο τοπικός σε περιοχές που σχηματίζεται εξαγωνικό πλέγμα

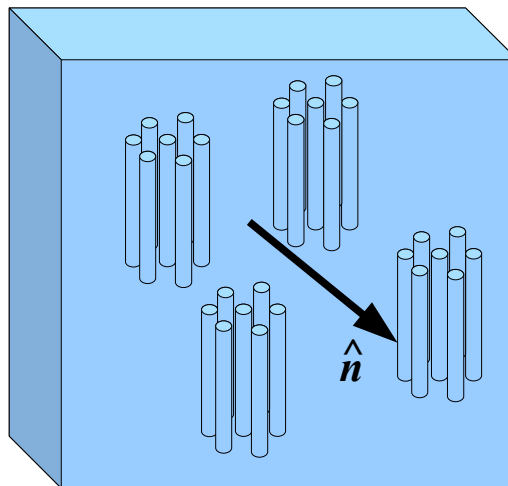
(εικ. 5.11). Η αζιμουθιακή γωνία φ στην οποία εμφανίζονται οι ανακλάσεις είναι τυχαία και εξαρτάται από το ακριβές σημείο που προσπίπτει η δέσμη. Στη θέση B (εικ. 5.10β) εμφανίζεται μια ισχυρή ισημερινή ανάκλαση και τρεις ασθενέστερες ανώτερης τάξης. Οι εντάσεις κατά μήκος του ισημερινού έχουν σχεδιαστεί στην εικ. 5.12. Οι πέντε κορυφές που εμφανίζονται συνολικά (κυματανύσματα $q_1=4.24$, $q_1=4.86$, 7.69 , 8.65 και 9.87 nm^{-1}) αντιστοιχούν σε ένα πλέγμα που δεν είναι ακριβώς εξαγωνικό, όπως αναφέρθηκε για το PBLG ήδη στο Κεφ. 4, με $a=1.64 \text{ nm}$, $b=1.43$ και $\gamma=115^\circ$ (εικ. 5.13). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι δύο κατώτερες ανακλάσεις q_1 και q_2 εμφανίζονται ισχυρότερες στις εικόνες περίθλασης από τη θέση A και τη θέση B, αντίστοιχα, υποδηλώνοντας ότι ο άξονας \hat{G}_2 του αντιστρόφου πλέγματος (αντιστοιχεί στο q_2) είναι προσανατολισμένος κάθετα στην επιφάνεια του φιλμ σε όλο το υλικό και ότι δίνει τις ισημερινές ανακλάσεις στη θέση B, ενώ το \hat{G}_1 δίνει τις ανακλάσεις στη θέση A. Αυτό οφείλεται στην πίεση που εξασκήθηκε στο υλικό για τη δημιουργία του φιλμ.



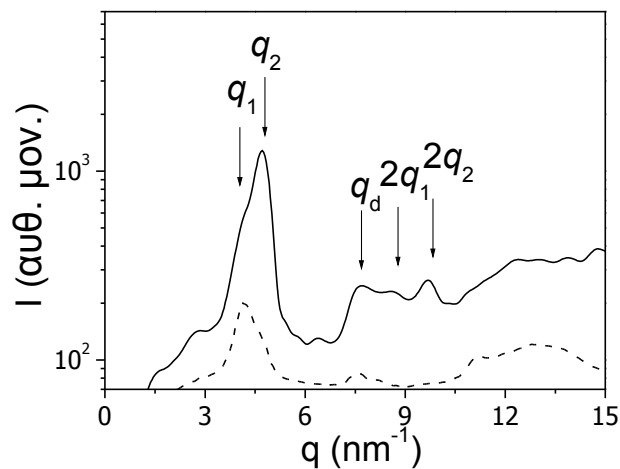
Εικ. 5.9. Τοποθέτηση του φιλμ PBLG σε σχέση με τη δέσμη ακτίνων-X: στη θέση A η δέσμη είναι κάθετη στην επιφάνεια του φιλμ, ενώ στη θέση B η δέσμη προσπίπτει πλάγια. Το ηλεκτρικό πεδίο \vec{E} ήταν επίσης κάθετο στην επιφάνεια.



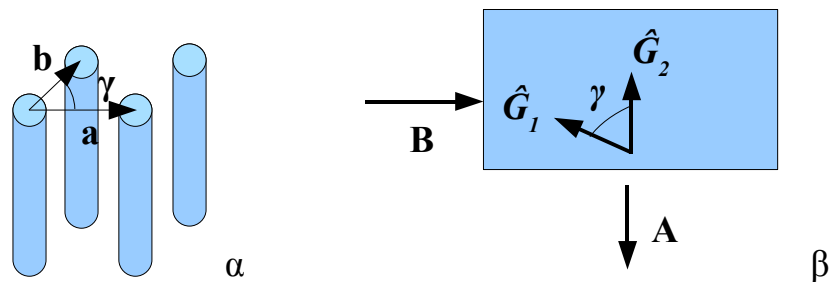
Εικ. 5.10. Δισδιάστατες εικόνες σκέδασης από φιλμ $PBLG_{45}$ στους 303 K στο οποίο έχει γίνει μόνο ανόπτηση στους 433 K επί 24 h ($E=0$) (α) στη θέση A (εικ. 5.9) και (β) το ίδιο δείγμα στη θέση B.



Εικ. 5.11. Προσανατολισμός των α -ελίκων του $PBLG$ στα φιλμ πριν εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο, σύμφωνα με τις ακτίνες X. Υπάρχουν μικρές περιοχές τοπικού προσανατολισμού όπου οι άξονες των εξαγωνικά οργανωμένων ελίκων είναι σχεδόν παράλληλοι στην επιφάνεια, κάθετοι στο διάνυσμα \hat{n} .



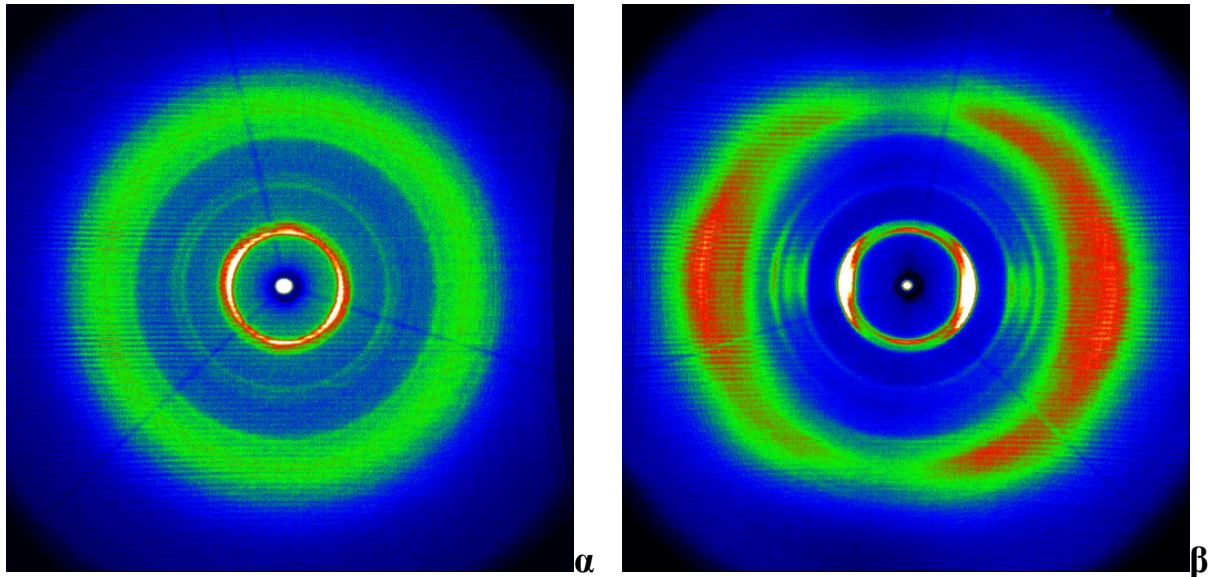
Εικ. 5.12. Σκεδαζόμενη ένταση συναρτήσει του κυματανύσματος q από δείγμα στο οποίο δεν έχει εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο: (διακεκομμένη γραμμή) θέση A – μέση τιμή από όλες τις αζιμουθιακές γωνίες, (συνεχής γραμμή) θέση B – ισημερινός. Οι κορυφές αντιστοιχούν σε πλέγμα που είναι περίπου εξαγωνικό (εικ. 5.13α).



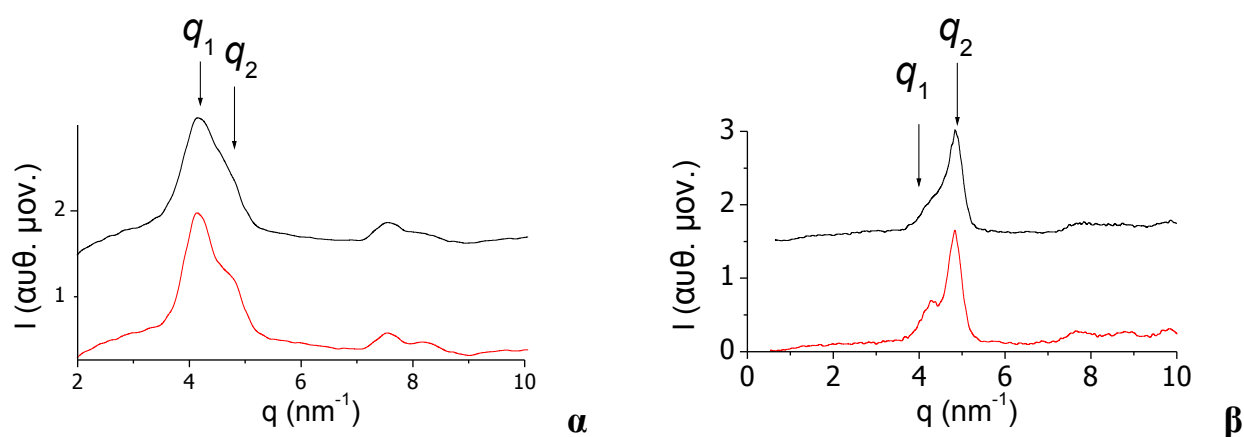
Εικ. 5.13. (α) Άξονες του πλέγματος που σχηματίζουν οι α -έλικες: $a=1.64\text{ nm}$, $b=1.43$ και $\gamma=115^\circ$. (β) Κάτοψη του φιλμ PBLG. Σύμφωνα με τις διαστάσεις εικόνας περίθλασης ο άξονας \hat{G}_2 του αντιστρόφου πλέγματος (αντιστοιχεί στο q_2) συμπίπτει σε όλο το υλικό και είναι κάθετος στην επιφάνεια του φιλμ, επομένως το διάνυσμα \vec{a} είναι παράλληλο με την επιφάνεια του φιλμ.

Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα, οι περισσότερες α -έλικες αρχικά είναι προσανατολισμένες περίπου παράλληλα προς την επιφάνεια του φιλμ και κάθετα στο πεδίο, οπότε η εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου ασκεί μεγάλη μηχανική ροπή, τείνοντας να τις προσανατολίσει παράλληλα προς αυτό. Σε όλα τα δείγματα που εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο παρατηρούμε ότι δεν εμφανίζονται στη θέση A ανακλάσεις σε εξαγωνική διάταξη (εικ. 5.14α), δείχνοντας ότι δεν έχει γίνει προσανατολισμός των αξόνων των ελίκων παράλληλα προς το πεδίο, τουλάχιστον πλήρως. Συνολικά, όμως, εμφανίζονται τέσσερις ανακλάσεις που δείχνουν ότι έχει αλλάξει ο προσανατολισμός. Επιπλέον, μία πιο προσεκτική ματιά δείχνει ότι τώρα υπάρχουν καλά

διαχωρισμένες ανακλάσεις και στις δύο θέσεις q_1 και q_2 (εικ. 5.15α), ενώ προηγουμένως μόνο στην q_1 με πολύ ασθενή στην q_2 , δηλαδή υπάρχουν περιοχές όπου το \hat{G}_2 δεν είναι κάθετο στην επιφάνεια, όπως προηγουμένως. Επομένως, σε κάποιες περιοχές οι άξονες των ελίκων έχουν αρχίσει να στρέφονται, αν και απέχουν πολύ από τον τέλει προσανατολισμό παράλληλα προς το πεδίο. Αντίστοιχα στη θέση Β, εμφανίζονται στον ισημερινό και οι δύο ανακλάσεις (εικ. 5.14β), όπως και στον μεσημβρινό, όπου είναι αρκετά πιο ασθενείς. Η μεγαλύτερη μεταβολή παρατηρήθηκε όταν η εφαρμογή του πεδίου έγινε στους 440 K, ενώ στους 390 K είναι αρκετά μικρότερη, δείχνοντας ότι η θερμοκρασία είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για τον προσανατολισμό. Πρέπει να σημειωθεί ότι η ανόπτηση στα δείγματα, όπου δεν εφαρμόστηκε πεδίο, έγινε στην ίδια θερμοκρασία και για τον ίδιο χρόνο με τα άλλα, ώστε να εμφανίζεται μόνον η επίδραση του πεδίου.



Εικ. 5.14. Δισδιάστατες εικόνες σκέδασης στους 303 K από δείγμα προσανατολισμένο στους 433 K επί 6 h με $E=10^6$ V/m (α) στη θέση Α και (β) στη θέση Β, όπου διακρίνεται η διπλή ανάκλαση σε μικρή γωνία κατά μήκος του ισημερινού.

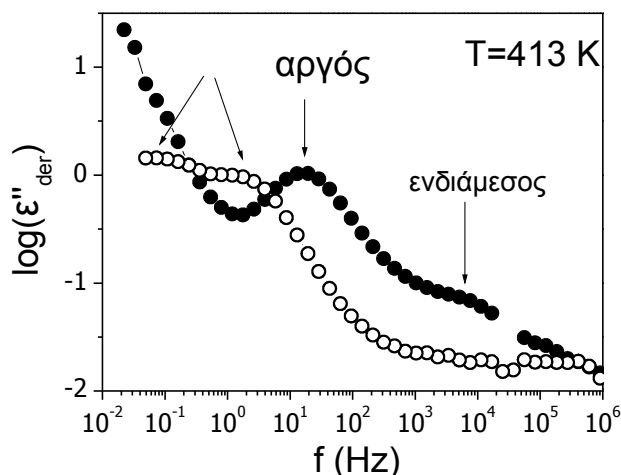


Εικ. 5.15. (α) Ολοκληρωμένη ένταση σε όλες τις αζιμουθιακές γωνίες από τα δείγματα των εικόνων 5.10 (πάνω) και 5.14 (κάτω) στη θέση Α. Αν και ασθενής ανάκλαση στο q_2 υπάρχει και στο δείγμα που δεν έχει εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο, γίνεται πολύ σαφέστερη με την εφαρμογή του πεδίου, δείχνοντας ότι ένα μέρος τουλάχιστον των ελίκων τείνει να γίνει παράλληλο με αυτό. (β) Ένταση στη θέση Β κατά μήκους του ισημερινού για τα ίδια δείγματα, όπου πάλι προκύπτει ότι το πεδίο τείνει να προσανατολίσει τις έλικες.

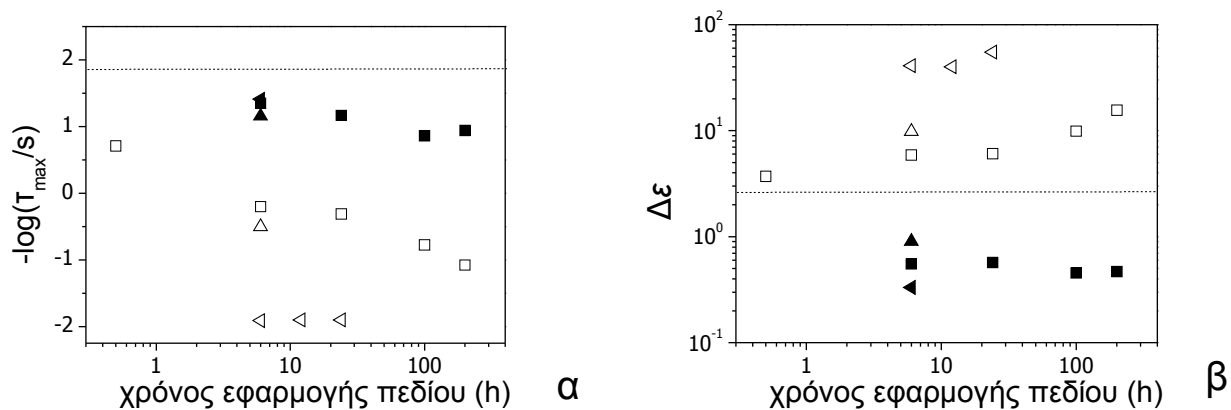
Συμπερασματικά η δομική μελέτη έδειξε ότι η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σε α -ελικοειδή πεπτίδια μπορεί να προσανατολίσει τις έλικες παράλληλα προς αυτό, φαίνεται όμως ότι χρειάζεται μεγάλος χρόνος ακόμα και σε υψηλές θερμοκρασίες (~ 430 K) για να γίνει πλήρης προσανατολισμός.

Η δυναμική μελέτη με τη χρήση της ΔΦ μπορεί να αποκαλύψει κατά πόσον αλλάζει το μήκος εμμόνης των ελίκων με την εφαρμογή του πεδίου. Η σύγκριση των φασμάτων του $\varepsilon''_{\text{der}}$ δείγματος, στο οποίο εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο, με το μη προσανατολισμένο (εικ. 5.16) δείχνει ότι η δυναμική αλλάζει σημαντικά. Ο «αργός» μηχανισμός του PBLG γίνεται διπλός και ακόμη πιο αργός, με μεγαλύτερη συνολική ένταση, ενώ εξασθενεί ο ενδιάμεσος. Και τα δύο είναι ενδείξεις αύξησης του μήκους εμμόνης. Περισσότερες πληροφορίες δίνει η εξάρτηση του χρόνου χαλάρωσης των δύο νέων μηχανισμών από το χρόνο εφαρμογής του πεδίου. Και οι δύο είναι πιο αργοί από το δείγμα στο οποίο δεν έχει εφαρμοστεί πεδίο και γίνονται ακόμα αργότεροι με την αύξηση του χρόνου και τη θερμοκρασία εφαρμογής του πεδίου, με τον πιο αργό να παρουσιάζει εντονότερη εξάρτηση (εικ. 5.17α). Η αύξηση της έντασης του πεδίου βελτιώνει τον προσανατολισμό, δεν επηρεάζει όμως σημαντικά το τελικό αποτέλεσμα. Οι εντάσεις, από την άλλη, παρουσιάζουν διαφορετική μεταξύ τους εξάρτηση (εικ. 5.17β). Ο πιο γρήγορος από τους δύο εξασθενεί σημαντικά, και μάλιστα εξαφανίζεται σχεδόν τελείως στα δείγματα που προσανατολίστηκαν σε υψηλή θερμοκρασία για πολύ χρόνο, ενώ, αντίθετα, ο πιο αργός γίνεται όλο και ισχυρότερος. Είναι σημαντικό ότι η αύξηση των χρόνων συνοδεύεται και από αύξηση της έντασης, δείχνοντας

δραστική αύξηση του μήκους εμμονής. Οι χρόνοι χαλάρωσης και οι εντάσεις του α -μηχανισμού δεν επηρεάζονται από την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου.



Εικ. 5.16. Φάσματα του ϵ''_{der} για δείγμα $PBLG_{175}$ στο οποίο έχει γίνει ανόπτηση (κλειστά σύμβολα) και δείγμα στο οποίο έχει εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο $E=10^6$ V/m επί 24 h στους 400 K. Το ηλεκτρικό πεδίο κάνει πιο αργό τον «αργό» μηχανισμό, αλλά και τον διαχωρίζει σε δύο νέους. Μειώνεται επίσης η ένταση του ενδιάμεσου.



Εικ. 5.17. Εξάρτηση των χρόνων (αριστερά) και των διηλεκτρικών εντάσεων (δεξιά) του πιο γρήγορου (κλειστά σύμβολα) και του πιο αργού (ανοιχτά σύμβολα) από τους δύο μηχανισμούς στους οποίους διαχωρίζεται ο «αργός» του PBLG: (τετράγωνα) $PBLG_{45}$ με πεδίο $E=10^6$ V/m στους 390 K, (πανω τρίγωνα) πεδίο 4×10^6 V/m στους 390 K και (αριστερά τρίγωνα) πεδίο 10^6 V/m στους 430 K. Οι αντίστοιχες τιμές του δείγματος στο οποίο έχει γίνει μόνο ανόπτηση σημειώνονται με διακεκομμένη γραμμή. Παρατηρούμε ότι η εφαρμογή του πεδίου αυξάνει πολύ τους χρόνους και τη συνολική ένταση, δείχνοντας αύξηση του μήκους εμμονής.

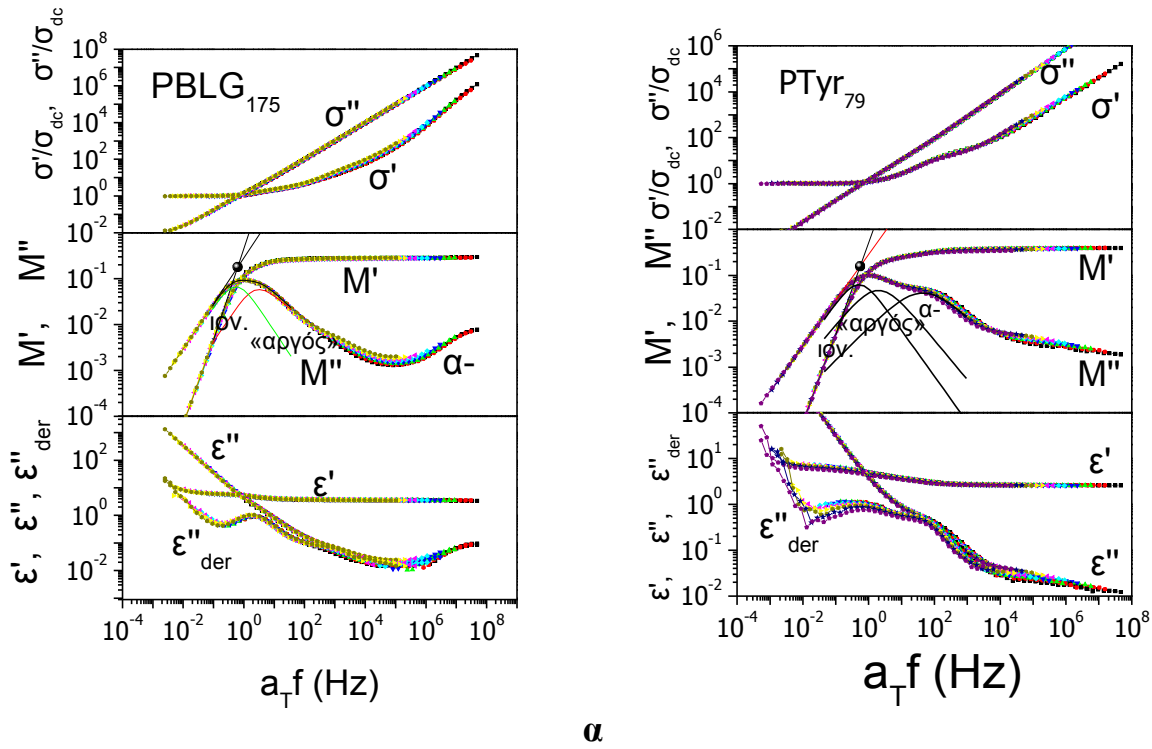
Ο διαχωρισμός του «αργού» μηχανισμού με την εφαρμογή του πεδίου μπορεί να εξηγηθεί

σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των ακτίνων X. Εντός του υλικού υπάρχουν περιοχές που δεν έχουν επηρεαστεί ιδιαίτερα από το πεδίο, δίνοντας τις ίδιες ανακλάσεις, όπως απουσία πεδίου, αλλά και νέες που τείνουν να προσανατολιστούν. Οι τελευταίες είναι υπεύθυνες για τον πιο αργό και ισχυρό από τους δύο μηχανισμούς.

Γενικά, η εφαρμογή ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου τείνει να προσανατολίσει τις α -έλικες παράλληλα προς αυτό, η διαδικασία όμως χρειάζεται πολύ χρόνο και υψηλές θερμοκρασίες, καθώς πρέπει να προσανατολιστούν ταυτόχρονα ολόκληρες περιοχές. Παρόλα αυτά, το μήκος εμμόνης της δομής αυξάνεται σημαντικά, αν και ποσοτικοί υπολογισμοί είναι δύσκολο να γίνουν. Ενδιαφέρον θα ήταν να γίνει στο μέλλον παρόμοια μελέτη σε δείγματα προσανατολισμένα από την αρχή (π.χ. φιλμ από εξάτμιση διαλύτη [13,14]), ώστε να βρεθεί αν και εκεί συμβαίνει αλλαγή στο μήκος εμμόνης.

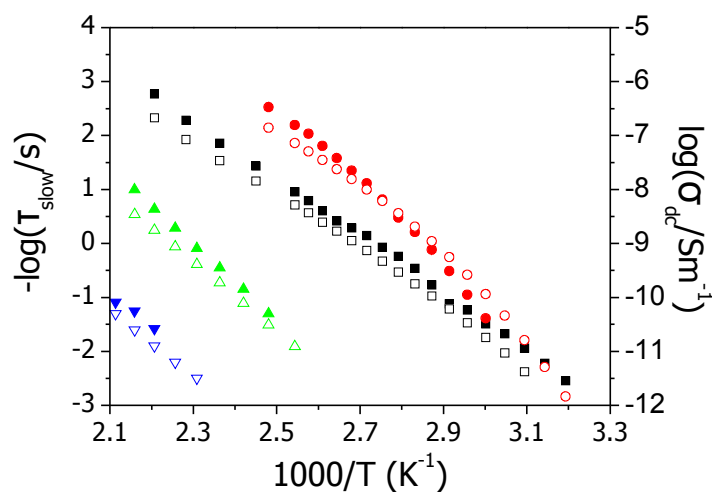
5.5 Κινητικότητα των ιόντων

Μέχρις εδώ δεν έγινε καμία αναφορά στην εγγενή ιοντική αγωγιμότητα των συστημάτων που μελετήθηκαν, και η οποία γενικά θεωρείται μάλλον ανεπιθύμητη στην ανάλυση των μοριακών μηχανισμών κίνησης. Εδώ, θα γίνει η διερεύνηση της σχέσης του αργού μηχανισμού με την ιοντική αγωγιμότητα. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν υπερθέσεις του πραγματικού και φανταστικού μέρους των μεγεθών ϵ^* , M^* , και $\sigma^* = \omega \epsilon_0 \epsilon^*$ και της παραγώγου ϵ''_{der} για τα δείγματα PBLG₁₇₅, PTyr₇₉ PLeu₁₅₂ και PZLL₁₃₅ (τα δύο τελευταία δεν δείχνονται) γύρω από την καμπύλη του M'' στους $T_{ref}=413$ K (εικ. 5.18). Οι συντελεστές οριζόντιας μετατόπισης a_T είναι κοινοί για τα τρία μεγέθη.



Εικ. 5.18. Υπερθέσεις του πραγματικού και φανταστικού μέρους των μεγεθών ϵ^* , M^* , και $\sigma^* = \omega \epsilon_0 \epsilon^*$ και της παραγώγου ϵ''_{der} για τα δείγματα (α) PBLG₁₇₅ και (β) PTyr₇₉, γύρω από την καμπύλη του M'' στη θερμοκρασία $T_{ref}=413$ K. Ο «αργός» μηχανισμός (πιο καθαρά στο ϵ''_{der}) είναι πολύ κοντά στο σημείο τομής των M' , M'' και σ' , σ'' , δείχνοντας ότι είναι συζευγμένος με την ιοντική αγωγιμότητα.

Το σημείο τομής του πραγματικού και φανταστικού μέρους όλων των μεγεθών είναι στην ίδια συχνότητα, ενώ σε μικρότερες συχνότητες κυριαρχεί η αγωγιμότητα συνεχούς ρεύματος ($\sigma_{dc} = \sigma_{\omega \rightarrow 0}$). Το μέγιστο του M'' είναι έντονα ασύμμετρο, λόγω της ύπαρξης του «αργού» μηχανισμού που αναφέρθηκε πιο πάνω, ο οποίος φαίνεται πιο καθαρά στις καμπύλες ϵ''_{der} . Οι χαρακτηριστικοί χρόνοι κίνησης των ιόντων μπορούν να εξαχθούν από τη συχνότητα του σημείου τομής, δεν μπορεί όμως να υπολογιστεί το αντίστοιχο χαρακτηριστικό μήκος, γιατί δεν υπάρχουν δεδομένα για τον αριθμό των φορέων. Η εικ. 5.19 συγκρίνει τους χρόνους του αργού μηχανισμού για τα τέσσερα δείγματα με την αγωγιμότητα συνεχούς, που υπολογίζεται από την περιοχή στις χαμηλές συχνότητες όπου το σ' είναι ανεξάρτητο της συχνότητας. Η ομοιότητα των εξαρτήσεων $\tau_{slow}(T)$ και $\sigma_{dc}(T)$, που μπορούν να περιγραφούν μέσω της εξίσωσης VFT (2.6), είναι εμφανής, δείχνοντας ότι η κίνηση των ιόντων είναι συζευγμένη με τη διάχυση των ατελειών, που αντανακλάται στον «αργό» μηχανισμό.



Εικ. 5.19. Σύγκριση των χρόνων χαλάρωσης του αργού μηχανισμού (κλειστά σύμβολα) με την ιοντική αγωγιμότητα (ανοιχτά σύμβολα) για τα δείγματα $PBLG_{175}$ (τετράγωνα), $PZLL_{135}$ (κύκλοι), $PTyr_{79}$ (πάνω τρίγωνα) και $PLeu_{152}$ (κάτω τρίγωνα). Η ομοιότητα στην εξάρτηση από τη θερμοκρασία των σ_{dc} και τ_{slow} δείχνει ότι η κίνηση των ιόντων συνδέεται με τη διάχυση των ατελειών κατά μήκος της πεπτιδικής αλυσίδας.

5.6 Συμπεράσματα

Η μελέτη της δυναμικής των αργών μηχανισμών χαλάρωσης πολυπεπτιδίων, παρουσία και απουσία διαλύτη και εξωτερικού πεδίου, έδειξε ότι:

1. Οι πιο αργοί μηχανισμοί είναι ισχυροί και με πολύ ασθενή εξάρτηση από το μοριακό βάρος. Επομένως δεν αντανakλούν την κίνηση της άκαμπτης α -έλικας εντός κώνου, όπως ήταν η μέχρι τώρα αντίληψη, αλλά την κίνηση ατελειών, δηλαδή σπασμένων δεσμών υδρογόνου. Υπάρχουν και τμήματα εντελώς άμορφα που χαλαρώνουν με έναν ενδιάμεσο, ασθενή μηχανισμό.
2. Ο «αργός» μηχανισμός δεν σχετίζεται με τη ροή του συστήματος, όπως συμβαίνει σε συνθετικά πολυμερή, δείχνοντας ότι υπάρχουν διαπλοκές μεταξύ γειτονικών αλυσίδων στα σημεία με ατέλειες της δομής.
3. Το μήκος εμμονής της α -έλικας σε ξηρά πεπτίδια εκτιμάται σε ~ 2 nm, και αυξάνεται μετά από εφαρμογή ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου που προσανατολίζει τις έλικες ή όταν συνυπάρχει έστω και μικρό ποσοστό διαλύτη.
4. Η κίνηση των ιόντων είναι συζευγμένη με τον αργό μηχανισμό, δηλαδή τη διάχυση των ατελειών στα σημεία των σπασμένων δεσμών υδρογόνου.

Αναφορές

- [1] Mori, Y.; Ookubo, N.; Hayakawa, R.; Wada, Y. *J. Polym. Sci.: Polym. Phys. Ed.* **20**, 2111 (1982).
- [2] Doi, M. *J. Polym. Sci.: Polym. Phys. Ed.* **20** 1963 (1982).
- [3] Wang, C. C.; Pecora, R. *J. Chem. Phys.* **72**, 5333 (1980).
- [4] Hartmann, H.; Kratzmüller, T.; Braun, H.-G.; Kremer, F. *Macromol. Rapid Commun.* **21**, 814 (2000).
- [5] Matsumoto, T.; Nishioka, N.; Teramoto, A.; Fujita, H. *Macromolecules* **7**, 824 (1974).
- [6] Muroga, Y.; Nagasawa, M. *Biopolymers* **45**, 281 (1998).
- [7] Wada, A. *J. Chem. Phys.* **29**, 674 (1958); **30**, 328 (1959); **30**, 324 (1959).
- [8] Watanabe, J.; Uematsu, I. *Polymer* **25**, 1711 (1984).
- [9] Papadopoulos, P.; Floudas, G. *Dielectric Newsletter* **21**, Issue Dec. 2005.
- [10] *Broadband Dielectric Spectroscopy*; Kremer, F., Schönhals, A., Eds.; Springer: New York, 2003.
- [11] Worley, C. G.; Linton, R. W.; Samulski, E. T. *Langmuir* **11**, 3805 (1995).
- [12] Perrin, F. *J. Phys. Radium* **5**, 497 (1934)).
- [13] Watanabe, J.; Imai, K.; Gehani, R.; Uematsu, I. *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* **19**, 653 (1981).
- [14] Watanabe, J.; Gehani, R.; Uematsu, I. *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* **19**, 1817 (1981).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΥΤΟ-ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΣΕ ΣΥΣΤΑΔΙΚΑ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΗ ΜΕ ΠΕΠΤΙΔΙΑ

6.1 Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια γίνεται εντατική έρευνα πάνω στο σχεδιασμό μακρομορίων που έχουν τη δυνατότητα αυτο-οργάνωσης σε κλίμακες μήκους μερικών νανομέτρων [1,2]. Τα συστήματα αυτά είναι υποψήφια για χρήση σε πολύ ευρύ πεδίο εφαρμογών, από τη φαρμακευτική ως τους ημιαγωγούς. Ειδικότερα, τα υλικά που προορίζονται για βιολογικές και φαρμακευτικές εφαρμογές πρέπει να συνδυάζουν την αυτο-οργάνωση με τη βιοσυμβατότητα και τη βιολογική δράση. Οι πρωτεΐνες, όπως αναφέρθηκε στο Κεφ. 1, συνδυάζουν μεγάλο αριθμό ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων (δεσμούς υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, κ.ά.), γι' αυτό και σχηματίζουν σταθερή τριτοταγή δομή που διασφαλίζει τη δράση τους. Σημαντικές προσπάθειες προς την κατεύθυνση της σύνθεσης βιομιμητικών υλικών γίνονται μέσω των συσταδικών συμπολυμερών με πολυπεπίδια, τα οποία είναι δυνατόν να συνδυάζουν πολλά είδη αλληλεπιδράσεων και μπορούν, για παράδειγμα, να χρησιμοποιηθούν στη μεταφορά φαρμάκων εντός ζωντανών οργανισμών (*drug delivery*) ή ως συνθετικά υποκατάστατα ιστών. Ανάλογα συστήματα έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως οργανωτικά μέσα για την παρασκευή νανοσωματιδίων, όπως μαγνητικών νανοσωματιδίων, κβαντικά περιορισμένων ημιαγωγών και υλικών με πόρους ελεγχόμενου μεγέθους και σχήματος [3-6].

Η οργάνωση συνθετικών συσταδικών συμπολυμερών με θερμοδυναμικά ασύμβατα τμήματα έχει μελετηθεί διεξοδικά και έχουν βρεθεί τα διαγράμματα φάσεων σε δυσσταδικά συμπολυμερή με δύο άμορφες συστάδες ή μία άμορφη και μία με δυνατότητα κρυστάλλωσης, ενώ υπάρχουν και αρκετές μελέτες σε συστήματα με περισσότερες συστάδες και διαφορετική αρχιτεκτονική, όπως σε σχήμα αστεριού [7,8]. Η έρευνα σε συμπολυμερή με άμορφα και πολυπεπτιδικά τμήματα είναι ακόμα σε πρώιμο στάδιο, παρόλο που τελευταία έχουν γίνει αρκετές επιτυχείς προσπάθειες σύνθεσης. Μία από τις πρώτες εργασίες αναφέρθηκε στη σύνθεση και τη δομή δυσσταδικών συμπολυμερών αποτελούμενων από μία άμορφη πολυβινυλική συστάδα (πολυστυρένιο ή πολυβουταδιένιο) και μία πεπτιδική (PBLG ή PZLL) [9]. Άλλες εργασίες έγιναν σε ανάλογα

συστήματα με πολυπεπίδια PBLG ή PZLL, που θεωρούνται ιδανικές άκαμπτες ράβδοι, συνδυασμένα με άμορφες συστάδες πολυίσοπρενίου ή πολυστυρενίου, σε γραμμική αρχιτεκτονική ή σε σχήμα «βούρτσας» [10-15]. Γενικά, παρατηρήθηκε φασικός διαχωρισμός, που υποδηλώνει ότι υπάρχει μεγάλη ασυμβατότητα λόγω της διαφορετικής δομής των μονομερών. Επίσης, η α-ελικοειδής δομή βρέθηκε να είναι πιο σταθερή από τη β-φυλλοειδή, αν και αυτό εξαρτάται από το είδος του αμινοξέος που χρησιμοποιείται [16]. Η κυριότερη νανοδομή που σχηματίζεται σε αυτά τα συστήματα είναι οι κύλινδροι σε φυλλοειδή δομή (*cylinder-in-lamellar*), αλλά παρατηρήθηκε και δομή κυλίνδρων σε εξαγωνικό πλέγμα. Η πολυδιασπορά των μοριακών βαρών βρέθηκε να προκαλεί διακυμάνσεις στο πάχος των φυλλοειδών φάσεων.

Η σύνθεση μοντέλων συσταδικών συμπολυμερών πολυπεπτιδίων με μικρή πολυδιασπορά μοριακών βαρών και καλά καθορισμένη αρχιτεκτονική είναι πιο πρόσφατη. Στην πρώτη εργασία πάνω σε αυτόν τον τομέα χρησιμοποιήθηκαν απαρχητές οργανονικελίου αντί για αμίνες, με τις οποίες γίνονταν οι μέχρι τότε προσπάθειες, ώστε να αποφευχθούν οι παράπλευρες αντιδράσεις των Ν-καρβοξυανυδριτών [17]. Με αυτή τη μέθοδο παρασκευάστηκαν δισυσταδικά, τρισυσταδικά και πεντασυσταδικά συμπολυμερή πεπτιδίων [15,17,18]. Μία δεύτερη προσέγγιση είναι η εφαρμογή τεχνικών υψηλού κενού ώστε να διασφαλιστούν οι συνθήκες ζωντανού πολυμερισμού των ΝCA, με χρήση αμινών ως απαρχητές [19]. Τα συμπολυμερή με πεπτιδικές μόνο συστάδες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία έχουν συντεθεί με την τελευταία μέθοδο. Πρέπει να σημειωθεί ότι, εκτός από αναφορές σχετικά με τη σύνθεση, ελάχιστες μελέτες για τη δομή αυτών των συστημάτων έχουν γίνει, και ακόμα λιγότερες για τη δυναμική.

Σε αυτό το κεφάλαιο θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα για τον φασικό διαχωρισμό, την αυτο-οργάνωση, τη δυναμική και την επίδραση του θερμοδυναμικού περιορισμού στο μήκος εμμονής των δευτεροταγών δομών σε: (α) μια σειρά τρισυσταδικών συμπολυμερών πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ)-b-πολυ(αιθυλενογλυκόλη)-b-πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ) (PBLG-b-PEG-b-PBLG), (β) μια σειρά τρισυσταδικών συμπολυμερών πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ)-b-πολυ(διμεθυλο-σιλοξάνιο)-b-πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ) (PBLG-b-PDMS-b-PBLG), (γ) μια σειρά δισυσταδικών συμπολυμερών πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ)-b-πολυγλυκίνη (PBLG-PGly) (δ) ένα δισυσταδικό συμπολυμερές πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνη)-b-πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ) (PZLL-b-PBLG) και (ε) ένα τρισυσταδικό συμπολυμερές πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνη)-b-πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ)-b-πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνη) (PZLL-b-PBLG-b-PZLL). Το πρώτο σύστημα συνδυάζει πεπτίδιο με δυνατότητα σχηματισμού και των δύο κύριων δευτεροταγών δομών με ένα υδατοδιαλυτό και βιοσυμβατό ημικρυσταλλικό πολυμερές, το δεύτερο συνδυάζει δύσκαμπτες με εύκαμπτες συστάδες (PBLG και

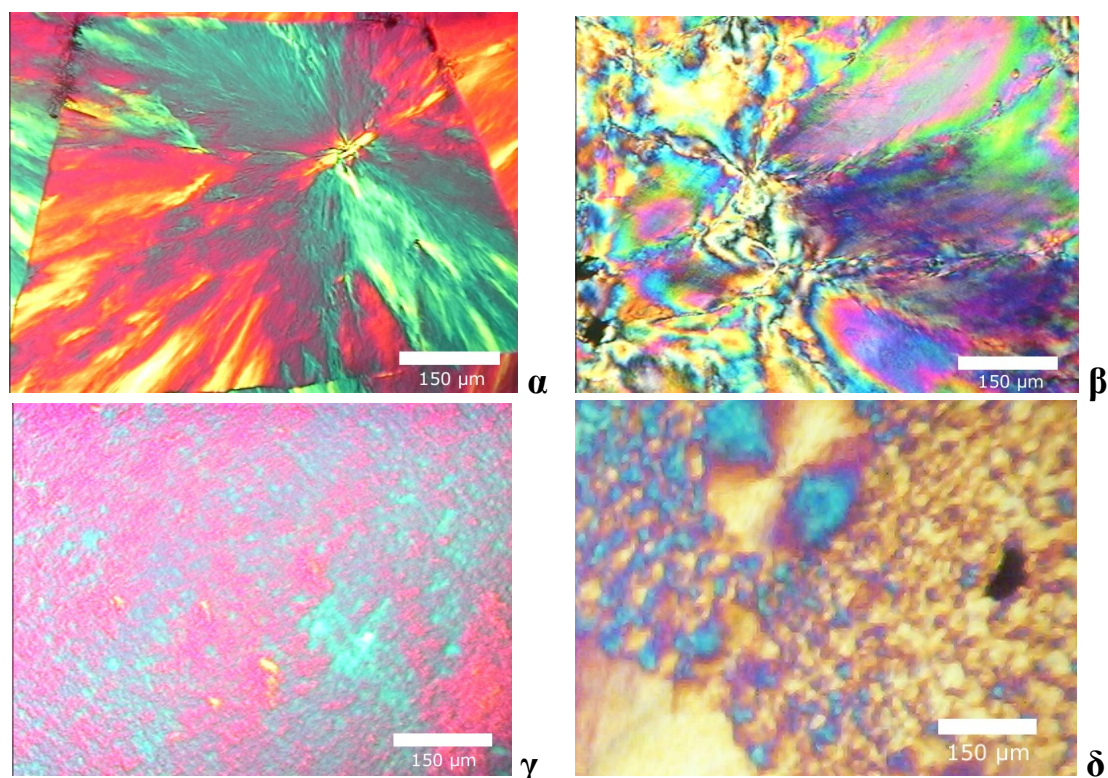
PDMS, αντίστοιχα), το τρίτο περιλαμβάνει τμήματα με διαφορετική δευτεροταγή δομή και μέγεθος μονομερών, ενώ τα δύο τελευταία αποτελούνται από συστάδες με ίδια δευτεροταγή δομή [20-22].

Η μελέτη γίνεται με χρήση «στατικών» μεθόδων (SAXS, WAXS, NMR, TEM), για το χαρακτηρισμό της δομής, τα αποτελέσματα των οποίων συμπληρώνει η ΔΦ με τις πληροφορίες για το μήκος εμμοής των δευτεροταγών δομών. Τα συστήματα προς μελέτη επιλέχθηκαν έτσι ώστε να μπορεί να μελετηθεί η επίδραση ασθενούς (ανάμιξη συστάδων) ή ισχυρού (νανοφασικός περιορισμός) θερμοδυναμικού πεδίου. Στην πρώτη περίπτωση βρέθηκε ότι ορισμένες δευτεροταγείς δομές αποσταθεροποιούνται (β -φύλλα, κρύσταλλοι), ενώ στη δεύτερη αυξάνεται σημαντικά το μήκος εμμοής των α -ελίκων.

6.2 Αυτο-οργάνωση και δυναμική τρισυσταδικών συμπολυμερών πολυ(γ -βενζυλο-L-γλουταμινικού οξέος)- b -πολυ(αιθυλενογλυκόλης)- b -πολυ(γ -βενζυλο-L-γλουταμινικού οξέος) (PBLG- b -PEG- b -PBLG)

Το σύστημα αυτό συνδυάζει πολλά είδη διαφορετικών αλληλεπιδράσεων: (α) κρυστάλλωση του PEG, (β) δεσμούς υδρογόνου, (γ) υγροκρυσταλλικότητα του PBLG, (δ) υδροφοβικότητα των πλευρικών αλυσίδων του PBLG και (ε) νανοφασικό διαχωρισμό. Γι' αυτό και η μελέτη της αυτο-οργάνωσής του παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Σε αυτή την εργασία μελετήθηκε μια σειρά 13 συμπολυμερών PBLG-PEG-PBLG (Πίνακας 3.5) με κλάσμα όγκου PBLG από 0.20 ως 0.98. Η μελέτη της δομής έγινε με ΠΟΜ, FTIR, ΔΘΣ, SAXS και WAXS, ενώ της δυναμικής με ΔΦ.

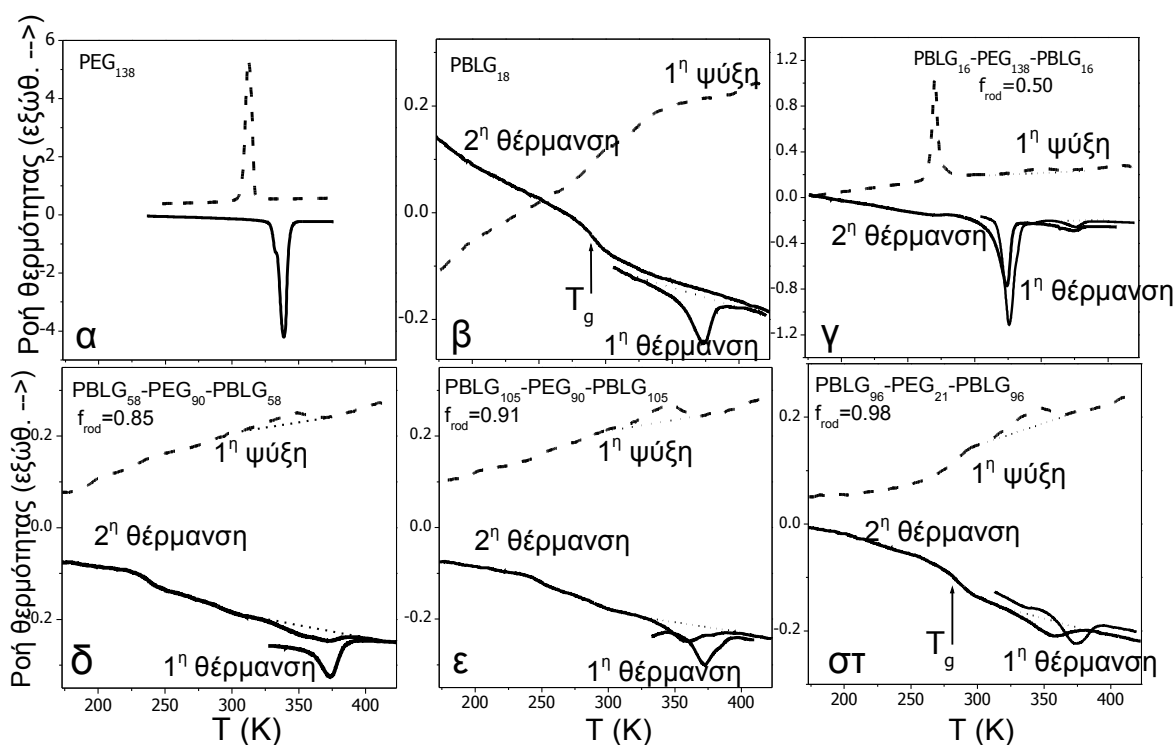
Η ΠΟΜ μπορεί να δώσει πληροφορίες για τη μακροσκοπική δομή των συστημάτων (διακριτική ικανότητα $\sim 2 \mu\text{m}$). Αντιπροσωπευτικές εικόνες για τα δείγματα PEG₉₀, PBLG₁₈, PBLG₁₇-PEG₉₀-PBLG₁₇ ($f_{\text{PBLG}}=0.62$) και PBLG₄-PEG₁₃₈-PBLG₄ ($f_{\text{PBLG}}=0.20$) στους 303 K παρουσιάζονται στην εικ. 6.1. Το PEG είναι ημικρυσταλλικό, με τη συνήθη μακροσκοπική δομή σφαιρόλιθου και με χαμηλή πυκνότητα πυρήνων κρυστάλλωσης, ενώ το πεπτίδιο δείχνει εικόνα νηματικής παρακρυσταλλικής δομής (Κεφ. 4). Το συμπολυμερές με μεγάλο ποσοστό PBLG, δείχνει πολύ ασθενή υγροκρυσταλλική τάξη και απουσία δομής σφαιρόλιθου, που είναι ένδειξη ότι το PEG δεν κρυσταλλώθηκε, ενώ, αντίθετα, το συμπολυμερές με υψηλότερο ποσοστό PEG παρουσιάζει σφαιρόλιθους, με αρκετά υψηλότερη πυκνότητα πυρήνων από το καθαρό PEG και ακανόνιστο μέγεθος. Τα αποτελέσματα αυτά είναι μια πρώτη, μακροσκοπική ένδειξη, ότι η δομή των συμπολυμερών διαφέρει από των αντίστοιχων καθαρών ομοπολυμερών. Όπως θα δούμε πιο κάτω, αυτή η αλλαγή αντανακλά θερμοδυναμικές μεταβολές σε μικρότερες κλίμακες μήκους, λόγω των μοριακών αλληλεπιδράσεων.



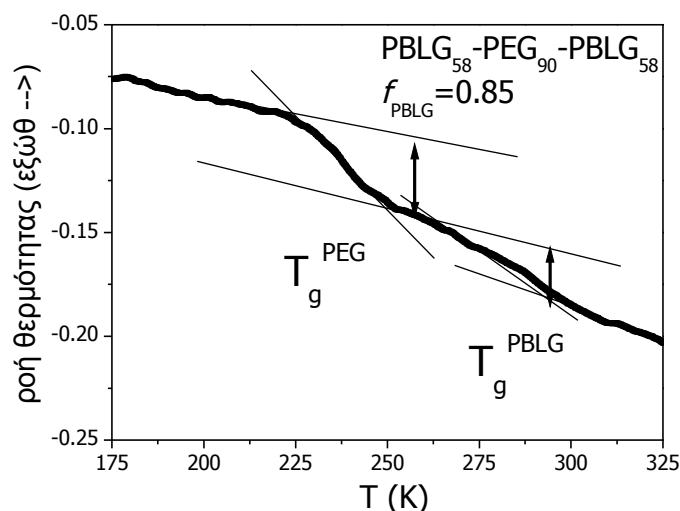
Εικ. 6.1. Εικόνες POM στους 303 K από δείγματα (α) PEG₉₀, (β) PBLG₁₈, (γ) PBLG₁₇-PEG₉₀-PBLG₁₇ ($f_{PBLG}=0.62$) και (δ) PBLG₄-PEG₁₃₈-PBLG₄ ($f_{PBLG}=0.20$). Το συμπολυμερές με μεγάλο ποσοστό PBLG δείχνει μόνο ασθενή υγροκρυσταλλική τάξη, ενώ το άλλο με μεγάλο ποσοστό PEG εμφανίζει σφαιρόλιθους ακανόνιστου μεγέθους με μεγάλη πυκνότητα πυρήνων.

Περισσότερες πληροφορίες για την κρυστάλλωση της συστάδας του PEG και άλλες δομικές αλλαγές μπορεί να δώσει η ΔΘΣ. Στην εικ. 6.2 συγκρίνονται οι καμπύλες ροής θερμότητας των καθαρών PEG και PBLG με τέσσερα συμπολυμερή. Το ομοπολυμερές PEG δείχνει θερμοκρασία κρυστάλλωσης και τήξης στους 316 και 336 K, αντίστοιχα, δηλαδή μια υπόψυξη ~ 20 K. Από την ενθαλπία τήξης ($\Delta H=177$ J/g) υπολογίζεται ο βαθμός κρυσταλλικότητας σε 85 % ($\Delta H_{\infty}=205$ J/g [23]). Το ομοπολυπεπτίδιο παρουσιάζει τη γνωστή (Κεφ. 4) μη αντιστρεπτή μεταβολή της έλικας από 7/2 στην συνηθισμένη 18/5 α -έλικα στους ~ 370 K και τη «μετάβαση» υάλου στους ~ 285 K. Στα συμπολυμερή τα αποτελέσματα διαφέρουν ανάλογα με το κλάσμα όγκου του πεπτιδίου f_{PBLG} . Για $f_{PBLG} < 0.65$, η συστάδα PEG κρυσταλλώνεται, αλλά με μεγάλη υπόψυξη, π.χ. 52 K για το PBLG₁₆-PEG₁₃₈-PBLG₁₆ ($f_{PBLG}=0.50$). Αυτή η μεγάλη υπόψυξη είναι χαρακτηριστική για κρυστάλλωση συστάδων σε νανοπεριορισμένες δομές [24-26]. Για $f_{PBLG} \sim 0.75$ (εικ. 6.2δ-ε-στ) η συστάδα PEG δεν κρυσταλλώνεται ακόμα και σε 250 K κάτω από το σημείο τήξης. Μία ακόμη διαφορά από τα αντίστοιχα ομοπολυμερή είναι και η αντιστρεπτότητα της μεταβολής της έλικας του PBLG στους ~ 370 K, αν και στη δεύτερη θέρμανση μειώνεται κάπως η αντίστοιχη ενθαλπία.

Η «μετάβαση» υάλου του PBLG παρουσιάζει μια αρκετά περίεργη συμπεριφορά: στο ομοπολυπεπίδιο και το συμπολυμερές PBLG₉₆-PEG₂₁-PBLG₉₆ εμφανίζεται το «σκαλοπάτι» της θερμοχωρητικότητας στους ~ 280 K, στα άλλα δύο συμπολυμερή, όμως, φαίνεται να υπάρχουν δύο T_g , στους ~ 240 K και στους ~ 270 K, που το πρώτο αποδίδεται στη συστάδα PEG, ενώ το δεύτερο στο PBLG. Η εικ. 6.3 δείχνει σε μεγέθυνση την συγκεκριμένη περιοχή για το συμπολυμερές PBLG₅₈-PEG₉₀-PBLG₅₈. Η μεταβολή της θερμοχωρητικότητας στα δύο σκαλοπάτια είναι ~ 0.21 και ~ 0.18 J/gK, αντίστοιχα. Η μετάβαση υάλου μελετήθηκε κυρίως με ΔΦ, που είναι πιο ευαίσθητη, τα αποτελέσματα της οποίας θα παρουσιαστούν πιο κάτω.

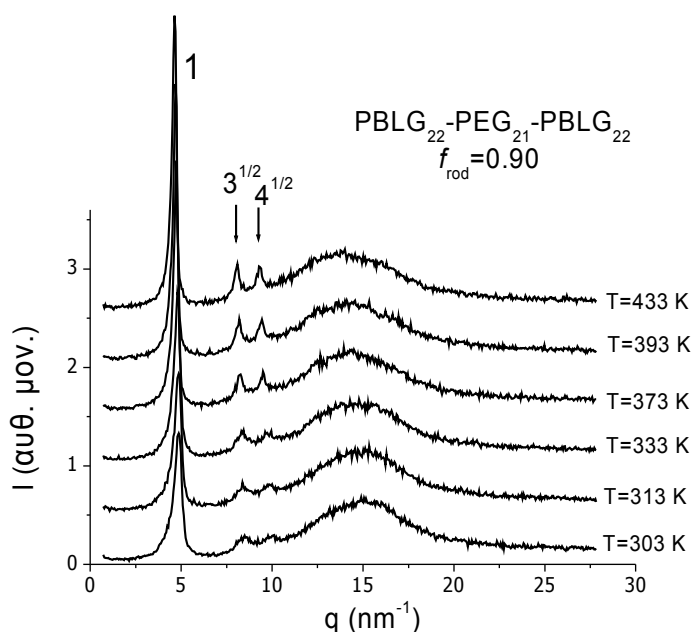


Εικ. 6.2. Καμπύλες ΔΘΣ για τα ομοπολυμερή: (α) PEG₁₃₈ και (β) PBLG₁₈ και τέσσερα τρισυσταδικά συμπολυμερή: (γ) PBLG₁₆-PEG₁₃₈-PBLG₁₆ ($f_{PBLG}=0.50$), (δ) PBLG₁₆-PEG₁₃₈-PBLG₁₆ ($f_{PBLG}=0.85$) (ε) PBLG₁₆-PEG₁₃₈-PBLG₁₆ ($f_{PBLG}=0.91$) και (στ) PBLG₁₆-PEG₁₃₈-PBLG₁₆ ($f_{PBLG}=0.98$). Οι συνεχείς και διακεκομμένες γραμμές προέρχονται από θέρμανση και ψύξη, αντίστοιχα. Εκτός από το PEG, δείχνεται και η πρώτη και η δεύτερη θέρμανση. Κρυστάλλωση της συστάδας PEG συμβαίνει μόνο στο PBLG₁₆-PEG₁₃₈-PBLG₁₆ με το μικρότερο ποσοστό PBLG, παρά την ψύξη όλων των δειγμάτων πολύ κάτω από το σημείο τήξης. Η μετάβαση πρώτης τάξης στους ~370 K στο PBLG₁₈ και τα συμπολυμερή οφείλεται στην αλλαγή της έλικας από 7/2 σε 18/5 (Κεφ. 4). Η μετάβαση υάλου του PBLG παρατηρείται στους ~280 K στα (β) και (στ).

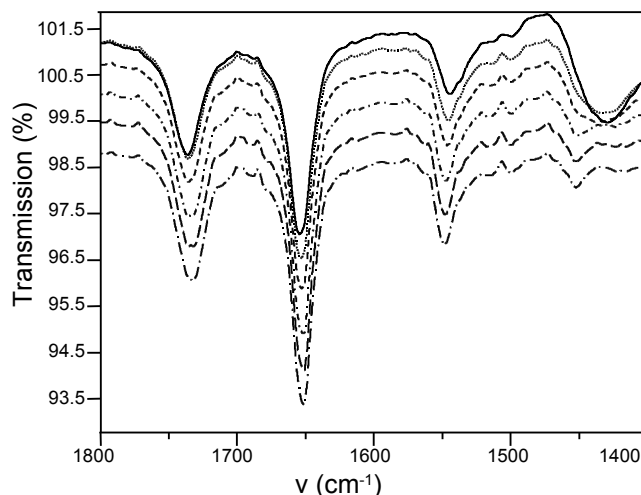


Εικ. 6.3. Μεγέθυνση της εικ. 6.2δ όπου φαίνονται οι δύο «μεταβάσεις» υάλου, που πιθανώς αντιστοιχούν στις συστάδες PEG και PBLG.

Η ΔΘΣ έδειξε, σε σχέση με τα αντίστοιχα ομοπολυμερή, ορισμένες δομικές αλλαγές που δεν ήταν αναμενόμενες. Επειδή η μέθοδος δεν είναι κατάλληλη για άμεσο προσδιορισμό της δομής, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές που μπορούν να «δουν» την οργάνωση σε διαφορετικές κλίμακες μήκους. Στις εικ. 6.4 και 6.5 παρουσιάζονται, αντίστοιχα, φάσματα WAXS και FTIR του συμπολυμερούς PBLG₂₂-PEG₂₁-PBLG₂₂ σε διάφορες θερμοκρασίες στην περιοχή 433 – 303 K (έχουν ληφθεί με ψύξη). Από τα WAXS προκύπτει ότι σχηματίζεται το σύνηθες εξαγωνικό πλέγμα των α -ελίκων, ενώ, ακόμα και στις χαμηλές θερμοκρασίες, απουσιάζουν οι χαρακτηριστικές κορυφές του κρυσταλλικού PEG στα 13.4 και 16.3 nm⁻¹ [27], σε συμφωνία με τη ΔΘΣ. Η σημαντικότερη διαφορά, ωστόσο, ανάμεσα σε αυτό το συμπολυμερές και το αντίστοιχο καθαρό πεπτίδιο είναι η απουσία της κορυφής στα 3.5 nm⁻¹ στα WAXS και της απορρόφησης στα 1630 cm⁻¹ στο φάσμα FTIR που αντιστοιχούν στη β -φυλλοειδή δομή (Κεφ. 4). Το πεπτίδιο PBLG₁₈ (εικ. 4.4 και 4.7α), που, δεδομένης και της πολυδιασποράς (Κεφ. 3), είναι ουσιαστικά ίδιου μήκους με τις συστάδες PBLG₂₂ του συμπολυμερούς, περιείχε και αρκετά σημαντικό ποσοστό β -φύλλων. Η μικρή PEG αλυσίδα στο συμπολυμερές αποσταθεροποιεί τη β -φυλλοειδή δομή του PBLG. Όπως θα φανεί και πιο κάτω, η ενδοεπιφανειακή ανάμιξη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε αυτό. Παρόλα αυτά, η ύπαρξη των α -ελίκων δίνει στο σύστημα μορφολογία ράβδου-τυχαίας διαμόρφωσης-ράβδου (*rod-coil-rod*).



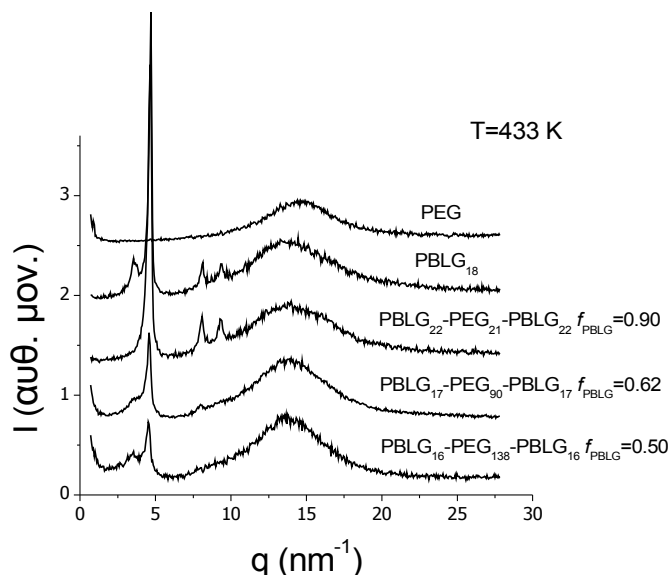
Εικ. 6.4. Φάσματα WAXS του τρισυσταδικού συμπολυμερούς $PBLG_{22}-PEG_{21}-PBLG_{22}$ σε διάφορες θερμοκρασίες στην περιοχή 433–303 K. Οι ανακλάσεις με σχετικές θέσεις $1:3^{1/2}:4^{1/2}$ αντιστοιχούν στο εξαγωνικό πλέγμα των α -ελίκων, ενώ, αντίθετα με το αντίστοιχο καθαρό πεπτιδίο, απουσιάζουν τα β -φύλλα (βλέπε και εικ. 4.7α). Επίσης το PEG δεν κρυσταλλώνεται ούτε στους 303 K.



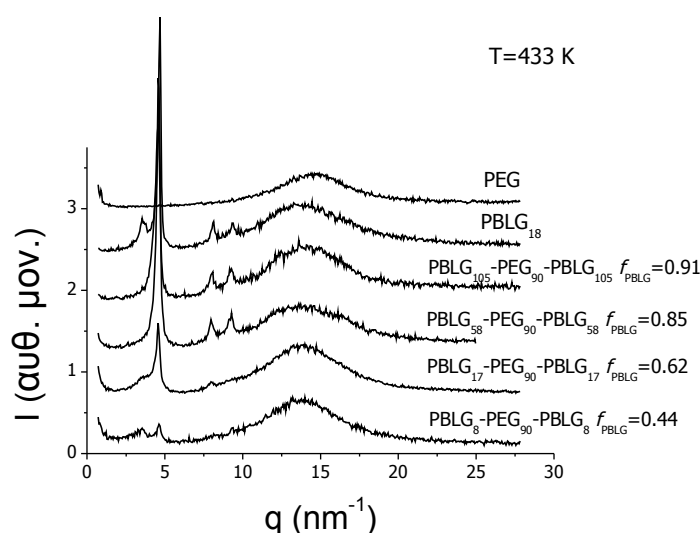
Εικ. 6.5. Φάσματα FTIR του τρισυσταδικού συμπολυμερούς $PBLG_{22}-PEG_{21}-PBLG_{22}$ στις ίδιες θερμοκρασίες με την εικ. 6.4. Απουσιάζει η απορρόφηση που αντιστοιχεί στα β -φύλλα, σε αντίθεση με το ομοπολυπεπτιδίο ίδιου βαθμού πολυμερισμού (βλέπε και εικ. 4.4β).

Για να βρεθεί η επίδραση της αύξησης του κλάσματος όγκου του PBLG στα συμπολυμερή είναι καλύτερο να εξεταστεί ξεχωριστά η αύξηση του μήκους του PEG, κρατώντας το PBLG σταθερό, και η αύξηση του βαθμού πολυμερισμού του PBLG, κρατώντας το PEG σταθερό (εικ. 6.6 και 6.7, αντίστοιχα). Τα φάσματα WAXS έχουν ληφθεί στους 433 K, όπου το PEG είναι τήγμα.

Στην εικ. 6.6 φαίνεται ότι, ενώ το μήκος του πεπτιδίου είναι αρκετά μικρό ώστε να επιτρέπει σχηματισμό β -φύλλων ($\langle x \rangle \sim 20$), στο πιο ασύμμετρο συμπολυμερές (PBLG₂₂-PEG₂₁-PBLG₂₂, $f_{\text{PBLG}}=0.90$) εμφανίζονται μόνο α -έλικες και στα υπόλοιπα μειωμένο ποσοστό β -φύλλων. Ανάλογο συμπέρασμα προκύπτει και από τη δεύτερη σύγκριση, αν και δεν είναι εύκολη η άμεση εξαγωγή συμπερασμάτων, γιατί η δευτεροταγής δομή είναι τώρα συνάρτηση και του βαθμού πολυμερισμού.



Εικ. 6.6. Φάσματα WAXS στους 433 K για τα ομοπολυμερή PEG και PBLG₁₈ και τρία συμπολυμερή με περίπου ίδιο βαθμό πολυμερισμού PBLG, ώστε να φανεί η επίδραση της αύξησης του μήκους του PEG. Η β -φυλλοειδής δομή (κορυφή στα 3.5 nm⁻¹) αποσταθεροποιείται με την αύξηση της ασυμμετρίας στη σύσταση.



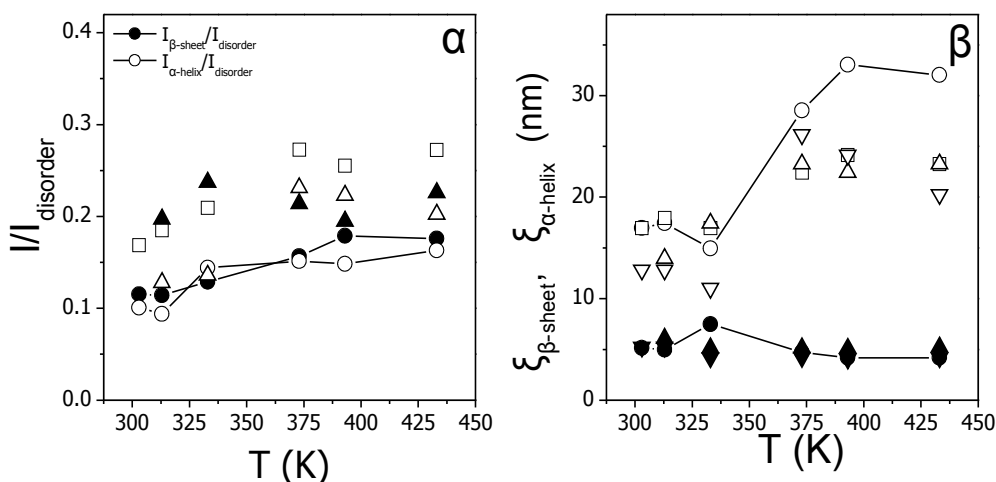
Εικ. 6.7. Φάσματα WAXS στους 433 K για τα ομοπολυμερή PEG και PBLG₁₈ και τέσσερα συμπολυμερή με ίδιο βαθμό πολυμερισμού PEG, ώστε να φανεί η επίδραση της αύξησης του μήκους του PBLG. Η β -φυλλοειδής δομή (κορυφή στα 3.5 nm⁻¹) φαίνεται να αποσταθεροποιείται με την αύξηση της ασυμμετρίας στη σύσταση, όπως στην εικ. 6.6.

Προκειμένου να εξαχθούν ποσοτικά αποτελέσματα, έγινε προσαρμογή στις ευρείες κορυφές των φασμάτων WAXS με άθροισμα συναρτήσεων Lorentz για τα β -φύλλα, τις α -έλικες και την άμορφη «άλω»:

$$I(q) = I_{\alpha}(q) + I_{\beta}(q) + I_{amorph}(q), \quad I_i(q) = \frac{2A}{\pi} \frac{w}{4(q - q^*)^2 + w^2} \quad (6.1)$$

όπου A το εμβαδό κάτω από την κορυφή, q^* το κυματάνυσμα στη μέγιστη ένταση και w το εύρος (FWHM) της κορυφής. Το μήκος συνοχής της δομής υπολογίζεται από τη σχέση $\xi = 2\pi/w$ που είναι ισοδύναμη της εξίσωσης του Scherrer [28]. Οι ολοκληρωμένες εντάσεις κάτω από τις κορυφές συγκρίνονται στην εικ. 6.8α. Οι τιμές για τις κορυφές που αντιστοιχούν στα β -φύλλα ($q^* \sim 3.5 \text{ nm}^{-1}$) και στις α -έλικες ($q^* \sim 4.7 \text{ nm}^{-1}$) έχουν διαιρεθεί με την τιμή της άλω ($q^* \sim 14 \text{ nm}^{-1}$), επειδή η τελευταία δεν αναμένεται να έχει εξάρτηση από τη δευτεροταγή δομή. Στο PBLG₁₈ η αναλογία α -ελίκων και β -φύλλων είναι περίπου 50:50 σε όλες τις θερμοκρασίες, αλλά φαίνεται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει το συνολικό ποσοστό των αλυσίδων με συγκεκριμένη δευτεροταγή δομή, σε βάρος των άμορφων τμημάτων. Παρόμοια τάση υπάρχει και στα συμπολυμερή.

Το μήκος συνοχής των δευτεροταγών δομών παρουσιάζεται στην εικ. 6.8β. Όπως και στο ομοπολυπεπτίδιο, στα τρισυσταδικά συμπολυμερή τα β -φύλλα έχουν μικρότερο μήκος συνοχής ($\sim 5 \text{ nm}$) από τις α -έλικες, στις οποίες εξαρτάται από τη θερμοκρασία και κυμαίνεται από 15 ως 30 nm (βλέπε και Κεφ. 4). Η μικρότερη συνοχή των β -φύλλων είναι αυτή που προκαλεί την εξαφάνισή τους στα πιο ασύμμετρα τρισυσταδικά συμπολυμερή.



Εικ. 6.8. (α) Σχετική ένταση των κορυφών που αντιστοιχούν στα β-φύλλα (κλειστά σύμβολα) και τις α-έλικες (ανοιχτά σύμβολα) συναρτήσει της θερμοκρασίας για τα δείγματα: (κύκλοι) PBLG₁₈, (τετράγωνα) PBLG₂₂-PEG₂₁-PBLG₂₂ ($f_{\text{PBLG}}=0.90$), (πάνω τρίγωνα) PBLG₁₇-PEG₉₀-PBLG₁₇ ($f_{\text{PBLG}}=0.62$) και (κάτω τρίγωνα) PBLG₁₆-PEG₁₃₈-PBLG₁₆ ($f_{\text{PBLG}}=0.50$). Η αναλογία α-ελίκων/β-φύλλων είναι περίπου ανεξάρτητη από τη θερμοκρασία, και εξαρτάται από το κλάσμα όγκου του πεπτιδίου, αλλά το συνολικό ποσοστό αλυσίδων με συγκεκριμένη δευτεροταγή δομή αυξάνεται με τη θερμοκρασία. (β) Μήκος συνοχής των δευτεροταγών δομών. Τα σύμβολα είναι ίδια με την εικ. (α). Στα συμπολυμερή δεν παρατηρείται ουσιαστική αλλαγή από το ομοπολυπεπίδιο, με τις α-έλικες να έχουν σημαντικά μεγαλύτερο μήκος συνοχής, αν και λίγο μικρότερο από το ομοπολυπεπίδιο (βλέπε και Κεφ. 4).

Η σκέδαση ακτίνων X, η ΔΘΣ και το FTIR έδειξαν σημαντικές μεταβολές στις δευτεροταγείς δομές του PBLG και στη δυνατότητα κρυστάλλωσης της συστάδας PEG στα συμπολυμερή, που εξαρτώνται από το κλάσμα όγκου του πεπτιδίου. Οι αλλαγές αυτές αντανακλούν αλλαγές στη φασική κατάσταση του συστήματος. Ο διαχωρισμός φάσεων σε συσταδικά συμπολυμερή, αποτελούμενα από άμορφες συστάδες με στατιστικές διαμορφώσεις, εξαρτάται (α) από την παράμετρο αλληλεπίδρασης χ , που περιγράφει την ενέργεια ανά επαφή διαφορετικών μονομερών, και (β) το συνολικό βαθμό πολυμερισμού N , που καθορίζει την εντροπία του συστήματος, λόγω διαφορετικών θέσεων και διαμορφώσεων [8]. Επειδή οι συνεισφορές της ενθαλπίας και της εντροπίας στην ελεύθερη ενέργεια Gibbs είναι ανάλογες, αντίστοιχα, του χ και του N^{-1} , ο νανοφασικός διαχωρισμός εξετάζεται συναρτήσει του γινομένου χN . Διαγράμματα φάσης για άμορφα-άμορφα συσταδικά συμπολυμερή είναι γνωστά. Σημαντική επίδραση στη φασική κατάσταση έχουν και άλλες παράμετροι, όπως η αρχιτεκτονική και η ασυμμετρία των βαθμών πολυμερισμού των συσταδών. Επίσης, το διάγραμμα φάσεων διαφέρει για αλυσίδες με μη τυχαίες διαμορφώσεις, όπως π.χ. ραβδοειδή-άμορφα συμπολυμερή, για τα οποία δεν υπάρχουν θεωρητικές προβλέψεις, αλλά και τα πειραματικά αποτελέσματα είναι πολύ περιορισμένα. Παρόλα αυτά, πιο

κάτω θα επιχειρήσουμε μια πρώτη εκτίμηση του χN για τα διαφορετικά συμπολυμερή, θεωρώντας αντίστοιχο παράγοντα δομής $S(q)$ με τα άμορφα-άμορφα συμπολυμερή. Πρέπει να σημειωθεί ότι για την κατασκευή ενός πλήρους διαγράμματος φάσεων χρειάζονται περίπου 30 κατάλληλα επιλεγμένα συμπολυμερή. Στην παρούσα εργασία, ο αριθμός δειγμάτων είναι σημαντικά μικρότερος, γι' αυτό τα αποτελέσματα είναι περισσότερο ποιοτικά.

Οι νανοδομές μπορούν να παρατηρηθούν μέσω της χρήσης SAXS, που μπορεί να «δει» αποστάσεις αρκετών δεκάδων nm που είναι συγκρίσιμες με τη γυροσκοπική ακτίνα των συστάδων. Η εικόνα της σκέδασης διαφέρει ανάλογα με το κλάσμα όγκου. Το τρισυσταδικό συμπολυμερές PBLG₁₇-PEG₉₀-PBLG₁₇ ($f_{\text{PBLG}}=0.62$) (εικ. 6.9α) δείχνει μια κύρια ανάκλαση σε $q^*=0.70 \text{ nm}^{-1}$ ($d=9 \text{ nm}$) και ανώτερης τάξης κορυφές, χαρακτηριστικές σε νανοφασικά διαχωρισμένα συσταδικά συμπολυμερή. Το συμπολυμερές PBLG₁₀₅-PEG₉₀-PBLG₁₀₅ ($f_{\text{PBLG}}=0.91$) (εικ. 6.9β), αντίθετα, δείχνει μόνο μια ευρεία κορυφή, όπως σε μίγματα πολυμερών ή συσταδικά συμπολυμερή όπου γίνεται ανάμιξη των συστάδων, σε $q^*=0.33 \text{ nm}^{-1}$. Αν και η κορυφή έχει αρκετά έντονο υπόβαθρο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνει μια εκτίμηση της παραμέτρου χ , μέσω των παρακάτω εξισώσεων για τον παράγοντα δομής $S(q)$ σε τρισυσταδικά συμπολυμερή με κλάσματα όγκου των τριών συστάδων f_1, f_2 και f_3 , αντίστοιχα [29,30]:

$$\frac{1}{S(q)} = \frac{F(x)}{N} - 2\chi \quad (6.2\alpha)$$

όπου

$$F(x) = \frac{g_{AA}(x) + g_{BB}(x) + 2g_{AB}(x)}{g_{AA}(x)g_{BB}(x) - g_{AB}^2(x)} \quad (6.2\beta)$$

όπου

$$g_{AA}(x) = g_D(f_1, x) + g_D(f_2, x) + g_D(f_3, x) + g_D(1, x) - g_D(1-f_1, x) - g_D(1-f_3, x)$$

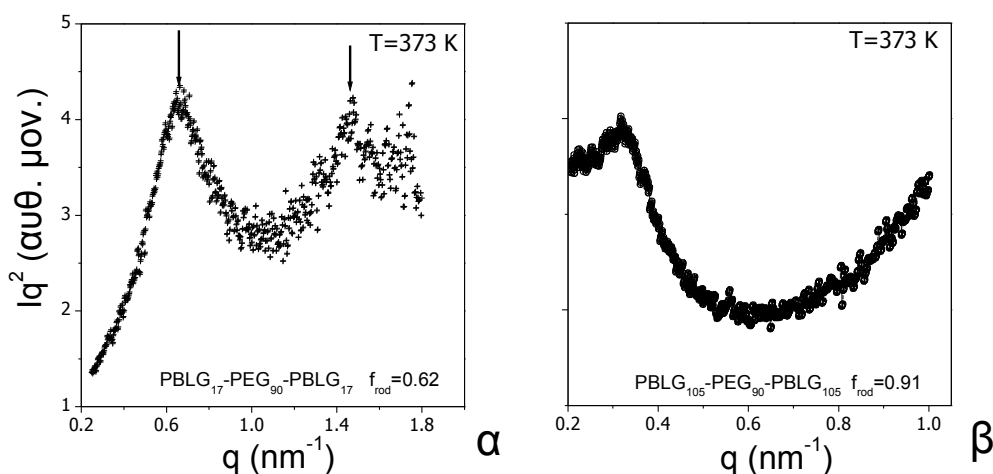
$$g_{BB}(x) = g_D(f_2, x)$$

$$g_{AB}(x) = \frac{1}{2}(g_D(1-f_1, x) + g_D(1-f_3, x) - g_D(f_1, x) - g_D(f_3, x) - 2g_D(f_2, x))$$

και $g_D(f, x)$ η συνάρτηση Debye που ορίζεται ως

$$g_D(f, x) = \frac{2}{x^2}(fx - 1 + e^{-fx}), \text{ με } x = q^2 R_g^2 \quad (6.2\gamma)$$

όπου R_g η γυροσκοπική ακτίνα του συμπολυμερούς. Η παράμετρος αλληλεπίδρασης μεταξύ των PBLG και PEG βρίσκεται ότι είναι $\chi^{\text{PBLG-PEG}} = 0.32 \pm 0.05$.



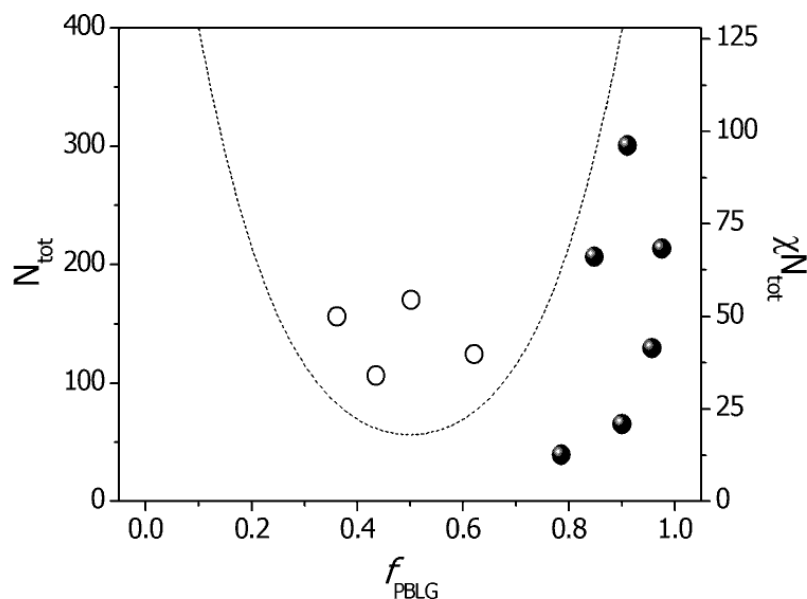
Εικ. 6.9. Σκεδαζόμενη ένταση σε μικρές γωνίες (SAXS) από τα συμπολυμερή (α) $PBLG_{17}-PEG_{90}-PBLG_{17}$ ($f_{PBLG}=0.62$) και (β) $PBLG_{105}-PEG_{90}-PBLG_{105}$ ($f_{PBLG}=0.91$). Το πρώτο δείχνει δύο ανακλάσεις με σχετικές θέσεις περίπου 1:2 που δείχνουν νανοφασικό διαχωρισμό με σχηματισμό φυλλοειδών νανοφάσεων. Το δεύτερο δείχνει μόνο μια ευρεία κορυφή χωρίς ανακλάσεις ανώτερης τάξης, όπως γίνεται σε συσταδικά συμπολυμερή με ανάμιξη των συστάδων. Η θέση της κορυφής εξαρτάται από τη γυροσκοπική ακτίνα, ενώ το σχήμα της από την παράμετρο αλληλεπίδρασης χ , η οποία προσδιορίστηκε με τις εξισώσεις 6.2 για τρισυσταδικό συμπολυμερές A-B-A: $\chi^{PBLG-PEG} = 0.32 \pm 0.05$. Επειδή οι εξισώσεις ισχύουν για συμπολυμερή με άμορφες και όχι ραβδοειδείς συστάδες, η τιμή είναι προσεγγιστική.

Τα αποτελέσματα για τη φασική κατάσταση και της συνέπειές της στην κρυστάλλωση του PEG και τη δευτεροταγή δομή του PBLG συγκεντρώνονται στον Πίνακα 6.1. Ανάλογα με το κλάσμα όγκου του πεπτιδίου, παρατηρούμε δύο περιπτώσεις: για $f_{PBLG} < 0.65$ το SAXS δείχνει πολλαπλές κορυφές, ένδειξη νανοφασικού διαχωρισμού, ενώ για $f_{PBLG} > 0.75$ παρατηρείται μόνο μια ευρεία κορυφή, ένδειξη ανάμιξης. Η ανάμιξη έχει συνέπειες στη δομή των συστάδων: η δευτεροταγής δομή με τη μικρότερη συνοχή (β -φύλλα) αποσταθεροποιείται λόγω της γειννίας με τις αλυσίδες PEG, οι οποίες με τη σειρά τους δεν μπορούν να κρυσταλλωθούν. Υπενθυμίζεται ότι η σύγκριση έγινε ανάμεσα σε συστήματα με μικρό βαθμό πολυμερισμού του PBLG, τα οποία θα έπρεπε να εμφανίζουν και τις δύο δευτεροταγείς δομές. Το γεγονός ότι οι α -έλικες δεν είναι ευαίσθητες στην ανάμιξη οφείλεται στο ότι σχηματίζουν ενδομοριακούς αντί για διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου, τους οποίους είναι πιο δύσκολο να σπάσουν οι αλυσίδες του PEG. Το ποιοτικό διάγραμμα φάσεων παρουσιάζεται στη εικ. 6.10, ενώ οι εικ. 6.11 και 6.12 δείχνουν σχηματικά τη δομή, όταν υπάρχει διαχωρισμός και ανάμιξη φάσεων αντίστοιχα. Στην πρώτη περίπτωση υπάρχουν νανοφάσεις με ξεχωριστές συστάδες του PBLG, όπου συνυπάρχουν α -έλικες και β -φύλλα, και του PEG με κρυστάλλους καθώς και άμορφων τμημάτων. Στη δεύτερη υπάρχει ανάμιξη με περιοχές εξαγωνικά οργανωμένων α -ελίκων και άμορφες αλυσίδες PEG και PBLG. Πρέπει να

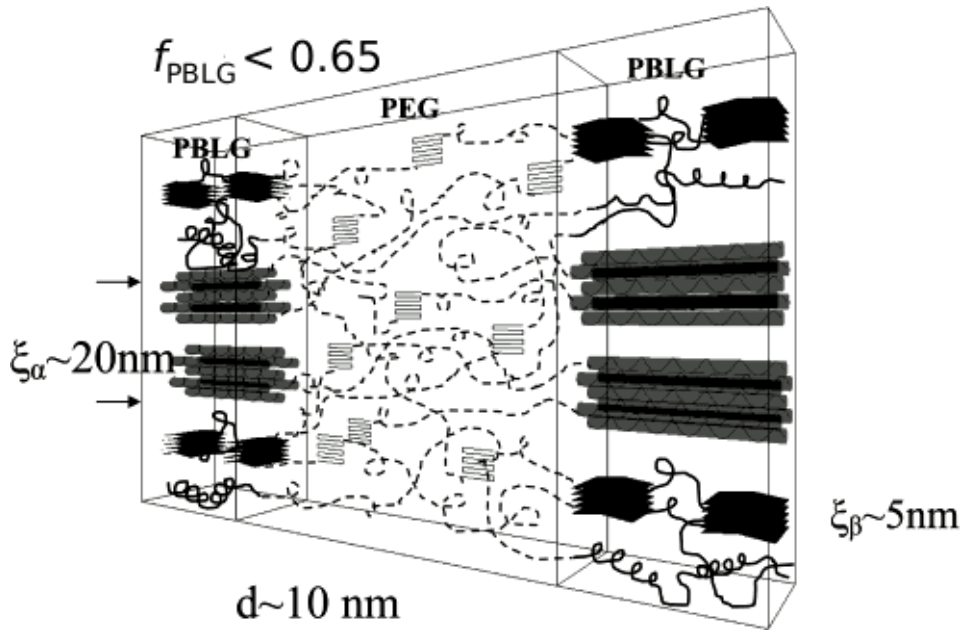
σημειωθεί ότι δυσσταδικά συμπολυμερή PEG-PBLG θα ήταν δυσκολότερο να παρουσιάσουν ανάμιξη, γιατί η κρίσιμη τιμή του γινομένου χN , όπου χ η παράμετρος αλληλεπίδρασης του Flory και N ο συνολικός βαθμός πολυμερισμού, είναι χαμηλότερη σε σχέση με τα τρισυσταδικά (~ 10.5 έναντι ~ 18) [30].

Πίνακας 6.1. Φασική κατάσταση των τρισυσταδικών συμπολυμερών PBLG-PEG-PBLG.

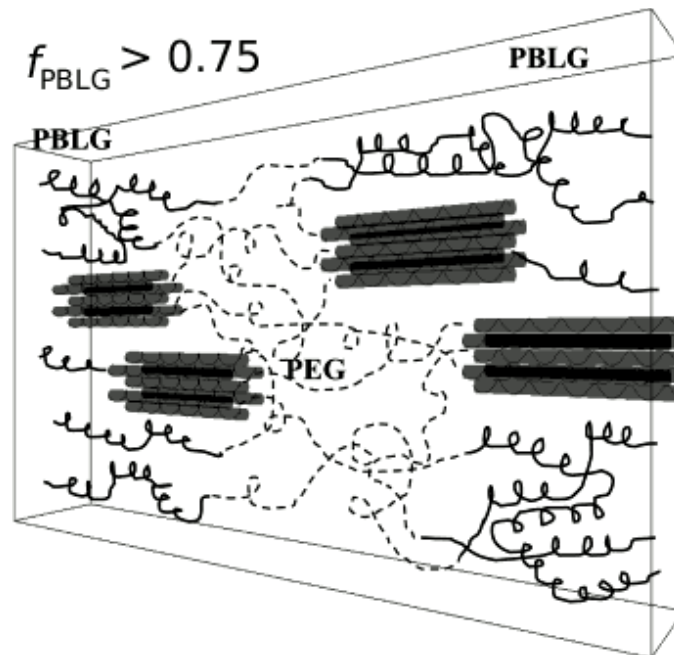
Σύστημα	f_{PBLG}	N_{tot}	νανοφασικός διαχωρισμός (SAXS)	δευτεροταγής δομή πεπτιδίου	κρυστάλλωση PEG
PBLG ₉ -PEG ₁₃₈ -PBLG ₉	0.36	156	✓	α/β	✓
PBLG ₈ -PEG ₉₀ -PBLG ₈	0.44	106	✓	α/β	✓
PBLG ₁₆ -PEG ₁₃₈ -PBLG ₁₆	0.50	170	✓	α/β	✓
PBLG ₁₇ -PEG ₉₀ -PBLG ₁₇	0.62	124	✓	α/β	✓
PBLG ₉ -PEG ₂₁ -PBLG ₉	0.79	39	✗	α	✗
PBLG ₅₈ -PEG ₉₀ -PBLG ₅₈	0.85	206	✗	α	✗
PBLG ₂₂ -PEG ₂₁ -PBLG ₂₂	0.90	65	✗	α	✗
PBLG ₁₀₅ -PEG ₉₀ -PBLG ₁₀₅	0.91	300	✗	α	✗
PBLG ₅₄ -PEG ₂₁ -PBLG ₅₄	0.96	129	✗	α	✗
PBLG ₉₆ -PEG ₂₁ -PBLG ₉₆	0.98	213	✗	α	✗



Εικ. 6.10. Ποιοτικό διάγραμμα φάσεων σε $T=373$ K των τρισυσταδικών συμπολυμερών PBLG-PEG-PBLG. Τα ανοιχτά και τα κλειστά σύμβολα αντιστοιχούν σε διαχωρισμό φάσεων και ανάμιξη, σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα SAXS, WAXS, FTIR και DSC. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει σχηματικά τα όρια μεταξύ των περιοχών, και το ελάχιστό της αντιστοιχεί στην κρίσιμη τιμή του γινομένου $\chi N=18$ για τρισυσταδικά συμπολυμερή A-B-A [30]. Η τιμή του $\chi=0.32$ υπολογίστηκε μέσω της εξίσωσης 6.2 από φάσμα SAXS συμπολυμερούς, όπου υπάρχει ανάμιξη (εικ. 6.9β).



Εικ. 6.11. Σχηματικό μοντέλο του νανοφασικού διαχωρισμού των τρισταδικών συμπολυμερών PBLG-PEG-PBLG για $f_{PBLG} > 0.65$. Το πεπτικό σχηματίζει α -έλικες και β -φύλλα (για βαθμούς πολυμερισμού ~ 20), αλλά έχει και άμορφα τμήματα, ενώ η φάση του PEG περιέχει κρυστάλλους και άμορφες αλυσίδες.

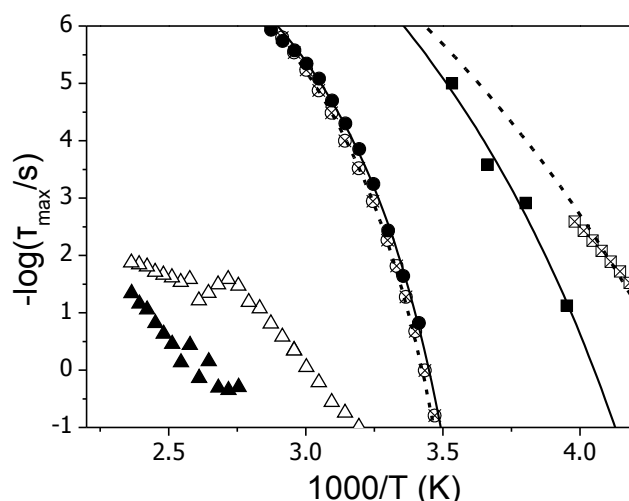


Εικ. 6.12. Σχηματικό μοντέλο της ανάμιξης των τρισταδικών συμπολυμερών PBLG-PEG-PBLG για $f_{PBLG} < 0.75$. Από τις δευτεροταγείς δομές διατηρούνται μόνο οι α -έλικες, ενώ το PEG παραμένει άμορφο, ακόμα και σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες.

Παράλληλα με τις τεχνικές σκέδασης (SAXS) η μέθοδος της ΔΦ είναι πολύ ευαίσθητη στην ύπαρξη τοπικής ανάμιξης πολυμερών. Πιο συγκεκριμένα, σε νανοφασικά διαχωρισμένα

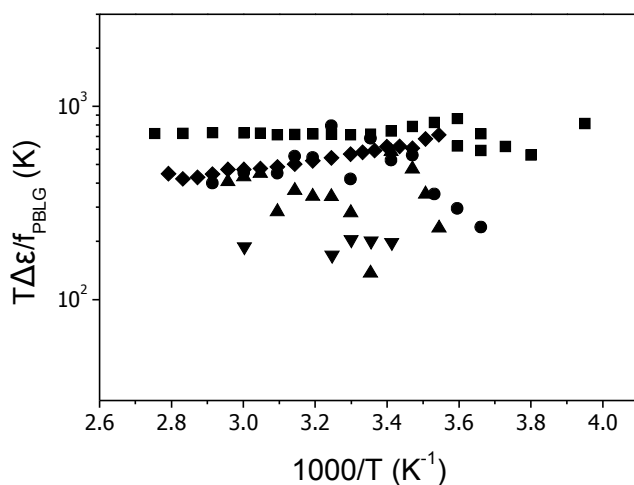
συμπολυμερή (στο όριο του ισχυρού διαχωρισμού φάσεων – *strong segregation limit*), όπως και σε πολυμερικά μίγματα, οι δύο α -μηχανισμοί βρίσκονται πολύ κοντά στα καθαρά συστατικά [31,32]. Αντίθετα, σε ομογενή μίγματα και συμπολυμερή ($\chi N < 2$ και 10.5, αντίστοιχα) οι δύο α -μηχανισμοί έχουν μετατοπιστεί σε σχέση με τα καθαρά συστατικά. Οι θεωρίες των διακυμάνσεων των Fischer και Zetsche [33] και των Kumar *et al.* [34] και της αυτο-συγκέντωσης των Lodge-McLeish [35] περιγράφουν ικανοποιητικά την πλάτυνση και τη θερμοκρασιακή εξάρτηση των χαρακτηριστικών χρόνων, αντίστοιχα.

Στα τρισυσταδικά συμπολυμερή παρατηρούνται, γενικά, οι πέντε μηχανισμοί χαλάρωσης του καθαρού PBLG (Κεφ. 4) και ο τμηματικός (α -) μηχανισμός του PEG, όπως δείχνει η εικ. 6.13 για το συμπολυμερές PBLG₁₀₅-PEG₉₀-PBLG₁₀₅ ($f_{\text{PBLG}}=0.91$). Πρέπει να σημειωθεί ότι παρατηρούνται δύο τμηματικοί μηχανισμοί, ακόμα και όταν υπάρχει ανάμιξη σύμφωνα με τις υπόλοιπες μεθόδους.



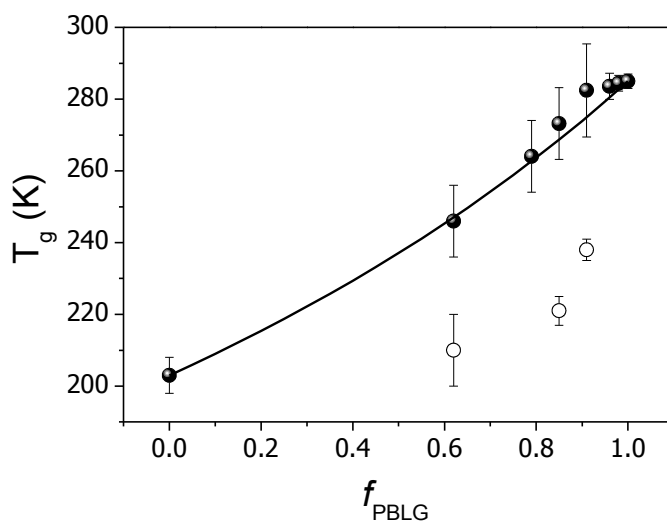
Εικ. 6.13. Τμηματικοί (α -) μηχανισμοί χαλάρωσης του PBLG (κύκλοι) και του PEG (τετράγωνα) και ο «αργός» μηχανισμός του PBLG (τρίγωνα) για το τρισυσταδικό συμπολυμερές PBLG₁₀₅-PEG₉₀-PBLG₁₀₅ ($f_{\text{PBLG}}=0.91$). Τα ανοιχτά και κλειστά σύμβολα αντιστοιχούν σε δεδομένα μετρημένα με θέρμανση και ψύξη, ενώ τα σύμβολα με x και οι διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στα ομοπολυμερή. Οι καμπύλες προέρχονται από προσαρμογή με την εξίσωση VFT (2.6).

Οι εντάσεις των τμηματικών μηχανισμών είναι σχεδόν ίσες με των αντίστοιχων ομοπολυμερών, λαμβάνοντας υπόψη και το κλάσμα όγκου. Η εικ. 6.14 συγκρίνει τις «κανονικοποιημένες» εντάσεις του α -μηχανισμού του PBLG στο ομοπολυπεπτίδιο και τα συμπολυμερή. Για το PEG η αντίστοιχη ένταση είναι $\Delta\varepsilon/f_{\text{PEG}} \sim 0.6$.



Εικ. 6.14. Σύγκριση των εντάσεων του α-μηχανισμού του PBLG (ανηγμένων σε κλάσμα όγκου 1) για τα δείγματα: (τετράγωνα) $PBLG_{16}-PEG_{138}-PBLG_{16}$, (κύκλοι) $PBLG_9-PEG_{21}-PBLG_9$, (πάνω τρίγωνα) $PBLG_{58}-PEG_{90}-PBLG_{58}$, (κάτω τρίγωνα) $PBLG_{105}-PEG_{90}-PBLG_{105}$ και (ρόμβοι) $PBLG_{45}$. Η ένταση παραμένει αρκετά σταθερή, δείχνοντας ότι οι α-έλικες δεν επηρεάζονται σημαντικά ακόμα και κατά την ανάμιξη συστάδων.

Από τους χρόνους των τμηματικών μηχανισμών υπολογίστηκαν τα αντίστοιχα σημεία υάλου, σε $\tau = 100$ s, τα οποία έχουν παρασταθεί γραφικά στην εικ. 6.15, συναρτήσει του κλάσματος όγκου του πεπτιδίου για τα ομοπολυμερή και πέντε τρισυσταδικά συμπολυμερή. Το T_g του PBLG ακολουθεί την εξίσωση Fox-Flory (4.5), ενώ το T_g του PEG δεν επηρεάζεται τόσο έντονα από την παρουσία της άλλης συστάδας, όπως συμβαίνει συνήθως στα μίγματα για το συστατικό με το μικρότερο σημείο υάλου. Ενδιαφέρουσα είναι η περίπτωση του συμπολυμερούς $PBLG_{17}-PEG_{90}-PBLG_{17}$ ($f_{PBLG}=0.62$), που έχει μεγάλη διαφορά στο T_g του PBLG σε σχέση με το ομοπολυπεπτίδιο, παρόλο που παρατηρείται φασικός διαχωρισμός. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με βάση το ποιοτικό διάγραμμα φάσεων της εικ. 6.10, όπου το συγκεκριμένο σύστημα βρίσκεται στο όριο του ασθενούς διαχωρισμού φάσεων (*weak segregation limit*).



Εικ. 6.15. Σημείο υάλου της συστάδας PBLG (κλειστά σημεία) και της συστάδας PEG (ανοιχτά σημεία) στα τρισυσταδικά συμπολυμερή, συναρτήσει του κλάσματος όγκου του πεπτιδίου. Η καμπύλη προέρχεται από την εξίσωση Fox-Flory (4.5) για το T_g μιγμάτων. Το PBLG επηρεάζεται έντονα από την παρουσία του PEG, ενώ το PEG λιγότερο, όπως συμβαίνει συνήθως στα μίγματα, στο συστατικό με το χαμηλότερο T_g [31,32].

Εκτός από το σημείο υάλου, η ανάμιξη έχει επίδραση και στον «αργό» μηχανισμό του PBLG, δείχνοντας μεταβολή στο μήκος εμμονής των α -ελίκων. Τα αποτελέσματα αυτά θα παρουσιαστούν στο τέλος του κεφαλαίου, μαζί με τα υπόλοιπα συστήματα.

Συμπερασματικά, οι πολλαπλές μοριακές αλληλεπιδράσεις στα τρισυσταδικά συμπολυμερή PBLG-PEG-PBLG προκαλούν ιεραρχικές δομές οργάνωσης και δομικές και δυναμικές αλλαγές στα δύο είδη συστάδων.

1. Οι ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του PBLG και του PEG προκαλούν νανοφασικό διαχωρισμό για κλάσμα όγκου του πεπτιδίου f_{PBLG} μικρότερο από 0.65 και σχηματισμό ομογενούς φάσης για $f_{\text{PBLG}} > 0.75$. Όταν παρατηρείται νανοφασικός διαχωρισμός, στο σύστημα συνυπάρχουν οι δύο δευτεροταγείς δομές του πεπτιδίου (α -έλικες, β -φύλλα) με τους κρυστάλλους του PEG (για την κρυστάλλωση απαιτείται σημαντική υπόψυξη).

2. Η ανάμιξη ($f_{\text{PBLG}} > 0.75$) οδηγεί στην αποσταθεροποίηση των β -φύλλων, πιθανώς λόγω δεσμών υδρογόνου του πεπτιδίου με το PEG, το οποίο επίσης δεν μπορεί να κρυσταλλωθεί. Η ανάμιξη των συστάδων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο/καταστροφή της β -φυλλοειδούς δομής, με πιθανές επιπτώσεις σε ασθένειες που σχετίζονται με την ύπαρξή της (*prion* – Κεφ. 1).
3. Η μεταβολή της α -έλικας από 7/2 στη συνηθισμένη 18/5 α -έλικα στους ~ 360 K είναι αντιστρεπτή, σε αντίθεση με το ομοπολυπεπτίδιο PBLG.

6.3 Αυτο-οργάνωση τρισυσταδικών συμπολυμερών πολυ(γ -βενζυλο-L-γλουταμινικού οξέος)-*b*-πολυ(διμεθυλο-σιλοξανίου)-*b*-πολυ(γ -βενζυλο-L-γλουταμινικού οξέος) (PBLG-*b*-PDMS-*b*-PBLG)

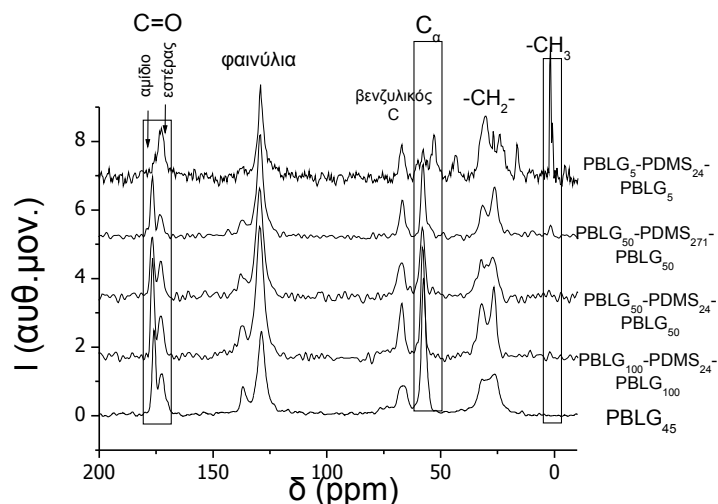
Παρότι η σύνθεση όμοιων τρισυσταδικών πολυμερών έχει αναφερθεί στο παρελθόν, δεν έγινε καμία μελέτη της δομής ή της δυναμικής τους [36,37]. Το σύστημα αυτό συνδυάζει το PBLG με το PDMS, που είναι υδρόφοβο, σε αντίθεση με το PEG, και έχει ένα από τα χαμηλότερα σημεία υάλου που παρατηρούνται σε πολυμερή ($T_g \sim 150$ K) [37]. Η μεγάλη διαφορά στην ευκαμψία των δύο συστάδων αναμένεται να οδηγήσει σε ασυμβατότητα και έκταση των αλυσίδων. Για τη μελέτη της δομής χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές $^{13}\text{C-NMR}$, POM, WAXS, SAXS, TEM/STEM και $\Delta\Phi$, ενώ για τη δυναμική η $\Delta\Phi$.

Η POM στα συμπολυμερή έδειξε τη συνήθη εικόνα, λόγω της διπλοθλαστικότητας του PBLG, δηλαδή του σχηματισμού νηματικής παρακρυσταλλικής φάσης (εικ. 6.16). Πιο πολλές λεπτομέρειες αποκαλύπτει το $^{13}\text{C-NMR}$ στερεάς κατάστασης (εικ. 6.17), που χρησιμοποιήθηκε και για την εύρεση της δευτεροταγούς δομής, αλλά και για μία ποιοτική εκτίμηση της φασικής κατάστασης του συστήματος. Στο συμπολυμερές PBLG₅-PDMS₂₄-PBLG₅, οι κορυφές του C _{α} και του C=O δείχνουν ότι το πεπτίδιο σχηματίζει β -φύλλα, ενώ τα υπόλοιπα, με $\langle x \rangle = 50$ ή 100, σχηματίζουν αποκλειστικά α -έλικες. Το ενδιαφέρον στο σύστημα PBLG₅-PDMS₂₄-PBLG₅ είναι ότι η κορυφή σε $\delta \sim 0$ ppm, που αντιστοιχεί στα μεθύλια του PDMS, είναι διπλή και πολύ έντονη, σε αντίθεση με το ομοπολυμερές PDMS και τα υπόλοιπα συμπολυμερή, όπου είναι πολύ ασθενής. Η μικρή της ένταση οφείλεται στη μειωμένη μεταφορά μαγνήτισης μεταξύ των πυρήνων ^1H και ^{13}C , λόγω της μεγάλης ευκινησίας της συστάδας (σε σχέση με την κλίμακα συχνοτήτων > 100 kHz του πειράματος). Αντίθετα, στο PBLG₅-PDMS₂₄-PBLG₅ η δυναμική έχει γίνει πιο αργή. Επιπλέον, η διπλή κορυφή δείχνει ότι υπάρχουν δύο διαφορετικά περιβάλλοντα για τα μεθύλια του PDMS, υποδηλώνοντας ότι μεγάλο μέρος τους γειτνιάζουν με μονομερή του PBLG, αντί για PDMS.

Επομένως το NMR δείχνει ότι σε αυτό το συμπολυμερές υπάρχει ανάμιξη, ενώ στα τρία υπόλοιπα νανοφασικός διαχωρισμός.



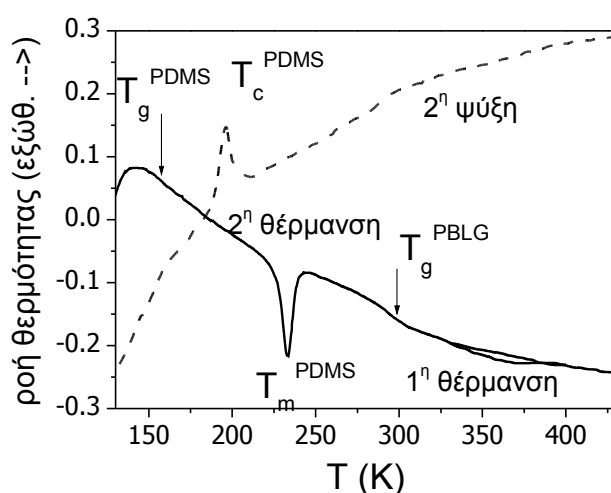
Εικ. 6.16. Εικόνα πολωτικού μικροσκοπίου στους 423 K από το τρισυσταδικό συμπολυμερές $PBLG_{50}$ - $PDMS_{24}$ - $PBLG_{50}$ ($f_{PBLG}=0.93$). Η δομή που παρατηρείται είναι η νηματική παρακρυσταλλική, όπως και στο ομοπολυπεπίδιο (εικ. 4.1).



Εικ. 6.17. Φάσματα ^{13}C -NMR ενός ομοπολυμερούς $PBLG$ και τεσσάρων τρισυσταδικών συμπολυμερών (από κάτω προς τα πάνω): $PBLG_{45}$, $PBLG_5$ - b - $PDMS_{24}$ - b - $PBLG_5$ ($f_{PBLG}=0.49$), $PBLG_{50}$ - b - $PDMS_{271}$ - b - $PBLG_{50}$ ($f_{PBLG}=0.57$), $PBLG_{50}$ - b - $PDMS_{24}$ - b - $PBLG_{50}$ ($f_{PBLG}=0.93$), $PBLG_{100}$ - b - $PDMS_{24}$ - b - $PBLG_{100}$ ($f_{PBLG}=0.96$). Στο τελευταίο, το $PBLG$ βρίσκεται στη β -φυλλοειδή δομή, ενώ στα υπόλοιπα σχηματίζει μόνο α -έλικες, όπως φαίνεται από τις κορυφές του C_α και του $C=O$. Η κορυφή σε $\delta=0$ ppm αντιστοιχεί στα μεθύλια του $PDMS$. Στο $PBLG_5$ - b - $PDMS_{24}$ - b - $PBLG_5$ είναι διπλή και έντονη, σε αντίθεση με το καθαρό $PDMS$ (δεν δείχνεται), υποδηλώνοντας πιο αργή τμηματική κίνηση του $PDMS$ και, επομένως, ανάμιξη με τις συστάδες $PBLG$. Στα άλλα δείγματα η κορυφή είναι ασθενής, όπως στο ομοπολυμερές $PDMS$, λόγω μεγάλης ευκινησίας της συστάδας, δείχνοντας την ύπαρξη διαχωρισμού φάσεων.

Η $\Delta\Theta$ μπορεί επίσης να δώσει έμμεσες ενδείξεις για τη φασική κατάσταση. Οι καμπύλες ροής θερμότητας (εικ. 6.18) δείχνουν κρυστάλλωση των συστάδων του $PDMS$ στα συμπολυμερή.

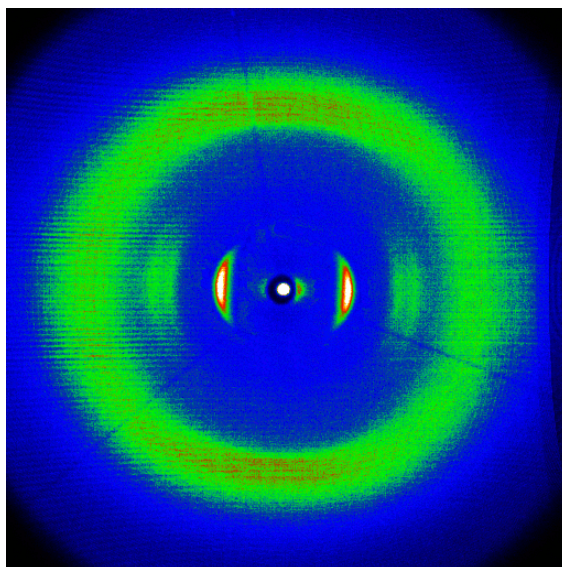
Η ενθαλπία τήξης είναι $\Delta H_f=22$ J/g, κάπως μικρότερη από την τιμή 27 J/g του ομοπολυμερούς [38]. Στους ~ 150 K παρατηρείται το σημείο υάλου της άμορφης φάσης του PDMS, πολύ κοντά στην αντίστοιχη τιμή του ομοπολυμερούς. Στη ΔΘΣ παρατηρείται επίσης η «μετάβαση» υάλου του PBLG σε $T \sim 290$ K, πρακτικά ίση με το καθαρό πεπτίδιο, και η μη αντιστρεπτή μεταβολή της ελίκας από 7/2 σε 18/5 στους ~ 360 K. Η μετάβαση υάλου θα παρουσιαστεί αναλυτικά πιο κάτω, μαζί με τα αποτελέσματα της ΔΦ. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα του NMR και της ΔΘΣ αποτελούν ενδείξεις ισχυρού φασικού διαχωρισμού στα συμπολυμερή με εξαίρεση το PBLG₅-PDMS₂₄-PBLG₅ που περιέχει το μικρότερο πεπτίδιο.



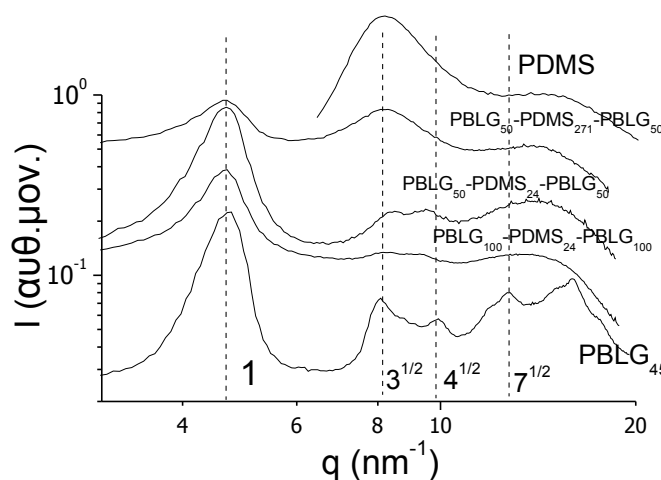
Εικ. 6.18. Καμπύλες ροής θερμότητας από ΔΘΣ για το τρισταδικό συμπολυμερές PBLG₅₀-PDMS₂₇₁-PBLG₅₀ ($f_{PBLG}=0.57$). Κατά την ψύξη το PDMS κρυσταλλώνεται ($T_c \sim 196$ K) ($\Delta H=22$ J/g) και τήκεται κατά τη θέρμανση σε $T_m=233$ K. Η ενθαλπία τήξης του PDMS στο συμπολυμερές υπολογίζεται σε $\Delta H_f=22$ J/g, κάπως μικρότερη από το ομοπολυμερές (27 J/g [38]), δείχνοντας ότι η κρυστάλλωση ενός μέρους των αλυσίδων εμποδίζεται από την παρουσία του PBLG. Στους ~ 150 K και ~ 290 K διακρίνονται οι «μεταβάσεις» υάλου του PDMS και του PBLG, αντίστοιχα, που βρίσκονται σχεδόν ακριβώς στην ίδια θερμοκρασία με τα αντίστοιχα ομοπολυμερή, υποδεικνύοντας ότι υπάρχει ισχυρός φασικός διαχωρισμός. Στους ~ 360 K εμφανίζεται στην πρώτη θέρμανση η μη αντιστρεπτή μεταβολή των ελίκων του PBLG από 7/2 σε 18/5, όπως στο ομοπολυπεπτίδιο.

Η σκέδαση ακτίνων X σε δύο διαστάσεις χρησιμοποιήθηκε, επίσης, για την εύρεση της δευτεροταγούς δομής των πεπτιδίων. Η προσανατολισμένη ίνα από το συμπολυμερές PBLG₅₀-PDMS₂₄-PBLG₅₀ (εικ. 6.19), όπως και τα άλλα με $\langle x \rangle=50$ και $\langle x \rangle=100$, δείχνει ισημερινές ανακλάσεις ανάλογες με του ομοπολυπεπτιδίου PBLG (εικ. 4.5β), αν και είναι σημαντικά φαρδύτερες, δείχνοντας μικρότερο μήκος συνοχής ($\xi \sim 10$ nm). Η σχετική θέση τους, παρόλα αυτά,

είναι $1:3^{1/2}:4^{1/2}$, και αντιστοιχεί σε εξαγωνικό πλέγμα των α -ελίκων, όπως στο ομοπολυμερές. Στην εικ. 6.20 συγκρίνονται οι εντάσεις κατά μήκος του ισημερινού για τα τρία συμπολυμερή, όπου το PBLG σχηματίζει α -έλικες με βάση το ^{13}C -NMR, και των αντίστοιχων ομοπολυμερών. Το PDMS είναι τήγμα για $T > 233\text{ K}$ και εμφανίζει μόνο δύο φαρδιές κορυφές, σε $q \sim 8\text{ nm}^{-1}$, η οποία είναι γνωστή ως χαμηλή κορυφή van der Waals (LVDW), και σε $q \sim 15\text{ nm}^{-1}$, γνωστή ως κορυφή van der Waals (VDW) [39]. Η θέση της πρώτης κορυφής συμπίπτει με τις ανακλάσεις ανώτερης τάξης από το εξαγωνικό πλέγμα των α -ελίκων του PBLG και ξεχωρίζει περισσότερο στο συμπολυμερές με το υψηλότερο κλάσμα όγκου PDMS (PBLG₅₀-PDMS₂₇₁-PBLG₅₀, $f_{\text{PBLG}}=0.57$). Στο συμπολυμερές με το μικρότερο πεπτίδιο (PBLG₅-PDMS₂₄-PBLG₅) το φάσμα WAXS (δεν δείχνεται) αποτελείται από τις δύο κορυφές του PDMS με μια ασθενή κορυφή σε $q \sim 3.5\text{ nm}^{-1}$, που προέρχεται από τα β -φύλλα του PBLG.

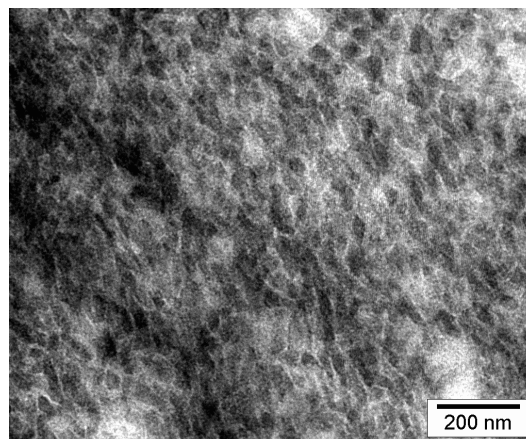
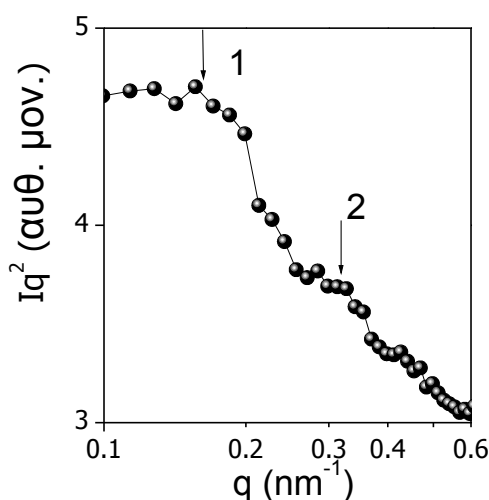


Εικ. 6.19. Εικόνα σκέδασης ακτίνων X σε δύο διαστάσεις από μια ίνα του PBLG₅₀-PDMS₂₄-PBLG₅₀ ($f_{\text{PBLG}}=0.93$) ($T_{\text{meas}}=413\text{ K}$, $T_{\text{extr}}=373\text{ K}$, $T_{\text{ann}}=413\text{ K}$). Οι ισημερινές κορυφές αντιστοιχούν στο εξαγωνικό πλέγμα των α -ελίκων, ενώ το PDMS συνεισφέρει στην άμορφη άλω.



Εικ. 6.20. Σκεδαζόμενη ένταση κατά μήκος του ισημερινού από τις μετρήσεις σε δύο διαστάσεις για τα ομοπολυμερή PBLG και PDMS και τα τρία συμπολυμερή όπου το PBLG σχηματίζει α-έλικες. Από πάνω προς τα κάτω: (α) PDMS, (β) PBLG₅₀-PDMS₂₇₁-PBLG₅₀ ($f_{\text{PBLG}}=0.57$, $T_{\text{meas}}=353$ K, $T_{\text{extr}}=353$ K, χωρίς ανόπτηση) (γ) PBLG₅₀-PDMS₂₄-PBLG₅₀ ($f_{\text{PBLG}}=0.93$, $T_{\text{meas}}=413$ K, $T_{\text{extr}}=373$ K, $T_{\text{ann}}=413$ K) (δ) PBLG₁₀₀-PDMS₂₄-PBLG₅₀ ($f_{\text{PBLG}}=0.96$, $T_{\text{meas}}=413$ K, $T_{\text{extr}}=353$ K) (ε) PBLG₄₂ ($T_{\text{meas}}=393$ K, $T_{\text{extr}}=353$ K, $T_{\text{ann}}=393$ K). Από το εύρος των κορυφών υπολογίζεται το πλευρικό μήκος συνοχής των ελίκων $\zeta \sim 10$ nm.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχει ανάμιξη των συστάδων στο συμπολυμερές PBLG₅-PDMS₂₄-PBLG₅ ($f_{\text{PBLG}}=0.49$) σε καλή συμφωνία με τα αποτελέσματα των NMR και ΔΘΣ και διαχωρισμός στα τρία υπόλοιπα. Για την εύρεση της μορφολογίας των νανοδομών χρησιμοποιήθηκε SAXS και TEM. Η εικ. 6.21α δείχνει την σκέδαση σε μικρές γωνίες από το συμπολυμερές PBLG₅₀-PDMS₂₄-PBLG₅₀ ($f_{\text{PBLG}}=0.93$) στους 363 K. Εμφανίζει ασθενείς και φαρδιές κορυφές με αναλογία των θέσεων 1:2 που υποδηλώνουν φυλλοειδή (*lamellar*) μορφολογία με χαρακτηριστική απόσταση $d \sim 40$ nm. Η εικόνα STEM (εικ. 6.21β) από το ίδιο συμπολυμερές υποδηλώνει επίσης φυλλοειδή μορφολογία, παρόλο δεν υπάρχει τάξη σε μεγάλη κλίμακα μήκους. Η μέση απόσταση στην τελευταία περίπτωση είναι ~ 30 nm. Επομένως, η συνολική μορφολογία μπορεί να περιγραφεί ως κύλινδροι σε φύλλα, δηλαδή έλικες του PBLG σε φυλλοειδή νανοδομή. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο σχηματισμός φυλλοειδούς νανοδομής συμβαίνει παρά την υψηλή ασυμμετρία της αρχιτεκτονικής των τρισυσταδικών συμπολυμερών, κάτι που δεν έχει παρατηρηθεί σε συστήματα, όπου οι συστάδες έχουν τυχαία διαμόρφωση. Αν και, όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο τμήμα, θεωρητικές προβλέψεις για το διάγραμμα φάσεων συμπολυμερών με πεπτίδια δεν υπάρχουν, η συμπεριφορά του PBLG, ως περίπου άκαμπτης ράβδου, ευθύνεται για την ύπαρξη μεγάλης περιοχής στο διάγραμμα φάσεων, όπου οι νανοδομές έχουν επίπεδες διαχωριστικές επιφάνειες.



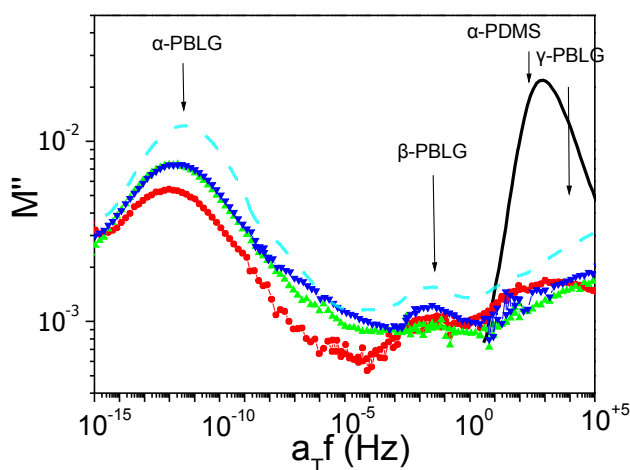
α

β

Εικ. 6.21. (α) Φάσμα SAXS από το συμπολυμερές PBLG₅₀-PDMS₂₄-PBLG₅₀ ($f_{\text{PBLG}}=0.93$) στους 363 K. Τα βέλη με σχετικές θέσεις 1:2 σε σχέση με την κορυφή σε $q^* \sim 0.16 \text{ nm}^{-1}$ δείχνουν ανακλάσεις που υποδηλώνουν φυλλοειδή μορφολογία. Η ένταση τους είναι χαμηλή, λόγω μικρής αντίθεσης, αλλά, παρόλα αυτά, επιτρέπουν τον υπολογισμό της χαρακτηριστικής απόστασης $d=2\pi/q^* \approx 40 \text{ nm}$. (β) Εικόνα STEM από το ίδιο τριστατικό συμπολυμερές. Οι σκούρες περιοχές πρέπει να αντιστοιχούν στη φάση του PDMS, λόγω του Si. Το μέσο μέγεθός τους είναι $\sim 30 \text{ nm}$, ενώ οι πιο φωτεινές περιοχές έχουν πάχος περίπου 7 nm.

Η ΔΦ είναι πολύ ευαίσθητη στις αλλαγές του τοπικού περιβάλλοντος και χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο της ανάμιξης φάσεων. Επιπλέον, επιτρέπει την εύρεση της θερμοκρασίας υάλου και για τα δύο είδη συστάδων με πολύ μεγαλύτερη ακρίβεια από τη ΔΘΣ. Το ομοπολυπεπίδιο PBLG έχει πέντε διηλεκτρικά ενεργούς μηχανισμούς χαλάρωσης, που εξετάστηκαν στο Κεφ. 4, ενώ το PDMS εμφανίζει μόνο τον τμηματικό μηχανισμό, ο οποίος γίνεται πιο αργός και ασθενής κατά την κρυστάλλωση [40]. Με βάση τα αποτελέσματα των στατικών μεθόδων που παρουσιάστηκαν πιο πάνω, σχετικά με το διαχωρισμό φάσεων, αναμένουμε οι τμηματικοί μηχανισμοί στα συμπολυμερή να συμπίπτουν ακριβώς με τα αντίστοιχα ομοπολυμερή, εκτός του PBLG₅-PDMS₂₄-PBLG₅. Στην εικ. 6.22 το φανταστικό μέρος του ηλεκτρικού μέτρου (M'') έχει παρασταθεί γραφικά συναρτήσει της θερμοκρασίας για τα τρία συμπολυμερή με βαθμό πολυμερισμού του PBLG $\langle x \rangle = 50$ και $\langle x \rangle = 100$ και τα ομοπολυμερή PBLG και PDMS. Οι καμπύλες προέρχονται από υπέρθεση με οριζόντια μετατόπιση δεδομένων από διαφορετικές θερμοκρασίες, ως προς την καμπύλη αναφοράς σε $T_{\text{ref}}=153 \text{ K}$, ώστε να καλυφθεί η μεγάλη διαφορά στην κλίμακα συχνοτήτων, όπου εμφανίζονται οι δύο τμηματικοί μηχανισμοί. Η υπέρθεση είναι προσεγγιστική, γιατί οι μηχανισμοί που παρατηρούνται έχουν διαφορετική εξάρτηση από τη θερμοκρασία. Παρόλα αυτά μπορεί να γίνει σύγκριση μεταξύ τους, αλλά για την εξαγωγή των χρόνων χαλάρωσης, που θα παρουσιαστούν πιο κάτω, έγινε προσαρμογή με τη συνάρτηση Havriliak-Negami (3.28), για κάθε μηχανισμό

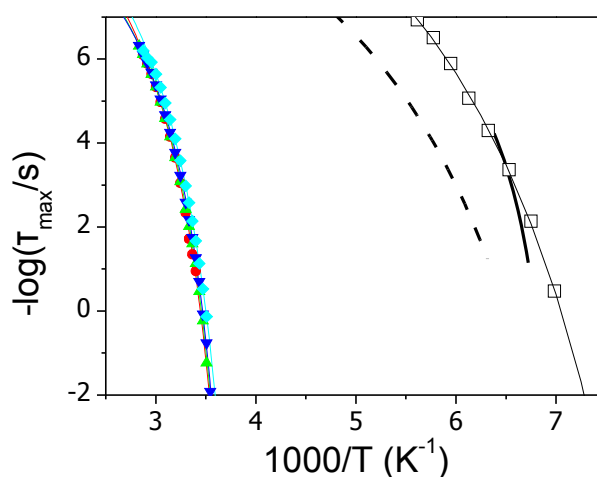
ξεχωριστά. Στην εικ. 6.22 παρατηρείται ο τμηματικός (α -) μηχανισμός του PBLG σε όλα τα συμπολυμερή, όπου, παρά τη χαμηλότερη ένταση, είναι φανερό ότι ο χρόνος χαλάρωσης δεν διαφέρει από το καθαρό πεπτίδιο. Η τμηματική κίνηση (α -μηχανισμός) στις συστάδες PDMS του συμπολυμερούς PBLG₅₀-PDMS₂₇₁-PBLG₅₀ με το μεγαλύτερο ποσοστό PDMS ($f_{\text{PBLG}}=0.57$) χαλαρώνει με τον ίδιο ρυθμό με το ομοπολυμερές, ενώ η ελαττωμένη ένταση οφείλεται στην κρυστάλλωση του μεγαλύτερου τμήματος του PDMS στους 153 K, όπου έγινε η μέτρηση, σύμφωνα με τη ΔΘΣ. Στα συμπολυμερή με υψηλότερο ποσοστό PBLG ο μηχανισμός αυτός (α -PDMS) επικαλύπτεται με τον γ -μηχανισμό του τελευταίου, γι' αυτό και δεν μπορεί να προσδιοριστεί η θέση του με ακρίβεια. Σε κάθε περίπτωση, η σύμπτωση της θέσης του α -μηχανισμού του PBLG σε όλα τα συμπολυμερή με το καθαρό πεπτίδιο και του PDMS στο PBLG₅₀-PDMS₂₇₁-PBLG₅₀ με το αντίστοιχο ομοπολυμερές είναι σαφής ένδειξη ισχυρού νανοφασικού διαχωρισμού, σε συμφωνία με τις ακτίνες X, το ¹³C-NMR και το STEM.



Εικ. 6.22. Υπέρθεση του φανταστικού μέρους του ηλεκτρικού μέτρου (M'') για τα ομοπολυμερή PDMS (συνεχής γραμμή) και PBLG (διακεκομμένη γραμμή) και τρία συμπολυμερή: (κύκλοι) PBLG₅₀-PDMS₂₇₁-PBLG₅₀, (πάνω τρίγωνα) PBLG₅₀-PDMS₂₄-PBLG₅₀, (κάτω τρίγωνα) PBLG₁₀₀-PDMS₂₄-PBLG₁₀₀. Η θερμοκρασία αναφοράς είναι $T_{\text{ref}}=153$ K. Το συμπολυμερές με το υψηλότερο ποσοστό PDMS (PBLG₅₀-PDMS₂₇₁-PBLG₅₀, $f_{\text{PBLG}}=0.57$) δείχνει μέγιστα που αντιστοιχούν ακριβώς στα αντίστοιχα ομοπολυμερή. Τα άλλα δύο εμφανίζουν όλους τους μηχανισμούς της συστάδας PBLG, αλλά η υψηλή ένταση του γ -μηχανισμού καλύπτει τον τμηματικό μηχανισμό του PDMS. Παρόλα αυτά, είναι φανερό ότι η θέση και των δύο τμηματικών μηχανισμών είναι σχεδόν η ίδια με τα αντίστοιχα ομοπολυμερή.

Οι χρόνοι χαλάρωσης των δύο τμηματικών μηχανισμών που αντιστοιχούν στο μέγιστο του M'' έχουν παρασταθεί γραφικά στην εικ. 6.23 στη συνήθη αναπαράσταση Arrhenius ($-\log t$ ως προς T^{-1}). Περιλαμβάνονται και οι χρόνοι του α -μηχανισμού του άμορφου και του ημικρυσταλλικού PDMS. Όλοι οι χρόνοι υπακούν στην εξίσωση VFT (2.6). Οι παράμετροι της εξίσωσης για τον α -

μηχανισμό του PBLG στα συμπολυμερή είναι $\tau_0 \sim 4.0 \times 10^{-12}$ s, $D_T = 5.4$, και $T_0 = 241$ K, ενώ για τον α -μηχανισμό του PDMS στο συμπολυμερές PBLG₅₀-PDMS₂₇₁-b-PBLG₅₀ είναι $\tau_0 \sim 1.6 \times 10^{-14}$ s, $D_T = 10.6$, και $T_0 = 106.2$ K. Και εδώ οι παράμετροι είναι πολύ κοντά στις αντίστοιχες των ομοπολυμερών (στο PBLG τα τ_0 , D_T , T_0 λαμβάνουν τιμές 2.5×10^{-12} s, 5.8, 235 K, αντίστοιχα, ενώ στο PDMS 1.6×10^{-14} s, 5.9 και 123 K, αντίστοιχα), δείχνοντας νανοφασικά διαχωρισμένες δομές.



Εικ. 6.23. Διάγραμμα Arrhenius των χρόνων χαλάρωσης των τμηματικών μηχανισμών στο μέγιστο M'' για τα δείγματα της εικ. 6.22. Οι υπόλοιποι μηχανισμοί έχουν παραληφθεί. (ανοιχτά σύμβολα) τμηματικός (α-) μηχανισμός του PDMS στο συμπολυμερές PBLG₅₀-PDMS₂₇₁-PBLG₅₀, (κλειστά σύμβολα) τμηματικός (α-) μηχανισμός του PBLG στα διάφορα συμπολυμερή, (κύκλοι) PBLG₅₀-PDMS₂₇₁-PBLG₅₀, (πάνω τρίγωνα) PBLG₅₀-PDMS₂₄-PBLG₅₀, (κάτω τρίγωνα) PBLG₁₀₀-PDMS₂₄-PBLG₁₀₀, (ρόμβοι) ομοπολυμερές PBLG₄₅. Η συνεχής και διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχούν στους χρόνους του άμορφου και του ημι-κρυσταλλικού PDMS. Οι τμηματικοί χρόνοι χαλάρωσης στα συμπολυμερή δεν αλλάζουν σχεδόν καθόλου σε σχέση με τα ομοπολυμερή, υποδηλώνοντας ισχυρό διαχωρισμό φάσεων σε συμφωνία με WAXS, SAXS, NMR και ΔΘΣ.

Είναι φανερό ότι στα τρισυσταδικά συμπολυμερή PBLG-b-PDMS-b-PBLG συμβαίνει ισχυρότερος διαχωρισμός φάσεων σε σχέση με τα PBLG-b-PEG-b-PBLG, παρόλο που τα μοριακά βάρη και τα κλάσματα όγκου του πεπτιδίου δεν διαφέρουν πολύ. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με την ικανότητα της μεσαίας συστάδας να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου. Το PEG σχηματίζει ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου, που, όπως αναφέρθηκε, μπορούν να καταστρέψουν τη β -φυλλοειδή δομή. Το PDMS, αν και περιέχει, επίσης, άτομα οξυγόνου στην κύρια αλυσίδα του, δεν φαίνεται να έχει δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, κάτι που αντανακλάται στην ισχυρή υδροφοβικότητά του. Αυτό το γεγονός πιθανώς συμβάλλει στην αύξηση της τιμής της παραμέτρου αλληλεπίδρασης χ , που οδηγεί σε ισχυρότερο νανοφασικό διαχωρισμό.

Οι πιο αργοί μηχανισμοί του PBLG παρατηρούνται και στα συμπολυμερή, όμως, σε σχέση με το ομοπολυπεπτίδιο, έχουν κάποιες διαφορές που αντανακλούν αλλαγή του μήκους εμμοής.

Αυτοί θα εξεταστούν χωριστά σε επόμενο τμήμα, μαζί με τα αντίστοιχα αποτελέσματα από τα υπόλοιπα συμπολυμερή.

Τα κυριότερα συμπεράσματα που προκύπτουν από τη μελέτη της στατικής δομής με ^{13}C -NMR στερεάς κατάστασης, σκέδαση ακτίνων X, ΔΘΣ, και TEM και της δυναμικής των τμηματικών μηχανισμών με ΔΘΣ και ΔΦ στα τρισυσταδικά συμπολυμερή PBLG-PDMS-PBLG είναι:

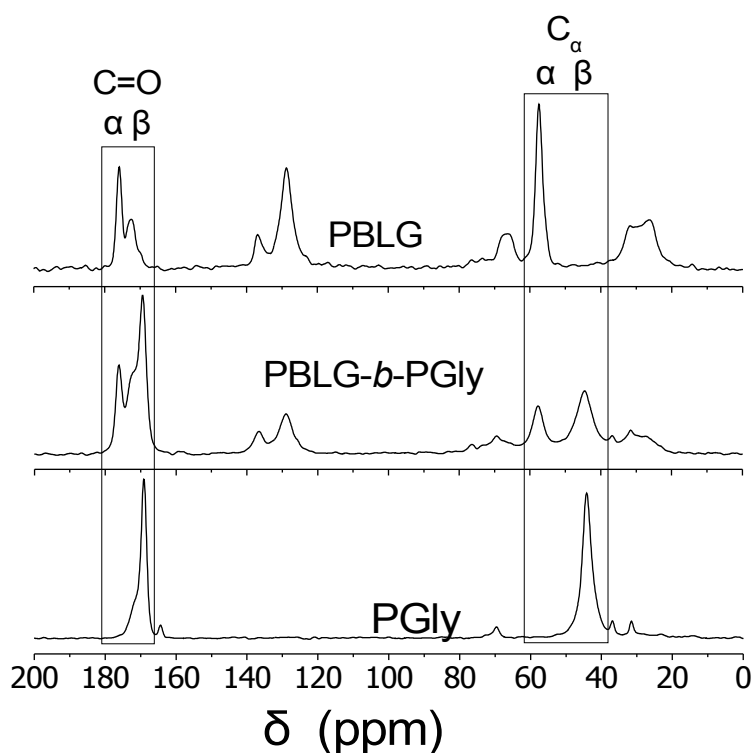
1. Με εξαίρεση το συμπολυμερές με το μικρό πεπτίδιο PBLG₅-PDMS₂₄-PBLG₅ ($f_{\text{PBLG}}=0.49$), σε όλα τα υπόλοιπα παρατηρείται ισχυρός νανοφασικός διαχωρισμός. Η συνολική μορφολογία είναι κύλινδροι σε φύλλα (*cylinder-in-lamellar*) ακόμα και σε πολύ ασύμμετρη αρχιτεκτονική, σε αντίθεση με τα συμπολυμερή PBLG-PEG-PBLG.
2. Ο ισχυρότερος διαχωρισμός σε σχέση με τα συστήματα PBLG-*b*-PEG-*b*-PBLG δείχνει να οφείλεται στη δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου στα τελευταία.
3. Το πλευρικό μήκος συνοχής του εξαγωνικού πλέγματος του PBLG ελαττώνεται σε σχέση με ομοπολυπεπτίδιο, λόγω της συστάδας PDMS.

6.4 Δισυσταδικά συμπολυπεπτίδια πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικού οξέος)-*b*-πολυγλυκίνης (PBLG-*b*-PGly)

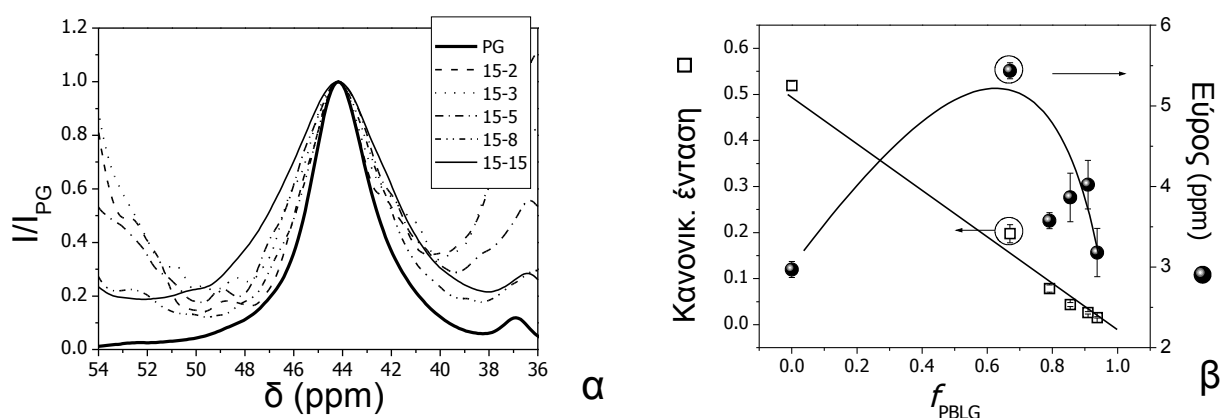
Στις φυσικές πρωτεΐνες συνυπάρχουν στο ίδιο μόριο όλες οι δευτεροταγείς δομές, α -έλικες, β -φύλλα, β -στροφές, έλικες άλλης μορφής ή τελείως άμορφα τμήματα (Κεφ. 1). Η μελέτη μοντέλων συμπολυπεπτιδίων, που συνδυάζουν τις διαφορετικές δευτεροταγείς δομές σε ένα μόριο, είναι ένα πολύ σημαντικό βήμα προς την κατανόηση των ιδιαίτερα πολύπλοκων πρωτεϊνών, που μπορεί να δώσει νέες κατευθύνσεις στη σύνθεση βιομιμητικών συστημάτων. Τα δισυσταδικά συμπολυπεπτίδια πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικό οξύ)-*b*-πολυγλυκίνη (PBLG-*b*-PGly) περιέχουν α -έλικες (συστάδα PBLG) και β -φύλλα (συστάδα PGly) και, επιπλέον, τα δύο είδη μονομερών έχουν μεγάλη διαφορά στο μέγεθος (εικ. 3.2). Οι διαφορές αυτές αναμένεται να οδηγήσουν σε μεγάλη ασυμβατότητα και διαχωρισμό φάσεων, που πιθανώς θα έχει επίδραση και στις δευτεροταγείς δομές. Στη σύνθεση δόθηκε προσοχή να κρατηθεί το μοριακό βάρος της συστάδας PBLG περίπου σταθερό (Πίνακας 3.3). Η δομική μελέτη έγινε με χρήση ^{13}C -NMR στερεάς κατάστασης, SAXS και WAXS, ενώ ΔΘΣ και ΔΦ χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της δυναμικής.

Το ^{13}C -NMR ανιχνεύει τον τύπο της δευτεροταγούς δομής και πιθανές ατέλειές της, μέσω

της κατανομής της διαμόρφωσης της αλυσίδας. Η εικ. 6.24 δείχνει φάσματα ^{13}C -NMR από το συμπολυμερές PBLG₁₅-PGly₁₅ και τα αντίστοιχα ομοπολυμερή. Με βάση την κορυφή που αντιστοιχεί στον C_α, αλλά και τον αμιδικό C=O, το PBLG και η PGly περιέχουν μόνο α-έλικες και β-φύλλα, αντίστοιχα (Κεφ. 4), ενώ το συμπολυμερές περιέχει και τις δύο δομές. Μία πιο προσεκτική ματιά στην κορυφή του C_α στα 44 ppm που αντιστοιχεί στα β-φύλλα αποκαλύπτει ότι έχει αρκετά έντονο υπόβαθρο, αλλά και ασθενέστερες κορυφές στα δεξιά (υψηλό πεδίο) που δείχνουν ότι αρκετά μονομερή βρίσκονται σε διαφορετική διαμόρφωση. Για να γίνει μια ποιοτική σύγκριση μεταξύ των συμπολυμερών και της PGly, στην εικ. 6.25α έχει γίνει υπέρθεση των αντίστοιχων φασμάτων γύρω από την κορυφή των β-φύλλων στα ~ 44 ppm. Παρατηρούμε ότι υπάρχει μια διεύρυνση που εξαρτάται από τη σύσταση, η οποία, όμως, δεν είναι γραμμική, όπως φαίνεται στην εικ. 6.25β. Το μέγιστο εύρος αντιστοιχεί στο συμπολυμερές PBLG₁₅-PGly₁₅. Τα αποτελέσματα ήταν επαναλήσιμα και ανεξάρτητα του θερμικού παρελθόντος των δειγμάτων.

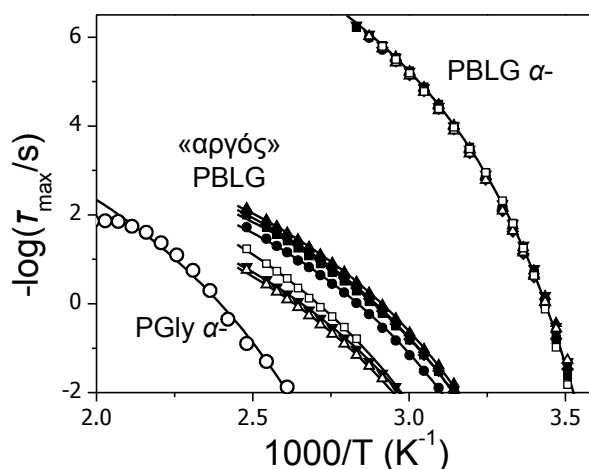


Εικ. 6.24. Φάσματα ^{13}C -NMR στερεάς κατάστασης του συμπολυπεπτιδίου PBLG₁₅-PGly₁₅ και των ομοπολυπεπτιδίων PBLG₄₅ και PGly₃₄₂ για σύγκριση. Το PBLG και η PGly σχηματίζουν α-έλικες και β-φύλλα, αντίστοιχα, ενώ το PBLG₁₅-PGly₁₅ περιέχει και τις δύο αντίστοιχες δευτεροταγείς δομές στις νανοφάσεις του PBLG και της PGly.



Εικ. 6.25. (α) Υπέρθυση φασμάτων ^{13}C -NMR γύρω από τη γραμμή συντονισμού του C_α των β -φύλλων της PGly σε $\delta \sim 44$ ppm. Η γραμμή παρουσιάζει σημαντική διεύρυνση σε όλα τα συμπολυμερή, ιδιαίτερα στο PBLG_{15} -PGly $_{15}$. (β) Κανονικοποιημένη ένταση (αριστερά) και εύρος FWHM (δεξιά) της γραμμής συντονισμού του $^{13}\text{C}_\alpha$ των β -φύλλων της PGly σε $\delta \sim 44$ ppm. Η διεύρυνση στα συμπολυμερή δεν είναι γραμμική συνάρτηση της σύστασης, δείχνοντας ευρεία κατανομή ηλεκτρονιακής πυκνότητας ή και διαμόρφωσης των αλυσίδων PGly.

Η ΔΦ, όπως αναφέρθηκε και στα προηγούμενα τμήματα, μπορεί να διαπιστώσει, με μεγάλη ευαισθησία, την ανάμιξη ή το διαχωρισμό φάσεων, μέσω της αλλαγής των χρόνων χαλάρωσης των τμηματικών (α -) μηχανισμών. Τα δυσσταδικά συμπολυμερή αναμένεται να εμφανίζουν μηχανισμούς και από τις δύο συστάδες. Το διάγραμμα Arrhenius της δυναμικής των συμπολυμερών PBLG-*b*-PGly και των αντίστοιχων ομοπολυμερών παρουσιάζεται στην εικ. 6.26, όπου γίνεται ξεκάθαρο ότι οι χρόνοι του α -μηχανισμού του PBLG δεν επηρεάζονται από την παρουσία της συστάδας PGly. Σε αυτό συμφωνεί και η ΔΘΣ (Πίνακας 6.2), που παρατηρεί ανεξαρτησία του σημείου υάλου του PBLG από τη σύσταση, αν και αυξάνεται κάπως το εύρος της «μετάβασης» υάλου. Από την άλλη μεριά, ο α -μηχανισμός της PGly δεν μπορεί να μελετηθεί, επειδή καλύπτεται από τον ισχυρό «αργό» μηχανισμό του PBLG. Παρόλα αυτά, ο α -μηχανισμός της PGly δεν είναι πιο γρήγορος από τον «αργό» του PBLG και αυτό αρκεί για να συμπεράνουμε ότι υπάρχει νανοφασικός διαχωρισμός στα συμπολυμερή. Πιο πολλές λεπτομέρειες για τη φασική κατάσταση δίνει η σκέδαση ακτίνων X που θα παρουσιαστεί πιο κάτω. Η αλλαγή των χρόνων του «αργού» μηχανισμού δείχνει μεταβολή στο μήκος εμμονής των α -ελίκων και θα εξεταστεί στο τμήμα 6.6, μαζί με τα αποτελέσματα των άλλων συστημάτων. Εδώ μπορούμε να αναφέρουμε ότι οι έλικες εξακολουθούν να είναι σπασμένες, όπως στο ομοπολυπεπτίδιο, αλλά με λιγότερες ατέλειες.



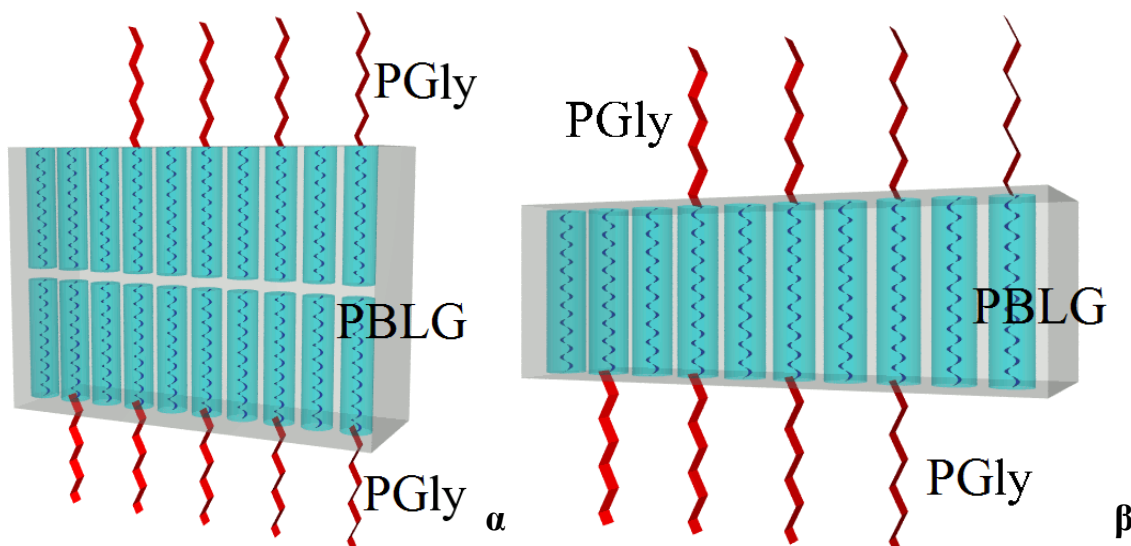
Εικ. 6.26. Χρόνοι χαλάρωσης των συμπολυμερών PBLG-*b*-PGly και των αντίστοιχων ομοπολυμερών: (κλειστά τετράγωνα) PBLG₄₅, (κλειστοί κύκλοι) 15-1, (κλειστά πάνω τρίγωνα) 15-2, (κλειστά κάτω τρίγωνα) 15-3, (κλειστά ρόμβοι) 15-5, (ανοιχτά πάνω τρίγωνα) 15-8, (ανοιχτά κάτω τρίγωνα) 15-15, (ανοιχτοί κύκλοι) PGly. Έχουν παραληφθεί οι μηχανισμοί κάτω από το σημείο υάλου, επειδή δεν δίνουν χρήσιμες πληροφορίες για τη φασική κατάσταση. Τα σημεία είναι τα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι καμπύλες είναι προσαρμογή με την εξίσωση VFT (4.2). Οι μηχανισμοί χαλάρωσης του PBLG είναι ορατοί σε όλα τα συμπολυμερή. Να σημειωθεί ότι ο α-μηχανισμός δεν επηρεάζεται από τη σύσταση (σε όλα τα δεδομένα μπορεί να γίνει προσαρμογή με $\tau_{max} = 5.0 \times 10^{-12}$ s, $D = 5.3$, $T_0 = 241.8$ K), υποδεινώνοντας ισχυρό νανοφασικό διαχωρισμό. Η έντονη αλλαγή του «αργού» μηχανισμού με το κλάσμα όγκου δείχνει σημαντική μεταβολή στο μήκος εμμονής των α-ελίκων.

Πίνακας 6.2. Χαρακτηριστικά της μετάβασης υάλου στα συμπολυπεπτιδία και το ομοπολυπεπτιδίο PBLG από τις μετρήσεις ΔΘΣ.

Δείγμα	T_g (K)	ΔT_g (K)	Δc_p (J K ⁻¹ g ⁻¹)
PBLG- <i>b</i> -PGly 15-1	294	20 ± 2	0.37
PBLG- <i>b</i> -PGly 15-2	294	23 ± 2	0.35
PBLG- <i>b</i> -PGly 15-3	294	25 ± 3	0.30
PBLG- <i>b</i> -PGly 15-5	294	23 ± 3	0.30
PBLG- <i>b</i> -PGly 15-8	294	25 ± 3	0.31
PBLG- <i>b</i> -PGly 15-15	292	28 ± 5	0.30
PBLG ₄₅	294	22 ± 2	0.38

Με βάση το διαχωρισμό φάσεων που βρέθηκε από τη ΔΦ μπορούν να σχεδιαστούν «εξιδανικευμένες» μορφολογίες για τις έλικες του PBLG. Δύο από τις πιθανές περιπτώσεις παρουσιάζονται στην εικ. 6.27, όπου οι έλικες στοιβάζονται ή συμπλέκονται. Στη δεύτερη περίπτωση το πάχος της νανοφάσης του PBLG είναι το μισό από την πρώτη. Μία εκτίμηση της τοποθέτησης των ελίκων μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας απλά επιχειρήματα σχετικά με τη

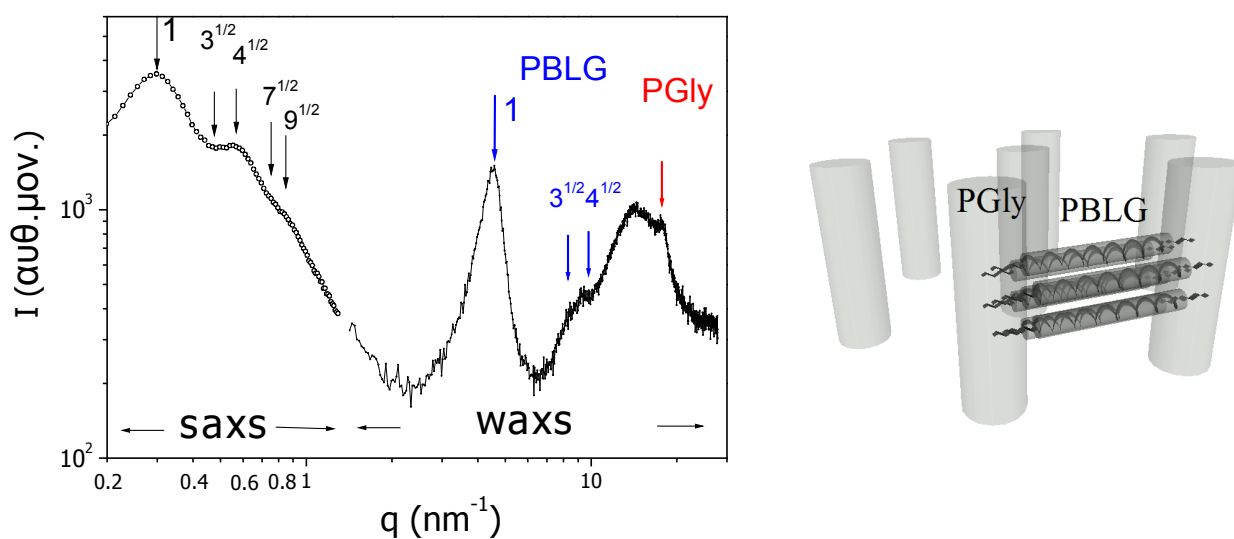
γεωμετρία του συστήματος. Ο γεωμετρικός παράγοντας $\gamma (=8M_n/(\pi N_A \rho d_h^2 d))$, που προκύπτει από τη διαίρεση του όγκου $V (=M_n/\rho N_A)$ μιας αλυσίδας με την διατομή της α -έλικας ($\pi d_h^2/4$, όπου d_h το διάστημα μεταξύ ελίκων) και τη μέση έκταση της αλυσίδας ($d/2$, όπου d το διάστημα μεταξύ φυλλοειδών νανοφάσεων), παίρνει τιμές 1 και 2 στην περίπτωση στοιβαγμένων ή συμπλεγμένων (ή με μία αναδίπλωση) ελίκων, αντίστοιχα.



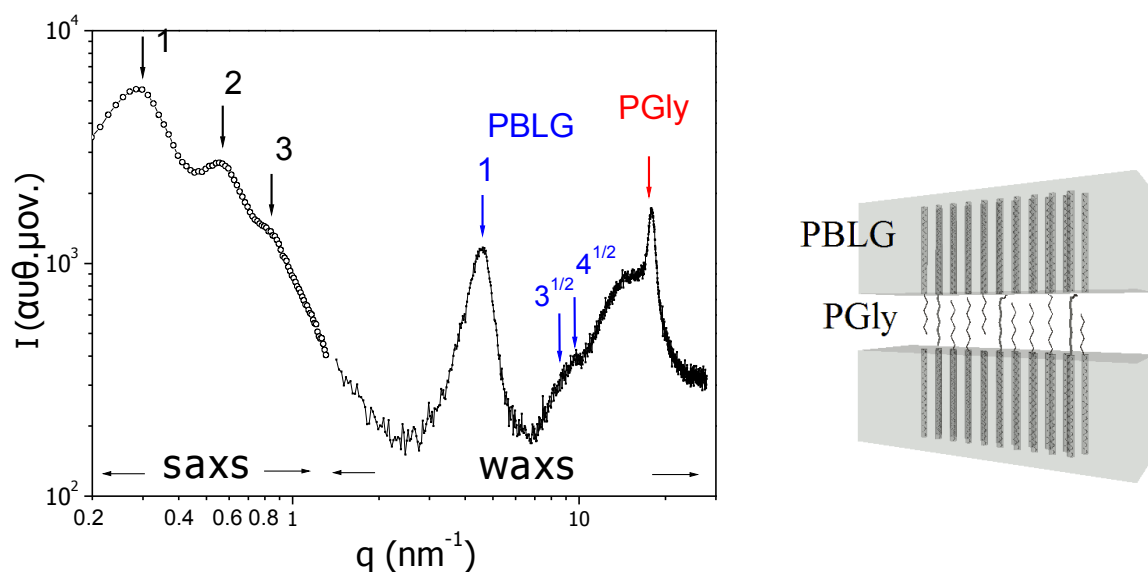
Εικ. 6.27. Εξιδανικευμένες φυλλοειδείς νανοφάσεις των συμπολυμερών PBLG-*b*-PGly με τις αντίστοιχες δευτεροταγείς δομές. (α) στοιβαγή και (β) συμπλοκή των α -ελίκων του PBLG. Η PGly δείχνεται σε διαμόρφωση εκτεταμένων β -φύλλων, χωρίς αναδιπλώσεις. Η στατική (μέσω NMR, SAXS και WAXS) και δυναμική ($\Delta\Phi$) διερεύνηση δείχνουν ότι αυτές οι δομές αποτελούν απλοποίηση της πραγματικής μορφολογίας (εικ. 6.34)

Η ακριβής μορφολογία και η δευτεροταγής δομή των πεπτιδίων μπορεί να βρεθεί με τη χρήση SAXS και WAXS, αντίστοιχα. Πρέπει να σημειωθεί ότι στα συγκεκριμένα συμπολυμερή υπάρχει μικρή αντίθεση (μικρή διαφορά ηλεκτρονιακής πυκνότητας) μεταξύ των συστάδων, λόγω της ακριβώς ίδιας κύριας αλυσίδας, γι' αυτό οι ανακλάσεις στο SAXS δεν αναμένεται να είναι έντονες. Συνδυασμένες καμπύλες SAXS και WAXS για τα συμπολυμερή PBLG₁₅-PGly₅ ($f_{\text{PBLG}}=0.86$) και PBLG₁₅-PGly₈ ($f_{\text{PBLG}}=0.79$) δείχνονται, αντίστοιχα, στις εικ. 6.28 και 6.29. Στην πρώτη εμφανίζονται κορυφές σε μικρές γωνίες με σχετικές θέσεις $1:\sqrt{3}:\sqrt{4}:\sqrt{7}:\sqrt{9}$ που δείχνουν εξαγωνική μορφολογία νανοφάσεων, ενώ στις μεγάλες γωνίες εμφανίζονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στην οργάνωση των α -ελίκων του PBLG και των β -φύλλων της PGly, στην ίδια περίπου θέση με τα αντίστοιχα ομοπολυμερή (Κεφ. 4). Παρόμοια μορφολογία βρέθηκε και στα συμπολυμερή PBLG₁₅-PGly₂ ($f_{\text{PBLG}}=0.94$) και PBLG₁₅-PGly₃ ($f_{\text{PBLG}}=0.91$), ενώ στο PBLG₁₅-PGly₁ ($f_{\text{PBLG}}=0.97$) το μικρό ποσοστό της PGly δεν επέτρεψε τη διερεύνηση της φασικής κατάστασης. Η

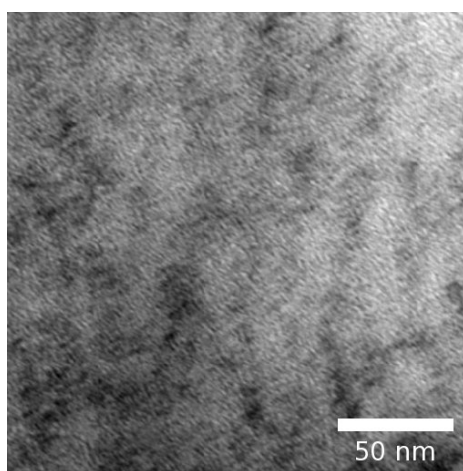
συνολική μορφολογία είναι κύλινδροι πάνω σε εξαγωνική μορφολογία (*cylinders-on-hexagonal*), δηλαδή εξαγωνικά οργανωμένες α -έλικες (κύλινδροι) πάνω σε εξαγωνικό πλέγμα κυλινδρικών νανοφάσεων που περιέχουν PGly. Η εικόνα από το PBLG₁₅-PGly₈ είναι διαφορετική. Οι κορυφές του SAXS με αναλογία 1:2:3 υποδηλώνουν φυλλοειδή μορφολογία, όπου ενσωματώνονται το εξαγωνικό πλέγμα των α -ελίκων και τα β -φύλλα της PGly, δηλαδή συνολική μορφολογία κύλινδροι σε φύλλα (*cylinders-in-lamellar*). Η ύπαρξη φυλλοειδούς μορφολογίας σε τόσο ασύμμετρη σύσταση είναι ιδιαίτερα ασυνήθιστη, συγκρινόμενη με συστήματα που περιέχουν συστάδες με τυχαία διαμόρφωση, και θυμίζει περιπτώσεις όπου υπάρχει κρυστάλλωση μιας από τις συστάδες. Όμοια μορφολογία παρατηρείται και στο PBLG₁₅-PGly₁₅ ($f_{\text{PBLG}}=0.67$). Εκτός από το SAXS χρησιμοποιήθηκε και TEM για το χαρακτηρισμό των νανοφάσεων (εικ. 6.30). Για την ενίσχυση της αντίθεσης χρησιμοποιήθηκε RuO₄ και οξικό ουρανύλιο (*staining*), όπως περιγράφεται στο Κεφ. 3. Το πρώτο αντιδρά με τις κύριες αλυσίδες και τους αρωματικούς δακτυλίους του PBLG, ενώ το δεύτερο συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου στους πεπτιδικούς δεσμούς. Παρατηρήθηκε διαχωρισμός νανοφάσεων, με απουσία τάξης μεγάλης κλίμακας, σε συμφωνία με το SAXS.



Εικ 6.28. Συνδυασμένα φάσματα SAXS και WAXS του συμπολυμερούς PBLG-b-PGly 15-5 ($f_{\text{PBLG}} = 0.86$) στους 303 K. Η καμπύλη SAXS δείχνει φαρδιές κορυφές (σχετικές θέσεις 1:√3:√4:√7:√9) που αντιστοιχούν σε εξαγωνική δομή με χαρακτηριστική απόσταση 24.6 nm. Στην καμπύλη WAXS εμφανίζονται ανακλάσεις από τις δευτεροταγείς δομές του PBLG, με σχετικές θέσεις 1:√3:√4 όπως στο ομοπολυπεπτίδιο, και της PGly, που αντιστοιχεί στην απόσταση 0.35 nm μεταξύ β -φύλλων. Η μορφολογία κυλίνδρων σε εξαγωνική νανοδομή (*cylinder-on-hexagonal*) δείχνεται σχηματικά στην «εξειδανικευμένη» εικόνα δεξιά, όπου όλες οι δευτεροταγείς δομές εμφανίζονται σαν ιδανικές.



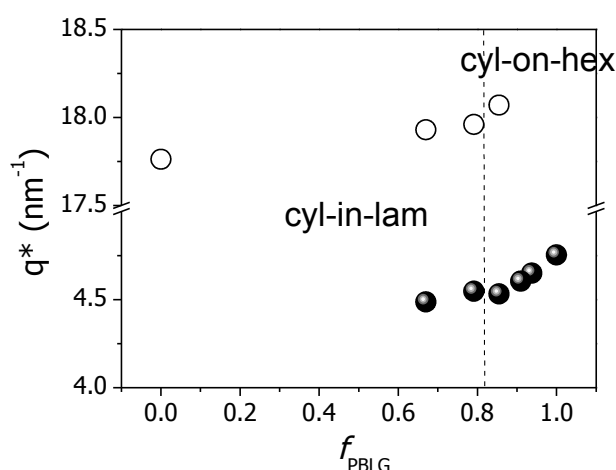
Εικ. 6.29. Συνδυασμένα φάσματα SAXS και WAXS του συμπολυμερούς PBLG-*b*-PGly 15-8 ($f_{\text{PBLG}} = 0.79$) στους 303 K. Στο SAXS εμφανίζονται τρεις κορυφές με σχετικές θέσεις 1:2:3, χαρακτηριστικές φυλλοειδών νανοφάσεων. Στο WAXS εμφανίζονται οι ανακλάσεις από τις εξαγωνικά οργανωμένες α-έλικες του PBLG και τα β-φύλλα της PGly. Η συνολική μορφολογία είναι κύλινδροι σε φύλλα (cylinder-in-lamellar) και απεικονίζεται σχηματικά στην εξιδανικευμένη εικόνα, δεξιά.



Εικ. 6.30. Εικόνα TEM του συμπολυμερούς PBLG₁₅-PGly₈, όπου παρατηρείται σχηματισμός φυλλοειδών νανοφάσεων χωρίς τάξη μεγάλης κλίμακας, σε συμφωνία με το SAXS. Το staining έγινε με RuO₄.

Το κλάσμα όγκου έχει επίδραση στο χαρακτηριστικό διάστημα των δευτεροταγών δομών, που υπολογίζεται από το WAXS, όπως φαίνεται στην εικ. 6.31. Η απόσταση μεταξύ των ελίκων PBLG μεγαλώνει με την αύξηση του ποσοστού της PGly, ενώ η απόσταση μεταξύ β-φύλλων της PGly μειώνεται με την αύξηση του κλάσματος όγκου του PBLG. Αυτή η συμπεριφορά δείχνει σύζευξη των πλευρικών αποστάσεων των δομών των δύο συστάδων. Να σημειωθεί ότι η ιδανική,

πλήρως κρυσταλλική, β -φυλλοειδής δομή της PGly δεν θα επέτρεπε τέτοια αλλαγή. Ένα ενδιαφέρον σημείο είναι ότι η δυναμική του τμηματικού μηχανισμού του PBLG δεν επιταχύνεται καθόλου, παρά την αύξηση του ελεύθερου χώρου ανάμεσα στις έλικες. Αυτό επιβεβαιώνει και ενισχύει τα συμπεράσματα του Κεφ. 4 σχετικά με την ενδογενή προέλευση της «μετάβασης» υάλου στα πεπτίδια. Αν ο τμηματικός μηχανισμός οφειλόταν σε κινήσεις πλευρικών αλυσίδων, θα έπρεπε να γίνεται ταχύτερος με την αύξηση της απόστασης μεταξύ των ελίκων.



Εικ. 6.31. Εξάρτηση της θέσης των κορυφών του WAXS από το κλάσμα όγκου του PBLG, που σχετίζεται με τις χαρακτηριστικές αποστάσεις μέσω της σχέσης $q^* = 2\pi/d$. Τα κλειστά σημεία αντιστοιχούν στην απόσταση μεταξύ α -ελίκων του PBLG, ενώ τα ανοιχτά στα β -φύλλα της PGly. Η απόσταση μεταξύ ελίκων (φύλλων) αυξάνει (μειώνεται) με την αύξηση του κλάσματος όγκου της PGly (PBLG). Η διακεκομμένη γραμμή διαχωρίζει τις δύο διαφορετικές μορφολογίες.

Από τις κορυφές του SAXS μπορούν να υπολογιστούν οι διαστάσεις των νανοφάσεων και να συγκριθούν με τις τιμές που υπολογίζονται για ιδανικές α -έλικες (0.15 nm/μονομερές) και β -φύλλα (0.35 nm/μονομερές) ίδιου μοριακού βάρους (Κεφ. 1). Τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται στον Πίνακα 6.3. Ο λόγος των πειραματικών τιμών για το χαρακτηριστικό μέγεθος των νανοφάσεων προς το μήκος των ιδανικών αντίστοιχων δευτεροταγών δομών έχει παρασταθεί γραφικά, συναρτήσει του κλάσματος όγκου του PBLG στην εικ. 6.32. Το μέγεθος της φάσης του PBLG είναι κάπως μεγαλύτερο από ένα μονόστρωμα ελίκων, αποκλείοντας τη συμπλοκή, αλλά μικρότερο από δύο στρώματα, αποκλείοντας και τη στοίβαξη. Ο γεωμετρικός παράγοντας για τα PBLG₁₅-PGly₈ και PBLG₁₅-PGly₁₅ είναι, αντίστοιχα, 1.62 και 1.31, δείχνοντας ότι καμία από τις «ιδανικές» δομές της εικ. 6.27 δεν αντιστοιχεί στην πραγματικότητα. Επίσης, αποκλείονται οι αναδιπλωμένες α -έλικες. Το πάχος της φάσης της PGly, αντίθετα, είναι πολύ μικρότερο από το μήκος ιδανικών β -φύλλων, υποδεικνύοντας ότι οι αλυσίδες αναδιπλώνονται πολλές φορές μέσα στη

φάση. Αυτό οφείλεται στην πολύ διαφορετική πυκνότητα των δύο συστάδων ($\rho_{PBLG}=1.278 \text{ g/cm}^3$, $\rho_{PGly}=1.61 \text{ g/cm}^3$) και εξηγεί τη φυλλοειδή μορφολογία στις τόσο ασύμμετρες αρχιτεκτονικές, όπως σε συστήματα με κρυσταλλικές φυλλοειδείς νανοφάσεις, π.χ. πολυϊσοπρένιο-*b*-πολυαιθυλενοξειδίο (PI-*b*-PEO) [41].

Πίνακας 6.3. Κλάσμα όγκου, μέγεθος νανοφάσεων από SAXS και μήκος πλήρως εκτεταμένης πεπτιδικής αλυσίδας των συμπολυμερών PBLG-*b*-PGly.

Δείγμα	N_n^{PBLG} (1)	N_n^{PGly} (2)	f_{PBLG} (3)	$d^{total} \text{ (nm)}$ (4)	$d_{PBLG} \text{ (nm)}$ (5)	$d_{PGly} \text{ (nm)}$ (6)	ℓ_{helix}^{ext} (nm) ⁽⁷⁾	$\ell_{\beta-sheet}^{ext}$ (nm) ⁽⁸⁾
PBLG- <i>b</i> -PGly 15-1	116	18	0.97				17.3	6.8
PBLG- <i>b</i> -PGly 15-2	136	44	0.94	30.1	23.3	6.8	20.4	16.1
PBLG- <i>b</i> -PGly 15-3	126	61	0.91	31.1	22.6	8.5	18.8	22.2
PBLG- <i>b</i> -PGly 15-5	102	84	0.86	24.6	16.0	8.5	15.3	30.9
PBLG- <i>b</i> -PGly 15-8	104	133	0.79	22.1	17.5	4.6	15.6	48.9
PBLG- <i>b</i> -PGly 15-15	84	202	0.67	24.7	16.6	8.2	12.7	73.9

(1) $M_{BLG} = 219 \text{ g/mol}$.

(2) $M_{Gly} = 57 \text{ g/mol}$.

(3) Υπολογισμένα στον Πίνακα 3.3

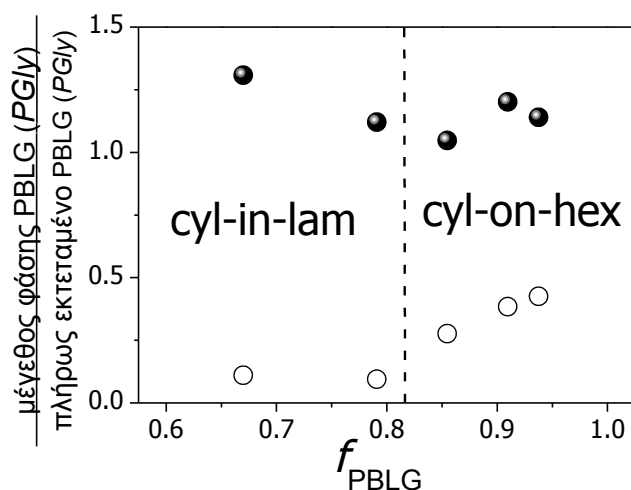
(4) $d^{total} = \frac{4\pi}{q^* \sqrt{3}}$ και $d^{total} = \frac{2\pi}{q^*}$ για τις μορφολογίες κύλινδροι σε εξαγωνικό πλέγμα (Cyl-on-Hex) και κύλινδροι σε φύλλα (Cyl-in-Lam), αντίστοιχα, όπου q^* η κύρια κορυφή στο SAXS.

(5) $d_{PBLG} = d^{total} \times \left(1 - \sqrt{1 - f_{PBLG}} \frac{3^{1/4}}{\sqrt{2\pi}}\right)$ και $d_{PBLG} = d^{total} \times f_{PBLG}$ για τις μορφολογίες Cyl-on-Hex και Cyl-in-Lam, αντίστοιχα..

(6) $d_{PGly} = d^{total} - d_{PBLG}$.

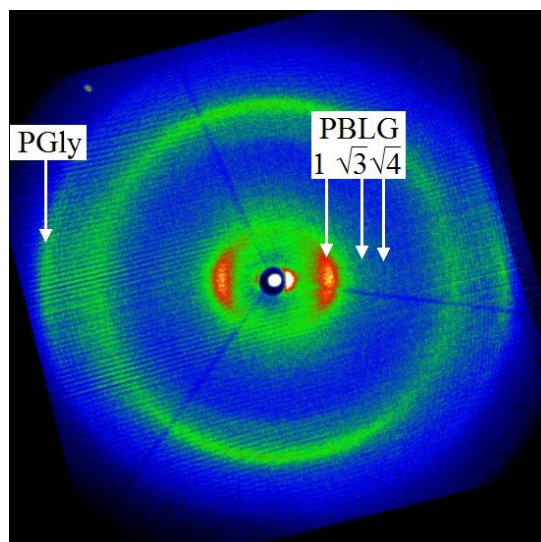
(7) $\ell_{helix}^{ext} = 0.15 \times N_n^{PBLG}$.

(8) $\ell_{\beta-sheet}^{ext} = 0.35 \times N_n^{PG}$.



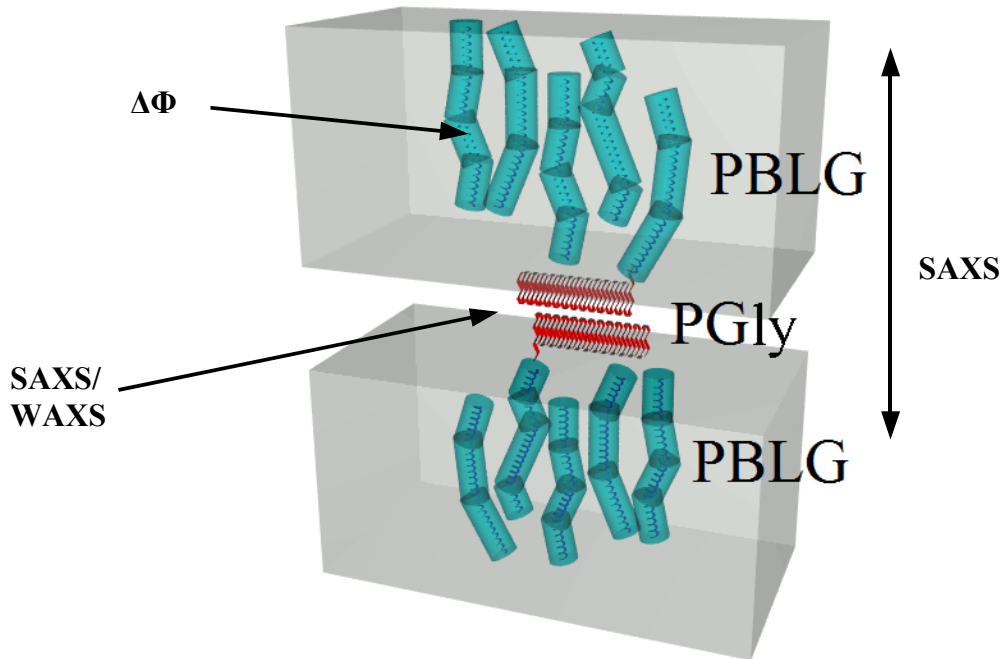
Εικ. 6.32. Λόγος του μεγέθους των φάσεων (από SAXS) προς τις διαστάσεις των ιδανικών δευτεροταγών δομών ίδιου μοριακού βάρους (0.15 και 0.35 nm/μονομερές για τις α-έλικες και τα β-φύλλα, αντίστοιχα), ως συνάρτηση του κλάσματος όγκου του PBLG (δεδομένα του Πίνακα 6.3). Τα ανοιχτά και κλειστά σύμβολα αντιστοιχούν στη φάση του PBLG και της PGly. Η φάση του PBLG είναι κάπως μεγαλύτερη από ένα μονόστρωμα, ενώ το πάχος της φάσης της PGly είναι πολύ μικρότερο από το μήκος του αντίστοιχου «ιδανικού» β-φύλλου, δείχνοντας ότι η αλυσίδα της PGly αναδιπλώνεται πολλές φορές μέσα στη νανοφάση. Η διακεκομμένη γραμμή διαχωρίζει τις διαφορετικές μορφολογίες.

Για να προσδιοριστεί ο ακριβής προσανατολισμός των πεπτιδικών αλυσίδων εντός των νανοφάσεων χρησιμοποιήθηκε σκέδαση ακτίνων X από προσανατολισμένες ίνες των συμπολυμερών (εικ. 6.33). Όλες οι ανακλάσεις εμφανίζονται κατά μήκος του ισημερινού, δείχνοντας ότι οι αλυσίδες του PBLG και τις PGly είναι παράλληλες και επομένως κάθετες στην ενδοεπιφάνεια.



Εικ. 6.33. Σκέδαση ακτίνων X σε δύο διαστάσεις από εφελκυσμένη ίνα του συμπολυμερούς PBLG₁₅-PGly₁₅ ($f_{PBLG}=0.67$) στους 413 K (ο εφελκυσμός έγινε στους 433 K και ακολούθησε ανόπτηση στους 423 K επί 24 h). Κατά μήκος του ισημερινού διακρίνονται οι ανακλάσεις που αντιστοιχούν στο εξαγωνικό πλέγμα των α-ελίκων, δείχνοντας ότι οι άξονές τους είναι παράλληλοι με την ίνα. Η ισημερινή ανάκλαση σε μεγάλη γωνία (χαρακτηριστική απόσταση $d=0.35$ nm) αντιστοιχεί στην απόσταση μεταξύ γειτονικών β-φύλλων της PGly, δείχνοντας ότι τα β-φύλλα έχουν τον ίδιο προσανατολισμό με τις έλικες, δηλαδή κάθετα στη διαχωριστική επιφάνεια των νανοφάσεων.

Βάσει των αποτελεσμάτων από τις στατικές μεθόδους (WAXS, SAXS) και τη $\Delta\Phi$ κατασκευάστηκε το σχηματικό μοντέλο της εικ. 6.34 που δείχνει τη μορφολογία των νανοφάσεων στα συμπολυμερή και τις δευτεροταγείς δομές. Για απλούστευση, παρουσιάζεται μόνο η περίπτωση της φυλλοειδούς μορφολογίας. Οι δύο συστάδες είναι πολύ καλά διαχωρισμένες, σύμφωνα με τη $\Delta\Phi$ και το SAXS, οι α-έλικες έχουν ατέλειες που τις αναγκάζουν να λυγίζουν σε ορισμένα σημεία ($\Delta\Phi$), η PGly αναδιπλώνεται πολλές φορές (SAXS, WAXS, ¹³C-NMR) και οι δύο δευτεροταγείς δομές οργανώνονται κάθετα στην ενδοεπιφάνεια (WAXS). Η μερική συμπλοκή των ελίκων εξηγείται εύκολα με αυτό το μοντέλο. Τα κενά που θα έμεναν στην περίπτωση των ιδανικών ελίκων, τώρα καλύπτονται από τις έλικες που μπορούν να λυγίζουν, λόγω των σπασμένων δεσμών υδρογόνου. Οι διαφορές από την αρχική απλοϊκή πρόβλεψη της εικ. 6.27 είναι εμφανείς.



Εικ. 6.34. Σχηματικό μοντέλο των συμπολυπεπτιδίων PBLG-b-PGly με $f_{PBLG} < 0.80$ (με φυλλοειδή μορφολογία) που είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα της στατικής (NMR, SAXS και WAXS) και της δυναμικής ($\Delta\Phi$) μελέτης. Οι α -έλικες του PBLG περιέχουν ατέλειες (τμήμα 6.6) που επιτρέπουν τη μερική συμπλοκή, ενώ οι αλυσίδες της PGly αναδιπλώνονται πολλές φορές, σε συμφωνία με το SAXS και το NMR. Οι διαφορές της πραγματικής δομής με την εξιδανικευμένη της εικ. 6.27 είναι εμφανείς.

Τα κυριότερα αποτελέσματα από τη στατική και δυναμική μελέτη των δισυσταδικών συμπολυπεπτιδίων PBLG-b-PGly είναι:

1. Οι μοριακές αλληλεπιδράσεις ευνοούν τον ιεραρχικό σχηματισμό δομών σε πολλαπλές κλίμακες μήκους, δίνοντας μορφολογίες κυλίνδρων σε εξαγωνικό πλέγμα ($0.86 \leq f_{PBLG} \leq 0.94$) και κυλίνδρων σε φύλλα ($0.67 \leq f_{PBLG} \leq 0.79$)
2. Δεν παρατηρήθηκαν δομικές μεταβολές τάξης-τάξης σε όλη την περιοχή θερμοκρασιών που ερευνήθηκε ($303 \leq T \leq 433$ K), δείχνοντας ισχυρό διαχωρισμό (*strong segregation limit* – SSL).
3. Οι α -έλικες δεν σχηματίζουν στοίβες, αλλά ούτε συμπλέκονται πλήρως. Λόγω των ατελειών τους συμπλέκονται μερικώς, χωρίς να αφήνουν κενό χώρο.
4. Οι αλυσίδες της PGly παρουσιάζουν πολλές αναδιπλώσεις εντός των νανοφάσεων, λόγω του θερμοδυναμικού περιορισμού και της μεγάλης διαφοράς πυκνότητας με το PBLG.
5. Λόγω των αναδιπλώσεων, σταθεροποιείται η φυλλοειδής μορφολογία σε πολύ ασύμμετρα συμπολυμερή ($f_{PBLG}=0.79$), όπως η κρυσταλλική φυλλοειδής νανοφάση σε συσταδικά συμπολυμερή με άμορφες και ημικρυσταλλικές συστάδες.

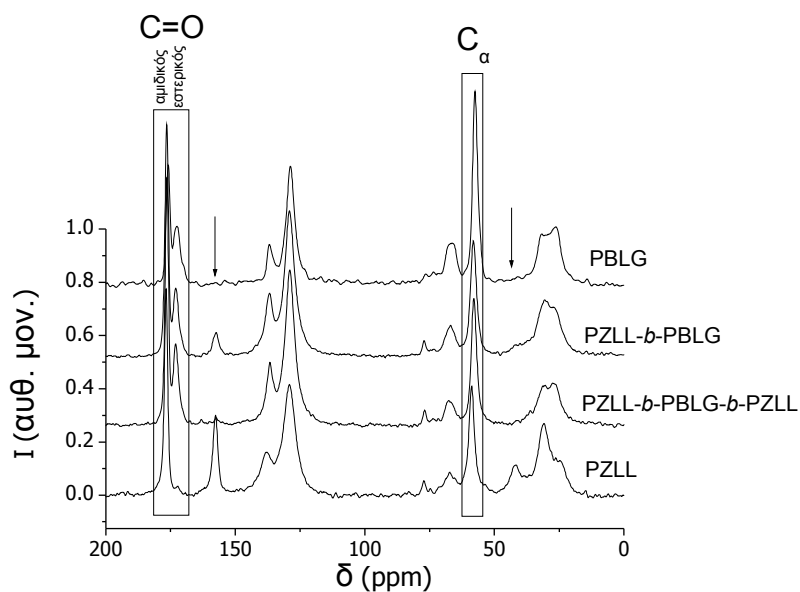
Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο θερμοδυναμικός περιορισμός σε πεπτιδικά συμπολυμερή με ανόμοιες συστάδες μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο του μήκους εμμονής των δευτεροταγών δομών, κυρίως των β -φύλλων.

6.5 Δισυσταδικό συμπολυμερές πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνης)-b-πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμινικού οξέος) (PZLL-b-PBLG) και τρισυσταδικό PZLL-b-PBLG-b-PZLL

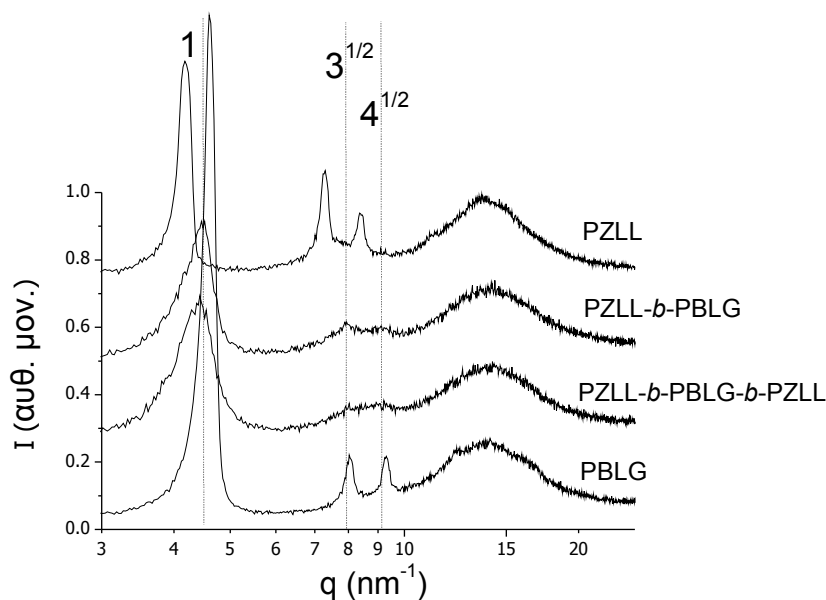
Στο προηγούμενο τμήμα μελετήθηκε η σειρά συμπολυμερών PBLG-b-PGly που συνδυάζει α -έλικες με β -φύλλα. Παρατηρήθηκε μεγάλη ασυμβατότητα μεταξύ των συστάδων και νανοφασικός διαχωρισμός, ακόμα και σε πολύ ασύμμετρο κλάσμα όγκου. Σε αυτό το τμήμα θα αναφερθούν πειραματικά αποτελέσματα για δύο συστήματα που αποτελούνται από συστάδες PBLG και PZLL, οι οποίες σχηματίζουν σταθερές α -έλικες. Το κλάσμα όγκου του PBLG στο δισυσταδικό και το τρισυσταδικό συμπολυμερές είναι περίπου το ίδιο, 0.70 και 0.65, αντίστοιχα (Πίνακας 3.4). Η δομή μελετήθηκε με ^{13}C -NMR, SAXS και WAXS, ενώ η δυναμική με $\Delta\Phi$.

Το ^{13}C -NMR (εικ. 6.35) αποκαλύπτει ότι δεν συμβαίνει καμία αλλαγή στη δευτεροταγή δομή των συστάδων. Οι κορυφές του $^{13}\text{C}_\alpha$ στα ~ 58 ppm και του $^{13}\text{C}=\text{O}$ στα ~ 176 ppm δεν μετατοπίζονται σε σχέση με τα αντίστοιχα ομοπολυμερή, αλλά ούτε διευρύνονται. Τα φάσματα των δύο συμπολυμερών, στο μεγαλύτερο μέρος τους, είναι απλώς το άθροισμα των αντίστοιχων ομοπολυμερών, αλλά παρατηρείται κάποια διαφορά στις κορυφές σε $\delta \sim 42$ και 157 ppm ($^{-13}\text{CH}_2\text{N}$ - και καρβαμικός άνθρακας της πλευρικής αλυσίδας της PZLL, αντίστοιχα). Στο δισυσταδικό συμπολυμερές παρατηρούνται και οι δύο, αν και αρκετά πιο ασθενείς, ενώ στο τρισυσταδικό δεν εμφανίζεται καμία, υποδεικνύοντας ότι έχει αλλάξει το περιβάλλον των πλευρικών αλυσίδων, δηλαδή υπάρχει μεγαλύτερη ανάμιξη. Στις κορυφές που αντιστοιχούν στους άνθρακες του PBLG δεν παρατηρείται κάποια αλλαγή.

Στο SAXS δεν παρατηρήθηκαν ανακλάσεις εξαιτίας της μικρής διαφοράς στο μέγεθος των μονομερών και την πυκνότητα (ηλεκτρονιακή πυκνότητα) του PBLG και της PZLL. Αντίθετα, στις μετρήσεις WAXS (εικ. 6.36) παρατηρούνται τρεις ανακλάσεις με σχετικές θέσεις $1:3^{1/2}:4^{1/2}$ που δείχνουν ότι οι α -έλικες και των δύο συστάδων οργανώνονται σε ενιαίο εξαγωνικό πλέγμα και στο δισυσταδικό και το τρισυσταδικό συμπολυμερές. Η απόσταση μεταξύ των ελίκων στα συμπολυμερή είναι και στα δύο $d=1.65$ nm, δηλαδή ο μέσος όρος των αποστάσεων στο PBLG και την PZLL (1.58 και 1.74 nm, αντίστοιχα). Το εύρος της κύριας κορυφής είναι αρκετά μεγάλο και δείχνει μειωμένο μήκος συνοχής, $\zeta \sim 10$ nm.

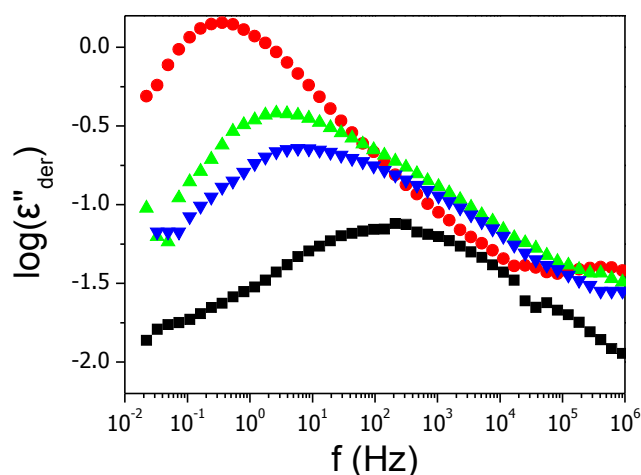


Εικ. 6.35. Φάσματα $^{13}\text{C-NMR}$ από το δισυσταδικό συμπολυμερές PBLG-b-PZLL, το τρισυσταδικό PZLL-b-PBLG-b-PZLL και τα αντίστοιχα ομοπολυμερή. Οι κορυφές του C_α και του $\text{C}=\text{O}$ αντιστοιχούν σε όλα τα συστήματα σε α -έλικες. Στα συμπολυμερή δεν παρατηρείται μετατόπιση, αλλά ούτε και διεύρυνση. Η απουσία στο τρισυσταδικό συμπολυμερές των κορυφών σε $\delta \sim 42$ και 157 ppm, που αντιστοιχούν σε άνθρακες της πλευρικής αλυσίδας της PZLL, δείχνουν αλλαγή της δυναμικής και ανάμιξη, που στο δισυσταδικό είναι ίσως λιγότερο έντονη.



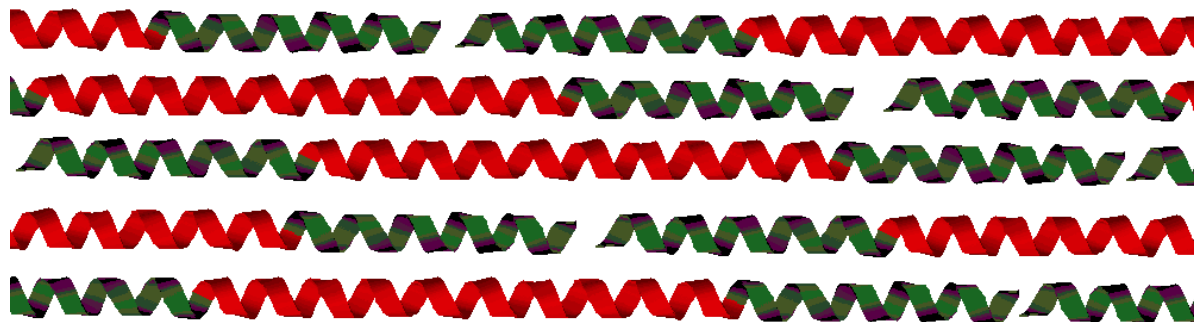
Εικ. 6.36. Φάσματα WAXS από τα συμπολυμερή και το αντίστοιχο ομοπολυμερές. Στα συμπολυμερή εμφανίζονται τρεις ανακλάσεις με σχετικές θέσεις $1:3^{1/2}:4^{1/2}$ που υποδηλώνουν ότι οι α -έλικες και των δύο συστάδων σχηματίζουν ενιαίο εξαγωνικό πλέγμα, δηλαδή υπάρχει ανάμιξη.

Η ΔΦ δείχνει επίσης ότι οι συστάδες της PZLL και του PBLG αναμιγνύονται στα συμπολυμερή. Εμφανίζεται ένας μοναδικός τμηματικός μηχανισμός (εικ. 6.37) με ενδιάμεσους χρόνους χαλάρωσης από τα δύο αντίστοιχα ομοπολυμερή. Στο επόμενο τμήμα θα παρουσιαστούν και τα δεδομένα για τον «αργό» μηχανισμό, επίσης μοναδικός, τα οποία δείχνουν ότι το μήκος εμμονής των ελίκων παραμένει πρακτικά το ίδιο με τα ομοπολυμερή.



Εικ. 6.37. Φάσματα του ε''_{der} (εξ. 3.30) στους 303 K για τα δείγματα: (τετράγωνα) PBLG₁₇₅, (κύκλοι) PZLL₁₃₅, (πάνω τρίγωνα) PZLL-b-PBLG και (κάτω τρίγωνα) PZLL-b-PBLG-b-PZLL. Παρατηρείται ο τμηματικός (α-) μηχανισμός. Στα συμπολυμερή εμφανίζεται μόνο ένας μηχανισμός, αν και σχετικά φαρδύς, αποκαλύπτοντας ότι οι συστάδες αναμιγνύονται.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα σχεδιάστηκε η εικ. 6.38 που δείχνει σχηματικά την ανάμιξη των συστάδων στα συμπολυμερή (συγκεκριμένα στο τρισυσταδικό). Οι συστάδες PBLG και PZLL σχηματίζουν α-έλικες που οργανώνονται σε ενιαίο πλέγμα, χωρίς να υπάρχουν περιοχές όπου συγκεντρώνονται έλικες της μιας ή της άλλης συστάδας. Πρέπει να πούμε ότι, σύμφωνα με το ¹³C-NMR, στο δισυσταδικό συμπολυμερές ίσως υπάρχει κάποια τάση διαχωρισμού των συστάδων, αλλά είναι πολύ ασθενής για να παρατηρηθεί μέσω SAXS ή WAXS, ακόμα και με τη ΔΦ, επειδή τα σημεία υάλου είναι πολύ κοντά.



Εικ. 6.38. Σχηματικό μοντέλο του τρισυσταδικού συμπολυμερούς PZLL-*b*-PBLG-*b*-PZLL. Οι συστάδες του PBLG και της PZLL τονίζονται με κόκκινο και πράσινο χρώμα, αντίστοιχα. Οι α -έλικες των συστάδων, που απεικονίζονται ιδανικές αν και δεν είναι (Κεφ. 5), οργανώνονται σε ενιαίο πλέγμα και κατανέμονται ομοιόμορφα στο χώρο.

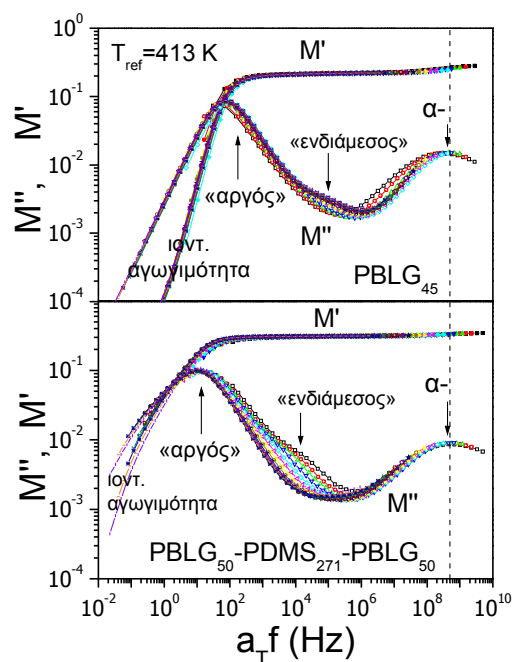
Συμπερασματικά, στα συμπολυμερή PZLL-*b*-PBLG και PZLL-*b*-PBLG-*b*-PZLL υπάρχει ανάμιξη των συστάδων με βάση τα αποτελέσματα των στατικών μεθόδων και της ΔΦ, με αποτέλεσμα οι α -έλικες να οργανώνονται σε ενιαίο εξαγωνικό πλέγμα με ενδιάμεσες διαστάσεις των δύο αντίστοιχων ομοπολυμερών. Οι α -έλικες φαίνεται ότι μπορούν να αναμιχθούν ευκολότερα μεταξύ τους. Το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση που συνυπάρχουν α -έλικες και β -φύλλα, αν και χρειάζεται μελέτη και άλλων συστημάτων για να εξακριβωθεί αυτό. Η ομοιότητα του μεγέθους των πλευρικών αλυσίδων και η ύπαρξη αρωματικών δακτυλίων (π-ηλεκτρόνια) ευνοούν τη συμβατότητα.

6.6 Μήκος εμμονής των δευτεροταγών δομών στα συσταδικά συμπολυμερή με πεπτιδία

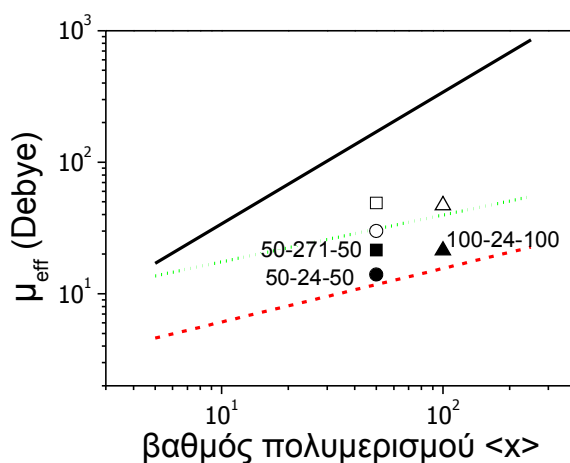
Στο Κεφ. 5 έγινε διερεύνηση, μέσω του «αργού» μηχανισμού των πεπτιδίων, κατά πόσον οι α -έλικες είναι ιδανικές ή περιέχουν ατέλειες και βρέθηκε ότι το μήκος εμμονής τους σε ξηρά ομοπολυμερή είναι αρκετά μικρότερο από το συνολικό μήκος της αλυσίδας, περίπου 2 nm, σχεδόν ανεξάρτητο του μοριακού βάρους (εικ. 5.7). Σε αυτό το τμήμα θα εξεταστεί η επίδραση του θερμοδυναμικού πεδίου των συμπολυμερών στο μήκος εμμονής της α -έλικας για συμπολυμερή που μελετήθηκαν προηγουμένως σε αυτό το κεφάλαιο.

Στη σειρά των τρισυσταδικών συμπολυμερών PBLG-*b*-PDMS-*b*-PBLG παρατηρήθηκε ισχυρός διαχωρισμός φάσεων για βαθμούς πολυμερισμού του PBLG 50 ή 100. Παρότι ο τμηματικός (α -) μηχανισμός της συστάδας PBLG δεν διέφερε από το ομοπολυπεπτιδίο ούτε στους χρόνους ούτε στην ένταση, ο «αργός» μηχανισμός επηρεάζεται από την παρουσία της συστάδας PDMS. Όπως δείχνουν τα φάσματα του πραγματικού και φανταστικού μέρους του ηλεκτρικού

μέτρου M^* για το PBLG₅₀-*b*-PDMS₂₇₁-*b*-PBLG₅₀ (εικ. 6.39), οι χρόνοι χαλάρωσής του γίνονται πιο αργοί (κατά μία δεκάδα περίπου) και η έντασή του αυξάνεται, με αποτέλεσμα η αντίστοιχη κορυφή να ξεχωρίζει από την κορυφή της αγωγιμότητας (σημείο τομής M' και M''). Και οι δύο μεταβολές αποτελούν ισχυρή ένδειξη αύξησης του μήκους εμμονής των α -ελίκων του PBLG, και αυτό παρά τη μείωση του μήκους συνοχής που παρατηρήθηκε στο WAXS. Επίσης, λόγω της απομάκρυνσης του «αργού» μηχανισμού, διακρίνεται και ο ενδιάμεσος μηχανισμός, που δεν παρουσιάζει αλλαγή στην ένταση ή τους χρόνους χαλάρωσης, και επομένως τα άμορφα τμήματα των αλυσίδων PBLG δεν επηρεάζονται. Για να γίνει πιο ποσοτική η σύγκριση, υπολογίστηκαν οι διπολικές ροπές των συμπολυμερών που αντιστοιχούν στον «αργό» μηχανισμό. Ο υπολογισμός έγινε με δύο τρόπους: με την εξίσωση Kirkwood-Fröhlich (3.12), που χρησιμοποιείται συνήθως και είναι πιο κατάλληλη για σφαιρικά μόρια, και την εξίσωση Buckingham (3.14) που ενδείκνυται για μακριές λεπτές ράβδους, όπως είναι οι α -έλικες στην παρούσα περίπτωση. Τα αποτελέσματα για τα τρία συμπολυμερή, όπου σχηματίζονται α -έλικες, απεικονίζονται στην εικ. 6.40 μαζί με τα αντίστοιχα της σειράς ομοπολυπεπτιδίων PBLG, που παρουσιάστηκαν στο Κεφ. 5, και τη θεωρητική τιμή $\mu_{\text{helix}}=3.5 \text{ Debye} * \langle x \rangle$. Τα συμπολυμερή PBLG₅₀-*b*-PDMS₂₄-*b*-PBLG₅₀ ($f_{\text{PBLG}}=0.93$) και PBLG₁₀₀-*b*-PDMS₂₄-*b*-PBLG₁₀₀ ($f_{\text{PBLG}}=0.96$), με μικρό ποσοστό PDMS, δείχνουν μικρή αύξηση της διπολικής ροπής σε σχέση με το καθαρό PBLG ίδιου μοριακού βάρους. Η περίπτωση του συμπολυμερούς PBLG₅₀-*b*-PDMS₂₇₁-*b*-PBLG₅₀ με υψηλό ποσοστό PDMS ($f_{\text{PBLG}}=0.57$) είναι διαφορετική, δίνοντας αρκετά μεγαλύτερη διπολική ροπή, αν και αυτή υπολείπεται σημαντικά της θεωρητικής τιμής.



Εικ. 6.39. Σύγκριση υπερθέσεων του πραγματικού (M' , κλειστά σύμβολα) και φανταστικού μέρους (M'' , ανοιχτά σύμβολα) του ηλεκτρικού μέτρου M^* του ομοπολυπεπτιδίου $PBLG_{45}$ (πάνω) και του συμπολυμερούς $PBLG_{50}$ - b - $PDMS_{271}$ - b - $PBLG_{50}$ ($f_{PBLG}=0.57$, κάτω). Η θερμοκρασία αναφοράς είναι $T_{ref}=413$ K. Το σημείο τομής των M' και M'' οφείλεται στην ιοντική αγωγιμότητα, ενώ η ασυμμετρία του M'' στο μέγιστο προέρχεται από τον «αργό» μηχανισμό που γίνεται πιο αργός στο συμπολυμερές κατά μία δεκάδα περίπου.

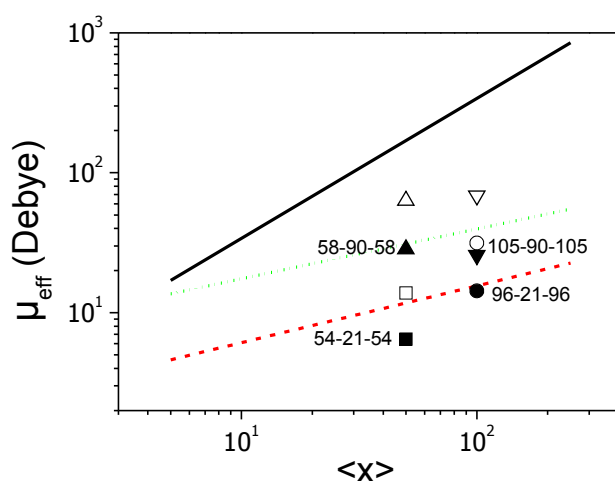


Εικ. 6.40. Διπολικές ροπές που αντιστοιχούν στον «αργό» μηχανισμό της συστάδας PBLG των συμπολυμερών $PBLG_{50}-b-PDMS_{271}-b-PBLG_{50}$ ($f_{PBLG}=0.57$, τετράγωνα), $PBLG_{50}-b-PDMS_{24}-b-PBLG_{50}$ ($f_{PBLG}=0.93$, κύκλοι) και $PBLG_{100}-b-PDMS_{24}-b-PBLG_{100}$ ($f_{PBLG}=0.96$, τρίγωνα), συναρτήσεως του βαθμού πολυμερισμού της συστάδας PBLG. Τα κλειστά και ανοιχτά σύμβολα αντιστοιχούν σε τιμές υπολογισμένες από την εξ. Kirkwood-Fröhlich (3.12) και την εξ. Buckingham (3.14). Η συνεχής γραμμή είναι η θεωρητική τιμή 3.5 Debye/μονομερές, ενώ οι διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στα ομοπολυπεπτίδια PBLG (Κεφ. 5) (παύλες – εξ. Kirkwood-Fröhlich, τελείες – εξ. Buckingham). Όλες οι τιμές είναι χαμηλότερες από τις θεωρητικές λόγω ατελειών των ελίκων, αλλά στο συμπολυμερές $PBLG_{50}-b-PDMS_{271}-b-PBLG_{50}$ ($f_{PBLG}=0.57$) είναι πιο υψηλές από τα άλλα συστήματα, δείχνοντας μείωση του αριθμού ατελειών.

Η κατανόηση της μείωσης του αριθμού ατελειών της α -έλικας στα συμπολυμερή μπορεί να γίνει μέσω της εξέτασης της ύπαρξης ικανού θερμοδυναμικού πεδίου στα νανοφασικά διαχωρισμένα συμπολυμερή. Σε συμπολυμερή με ισχυρό διαχωρισμό ($\chi N \rightarrow \infty$, SSL) οι αλυσίδες είναι αρκετά εκτεταμένες, σε σχέση με τα αντίστοιχα ομοπολυμερή, και το μέγεθος των περιοχών, όπου βρίσκονται, είναι ανάλογο του $N^{2/3}\chi^{1/6}$ (για άμορφα συμπολυμερή) [42], δηλαδή με ισχυρή εξάρτηση από το N . Σύμφωνα με αυτό το σκεπτικό, το συμπολυμερές $PBLG_{50}-b-PDMS_{271}-b-PBLG_{50}$, με το μεγαλύτερο συνολικό βαθμό πολυμερισμού και την πιο συμμετρική σύσταση ($f_{PBLG}=0.57$, το επιχείρημα αυτό ισχύει αν υποθεθεί ένα αρκετά συμμετρικό διάγραμμα φάσεων) που εμφανίζει τον ισχυρότερο διαχωρισμό, αναμένεται να παρουσιάζει εντονότερη έκταση των αλυσίδων, λόγω του θερμοδυναμικού περιορισμού. Αυτή η έκταση οδηγεί σε μερική καταστροφή των ατελειών των α -ελίκων και αύξηση του μήκους εμμόνης, όπως παρατηρείται πειραματικά.

Στα τρισυσταδικά συμπολυμερή $PBLG-b-PEG-b-PBLG$ παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συμβατότητα των συστάδων, καθώς για παρόμοια μοριακά βάρη και κλάσματα όγκου υπήρξε ανάμιξη. Έτσι στο $PBLG_{54}-PEG_{21}-PBLG_{54}$ ($f_{PBLG}=0.96$) από τη μειωμένη διπολική ροπή που αντιστοιχεί στον «αργό» μηχανισμό (εικ. 6.41) προκύπτει μικρότερο μήκος εμμόνης από ότι στο

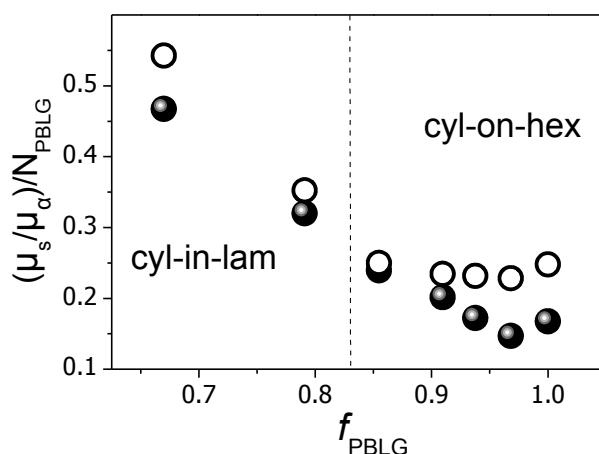
ομοπολυπεπτιδίο. Αυτό οφείλεται στην ανάμιξη (βλέπε και διάγραμμα φάσεων της εικ. 6.10) και στον σχηματισμό μικρού αριθμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ PEG και PBLG. Στα PBLG₅₈-PEG₉₀-PBLG₅₈ ($f_{\text{PBLG}}=0.98$) και PBLG₁₀₅-PEG₉₀-PBLG₁₀₅ ($f_{\text{PBLG}}=0.96$), παρά την ανάμιξη παρατηρείται αρκετά σημαντική αύξηση της ενεργού διπολικής ροπής που αντιστοιχεί στον «αργό» μηχανισμό και το μήκος εμμόνης των α -ελίκων. Παρατηρώντας το διάγραμμα φάσεων της εικ. 6.10, διαπιστώνουμε ότι αυτά τα δύο συμπολυμερή γειτνιάζουν με το όριο τάξης-αταξίας, και επομένως υπάρχουν διακυμάνσεις της συγκέντρωσης, που συνοδεύονται από μερική έκταση των αλυσίδων σε σχέση με τα αντίστοιχα ομοπολυμερή. Η τάση προς διαχωρισμό έχει ως συνέπεια την αύξηση του μήκους εμμόνης της δευτεροταγούς δομής του πεπτιδίου. Σε όσα συμπολυμερή παρατηρήθηκε διαχωρισμός φάσεων, το πεπτιδίο ήταν μικρό ($\langle x \rangle < 20$) και σχημάτιζε και β -φύλλα εκτός από α -έλικες, γι' αυτό και δεν παρουσιάζεται η ανάλυση για το μήκος εμμόνης σε αυτά.



Εικ. 6.41. Διπολικές ροπές που αντιστοιχούν στον «αργό» μηχανισμό της συστάδας PBLG των συμπολυμερών PBLG₅₄-b-PEG₂₁-b-PBLG₅₄ ($f_{\text{PBLG}}=0.96$, τετράγωνα), PBLG₉₆-b-PEG₂₁-b-PBLG₉₆ ($f_{\text{PBLG}}=0.98$, κύκλοι), PBLG₅₈-b-PEG₉₀-b-PBLG₅₈ ($f_{\text{PBLG}}=0.85$, πάνω τρίγωνα) και PBLG₁₀₅-b-PEG₉₀-b-PBLG₁₀₅ ($f_{\text{PBLG}}=0.91$, κάτω τρίγωνα), συναρτήσει του βαθμού πολυμερισμού της συστάδας PBLG. Τα κλειστά και ανοιχτά σύμβολα αντιστοιχούν σε τιμές υπολογισμένες από την εξ. Kirkwood-Fröhlich (3.12) και την εξ. Buckingham (3.14). Η συνεχής γραμμή είναι η θεωρητική τιμή 3.5 Debye/μονομερές, ενώ οι διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στα ομοπολυπεπτιδία PBLG (Κεφ. 5) (παύλες από εξ. Kirkwood-Fröhlich, τελείες από εξ. Buckingham). Σε κανένα από τα συμπολυμερή δεν παρατηρήθηκε διαχωρισμός φάσεων, όμως τα PBLG₉₆-b-PEG₂₁-b-PBLG₉₆ και PBLG₅₈-b-PEG₉₀-b-PBLG₅₈ βρίσκονται πολύ κοντά στα όρια τάξης – αταξίας (εικ. 6.10), με αποτέλεσμα να υπάρχουν διακυμάνσεις της συγκέντρωσης και μερική έκταση των αλυσίδων. Γι' αυτό το λόγο αυτά τα δύο συστήματα σχηματίζουν α -έλικες με μεγαλύτερο μήκος εμμόνης από τα υπόλοιπα. Αντίθετα, το PBLG₅₄-b-PEG₂₁-b-PBLG₅₄ είναι το πιο καλά αναμεμιγμένο.

Η επίδραση του θερμοδυναμικού περιορισμού στις δευτεροταγείς δομές (α -έλικες και β -φύλλα) παρατηρείται ακόμα καλύτερα στα δισυσταδικά συμπολυμερή, όπου ο διαχωρισμός των

συστάδων είναι ακόμα πιο ισχυρός. Αναφέρθηκε ήδη ότι η β-φυλλοειδής δομή της PGLy αναγκάζεται να κάνει μεγάλο αριθμό αναδιπλώσεων μέσα στις νανοφάσεις. Κατά συνέπεια το μήκος εμμονής της μειώνεται δραστικά (εικ. 6.31). Σχετικά με το μήκος εμμονής των α-ελίκων του PBLG, ανάλογη ανάλυση με τα προηγούμενα συστήματα δείχνει έντονη εξάρτηση από το κλάσμα όγκου. Στην εικ. 6.42 παρουσιάζεται η ενεργός διπολική ροπή που αντιστοιχεί στον «αργό» μηχανισμό, διαιρεμένη με τη σχεδόν σταθερή διπολική ροπή του α-μηχανισμού και το βαθμό πολυμερισμού της συστάδας PBLG, λόγω των μικρών διαφορών στα μοριακά βάρη (Πίνακας 3.3). Έχουν απεικονιστεί δύο σειρές δεδομένων: μία από δείγματα που μετρήθηκαν όπως ελήφθησαν (σύνθεση σε DMF) και μία από δείγματα που παρασκευάστηκαν με αργή εξάτμιση αραιών διαλυμάτων σε μ-κρεσόλη. Η αυξητική τάση της διπολικής ροπής του «αργού» μηχανισμού με τη μείωση του κλάσματος όγκου του PBLG είναι εμφανής και στις δύο περιπτώσεις. Το γεγονός ερμηνεύεται με ανάλογο συλλογισμό με τα προηγούμενα συστήματα. Η μείωση του κλάσματος όγκου του PBLG οδηγεί σε πιο συμμετρικά συμπολυμερή, που παρουσιάζουν ισχυρότερο διαχωρισμό. Η αύξηση του θερμοδυναμικού πεδίου οδηγεί σε αύξηση του χαρακτηριστικού μήκους εμμονής της α-έλικας που αρχίζει τώρα να προσεγγίζει την «τέλεια» έλικα, σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα.



Εικ. 6.42. Λόγος των ενεργών διπολικών ροπών που αντιστοιχούν στον «αργό» και τον τμηματικό (α-) μηχανισμό της συστάδας PBLG σε όλα τα συμπολυμερή PBLG-b-PGLy, όπως και στο ομοπολυπεπίδιο PBLG. Για τον «αργό» χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση του Buckingham (3.14), ενώ για τον τμηματικό η εξίσωση Kirkwood-Fröhlich (3.12). Συγκρίνονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων από εξάτμιση διαλυμάτων σε DMF (ανοιχτά σύμβολα) και μ-κρεσόλη (κλειστά σύμβολα). Λόγω των μικρών διαφορών στο μοριακό βάρος της συστάδας PBLG (Πίνακας 3.3), έχει γίνει κανονικοποίηση με το μέσο βαθμό πολυμερισμού. Αν η έλικα του PBLG ήταν ιδανική, δηλαδή εντελώς άκαμπτη, ο λόγος έπρεπε να είναι σταθερός. Αντίθετα, παρατηρούμε ότι η τιμή του αυξάνεται έντονα με την αύξηση του κλάσματος όγκου της PGLy, δείχνοντας μερική εξαφάνιση των ατελειών. Η διακεκομμένη γραμμή διαχωρίζει τις περιοχές με διαφορετική μορφολογία. Το ομοπολυπεπίδιο PBLG₉₃ αντιστοιχεί στο σημείο με $f_{PBLG}=1.0$.

6.7 Συμπεράσματα

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάστηκαν αποτελέσματα σχετικά με την αυτο-οργάνωση σε διαφορετικά συμπολυμερή, που συνδυάζουν τις πολύπλοκες δευτεροταγείς δομές των βιολογικών μακρομορίων (πεπτιδίων) με την απλούστερη στατιστική φύση των συνθετικών μακρομορίων. Μελετήθηκε η δομή με έμφαση στην επίδραση του θερμοδυναμικού πεδίου που αναπτύσσεται κατά τον νανοφασικό διαχωρισμό στο μήκος εμμονής της α -έλικας. Γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν οι γνωστές «στατικές» τεχνικές ανάλυσης της δομής (είδος δευτεροταγούς δομής, μήκος συνοχής) με τη μέθοδο της ΔΦ (μήκος εμμονής α -ελίκων). Τα συστήματα που μελετήθηκαν ήταν: μια σειρά τρισυσταδικών συμπολυμερών PBLG-*b*-PEG-*b*-PBLG, μια σειρά τρισυσταδικών συμπολυμερών PBLG-*b*-PDMS-*b*-PBLG, μια σειρά δισυσταδικών συμπολυμερών PBLG-PGly, ένα δισυσταδικό συμπολυμερές PZLL-*b*-PBLG, ένα τρισυσταδικό συμπολυμερές PZLL-*b*-PBLG-*b*-PZLL και τα κυριότερα συμπεράσματα είναι:

1. Στα συστήματα PBLG-*b*-PDMS-*b*-PBLG και PBLG-*b*-PGly παρατηρείται νανοφασικός διαχωρισμός, ενώ στα PBLG-*b*-PEG-*b*-PBLG σε μικρότερο βαθμό και στα συμπολυμερή της PZLL με PBLG υπάρχει ανάμιξη. Ο διαχωρισμός ευνοείται από την αδυναμία σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συστάδων (το PEG σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου, ενώ το PDMS όχι) και από τη μεγάλη διαφορά στο μέγεθος των μονομερών (η Gly είναι πολύ μικρότερη από το BLG, ενώ η ZLL είναι σχεδόν όμοια σε μέγεθος).
2. Υπό την επίδραση ασθενούς θερμοδυναμικού πεδίου (ανάμιξη συστάδων) οι β -φυλλοειδείς δομές αποσταθεροποιούνται σε αντίθεση με τις α -έλικες, λόγω των ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου που δεν σπάνε το ίδιο εύκολα.
3. Το πλευρικό μήκος συνοχής των α -ελίκων μειώνεται δραστικά στα συμπολυμερή, αλλά αυτό δεν επηρεάζει το μήκος εμμονής.
4. Η επίδραση ισχυρού θερμοδυναμικού πεδίου (διαχωρισμός) οδηγεί σε έκταση των αλυσίδων και αύξηση του μήκους εμμονής των α -ελίκων.
5. Οι αλυσίδες που σχηματίζουν β -φύλλα (PGly) σε συμπολυμερή με πεπτιδία τα οποία φέρουν μεγάλες πλευρικές αλυσίδες αναδιπλώνονται πολλές φορές εντός των νανοφάσεων, για τη διατήρηση σταθερής πυκνότητας.
6. Στα συμπολυμερή με α -έλικες PZLL και PBLG υπάρχει ανάμιξη και σχηματίζεται ενιαίο εξαγωνικό πλέγμα.

7. Όπως ήταν αναμενόμενο, η ανάμιξη εμποδίζει την κρυστάλλωση των συστάδων (PEG, PDMS).
8. Η αύξηση του μήκους εμμονής στις περιπτώσεις ισχυρού διαχωρισμού (π.χ στα πιο συμμετρικά συμπολυμερή PBLG-*b*-PGly) είναι συγκρίσιμη με την αύξηση που προκαλείται από το ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο, όταν εφαρμόζεται σε υψηλή θερμοκρασία (Κεφ. 5).

Η μελέτη και άλλων συμπολυμερών πεπτιδίων με συνθετικά πολυμερή ή άλλα πεπτίδια αναμένεται να δώσει πολύ ενδιαφέροντα και, πιθανώς, μη αναμενόμενα αποτελέσματα.

Αναφορές

- [1] Muthukumar, M.; Ober, C. K.; Thomas, E. L. *Science* **277**, 1225 (1997).
- [2] Stupp, S. I.; Braun, P. V. *Science* **277**, 1242 (1997).
- [3] Euliss, L. E.; Grancharov, S. G.; O'Brien, S.; Deming, T. J.; Stucky, G. D.; Murray, C. B.; Held, G. A. *Nano Lett.* **3**, 1489 (2003).
- [4] Wong, M. S.; Cha, J. N.; Choi, K.-S.; Deming, T. J.; Stucky, G. D. *Nano Lett.* **2**, 583 (2002).
- [5] Cha, J. N.; Bartl, M. H.; Wong, M. S.; Popitsch, A.; Deming, T. J.; Stucky, G. D. *Nano Lett.* **3**, 907 (2003).
- [6] Hawkins, K. M.; Wang, S. S.; Ford, D. M.; Shantz, D. F. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9112 (2004).
- [7] Hamley, I. W. In *The Physics of Block Copolymers*; Oxford University Press: Oxford, U.K., 1998.
- [8] Hadjichristidis, N.; Pispas, S.; Floudas, G. In *Block Copolymers. Synthetic Strategies, Physical Properties and Applications*; J. Wiley & Sons Inc.: New York, 2002.
- [9] Douy, A.; Gallot, B. *Polymer* **23**, 1039 (1982).
- [10] Klok, H.-A.; Langenwaller, J.F.; Lecommandoux, S. *Macromolecules* **33**, 7819 (2000).
- [11] Babin, J. ; Rodriguez-Hernandez, J. ; Lecommandoux, S. ; Klok, H.-A. ; Achard, M.-F. *Faraday Discuss.* **218**, 1 (2004).
- [12] Schlaad, H.; Antonietti, M. *Eur. Phys. J. E* **10**, 17 (2003).
- [13] Schlaad, H.; Smarsly, B.; Losik, M. *Macromolecules* **37**, 2210 (2004).

- [14] Schlaad, H.; Kukulka, H.; Smarsly, B.; Antonietti, M.; Pakula T. *Polymer* **43**, 5321 (2002).
- [15] Minich, E.A.; Nowak, A.P.; Deming, T.J.; Pochana, D.J. *Polymer* **45**, 1951 (2004).
- [16] Wu, G.L.; Sun, P.C.; Lin, H.; Ma, J.B *J. Mol. Struct.* **689**, 143 (2004).
- [17] Deming, T. J. *Nature* **390**, 386 (1977).
- [18] Brzezinska, K. R.; Curtin, S. A.; Deming, T. J. *Macromolecules* **35**, 2970 (2002).
- [19] Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *Biomacromolecules* **5**, 1653 (2004).
- [20] Floudas, G.; Papadopoulos, P.; Klok, H.-A.; Vandermeulen, G. W. M.; Rodriguez-Hernandez, J. *Macromolecules* **36**, 3673 (2003).
- [21] Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *Biomacromolecules* **6**, 2352 (2005).
- [22] Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Schnell, I.; Lieberwirth, I.; Nguyen, T. Q.; Klok, H.-A. *Biomacromolecules* 2005 (*in press*).
- [23] Floudas, G.; Tsitsilianis, C. *Macromolecules* **30**, 4381 (1997).
- [24] Loo, Y.-L.; Register, R. A.; Ryan, A. J.; Dee, G. T. *Macromolecules* **34**, 8968 (2001).
- [25] Loo, Y.-L.; Register, R. A.; Ryan, A. J. *Macromolecules* **35**, 2365 (2002).
- [26] Schipper, F. J. M.; Floudas, G.; Pispas, S.; Hadjichristidis, N.; Pakula, T. *Macromolecules* **35**, 8860 (2002).
- [27] Kovacs, A. J.; Ginthier, A. *Kolloid Z. Z. Polym.* **250**, 530 (1972).
- [28] Scherrer, P. *Göttinger Nachrichten* (1918); Patterson, A. L. *Phys. Rev.* **56**, 978 (1939).
- [29] Mori, K.; Tanaka, H.; Hashimoto, T. *Macromolecules* **20**, 381 (1987).
- [30] Mayes, A. M.; de la Cruz, M. O. *J. Chem. Phys.* **91**, 7228 (1989).
- [31] Kamath, S.; Colby, R. H.; Kumar, S. K.; Karatasos, K.; Floudas, G.; Fytas, G.; Roovers, J. E. L. *J. Chem. Phys.* **111**, 6121 (1999).
- [32] Floudas, G.; Fytas, G.; Reisinger, T.; Wegner, G. *J. Chem. Phys.* **111**, 9129 (1999).
- [33] Zetsche, A.; Fischer, E. W. *Acta Polymer.* **45**, 168 (1994)
- [34] Kumar, S. K.; Colby, R. H.; Anastasiadis, S. H.; Fytas, G. *J. Chem. Phys.* **105**, 3777 (1996).
- [35] Lodge, T. P.; McLeish T. C. B. *Macromolecules* **33**, 5278 (2000).
- [36] Kania, C.M.; Nabizadeh, H.; McPhillimy, D.G.; Patsiga, R.A. *J. Appl. Polym. Sci.* **27**, 139 (1982).
- [37] Kumaki, T.; Sisido, M.; Imanishi, Y. *J. Biomed. Mater. Res.* **19**, 785 (1985).

- [38] Litvinov, V. M.; Barthel, H.; Weis, J. *Macromolecules* **35**, 4356 (2002).
- [39] Arrighi, V.; Higgins J.S.; Burgess, A.N.; Floudas, G. *Polymer* **39**, 6369 (1998).
- [40] Kirst, K.U.; Kremer, F.; Litvinov, V.M. *Macromolecules* **26**, 975 (1993).
- [41] Floudas, G.; Vazaiou, B.; Schipper, F.; Ulrich, R.; Wiesner, U.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *Macromolecules* **34**, 2947 (2001).
- [42] Semenov, A. N. *Sov. Phys. JETP* **61**, 733 (1985).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην εργασία αυτή έγινε η μελέτη της αυτο-οργάνωσης και της δυναμικής βιολογικών μακρομορίων (πολυπεπτιδίων). Ο σκοπός της εργασίας ήταν να απαντηθούν τα πιο κάτω ερωτήματα, για τα οποία υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα στη βιβλιογραφία.

1. Στις πρωτεΐνες και τα πεπτίδια γενικά παρατηρείται μια δυναμική μετάβαση («μετάβαση υάλου») σε ~ 200 K που συνδέεται άμεσα με τη βιολογική τους δράση (τα καθιστά ανενεργά). Η προέλευση αυτής της μετάβασης δεν έχει διευκρινιστεί. Ενώ υπάρχει συμφωνία για την παρουσία της σε ενυδατωμένα συστήματα, υπάρχει διάσταση απόψεων για τα ξηρά συστήματα. Επιπλέον, ορισμένες μελέτες σχετίζουν τη μετάβαση με κινήσεις πλευρικών αλυσίδων. Αποτελεί αυτή η μετάβαση ενδογενές χαρακτηριστικό των πεπτιδίων, ανεξάρτητα από το είδος της πλευρικής αλυσίδας και της δευτεροταγούς δομής (όπως στα συνθετικά μακρομόρια), και αν ναι, ποιες κινήσεις αντανακλά; Ποια θερμοδυναμική παράμετρος είναι υπεύθυνη για το πάγωμα των βαθμών ελευθερίας κίνησης στο T_g ;
2. Οι δευτεροταγείς δομές των πεπτιδίων, παρόλο που σταθεροποιούνται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς, θεωρούνται άκαμπτες. Υπάρχουν, ωστόσο, ορισμένα αποτελέσματα που δείχνουν αποκλίσεις από αυτή τη συμπεριφορά, υποδηλώνοντας ότι το μήκος εμμοής ζ των δευτεροταγών δομών είναι πεπερασμένο. Ποια είναι η τιμή του μήκους εμμοής και πώς εξαρτάται από το είδος του αμινοξέος, την ύπαρξη διαλυτών και από την εφαρμογή εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου;
3. Στις πρωτεΐνες συνυπάρχουν διαφορετικές δευτεροταγείς δομές στο ίδιο μόριο (α -έλικες, β -φύλλα, β -στροφές, άμορφα τμήματα κλπ.). Ποια είναι η επίδραση του θερμοδυναμικού πεδίου, του υπεύθυνου για το διαχωρισμό των διαφορετικών συστάδων σε συσταδικά συμπολυμερή πολυπεπτιδίων, στο είδος των δευτεροταγών δομών και στο μήκος εμμοής τους;

Για να απαντηθούν τα παραπάνω ερωτήματα χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές «στατικές» και «δυναμικές» τεχνικές, καθώς και μοντέλα συστημάτων πολυπεπτιδίων (ομοπολυμερών και συμπολυμερών). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι «στατικές» μέθοδοι $^{13}\text{C-NMR}$, SAXS,

WAXS, TEM, ΔΘΣ και POM και οι «δυναμικές» ΔΦ και ρεολογία. Για να απαντηθεί το πρώτο ερώτημα έγινε μελέτη ομοπολυπεπτιδίων με διαφορετική δευτεροταγή δομή, απουσία και παρουσία διαλύτη, καθώς και συναρτήσει της πίεσης και της θερμοκρασίας. Για το δεύτερο ερώτημα, έγινε υπολογισμός του μήκους εμμονής των α -ελίκων σε ξηρά πεπτίδια, με χρήση της διπολικής ροπής κατά μήκος της κύριας αλυσίδας (~ 3.5 Debye/μονομερές), ενώ μελετήθηκε και η επίδραση διαλύτη καθώς και ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου. Τέλος, για το τρίτο ερώτημα χρησιμοποιήθηκαν συσταδικά συμπολυμερή με πεπτίδια που συνδύαζαν α -ελικοειδή πεπτίδια με ημικρυσταλλικά ή άμορφα συνθετικά μακρομόρια, καθώς και συσταδικά συμπολυμερή με αποκλειστικά πεπτιδικές συστάδες, με την ίδια ή διαφορετική δευτεροταγή δομή. Τα κυριότερα συμπεράσματα είναι:

1. Ο συνδυασμός στατικών και δυναμικών μεθόδων έδειξε ότι η «μετάβαση υάλου» είναι ενδογενές χαρακτηριστικό των πεπτιδίων, ανεξάρτητα από τη δευτεροταγή δομή, τους πλευρικούς υποκαταστάτες και την ύπαρξη διαλύτη, σε αντίθεση με τα μέχρι τώρα δεδομένα της βιβλιογραφίας.
2. Σε διαλύματα πεπτιδίων παρατηρούνται δύο σημεία υάλου, αυτά του διαλύτη και του πεπτιδίου, σε αντίθεση με τα πρόσφατα αποτελέσματα προσομοιώσεων που δείχνουν ότι η δυναμική της πρωτεΐνης είναι συζευγμένη με τη δυναμική του διαλύτη.
3. Το σημείο υάλου έχει εξάρτηση τύπου Fox-Flory από το μοριακό βάρος, δείχνοντας τη σημασία των άκρων της αλυσίδας στη δυναμική και ότι η «μετάβαση» υάλου δεν οφείλεται σε κινήσεις πλευρικών αλυσίδων.
4. Το «πάγωμα» της δυναμικής οφείλεται κυρίως στη μείωση της θερμικής ενέργειας, παρά στην έλλειψη ελεύθερου όγκου.
5. Οι δευτεροταγείς δομές περιέχουν ατέλειες, δηλαδή σπασμένους δεσμούς υδρογόνου. Ο μηχανισμός χαλάρωσης που σχετίζεται με τη «μετάβαση» υάλου οφείλεται στο σπάσιμο και την αναδημιουργία δεσμών υδρογόνου.
6. Λόγω των ατελειών, σχηματίζονται διαπλοκές μεταξύ γειτονικών αλυσίδων στα σημεία με σπασμένους δεσμούς υδρογόνου, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η ροή του συστήματος, ακόμα και σε υψηλές θερμοκρασίες.
7. Η κίνηση των ιόντων είναι συζευγμένη με τη διάχυση των ατελειών.
8. Το μήκος εμμονής ξ των α -ελίκων σε ξηρά ομοπολυπεπτίδια είναι περίπου 2 nm, αυξανόμενο με την προσθήκη μικρής ποσότητας διαλύτη ή με την επίδραση ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου.
9. Το ασθενές θερμοδυναμικό πεδίο σε συσταδικά συμπολυμερή (ανάμιξη συστάδων)

αποσταθεροποιεί τις β -φυλλοειδείς δομές. Αυτό μπορεί να έχει ενδιαφέρουσες βιολογικές εφαρμογές σχετικές με τις ασθένειες που οφείλονται σε συσσωματώματα β -φυλλοειδών μορφών πρωτεϊνών (ασθένειες *prion*).

10. Αντίθετα, το ισχυρό θερμοδυναμικό πεδίο σε συσταδικά συμπολυμερή (διαχωρισμός φάσεων) οδηγεί σε έκταση των πεπτιδικών αλυσίδων και σε αύξηση του μήκους εμμόνης των α -ελίκων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ

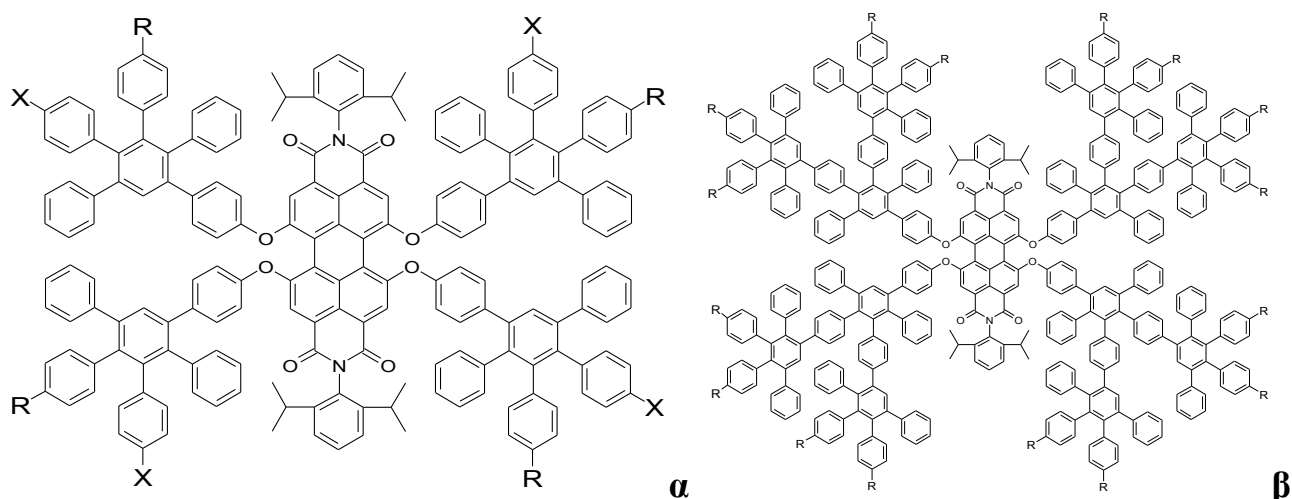
Παρόλο που σε αυτή την εργασία μελετήθηκε ένας αρκετά μεγάλος αριθμός διαφορετικών συστημάτων, τα ενδιαφέροντα αποτελέσματα ενθαρρύνουν τη συνέχιση της μελέτης της δυναμικής των πεπτιδίων, ιδιαίτερα σε συμπολυμερή.

Η σειρά δισυσταδικών συμπολυμερών PBLG-*b*-PGly, που παρουσιάστηκε εδώ, συνδυάζει συστάδες που σχηματίζουν α -έλικες με β -φύλλα, αλλά ορισμένα από τα αποτελέσματα, όπως ο μεγάλος αριθμός των αναδιπλώσεων της PGly, οφείλονται κυρίως στη διαφορά μεγέθους των μονομερών. Θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί ένα δισυσταδικό συμπολυμερές με διαφορετικές δευτεροταγείς δομές των συστάδων, αλλά μικρή διαφορά στο μέγεθος των μονομερών. Κατάλληλη για τέτοια μελέτη είναι μία σειρά συμπολυμερών PBLG-*b*-PTyr, που παρασκευάστηκε στο Τμ. Χημείας του Π. Α.

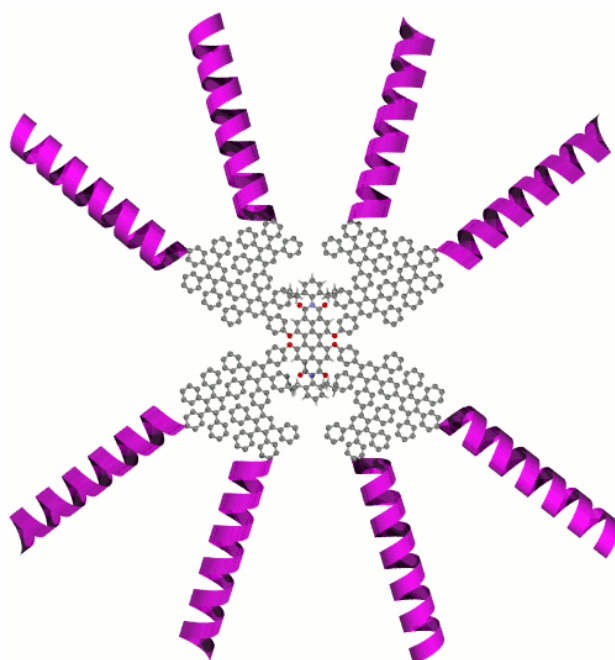
Η αναμιξιμότητα των συστάδων α -ελίκων πρέπει να ελεγχθεί και σε άλλα συστήματα εκτός από τα PZLL-*b*-PBLG και PZLL-*b*-PBLG-*b*-PZLL, με αμινοξέα που διαφέρουν περισσότερο μεταξύ τους. Στο εργαστήριό μας έχουμε ήδη ξεκινήσει τη μελέτη σε μια σειρά δισυσταδικών συμπολυμερών PBLG-*b*-PLEu, η σύνθεση των οποίων έγινε επίσης στο Π. Α.

Ενδιαφέροντα συστήματα, με πιθανές εφαρμογές στη φαρμακευτική (*drug delivery*), είναι τα δενδρομερή πολυφαινυλενίων που επιτρέπουν την προσθήκη μεγάλου αριθμού πεπτιδίων PZLL ή πολυ(L-λυσίνης) (PLys) στην επιφάνειά τους. Η σύνθεση των δενδρομερών έγινε στο Ινστιτούτο Max-Planck für Polymerforschung από την ομάδα του Klaus Müllen [1]. Οι εικ. 8.1 και 8.2 δείχνουν τη μοριακή δομή τους, με τον πυρήνα, που είναι φθορίζουσα χρωμοφόρος ομάδα (διμίδιο του περυλενίου – *PDI*), και τους κλάδους με φαινυλένια. Τα δενδρομερή είναι πρώτης και δεύτερης γενεάς, με μεταβαλλόμενο αριθμό πεπτιδίων πολυ(ε-καρβοβενζοξυ-L-λυσίνης) ή πολυ(L-λυσίνης) στην επιφάνεια. Το ενδιαφέρον είναι ότι συνδυάζουν πολλά είδη αλληλεπιδράσεων, όπως την τάση των πυρήνων με αρωματικούς δακτυλίους να σχηματίζουν σωρούς και την τάση των πεπτιδίων να οργανώνονται σε εξαγωνικό πλέγμα. Τα πρώτα αποτελέσματα σχετικά με την αυτο-οργάνωση δείχνουν ότι η δευτεροταγής δομή των πεπτιδίων είναι διαφορετική στα δενδρομερή από ότι σε ομοπολυπεπτίδια με ίδιο βαθμό πολυμερισμού, γεγονός που οφείλεται στην οργάνωση του πυρήνα. Αυτή η τάση για πολλαπλή οργάνωση (πυρήνας – πεπτίδια) έχει συνέπειες και στη δυναμική. Για

τη μελέτη της δυναμικής εκτός από τη ΔΦ χρησιμοποιείται και $^{13}\text{C-NMR}$, που μπορεί να δώσει πληροφορίες για τη δυναμική συγκεκριμένων ατόμων μέσα στο μόριο. Η τεχνική που χρησιμοποιείται είναι η REREDOR (*rotor-encoded rotational echo, double resonance*), που μπορεί να δώσει πληροφορίες για την κατανομή του προσανατολισμού των μορίων, αλλά και τη δυναμική τους [2].



Εικ. 8.1. Δομή δενδρομερών πολυφαινυλενίων (α) πρώτης και (β) δεύτερης γενεάς. Ο πυρήνας είναι διμίδιο του περυλενίου. Τα ομοπολυπεπτίδια βρίσκονται στην επιφάνεια (ομάδες R ή/και X).



Εικ. 8.2. Μοντέλο δενδρομερούς δεύτερης γενεάς (υπό κλίμακα). Δεν παρουσιάζονται οι πλευρικές αλυσίδες των πεπτιδίων.

Αναφορές

- [1] Mihov, G.; Grebel-Koehler, D.; Lübbert, A.; Vandermeulen, G. W. M.; Herrmann, A.; Klok, H.-A.; Müllen, K. *Bioconjugate Chem.* **16**, 283 (2005).
- [2] Fischbach, I; Ebert, F.; Spiess, H. W.; Schnell, I. *ChemPhysChem* **5**, 895 (2004).

CURRICULUM VITAE

PERIKLIS PAPADOPOULOS

PERSONAL

- Date of birth: 20/08/1979
- Place of birth: Ioannina, Greece
- Marital status: Single

EDUCATION

- Oct 2001-present: Postgraduate Physics Student, University of Ioannina, Greece (Thesis advisor: Assoc. Prof. G. Floudas)
- Sept 1997-July 2001: BSc Physics, University of Ioannina, Greece.

AWARDS AND HONORS

- Scholarship for postgraduate studies, Physics Dept., University of Ioannina, Greece.
- Graduation from Physics Dept. University of Ioannina, Greece (first among those entered in 1997).
- Participation and 1st prize in the “Advanced Physics Summer School”, Heraklion, Crete, July 2000.
- Recipient of Greek National Foundation Scholarships (IKY) awards (1997-2000).
- Participation in the XXIX International Chemistry Olympiad, Montreal, Quebec, Canada.
- Second place in the Greek National Student Chemistry Contest, April 1997.

PAPERS IN REFEREED JOURNALS

1. “Hierarchical self-assembly of poly(γ -benzyl-L-glutamate)-*b*-poly(ethylene glycol)-*b*-poly(γ -benzyl-L-glutamate) rod-coil-rod triblock copolymers”,
G. Floudas, **P. Papadopoulos**, H. -A. Klok, G.W.M. Vandermeulen, J. Rodriguez-Hernandez.
Macromolecules **2003**, *36*, 3673-3683.
2. “Self-Assembly and Dynamics of Poly(γ -benzyl-L-glutamate) Peptides”,
P. Papadopoulos, G. Floudas, H.-A. Klok, I. Schnell, T. Pakula. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 81-89.
3. “Molecular dynamics of oligofluorenes. A dielectric spectroscopy investigation”,
P. Papadopoulos, G. Floudas, C. Chi, G. Wegner.
J. Chem. Phys. **2004**, *120*, 2368-2374.
4. “Origin of Glass Transition of Poly(2-vinylpyridine). A Temperature- and Pressure-Dependent Dielectric Spectroscopy Study”,
P. Papadopoulos, D. Peristeraki, G. Floudas, G. Koutalas, N. Hadjichristidis
Macromolecules **2004**, *37*, 8116-8122.
5. ““Glass transition” in peptides. Temperature and pressure effects”,
P. Papadopoulos, G. Floudas, I. Schnell, H.-A. Klok, T. Aliferis, H. Iatrou, N. Hadjichristidis
J. Chem. Phys. **2005**, *122*, 224906.
6. “Nanodomain-induced chain folding in poly(γ -benzyl-L-glutamate)-*b*-polyglycine diblock copolymers”,

- P. Papadopoulos**, G. Floudas, I. Schnell, T. Aliferis, H. Iatrou, N. Hadjichristidis
Biomacromolecules **2005**, 6, 2352.
7. “Thermodynamic confinement and α -helix persistence length in poly(γ -benzyl-L-glutamate-*b*-poly(dimethyl siloxane)-*b*- poly(γ -benzyl-L-glutamate) triblock copolymers”
P. Papadopoulos, G. Floudas, I. Schnell, I. Lieberwirth, T. Q. Nguyen, H.-A. Klok
Biomacromolecules **2005** (*in press*)
8. “The role of temperature and density on the glass transition dynamics of glass-formers”
G. Floudas, K. Mpoukouvalas, **P. Papadopoulos**
J. Chem. Phys. (*submitted*)

OTHER PAPERS

- “Self-assembly and the associated Dynamics in PBLG-PEG-PBLG Triblock Copolymers”
P. Papadopoulos, G. Floudas
Adv. Study Inst., Kluwer Academic Publishers (2004)
- “Glass transition in Peptides. Temperature and Pressure effects”
P. Papadopoulos, G. Floudas, I. Schnell, H.-A. Klok, T. Aliferis, H. Iatrou, N. Hadjichristidis
PMSE Polymer Preprints (2005).
- “Polypeptide dynamics: glass “transition” and “broken” helices”
P. Papadopoulos, G. Floudas
Dielectric Newsletter **21**, Novocontrol GmbH (Issue Dec. 2005).

OTHER

- “Study of two-dimensional quantum systems with spin interactions” (supervisor: Prof. S.N. Evangelou, University of Ioannina, Greece).

RESEARCH INTERESTS

- Structure and dynamics of biological macromolecules.

PRESENTATIONS IN CONFERENCES

- XVIII Panhellenic Solid State Physics and Materials Conference, Heraklion, Crete 2002.
«Self-assembly in triblock peptide copolymers».
- Supernet 2003 Conference on “Complex Polymer Structures: Synthesis, Characterization and Modeling”, Sept. 6-11, 2003, Spa, Belgium.
“Hierarchical self-assembly of peptide-based block copolymers”.
- Advanced Research Workshop on Nonlinear Dielectric Phenomena in Complex liquids, May 10-14, 2003, Poland.
“Self-assembly and Dynamics in PBLG polypeptides”.
- EPF 2nd Summer School on “Nanostructured Polymer Materials”, May 25-30, 2003, Gargnano (BS), Italy.
“Structure and dynamics of poly(γ -benzyl-L-glutamate) oligopeptides”.
- XIX Panhellenic Solid State Physics and Material Science Conference, Sept. 21-24,

- 2003, Thessaloniki, Greece.
 “Structure and dynamics of poly(γ -benzyl-L-glutamate) oligopeptides”.
- f. “1st International Workshop on Dynamics in Viscous Liquids”, March 14-17, 2004, Munich, Germany.
 “Structure and dynamics of poly(γ -benzyl-L-glutamate) oligopeptides”.
- g. Faraday Discussion 128 on “Self-Organising Polymers”, July 19-21, 2004, Leeds, UK.
 “Structure and dynamics of poly(γ -benzyl-L-glutamate)-b-polyglycine diblock copolymers”.
- h. XX Panhellenic Solid State Physics and Material Science Conference, Sept. 26-29, 2004, Ioannina, Greece.
 “Structure and dynamics of poly(γ -benzyl-L-glutamate)-b-polyglycine diblock copolymers”.
- i. World Polymer Congress MACRO 2004, 40th International Symposium on Macromolecules, Paris (2004).
 “Hierarchical self-assembly of block copolymers based on peptides”
- j. Turkish-Greek-German Symposium on Polymer in Material Science and Biology, Istanbul (2004)
 “Self assembly and dynamics of block copolymers based on poly(γ -benzyl-L-glutamate) peptides”
- k. 229th ACS National Meeting, March 13-17, 2005, San Diego, CA, USA.
 ““Glass transition” in peptides. Temperature and pressure effects”.
- l. 5th International Discussion Meeting on Relaxations in Complex Systems (SIDMRCS), July 7-13, 2005, Lille, France.
 “Molecular dynamics of oligofluorenes: A dielectric spectroscopy investigation”
 ““Glass transition” in peptides. Temperature and pressure effects”
 “Effect of pressure on homopolymer and blend dynamics”

FOREIGN LANGUAGES

- a. Certificate of Proficiency in English, Cambridge University.
- b. Zertifikat Deutsch als Fremdsprache, Goethe Institut.