

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ



Εργαστήριο Βιοϋλικών

Διπλωματική εργασία: Γεωργιλής Ευάγγελος

**“Μελέτη Αυτο-οργάνωσης του Πεπτιδίου της
Διφαινυλαλανίνης και Υβριδίων του με Πορφυρίνες”**

Υπεύθυνη Καθηγήτρια: Αναπλ. Καθ. Άννα Μητράκη

Ηράκλειο 2013

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή αποτέλεσε την πρώτη μου επαφή με την έρευνα και μου προσέφερε πλήθος μοναδικών εμπειριών. Συνεπώς, είναι καθήκον μου αλλά και ευχαρίστηση να αναγνωρίσω τη συμβολή όλων των ανθρώπων οποίους οφείλω αυτή την ενδιαφέρουσα τροπή στη ζωή μου.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, Αναπλ. Καθ. Άννα Μητράκη για την εμπιστοσύνη και την στήριξη που έδειξε στο πρόσωπό μου, δίνοντάς μου την έμπνευση να συνεχίζω και να γίνομαι καλύτερος στις ακαδημαϊκές μου επιδόσεις.

Επίσης, υπήρξε σημαντική η συμβολή και των μελών του εργαστηρίου Αριάδνη Πριγκηπάκη, Ντίνα Τερζάκη, Μανώλη Κασωτάκη, Λία Αναγνωστοπούλου, Ρένα Ορنيθοπούλου, Ιωάννα Παπακυριακού, Graziano Deidda, οι οποίοι με ενέταξαν στο χώρο του εργαστηρίου και μου παρείχαν τις απαραίτητες επιστημονικές συμβουλές για να κάνω σωστά τα πειράματά μου, και παράλληλα τους ευχαριστώ για τις ευχάριστες στιγμές που περάσαμε.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τους συνεργάτες: από το Τμήμα Χημείας Καθ. Αθανάσιο Κουτσολέλο, Γιώργο Χαραλαμπίδη και Κωνσταντίνο Καρίκη, από το Τμήμα Εφαρμοσμένων Μαθηματικών τους Επικ. Καθ. Ευάγγελο Χαρμανδάρη και Επικ. Καθ. Αναστασία Ρισσάνου, και από την ομάδα Self Assembly της nanoGUNE τους Καθ. Alexander Bittner, Wiwat Nuansing και Aitziber Eleta, για την άψογη συνεργασία μαζί τους καθώς και τις όμορφες στιγμές.

Φυσικά, θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας του Τμήματος Βιολογίας Αλεξάνδρα Σιάκουλη, Αλέκα Μανουσάκη και Στέφανο Παπαδάκη για τη σκληρή δουλειά τους στην παρατήρηση των δειγμάτων μου στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω θερμά τους φίλους μου, που με την ψυχολογική τους στήριξη και τις ευχάριστες στιγμές μας έκαναν τη ζωή μου ομορφότερη και μου έδωσαν τη δύναμη να συνεχίζω απτόητος σε ό,τι επιθυμώ να κάνω.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς και συγγενείς μου για την ψυχολογική και υλική τους στήριξη, καθώς επίσης και για την απεριόριστη αγάπη που μου δείχνουν. Εύχομαι πάντα να τους κάνω υπερήφανους και ευτυχισμένους.

Η εργασία αυτή είναι αφιερωμένη στο θείο μου Κωνσταντίνο Βλαστό και στη γιαγιά μου Ελένη Γεωργιλή των οποίων η απώλεια είναι παραπάνω από αισθητή και δεν κατάφεραν να με δουν με το πτυχίο μου.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	4
1.1 Σκοπός.....	4
1.2 Θεωρητικό Μέρος.....	5
1.2.1 Αναδίπλωση πρωτεϊνών.....	5
1.2.2 Αμυλοειδή ινίδια.....	7
1.2.3 Το πεπτιδίο FF.....	10
1.2.4 Πορφυρίνες.....	11
Κεφάλαιο 2: Τεχνικές	13
2.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (S.E.M.).....	13
2.2 Περίθλαση Ακτίνων X (XRD).....	13
2.3 Μικροσκοπία AFM.....	14
2.4 Electrospinning.....	14
2.5 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FTIR).....	15
Κεφάλαιο 3: Δομές Πεπτιδίου Διφαινυλαλανίνης (FF)	16
3.1 Θεωρητικό Υπόβαθρο.....	16
3.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	16
3.2.1 Αυτο-οργάνωση του πεπτιδίου FF σε σύστημα ενός διαλύτη.....	16
3.2.2 Δείγματα μετά από εξάτμιση του HFIP.....	17
3.2.3 Αυτο-οργάνωση του FF σε νερό και μεθανόλη υπό όμοιες συνθήκες.....	18
3.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	19
3.3.1 Αυτο-οργάνωση του πεπτιδίου FF σε σύστημα ενός διαλύτη.....	19
3.3.2 Δείγματα μετά από εξάτμιση του HFIP.....	25
3.3.3 Αυτο-οργάνωση του FF σε νερό και μεθανόλη υπό όμοιες συνθήκες.....	26
Κεφάλαιο 4: Δομές Υβριδίων Διφαινυλαλανίνης-Πορφυρίνης	30
4.1 Θεωρητικό Υπόβαθρο.....	30
4.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	30
4.2.1 Αυτο-οργάνωση εναντιομερών των υβριδίων.....	30
4.2.2 Αυτο-οργάνωση εναντιομερών των υβριδίων χωρίς τη χρήση (1,1,1,3,3,3)εξαφθοροισοπροπανόλης (HFIP).....	31
4.2.3 Αυτο-οργάνωση υβριδίων με ελεύθερο καρβοξυτελικό άκρο.....	31
4.2.4 Μείγματα υβριδικών πεπτιδίων.....	32
4.2.5 Ίνες υβριδικού πεπτιδίου με τη μέθοδο Electrospinning.....	33
4.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	35
4.3.1 Αυτο-οργάνωση εναντιομερών των υβριδίων.....	35
4.3.2 Αυτο-οργάνωση εναντιομερών των υβριδίων χωρίς τη χρήση (1,1,1,3,3,3)εξαφθοροισοπροπανόλης (HFIP).....	36
4.3.3 Αυτο-οργάνωση υβριδίων με ελεύθερο καρβοξυτελικό άκρο.....	39
4.3.4 Μείγματα υβριδικών πεπτιδίων.....	42
4.3.5 Ίνες υβριδικού πεπτιδίου με τη μέθοδο Electrospinning.....	45
Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα	53
Κεφάλαιο 6: Ευρετήριο	55
6.1 Λίστα αναφορών.....	55

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Σκοπός

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία διεκπεραιώθηκε στο Εργαστήριο Βιοϋλικών του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών του Πανεπιστημίου Κρήτης και εστιάζεται στην αυτο-οργάνωση πεπτιδίων διφαινυλαλανίνης και των υβριδίων τους με πορφυρίνες.

Τα βιομόρια είναι μία κατηγορία υλικών πολλά υποσχόμενη για τη δημιουργία αυτο-οργανωμένων νανοδομών. Εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση και ακρίβεια στις αλληλεπιδράσεις και χημικές τους ιδιότητες, καθώς επίσης μεγάλη ευκολία στη ρύθμιση των χαρακτηριστικών αυτών ώστε να επιτελούν μία επιθυμητή λειτουργία. Τα προτερήματα αυτά τα καθιστούν ιδανικά για ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών σε επιστημονικά πεδία όπως η υπερμοριακή χημεία, η επιστήμη υλικών, η μικροηλεκτρονική και η μηχανική ιστών.

Επίκεντρο της εργασίας είναι η αυτο-οργάνωση πεπτιδίων σε αμυλοειδή ινίδια και ο συνδυασμός τους με πορφυρίνες. Τα αμυλοειδή ινίδια είναι μία κατηγορία αυτο-οργάνωσης πρωτεϊνών η οποία συναντάται σε ασθένειες όπως οι νόσοι Alzheimer και Huntington. Εκτός από παθολογικές, τα αμυλοειδή ινίδια συναντώνται σε αυγά εντόμων όπως το έντομο *Chrysopa*, όπου η ίνα χρησιμεύει για προστασία από θύτες. Οι πορφυρίνες, είναι χρωμοφόρα μόρια που συναντώνται στις ομάδες αίμης της αιμοσφαιρίνης και δεσμεύουν το σίδηρο στο αίμα. Οι φωτο-ηλεκτρονικές τους ιδιότητες τις θέτουν πολύ ενδιαφέρουσες στην έρευνα για αποτελεσματικούς φωτοευαίσθητοποιητές σε φωτοβολταϊκές διατάξεις.

Πρώτος στόχος της εργασίας είναι η πειραματική επιβεβαίωση της θεωρητικής πρόβλεψης για ελκτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων διφαινυλαλανίνης σε διαλύτη νερό, οδηγώντας στη δημιουργία αυθόρμητα αυτο-οργανωμένων δομών, και απωστικές αλληλεπιδράσεις σε διαλύτη μεθανόλη που δεν ευνοούν τη δημιουργία καλά οργανωμένων δομών.

Δεύτερος στόχος είναι η δημιουργία αυτο-οργανωμένων δομών από υβριδικά πεπτίδια διφαινυλαλανίνης-(τετραφαινυλο)πορφυρίνης (FF-TPP) ώστε να δημιουργηθούν φωτοευαίσθητα οργανικά ηλιακά κύτταρα με το βιολογικό μέρος να λειτουργεί ως εκμαγείο.

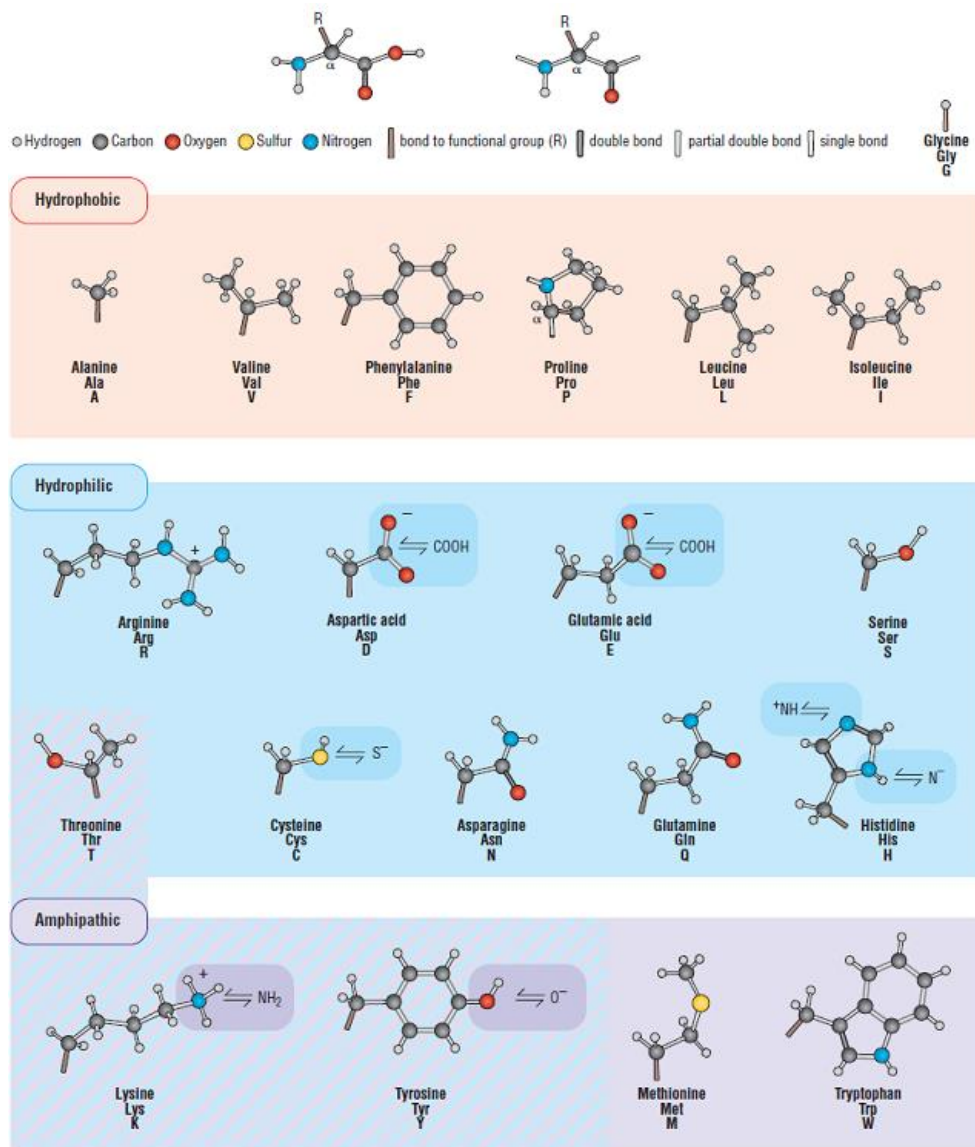
Τα δείγματα παρατηρήθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (S.E.M.) για δομικό χαρακτηρισμό. Επιπροσθέτως σε μία σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε περίθλαση ακτίνων-X (XRD), φασματοσκοπία FTIR, φασματοσκοπία Raman και μικροσκοπία A.F.M..

Συνολικά, η μελέτη δείχνει τις δυνατότητες του πεπτιδίου της διφαινυλαλανίνης να σχηματίζει δομές σε ένα σύνολο διαλυτών και τα υβρίδια διφαινυλαλανίνης-πορφυρίνης να σχηματίζουν δομές με δυνατότητες μεταφοράς ενέργειας.

1.2 Θεωρητικό Μέρος

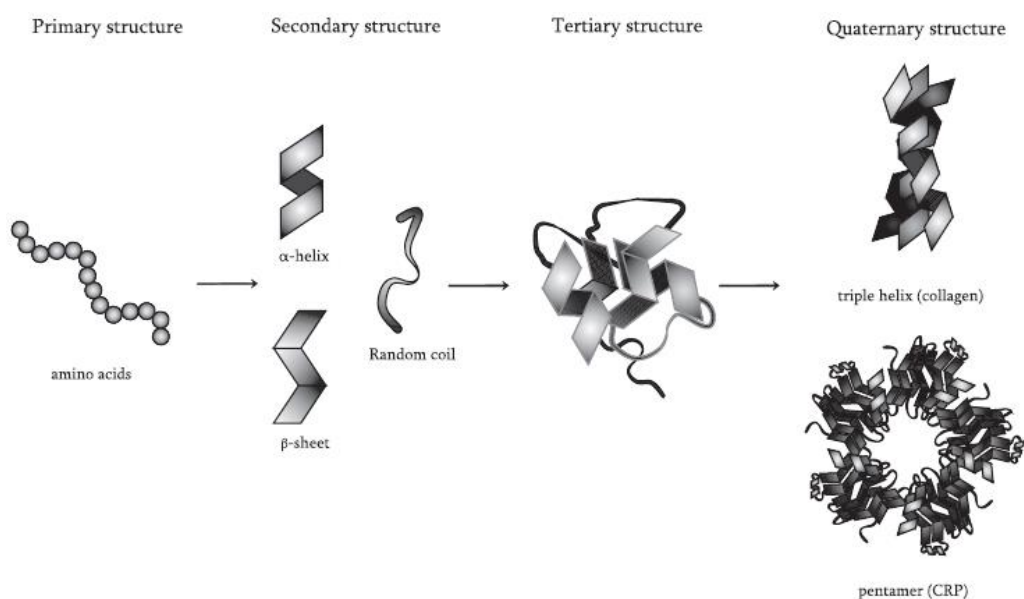
1.2.1 Αναδίπλωση πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες είναι γραμμικά πολυμερή αμινοξέων (Εικόνα 1), τα οποία κωδικοποιούνται από το γονίδιο που καθορίζει την αλληλουχία τους, μέσω της μετάφρασης του mRNA. Οι πρωτεΐνες αναδιπλώνονται συνήθως αυθόρμητα σε πιο συμπαγείς τρισδιάστατες δομές. Η αναδίπλωση κάποιες φορές μπορεί να υποβοηθάται από άλλες πρωτεΐνες, τις σαπερόνες, αλλά οι περισσότερες πρωτεΐνες μπορούν να ξεδιπλωθούν και να αναδιπλωθούν σε αραιό διάλυμα, υποδεικνύοντας ότι η από μόνη της η αλληλουχία της πρωτεΐνης είναι ικανή και αναγκαία συνθήκη για την αναδίπλωσή της^[1].



Εικόνα 1: Πάνω: Η δομή ενός αμινοξέος αδέσμευτου (αριστερά) και δεσμευμένου σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα (δεξιά). Κάτω: Οι πλευρικές ομάδες των αμινοξέων κατηγοριοποιημένες σε υδρόφοβες (hydrophobic), υδρόφιλες (hydrophilic) και αμφιπαθείς (amphipathic). (Petsko, Protein

Τα αμινοξέα συνδέονται μεταξύ τους με αμιδικούς (πεπτιδικούς) δεσμούς για να σχηματίσουν πολυπεπτιδικές αλυσίδες (πρωτοταγής δομή). Στη φύση, η διαδικασία αυτή γίνεται στο ριβόσωμα και χρησιμοποιούνται τα L εναντιομερή των αμινοξέων. Στη συνέχεια, η πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να αναδιπλώνεται σε κανονικές δομές όπως οι α-έλικες, οι β-πτυχώσεις, οι στροφές και οι θηλιές (δευτεροταγής δομή). Τα δομικά στοιχεία της δευτεροταγούς δομής αναδιπλωμένα στο χώρο δημιουργούν μία συμπαγή δομή (τριτοταγής δομή). Επιπλέον, για πρωτεΐνες που αποτελούνται από περισσότερες από μία πολυπεπτιδικές αλυσίδες εμφανίζεται η τεταρτοταγής δομή όπου τα ανεξάρτητα πολυπεπτιδία που συγκροτούν την πρωτεΐνη (υπομονάδες) αλληλεπιδρούν και συγκρατούνται κυρίως με μη ομοιοπολικούς δεσμούς.^[2] (Εικόνα 2)

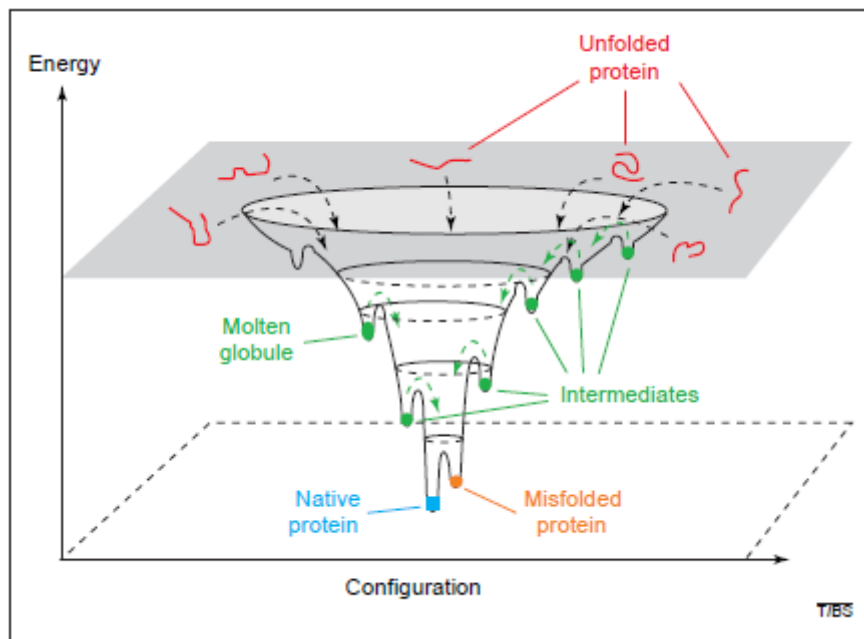


Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των δομικών στοιχείων των πρωτεϊνών. Herczenik and Gebbink, FASEB Journal, Vol. 22, 2008, 2115-2133

Η διαδικασία αναδίπλωσης μπορεί να γίνει γρήγορα, αλλά υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία ότι μπορούν να συμμετέχουν μία ή περισσότερες μερικώς αναδιπλωμένες ενδιάμεσες καταστάσεις παροδικά κατά την πορεία στην τελική δομή. Σημαντικό στάδιο στο μονοπάτι αναδίπλωσης είναι η μετάπτωση σε μία μερικώς οργανωμένη σφαιρική κατάσταση γνωστή ως «εύπλαστη σφαίρα». Το στάδιο αυτό είναι γρήγορο και εμπεριέχει το μεγαλύτερο μέρος της δευτεροταγούς δομής και σε μερικές περιπτώσεις οι α-έλικες και οι β-πτυχώσεις κατέχουν τις ίδιες θέσεις που κατέχουν και στη φυσική κατάσταση.

Η αναδιπλωμένη κατάσταση μίας πρωτεΐνης είναι ενεργειακά ευνοϊκότερη από την αποδιπλωμένη, με μικρή ενεργειακή διαφορά (5-15 kcal/mol). Σε αυτή την κατάσταση συμβάλλουν οι χημικές αλληλεπιδράσεις όπως οι δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ καταλοίπων κυστεΐνης, οι γέφυρες άλατος, οι δεσμοί υδρογόνου, οι μεγάλοι εύρους ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και οι

αλληλεπιδράσεις Van der Waals. Σημαντικό είναι επίσης υδρόφοβο φαινόμενο, που οδηγεί τα υδρόφοβα αμινοξέα στο εσωτερικό των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών, ενώ για τις πρωτεΐνες σε υδρόφοβο περιβάλλον (π.χ. μεμβράνες) εμφανίζεται αντίθετη κατανομή αμινοξέων.^[1,3] (Εικόνα 3)



Εικόνα 3: Το τρισδιάστατο ενεργειακό τοπίο που ακολουθεί μία αποδιπλωμένη πρωτεΐνη (unfolded protein) στην πορεία της από ενδιάμεσα στάδια (intermediates) για να φτάσει στην σωστά διπλωμένη ή λανθασμένα διπλωμένη μορφή (native protein και misfolded protein αντίστοιχα). Σημαντικό ενδιάμεσο στάδιο η δομή της «εύπλαστης σφαίρας» (molten globule). S. E. Radford, TIBS, 2000, 611-618.

Οι πρωτεΐνες, στην πορεία για να φτάσουν στη φυσική τους κατάσταση, περνούν από ενεργειακά ενδιάμεσα τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε λανθασμένη διαμόρφωση. Ο εγκλωβισμός σε ένα τέτοιο ενεργειακό ενδιάμεσο αποτελεί μία ενδογενή τάση των πρωτεϊνών. Η λανθασμένη αναδίπλωση εξαρτάται από την αμινοξική αλληλουχία και η διαδικασία επιταχύνεται από συγκεκριμένες μεταλλάξεις. Επιπλέον επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως αύξηση της θερμοκρασίας, υψηλό/χαμηλό pH, αναταραχή (agitation), υψηλά ποσοστά γλυκόζης, οξειδωτικούς παράγοντες κλπ. Ο εγκλωβισμός σε τέτοια ενεργειακά ενδιάμεσα συνδέεται συχνά με το σχηματισμό συσσωματωμάτων των πρωτεϊνών.^[4]

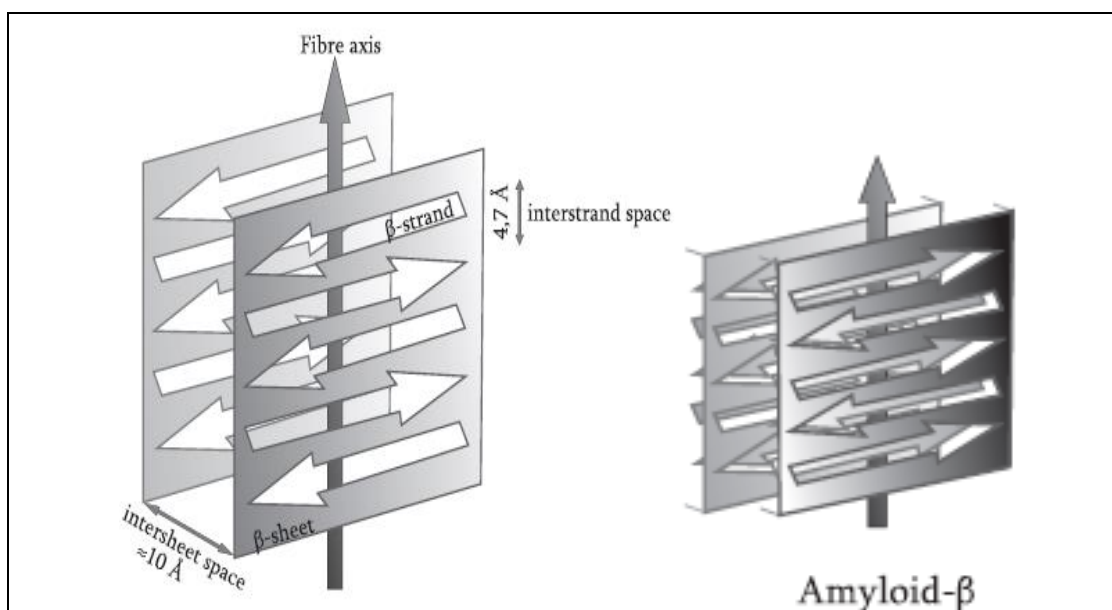
1.2.2 Αμυλοειδή ινίδια

Σημαντικά παραδείγματα συσσωμάτωσης πρωτεϊνών είναι τα σωματίδια εγκλεισμού (inclusion bodies) και τα αμυλοειδή ινίδια.

Τα σωματίδια εγκλεισμού είναι συχνό αποτέλεσμα της υπερέκφρασης μίας ετερόλογης πρωτεΐνης σε βακτήρια όπως η E.coli. Είναι άμορφα συσσωματώματα, αρκετά πορώδη, τα οποία

αποτελούνται κατά 70-95% από την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Επίσης, διατηρούν σε μεγάλο ποσοστό στοιχεία της δευτεροταγούς δομής και τη βιολογική τους ενεργότητα.

Τα αμυλοειδή ινίδια από την άλλη, είναι μεγάλου μήκους ραβδοειδείς δομές που αποτελούνται από παράλληλες ή αντιπαράλληλες β-πτυχώσεις κάθετες στον άξονα της ίνας, με απόσταση μεταξύ των πτυχώσεων 4,7Å και απόσταση μεταξύ των πτυχωτών φύλων περίπου 10Å (Εικόνα 4). Και οι δύο μορφές συσσωμάτωσης καθοδηγούνται από εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνικών αλυσίδων. Σημαντικό στάδιο για την έναρξή τους είναι ο σχηματισμός πυρήνα από αλληλουχίες που προκαλούν συσσωμάτωση γύρω από τον οποίο σχηματίζεται η δομή. Ως υλικά, εμφανίζουν μεγάλη μηχανική και χημική σταθερότητα· είναι ανθεκτικά στην αύξηση θερμοκρασίας και στην παρουσία τασιενεργών και αποδιατακτικών μέσων. [5,6]



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της δομής ενός αμυλοειδούς ινιδίου (αριστερά) και των αμυλοειδών πλακών του Αβ πεπτιδίου της νόσου Alzheimer (δεξιά). Οι β-πτυχώσεις στο συγκεκριμένο σχήμα είναι αντιπαράλληλες. Herczenik and Gebbink, FASEB Journal, Vol. 22, 2008, 2115-2133

Τα αμυλοειδή ινίδια έχουν αρκετά μεγάλη σημασία όσον αφορά της ανθρώπινες ασθένειες. Συναντώνται σε πληθώρα νόσων, όπως νευροεκφυλιστικές νόσοι Huntington και Alzheimer (Πίνακας 1).

Disease	Associated proteins	Affected tissues
Amyloidosis—systemic		
Primary systemic amyloidosis	Ig light chain	Most tissues
Ig heavy-chain-associated amyloidosis	Ig heavy chain	Most tissues
Secondary (reactive) systemic amyloidosis	SAA	Most tissues
Senile systemic amyloidosis	Transthyretin	Microvasculature
Hemodialysis-related amyloidosis	β_2 -Microglobulin	Osteoarticular tissues
Hereditary systemic ApoAI amyloidosis	ApoA-I	Liver, kidney, heart
Hereditary systemic ApoAII amyloidosis	ApoA-II	Kidney, heart
Finnish hereditary amyloidosis	Gelsolin	Most tissues
Hereditary lysozyme amyloidosis	Lysozyme	Kidney, liver
Hereditary cystatin C amyloid angiopathy	Cystatin C	Most tissues
Amyloidosis—localized		
Injection-localized amyloidosis	Insulin	Skin, muscles
Hereditary renal amyloidosis	Fibrinogen	Kidney
Senile seminal vesicle amyloid	Lactoferrin, seminogelin	Seminal vesicles
Familial subepithelial corneal amyloidosis	Lactoferrin	Cornea
Cataract	Crystallin	Eye
Medullary thyroid carcinoma	Calcitonin	Thyroid tissues
Neurodegenerative diseases		
Alzheimer's disease	Amyloid- β , tau	Brain
Parkinson's disease	α -Synuclein	Brain
Lewy-body dementia	α -Synuclein	Brain
Huntington's disease	Huntington	Brain
Spongiform encephalopathies	Prion	Brain, peripheral nervous system
Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis	Cystatin C	Cerebral vasculature
Amyotrophic lateral sclerosis	Superoxide dismutase 1	Brain
Familial British dementia	Abri	Brain
Familial Danish dementia	ADan, amyloid- β	Brain
Familial amyloidotic polyneuropathy	Transthyretin	Peripheral nervous system
Frontotemporal dementias	Tau	Brain
Other diseases		
Diabetes mellitus	IAPP, amylin	Pancreas (islet)
Atherosclerosis	Modified LDL	Arteries
Sickle cell anemia	Hemoglobin	Erythrocytes

Πίνακας 1: Ασθένειες που προκαλούνται λόγω αμυλοείδωσης, οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε αυτήν και οι ιστοί που πλήττονται. . Herczenik and Gebbink, FASEB Journal, Vol. 22, 2008, 2115-2133

Η νόσος του Huntington προκαλείται όταν στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη huntingtin η αλληλουχία νουκλεοτιδίων CAG επαναλαμβάνεται σε πάνω από 35 επαναλήψεις, ενώ οι φυσιολογικές επαναλήψεις είναι από 16 έως 20. Αυτή η επανάληψη της αλληλουχίας κωδικοεύει μία μακριά αλληλουχία πολυ-γλουταμίνης στο αμιντελικό άκρο της huntingtin, η οποία καθοδηγεί τη συσσωμάτωσή της σε τοξικές αμυλοειδείς ίνες.^[7]

Στη νόσο Alzheimer, το πεπτιδίο amyloid- β ($A\beta$) με μήκος 40-42 αμινοξέων παράγεται από το κόψιμο της πρωτεΐνης Amyloid Precursor Protein (APP) και αυτο-οργανώνεται σε πλάκες αμυλοειδών ινιδίων στον εγκέφαλο των ασθενών^[4] (Εικόνα 4). Κρίσιμη αλληλουχία αναγνώρισης για την αυτο-οργάνωση των αμυλοειδών πλακών του πεπτιδίου $A\beta$ είναι η αλληλουχία KLVFFAE^[8].

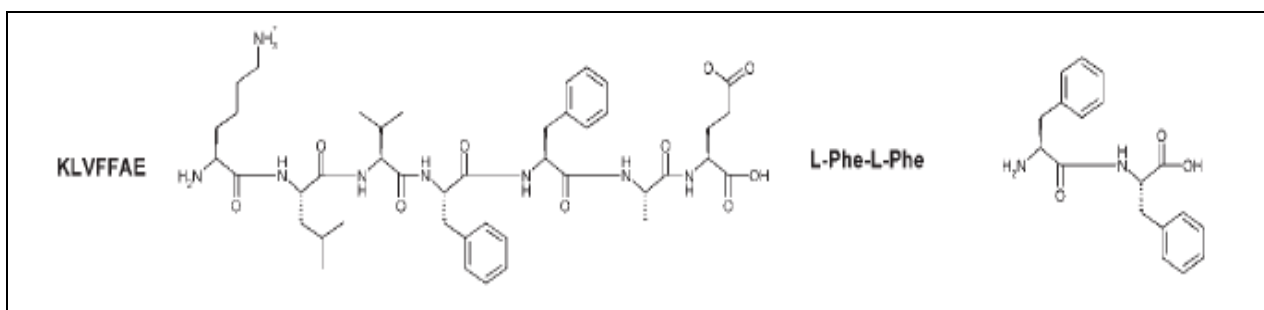
Βέβαια, τα αμυλοειδή ινίδια στη φύση δε συναντώνται μόνο ως αίτια παθογενειών. Το χόριο αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του κελύφους των αυγών του μεταξοσκώληκα. Οι πρωτεΐνες του χορίου έχουν τη δυνατότητα να αυτο-οργανώνονται σε αντιπαράλληλες συστραμμένες β -πτυχώσεις (β -έλικες), υποδεικνύοντας ότι το χόριο αποτελείται από αμυλοειδή ινίδια, παρέχοντας προστασία στο ωοκύτταρο και το έμβρυο του μεταξοσκώληκα^[9]. Άλλο ένα παράδειγμα αποτελεί το στέλεχος που συγκρατεί το αυγό του εντόμου *Chrysopa Flava*, το οποίο αποτελείται από αμυλοειδείς πλάκες,

προστατεύοντας το αυγό από θύτες^[5].

1.2.3 Το πεπτίδιο FF

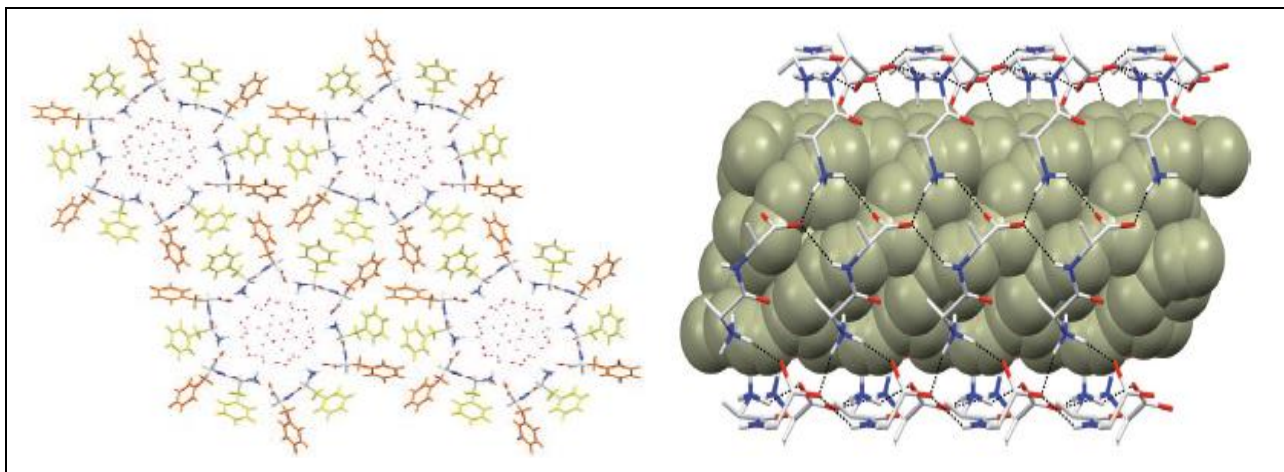
Τα αμυλοειδή ινίδια έχουν εμπνεύσει την έρευνα ώστε να κινηθεί προς τη δημιουργία βιολογικών νανοδομών από πεπτίδια που αυτο-οργανώνονται με σκοπό να βρεθούν εφαρμογές τους σε πλήθος τομέων όπως η νανοτεχνολογία, η υπερμοριακή χημεία και η βιοϊατρική^[10]. Διαθέτουν το πλεονέκτημα ως υλικά να διατάσσονται σε ιεραρχημένες δομές με μεγάλη ακρίβεια και υψηλή λειτουργικότητα. Το μοντέλο της αυτο-οργάνωσής τους είναι bottom-up και έχει το χαρακτηριστικό ότι τα μόρια συνθέτουν μία δομή ένα προς ένα, μέσω εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων. Αντίθετα, στο μοντέλο top-down χρειάζεται να ξεκινήσει κανείς από ένα κομμάτι σύνθετου ή ογκώδους υλικού το οποίο πρέπει σταδιακά να τροποποιεί για να φτάσει στην επιθυμητή δομή.^[11]

Το πεπτίδιο Αβ της νόσου Alzheimer, διαθέτει στην κεντρική αλληλουχία αναγνώρισης KLVFFAE δύο κατάλοιπα φαινυλαλανίνης (FF) (Εικόνα 5). Χρησιμοποιώντας αυτό το διπεπτίδιο, βρέθηκε ότι μπορεί να αυτο-οργανώνεται σε νανοσωλήνες σε υδατικό διάλυμα. Οι νανοσωλήνες αυτοί διαθέτουν υψηλό μέτρο ελαστικότητας (~20GPa) και έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί σε καινοτόμες εφαρμογές. Σημαντικό παράδειγμα μιας τέτοιας εφαρμογής είναι η χρήση τους ως εκμαγεία για την παραγωγή μεταλλικών νανο-καλωδίων διαμέτρου ~20nm.^[12]



Εικόνα 5: Η αλληλουχία KLVFFAE (αριστερά) και το πεπτίδιο FF (δεξιά). S. Gilead, E.Gazit, *Supramolecular Chemistry*, Vol. 17, 2005, 87-92

Οι κύριες δυνάμεις που καθοδηγούν τη δημιουργία των νανοσωλήνων είναι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, πιθανώς η π - π^* στοίβαξη των αρωματικών ομάδων παράλληλα στον άξονα του νανοσωλήνα και οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ οξυγόνων της καρβοξυλομάδας και υδρογόνων της αμινομάδας του πεπτιδικού σκελετού, κεκλιμένοι ως προς τον άξονα.^[12,13] Ως αποτέλεσμα, οι νανοσωλήνες συγκρατώνται από ένα πολύπλοκο δίκτυο δεσμών (Εικόνα 6) το οποίο πιθανώς να εξηγεί το υψηλό μέτρο ελαστικότητας και την υψηλή θερμική σταθερότητα^[14], ενώ παράλληλα εγείρει την προσοχή για το πλήθος δομών που μπορεί να δώσει το πεπτίδιο επηρεάζοντας αυτές τις παραμέτρους.



Εικόνα 6: Κρυσταλλική δομή των νανοσωλήνων FF. Αριστερά: κάτοψη του νανοσωλήνα όπου φαίνεται η διαρρύθμιση με τις αρωματικές ομάδες στο εξωτερικό ενώ ο πεπτιδικός σκελετος στο εσωτερικό δημιουργεί ένα κανάλι ικανό να φιλοξενήσει μόρια νερού. Δεξιά: πλάγια όψη του νανοσωλήνα όπου φαίνονται οι δεσμοί υδρογόνου με διακεκομμένες γραμμές και τα μόρια νερού με γκρί χρώμα στο εσωτερικό (παραλείπονται οι αρωματικές ομάδες για ευκρίνεια). C. H. Görbitz, Chemistry-A European Journal, Vol. 13, 2007, 1022-1031

Πέρα από τα διαλύματα νερού, το πεπτίδιο της διφαινυλαλανίνης μπορεί να δώσει δομές σε αρκετούς οργανικούς διαλύτες όπως το ακετονιτρίλιο, τη μεθανόλη, την αιθανόλη κ.ά.^[14], υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ένα αρκετά ανθεκτικό μόριο. Ένα ακόμα στοιχείο που ενισχύει τα δεδομένα για την ανθεκτικότητά του είναι ότι μπορεί να υποστεί διαδικασίες όπως η εναπόθεση ατμών^[10] (vapor deposition) σε θερμοκρασία 200°C.

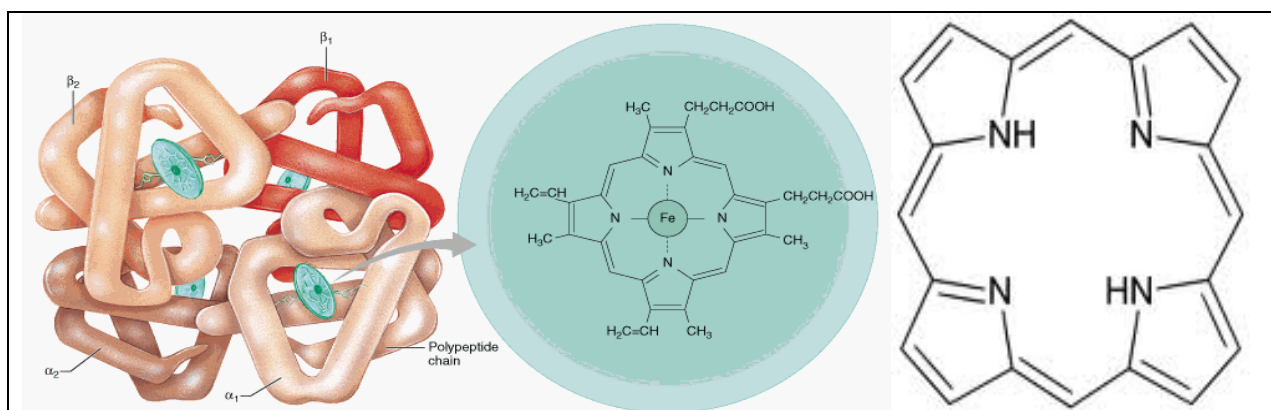
Συνηθισμένο πρωτόκολλο παρασκευής δομών του FF αλλά και τροποποιημένων ανάλογων μορίων του, είναι η πρώιμη διαλυτοποίησή του σε ένα χαοτροπικό διαλύτη σε υψηλές συγκεντρώσεις πριν την προσθήκη του διαλύτη ενδιαφέροντος. Για παράδειγμα σε ένα δείγμα νερού, το πεπτίδιο διαλύεται σε 1,1,1,3,3,3-εξαφθοροϊσοπροπανόλη (HFIP) σε συγκεντρώσεις 50 ή 100mg/mL και προστίθεται σε αυτό νερό καταλήγοντας σε τελική συγκέντρωση της τάξης του 1-10mg/mL. Βέβαια, η χημική και μηχανική σταθερότητα του μορίου επιτρέπει και άλλους τρόπους επεξεργασίας για την παρασκευή δομών, όπως για παράδειγμα τη θέρμανση ακολουθούμενη από ψύξη^[15,16] ή το ηλεκτρικό πεδίο^[17].

Συνδυάζοντας τις παραπάνω ιδιότητες, καταλήγουμε ότι το πεπτίδιο της διφαινυλαλανίνης είναι πολλά υποσχόμενο για την παρασκευή σταθερών, δυναμικά βιοσυμβατών δομών^[18] που μπορούν να συνδυαστούν με άλλα οργανικά ή ανόργανα υλικά^[15] για να επιτελέσουν επιθυμητές λειτουργίες.

1.2.4 Πορφυρίνες

Η πορφυρίνες είναι ένα οργανικά μακροκυκλικά μόρια τα οποία συναντώνται στη φύση στις

ομάδες αίμης της αιμογλοβίνης δεσμεύοντας το σίδηρο στο αίμα (Εικόνα 7), καθώς επίσης και στις ομάδες της χλωροφύλλης των φυτών συμμετέχοντας σε φωτοχημικές αντιδράσεις.



Εικόνα 7: Αριστερά: Τετραμερές της αιμοσφαιρίνης. Κέντρο: Η ομάδα αίμης δεσμευμένη με ένα ιόν σιδήρου. Δεξιά: Η απλούστερη μορφή της πορφυρίνης.
[legacy.owensboro.kctcs.edu/gcaplan/anat2/notes/APIINotes6 Blood RBC.htm](http://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcaplan/anat2/notes/APIINotes6%20Blood%20RBC.htm)

Ως χρωμοφόρο μόριο, η πορφυρίνη έχει τη δυνατότητα να απορροφά φως και να παρέχει ηλεκτρόνια. Αυτή η μετατροπή του φωτός σε ρεύμα την καθιστά χρήσιμη στην έρευνα για ηλιακά κελιά από φωτοευαίσθητα οργανικά μόρια. Για αυτό το λόγο έχουν ερευνηθεί και σύνθετα μόρια όπως πολυμερή πορφυρινών^[20], υβρίδια πορφυρίνης με carbon-nanohorns^[21] αλλά και βιολογικά μόρια, όπως κυκλικούς πολυσακχαρίτες^[22].

Πολλά τροποποιημένα ανάλογα της πορφυρίνης χρησιμοποιούνται και για ανάπτυξη νανοδομών με σκοπό τη μεταφορά ενέργειας σε μεγάλο εύρος. Η χημική της σταθερότητα παρέχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν αρκετοί τρόποι παρασκευής και να προκύψουν πλήθη νανοδομών. Για παράδειγμα, έχουν παραχθεί δομές πορφυρίνης μέσα από διάλυση σε σύστημα οργανικού διαλύτη και νερού με τη βοήθεια επιφανειοδραστικών ουσιών^[23]. Επίσης, υπάρχει αρκετή έρευνα γύρω από την αυτο-οργάνωση της πορφυρίνης με χρήση πεπτιδίων ή πρωτεϊνών ως εκμαγεία για τη δομή. Η πορφυρίνη μπορεί να συμπλοκοποιείται σε μία ιεραρχημένη πρωτεϊνική δομή με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, όπως στο καψίδιο ενός ιού όπου αλληλεπιδρά παράλληλα και με το ιικό DNA^[24]. Όμοια μπορούν να σχηματιστούν δομές με πεπτίδια όπως το πεπτίδιο FF^[25], ενώ έχουν δημιουργηθεί και πεπτίδια ομοιοπολικά συνδεδεμένα με πορφυρίνες όπου έντοπίζεται μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των ομάδων πορφυρίνης^[19,26].

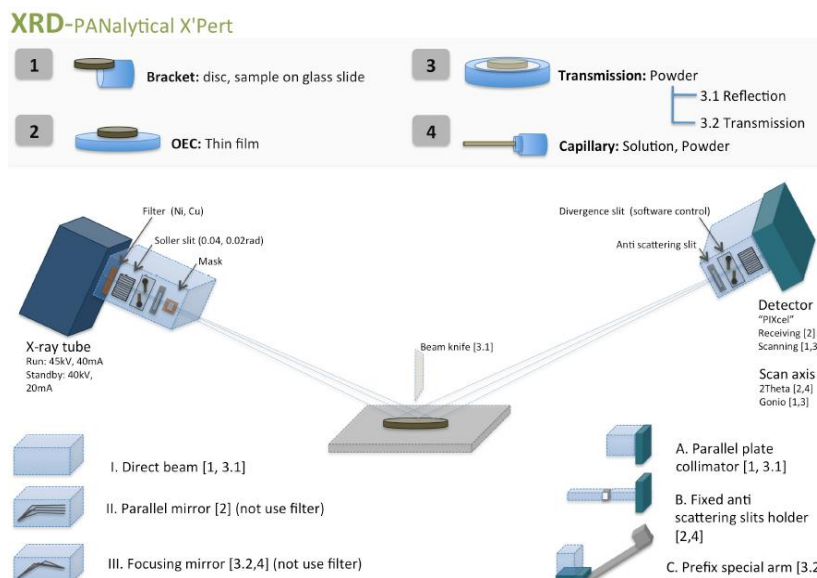
Κεφάλαιο 2: Τεχνικές

2.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (S.E.M.)

Τα πειράματα S.E.M. έγιναν στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, χρησιμοποιώντας το μοντέλο JEOL JSM-6390LV. Στο S.E.M. σκοπός είναι να «σαρωθεί» η επιφάνεια του δείματός μας από μία δέσμη ηλεκτρονίων. Η σάρωση του δείματος από ηλεκτρόνια μπορεί να προκαλέσει ανάκλαση των ηλεκτρονίων που αλληλεπιδρούν με το δείγμα, έξοδο των ηλεκτρονίων από την επιφάνεια του δείματος (δευτερογενή ηλεκτρόνια) και ελευθέρωση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που χαρακτηρίζει τη σύσταση του δείματος. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια μπορούν να δώσουν πληροφορία για την επιφανειακή μορφολογία του δείματος και αφού ληφθούν από τους κατάλληλους ανιχνευτές, να εμφανιστεί στην οθόνη της διάταξης μία τρισδιάστατη εικόνα του δείματος. Επειδή τα βιολογικά δείγματα δεν είναι αγωγικά ώστε να δώσουν δευτερογενή ηλεκτρόνια, έγινε κάλυψη των δειγμάτων με ~15nm χρυσού.

2.2 Περίθλαση Ακτίνων X (XRD)

Τα πειράματα περίθλασης ακτίνων-X έγιναν στις εγκαταστάσεις της nanoGUNE στο San Sebastián της Ισπανίας χρησιμοποιώντας το μοντέλο XRD- PANalytical X'Pert (Εικόνα 8). Η διάταξη ενός περιθλασίμετρου ακτίνων-X περιλαμβάνει μία πηγή ακτίνων-X, μία βάση όπου τοποθετείται το δείγμα και έναν ανιχνευτή. Δέσμη ακτίνων-X προσκρούει στο δείγμα από διαφορετικές γωνίες και ο ανιχνευτής μετρά τα φωτόνια ακτινοβολίας-X που προσπίπτουν σε αυτόν. Σε ένα κρυσταλλικό υλικό, οι ακτίνες-X ανακλώνται από τα παράλληλα και ισαπέχοντα πλεγματοειδή του επίπεδα συμβάλλοντας ενισχυτικά για τη συγκεκριμένη γωνία πρόσπτωσης θ . Συνεπώς σε ένα διάγραμμα έντασης ως προς τη γωνία, οι κορυφές μας δείχνουν τη συμβολή από αυτά τα επίπεδα και μπορούν να προσδιοριστούν οι αποστάσεις των επιπέδων σύμφωνα με το νόμο του Bragg $2d\sin\theta = n\lambda$, όπου d η απόσταση των κρυσταλλικών επιπέδων, n η τάξη της περίθλασης και λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας.



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση περιθλασίμετρου ακτίνων-Χ στις εγκαταστάσεις της nanoGUNE.

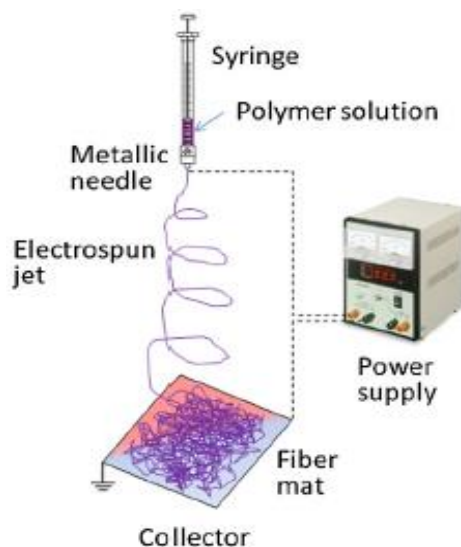
2.3 Μικροσκοπία AFM

Τα πειράματα μικροσκοπίας AFM έγιναν στις εγκαταστάσεις της nanoGUNE στο San Sebastián της Ισπανίας από την κυρία Aitziber Eleta. Το AFM περιλαμβάνει ένα βραχίονα με μία ακίδα στην άκρη, η οποία στο πίσω μέρος της ακτινοβολείται από μία δέσμη laser. Η ακίδα είναι συνήθως από Si ή SiN₄ με ακτίνα μερικών δεκάδων νανομέτρων, και ταλαντεύεται καθώς σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος σε υψηλές συχνότητες. Καθώς έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του δείγματος, καταγράφεται η ανάκλαση της ακτίνας laser από ανιχνευτή και μετράται η δύναμη με την οποία αλληλεπιδρούν η ακίδα και η επιφάνεια ($\sim 10^{-12}$ N). Ο υπολογισμός της δύναμης γίνεται μέσω του νόμου του Hook $F=-kz$, όπου F η δύναμη, k η σκληρότητα του βραχίονα και z το ύψος στο οποίο βρίσκεται ο βραχίονας σε σχέση με την αρχική του θέση.

2.4 Electrospinning

Τα πειράματα του Electrospinning έγιναν μέσω μίας αυτοσχέδιας διάταξης στις εγκαταστάσεις της nanoGUNE στο San Sebastián της Ισπανίας. Η διάταξη αυτή (Εικόνα 10) περιλαμβάνει μία σύριγγα από την οποία εξέρχεται ένα διάλυμα, μία παροχή ρεύματος και μία βάση. Η υψηλή τάση ωθεί μία σταγόνα στην άκρη της σύριγγας να εκτείνεται μέχρι ένα κρίσιμο σημείο όπου ένα ρεύμα του υγρού να φύγει από τη σταγόνα σχηματίζοντας έναν «Κώνο Taylor». Το ρεύμα του υγρού κατευθύνεται προς τη βάση και ανάλογα με τα φυσικά χαρακτηριστικά του δείγματος (ιζώδες, φορτίο μορίων) δίνεται η δυνατότητα να παραχθούν ίνες, αρκεί το ρεύμα του υγρού να είναι συνεχές. Η αυτοσχέδια διάταξη δεν είχε σύριγγα, παρά μόνο μία μεταλλική ακίδα,

οπότε μεταφέραμε το διάλυμά μας μέσω πιπέτας κοντά στην ακίδα για να γίνει το Electrospinning του δείγματος.



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση μίας διάταξης Electrospinning. D.B. Khadka, D.T. Haynie, Nanomedicine: Nanotechnology Biology and Medicine, Vol. 8, 2012, 1242-1262

2.5 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Τα πειράματα FTIR έγιναν στις εγκαταστάσεις της nanoGUNE στο San Sebastián της Ισπανίας. Στη φασματοσκοπία υπέρυθρου, το δείγμα ακτινοβολείται με υπέρυθρη ακρινοβολία μέρος της οποίας απορροφάται από αυτό ενώ η υπόλοιπη διαπερνά και συλλέγεται από ανιχνευτή. Το φάσμα που λαμβάνεται ανταποκρίνεται στις συχνότητες των δονήσεων των δεσμών από τα άτομα που αποτελούν το δείγμα. Έτσι, το αποτύπωμα του δείγματος μπορεί να δώσει στοιχεία για την αναγνώριση άγνωστων μορίων, την ποιότητα και τη συνοχή καθώς και για το ποσοστό κάθε συστατικού. Η διαφορά της απλής φασματοσκοπίας υπέρυθρου με την FTIR είναι ότι στην FTIR χρησιμοποιείται μετασχηματισμός Fourier για την ανάκτηση των δεδομένων.

Κεφάλαιο 3: Δομές Πεπτιδίου Διφαινυλαλανίνης (FF)

3.1 Θεωρητικό Υπόβαθρο

Το πεπτίδιο της διφαινυλαλανίνης (FF) είναι ένα διπεπτίδιο το οποίο βρίσκεται στην αλληλουχία KLVFFAE, βασική αλληλουχία για την δημιουργία αμυλοειδών ινών στη νόσο Alzheimer. Έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη σύγχρονη έρευνα λόγω των δυνατοτήτων του να δημιουργεί νανο-σωλήνες αυθόρμητα σε υδατικό διάλυμα, παρέχοντας έτσι πλήθος εφαρμογών. Ένα βασικό ερώτημα που μελετάται είναι ποιες είναι οι βασικές δυνάμεις οι οποίες οδηγούν σε μία τέτοια αυτό-οργανωμένη δομή και ποιοι παράγοντες μπορούν να την αποτρέψουν. Επίσης είναι ενδιαφέρον να ελεγχθεί πώς αλλάζοντας τις συνθήκες αυτο-οργάνωσης μπορούμε να πάρουμε και διαφορετικά είδη δομών.

3.2 Υλικά και Μέθοδοι

Τα συγκεκριμένα πειράματα διεξήχθησαν σε συνεργασία με τον Επικ. Καθ. Ευάγγελο Χαρμανδάρη και την Επικ. Καθ. Αναστασία Ρισσάνου από το Τμήμα Εφαρμοσμένων Μαθηματικών του Πανεπιστημίου Κρήτης, οι οποίοι έκαναν τη θεωρητική μελέτη της επίδρασης του διαλύτη στην αυτο-οργάνωση του πεπτιδίου της Διφαινυλαλανίνης. Το δικό μου κομμάτι εργασίας ήταν η παρασκευή και ο έλεγχος των δομών που μπορεί να δώσει το πεπτίδιο ανάλογα με τον διαλύτη που χρησιμοποιείται, με σκοπό την πειραματική υποστήριξη των θεωρητικών υπολογισμών.

3.2.1 Αυτο-οργάνωση του πεπτιδίου FF σε σύστημα ενός διαλύτη

Στην πρώτη σειρά πειραμάτων ελέγχεται η δυνατότητα του πεπτιδίου να αυτο-οργανώνεται σε διαλύτες χωρίς τη χρήση 1,1,1,3,3,3,εξαφθορο-ισοπροπανόλης (HFIP), η οποία χρησιμοποιείται ως πρόσθετος διαλύτης σε πρωτόκολλα παρασκευής δομών FF. Αυτή η διαδικασία βοηθά ώστε να μελετηθεί η δομή σε σύστημα ενός διαλύτη και να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για παρασκευή δομών σε αυτό.

Παρασκευάστηκαν τα εξής δείγματα σε νερό:

- FF σε νερό σε συγκέντρωση 10 mg/mL σε eppendorf tube.
- FF σε νερό σε συγκέντρωση 5 mg/mL σε eppendorf tube.
- FF σε νερό σε συγκέντρωση 4 mg/mL σε eppendorf tube.
- FF σε νερό σε συγκέντρωση 3 mg/mL σε eppendorf tube.
- FF σε νερό σε συγκέντρωση 2 mg/mL σε eppendorf tube.

Για την παρασκευή των διαλυμάτων:

- Τοποθετούμε τη σκόνη του πεπτιδίου σε eppendorf tube.
- Προσθέτουμε το νερό.
- Βάζουμε το eppendorf tube σε θερμό υδατόλουτρο με αρχική θερμοκρασία 55°C αυξάνοντας έως τους 85°C (για τα δείγματα με συγκέντρωση 10mg/mL η θερμοκρασία αυξήθηκε έως τους 100°C) αφήνοντας το διάλυμα σε ισορροπία για 30 λεπτά ανά 10°C αύξησης της θερμοκρασίας.
- Έπειτα από τη θερμική επεξεργασία τα δείγματα επαναφέρονται σε θερμοκρασία δωματίου.

Καταλήγοντας στην κατάλληλη συγκέντρωση και θερμοκρασία θέρμανσης για το πεπτίδιο, παρασκευάστηκαν τα δείγματα:

- FF σε νερό σε συγκέντρωση 2 mg/mL σε eppendorf tube.
- FF σε νερό σε συγκέντρωση 10 mg/mL σε eppendorf tube.

Τα δείγματα αυτά θερμάνθηκαν σε υδατόλουτρο στους 75°C για 30 λεπτά με χρήση sonication διάρκειας 20 δευτερολέπτων για κάθε 10 λεπτά επώασης. Μετά τη θερμική κατεργασία τα δείγματα ψύχθηκαν σε μείγμα πάγου-νερού (0°C).

Σε οργανικούς διαλύτες παρασκευάστηκαν τα εξής δείγματα:

- FF σε THF σε συγκέντρωση 2mg/mL σε eppendorf tube.
- FF σε THF σε συγκέντρωση 1mg/mL σε γυάλινο φιαλίδιο.
- Fmoc-FF σε THF σε συγκέντρωση 2mg/mL σε eppendorf tube.
- FF σε αιθανόλη σε συγκέντρωση 2mg/mL σε eppendorf tube.
- FF σε μεθανόλη σε συγκέντρωση 10mg/mL σε eppendorf tube.
- FF σε μεθανόλη σε συγκέντρωση 2mg/mL σε eppendorf tube.

Για την παρασκευή των δειγμάτων

- Τοποθετούμε τη σκόνη του πεπτιδίου σε eppendorf tube/γυάλινο φιαλίδιο.
- Προσθέτουμε το διαλύτη που επιλέξαμε.
- Βάζουμε το φιαλίδιο/eppendorf tube σε θερμό υδατόλουτρο για 30 λεπτά χρησιμοποιώντας ανά 10 λεπτά sonication με διάρκεια 20 δευτερολέπτων για κάθε φορά. Αυτή η διαδικασία δε χρησιμοποιήθηκε για τα δείγματα FF σε THF 2mg/mL και Fmoc-FF σε THF 2mg/mL.
- Το υδατόλουτρο ήταν σε θερμοκρασία 65°C για τα δείγματα αιθανόλης, 55°C για τα δείγματα μεθανόλης και 56°C για το δείγμα FF σε THF 1mg/mL
- Έπειτα επαναφέρουμε τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την παρατήρηση των δειγμάτων:

- Βάζουμε σταγόνα 10μL σε γυάλινο υπόστρωμα και αφήνουμε μία μέρα για να εξατμιστεί ο διαλύτης.
- Κάνουμε sputtering χρυσού 15nm και παρατηρούμε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

3.2.2 Δείγματα μετά από εξάτμιση του HFIP

Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων ελέγχεται η αυτο-οργάνωση του πεπτιδίου σε διαλύτες μετά από εξάτμιση του HFIP.

Παρασκευάστηκαν τα εξής δείγματα:

- Ξηρό FF μετά από εξάτμιση του HFIP σε γυάλινο φιαλίδιο.
- FF σε νερό σε συγκέντρωση 2 mg/mL έπειτα από εξάτμιση του HFIP σε γυάλινο φιαλίδιο.
- FF σε αιθανόλη σε συγκέντρωση 2 mg/mL έπειτα από εξάτμιση του HFIP σε γυάλινο φιαλίδιο.
- FF σε μεθανόλη σε συγκέντρωση 2 mg/mL έπειτα από εξάτμιση του HFIP σε γυάλινο φιαλίδιο.

Για την παρασκευή των δειγμάτων

- Τοποθετούμε τη σκόνη του πεπτιδίου σε eppendorf tube/γυάλινο φιαλίδιο.
- Διαλύουμε το πεπτίδιο σε HFIP σε συγκέντρωση 50mg/mL και αφήνουμε μία μέρα να εξατμιστεί ο διαλύτης.
- Προσθέτουμε το διαλύτη που επιλέξαμε και κάνουμε ισχυρό vortex μέχρι την απομάκρυνση του πεπτιδίου από τα τοιχώματα του φιαλιδίου. Στο δείγμα του ξηρού FF δεν υπήρξε προσθήκη διαλύτη.

Για την παρατήρηση των δειγμάτων:

- Βάζουμε σταγόνα 10μL σε γυάλινο υπόστρωμα και αφήνουμε μία μέρα για να εξατμιστεί ο διαλύτης.
- Για το δείγμα ξηρού FF απομακρύνουμε τις πεπτιδικές δομές με πλαστικό κρικοφόρο στυλέο και τις τοποθετούμε σε γυάλινο υπόστρωμα καλυμμένο με ταινία διπλής όψεως.
- Κάνουμε sputtering χρυσού 15nm και παρατηρούμε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

3.2.3 Αυτο-οργάνωση του FF σε νερό και μεθανόλη υπό όμοιες συνθήκες

Στην τρίτη σειρά πειραμάτων, συγκρίνονται οι δυνατότητες αυτο-οργάνωσης του πεπτιδίου σε νερό και μεθανόλη κάτω από όμοιες συνθήκες επεξεργασίας.

Παρασκευάστηκαν τα εξής δείγματα:

- FF σε νερό σε συγκέντρωση 2 mg/mL σε γυάλινο φιαλίδιο.
- FF σε μεθανόλη σε συγκέντρωση 2 mg/mL σε γυάλινο φιαλίδιο.

Για την παρασκευή των δειγμάτων

- Τοποθετούμε τη σκόνη του πεπτιδίου σε γυάλινο φιαλίδιο.
- Προσθέτουμε το διαλύτη που επιλέξαμε φροντίζοντας ώστε οι όγκοι των διαλυτών να είναι σχεδόν ίδιοι και για το δείγμα νερού και για το δείγμα μεθανόλης.
- Βάζουμε τα φιαλίδια σε θερμό υδατόλουτρο για 30 λεπτά χρησιμοποιώντας ανά 5 λεπτά sonication με διάρκεια 20 δευτερολέπτων για κάθε φορά.
- Το υδατόλουτρο ήταν σε θερμοκρασία 55°C και για τα δύο δείγματα.
- Μετά το πέρας των 30 λεπτών, ο μισός όγκος του κάθε δείγματος μεταγγίζεται σε αντίστοιχο φιαλίδιο στους 27°C. Συνεχίζουμε συγκρίνοντας τις μεταβολές που συμβαίνουν στα διαλύματα όσο παραμένουν στους 55°C και στους 27°C.

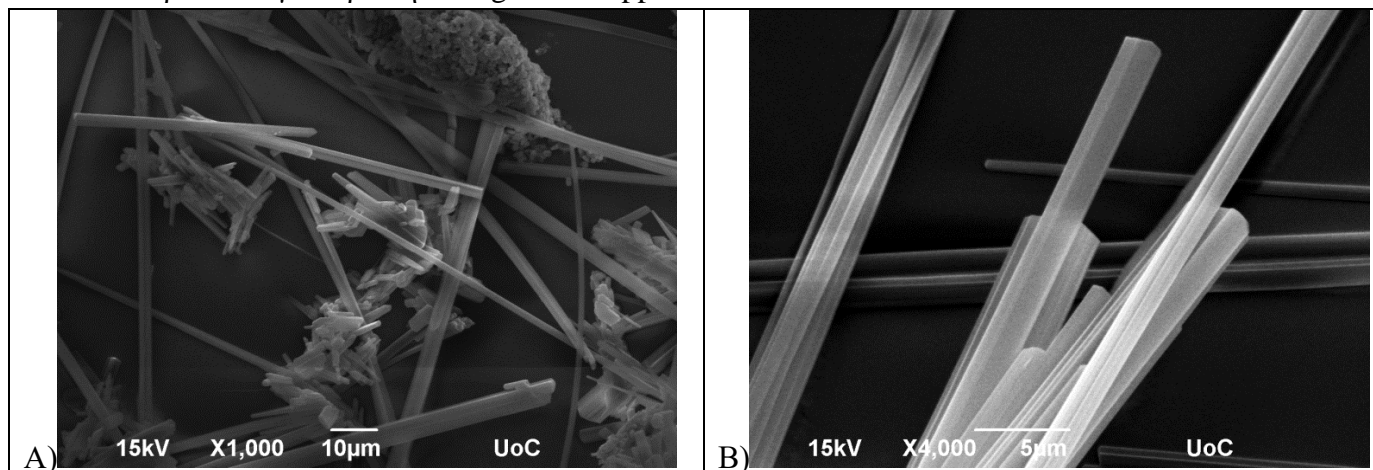
Για την παρατήρηση των δειγμάτων:

- Βάζουμε σταγόνα 10μL σε γυάλινο υπόστρωμα και αφήνουμε μία μέρα για να εξατμιστεί ο διαλύτης.
- Κάνουμε sputtering χρυσού 15nm και παρατηρούμε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.
- Επίσης τα φιαλίδια φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή ώστε να ελεγχθεί η αυτο-οργάνωση στο διάλυμα με γυμνό μάτι.

3.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.3.1 Αυτο-οργάνωση του πεπτιδίου FF σε σύστημα ενός διαλύτη

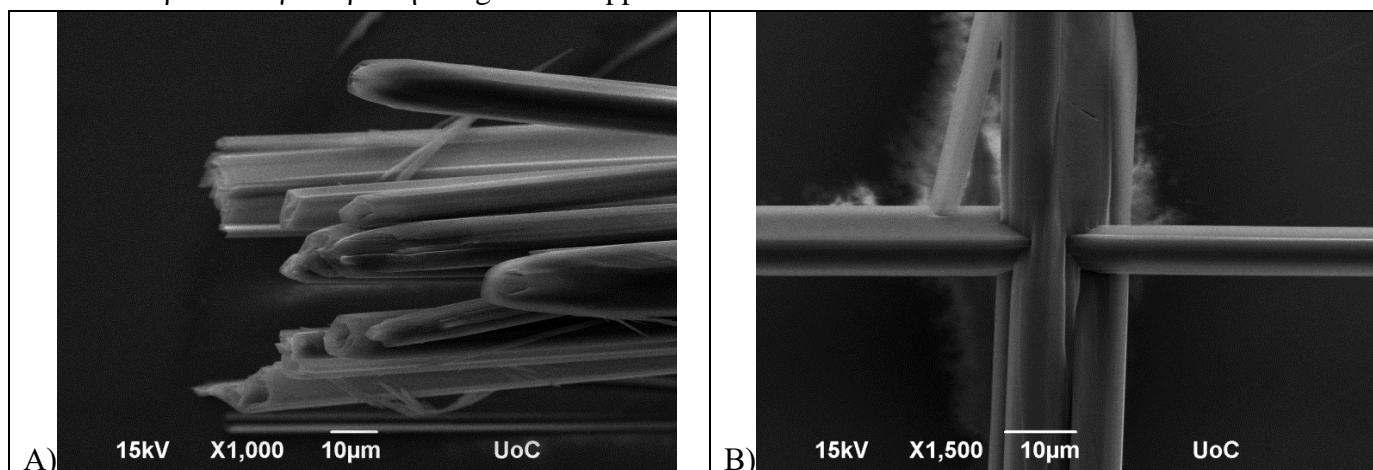
- FF σε νερό σε συγκέντρωση 10 mg/mL σε eppendorf tube.

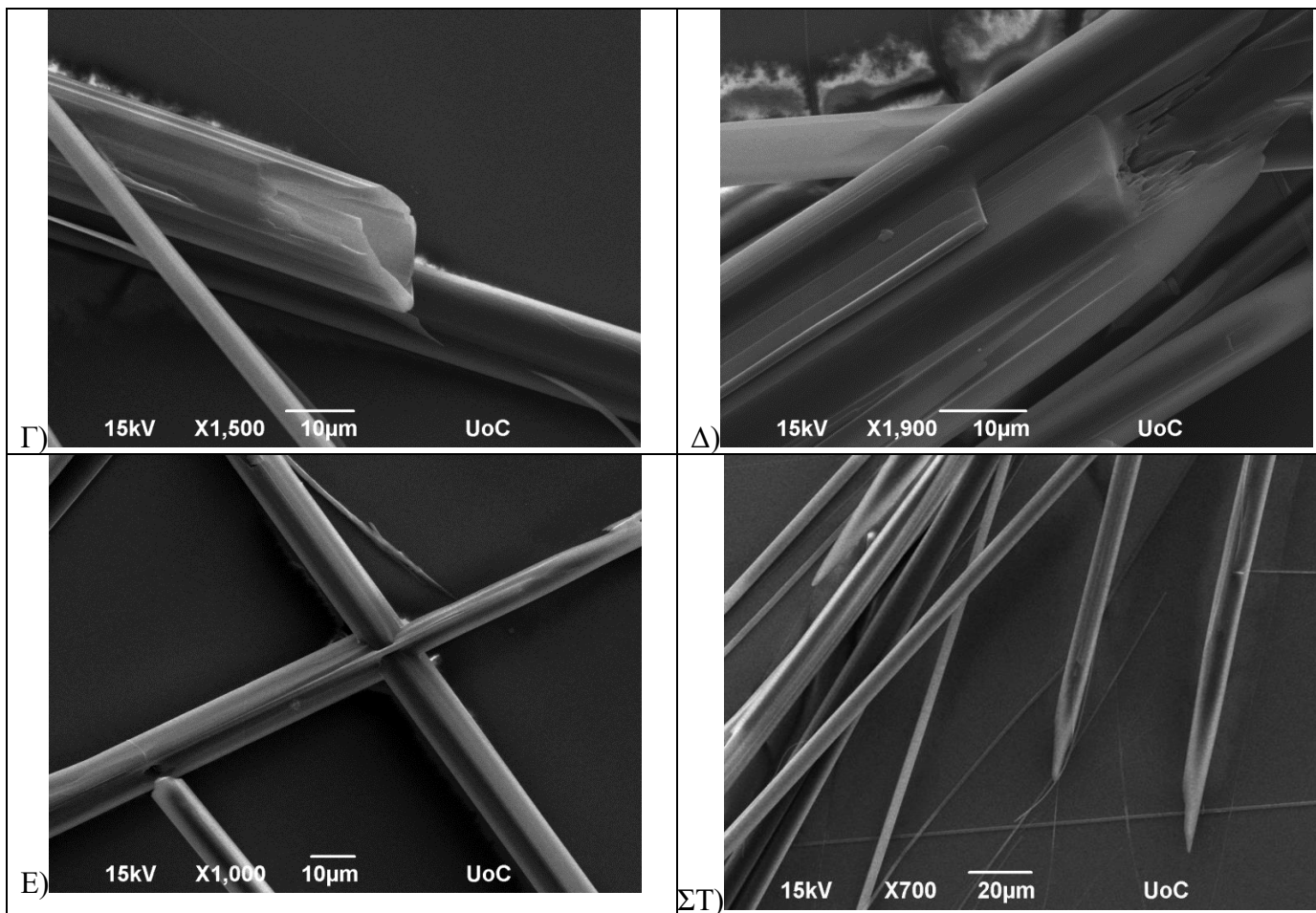


Εικόνα 11: Φωτογραφία μικροσκοπίου S.E.M.. FF σε νερό 10mg/mL A) μετά από θέρμανση στους 100°C, B) μετά από θέρμανση στους 75°C με χρήση sonication και ψύξη στους 0°C.

Στο δείγμα αυτό, η σκόνη του πεπτιδίου δε διαλύεται στο διάλυμα πλήρως. Μετά τη θερμική κατεργασία, το δείγμα θολώνει λόγω σχηματισμού δομών οι οποίες συνυπάρχουν με τους αδιάλυτους κόκκους. Οι φωτογραφίες του μικροσκοπίου S.E.M. δείχνουν σχηματισμό συμπαγών ινών διαφόρων μηκών και άμορφων κόκκων για το δείγμα που θερμάνθηκε στους 100°C, ενώ για το δείγμα που θερμάνθηκε στους 75°C σχηματίζονται συμπαγείς ίνες χωρίς άμορφα συσσωματώματα.

- FF σε νερό σε συγκέντρωση 2 mg/mL σε eppendorf tube.

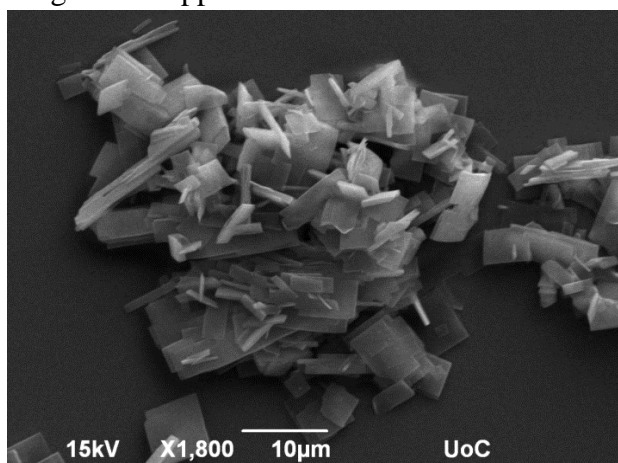




Εικόνα 12: Φωτογραφίες μικροσκοπίου S.E.M.. FF σε νερό 2mg/mL μετά από θέρμανση στους 75°C με χρήση sonication A) αμέσως μετά τη θέρμανση, B) 30 λεπτά μετά από επώαση στους 0°C, Γ) μία ώρα μετά από επώαση στους 0°C, Δ) δύο ώρες μετά από επώαση στους 0°C, E) μία ημέρα μετά από επώαση στους 0°C. ΣΤ) FF σε νερό 2mg/mL μετά από θέρμανση στους 85°C και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου.

Στα δείγματα αυτά, η σκόνη του πεπτιδίου διαλύεται στο νερό μετά το πέρας της θερμικής κατεργασίας σταδιακά διαφαίνονται ινώδεις δομές με γυμνό μάτι. Τα αποτελέσματα μικροσκοπίας S.E.M. δείχνουν τη δημιουργία ιών και νανο-σωλήνων μετά από θέρμανση στους 85°C. Μετά από θέρμανση στους 75°C με χρήση sonication εμφανίζονται οι ίδιες δομές με κάποιες από τις ίνες να διαπερνούν η μία την άλλη.

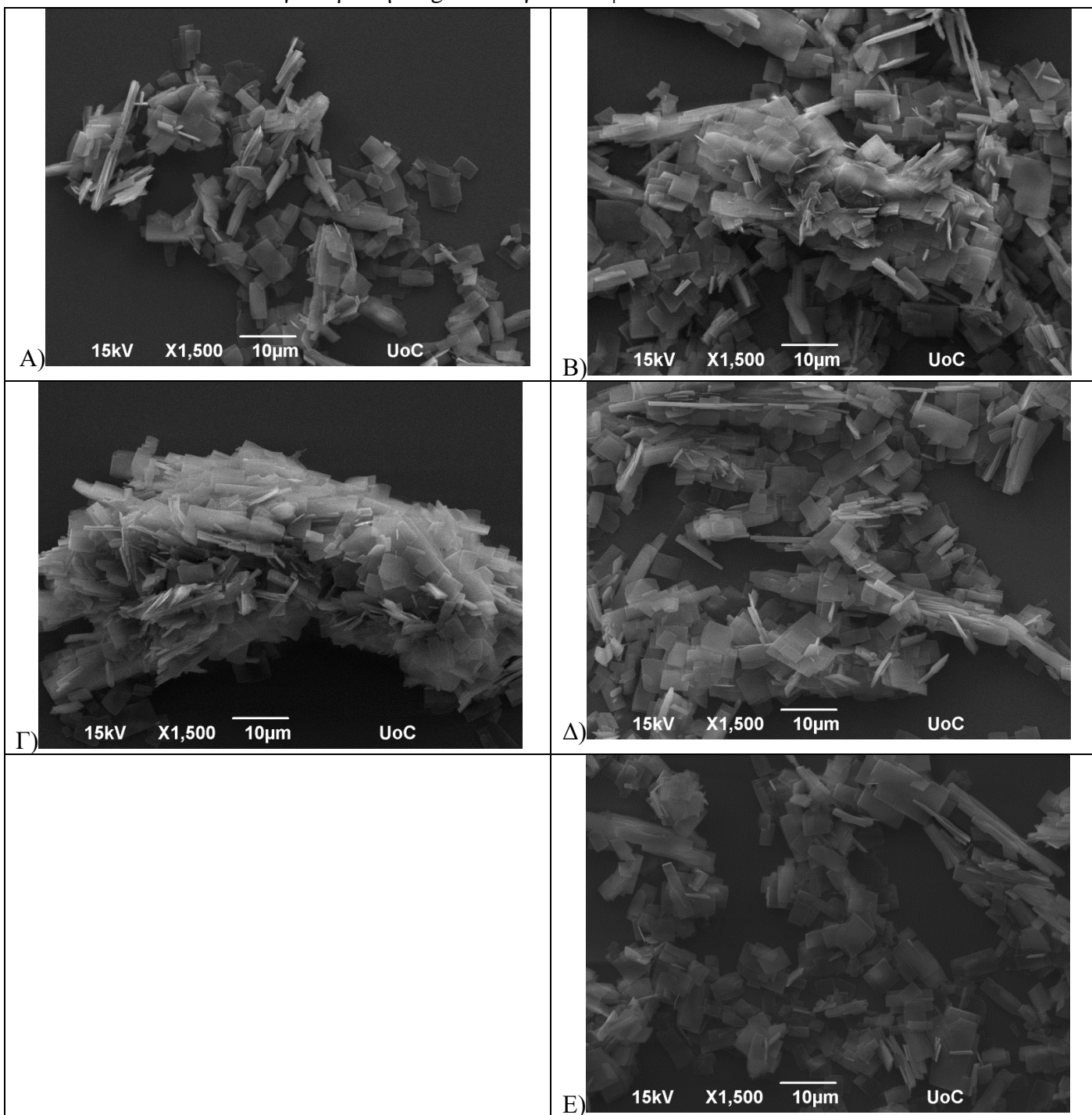
- FF σε THF σε συγκέντρωση 2mg/mL σε eppendorf tube.



Εικόνα 13: Φωτογραφία μικροσκοπίου S.E.M.. FF σε THF 2mg/mL.

Στο δείγμα αυτό, η σκόνη του πεπτιδίου δε διαλύθηκε. Παρόλα αυτά, εμφανίζονται δομές ορθογώνιων πλακών με ποικίλες διαστάσεις μήκους-πλάτους.

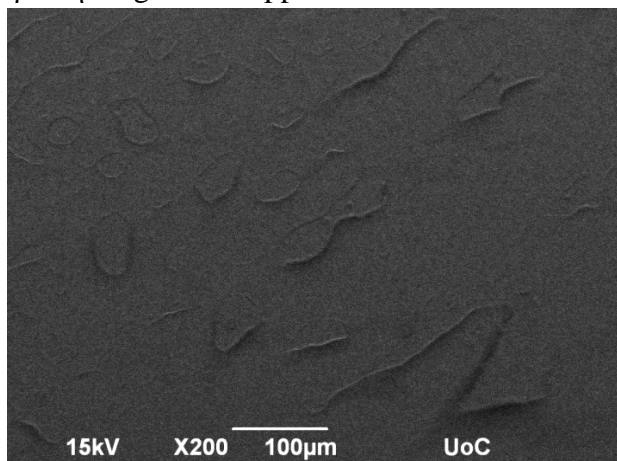
- FF σε THF σε συγκέντρωση 1mg/mL σε γυάλινο φιαλίδιο.



Εικόνα 14: Φωτογραφίες μικροσκοπίου S.E.M.. FF σε THF 1mg/mL μετά από θέρμανση στους 56°C με χρήση sonication A) αμέσως μετά τη θέρμανση, B) 30 λεπτά μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, Γ) μία ώρα μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, Δ) τρεις ώρες μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, E) μία ημέρα μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου.

Η σκόνη του πεπτιδίου διαλύεται μετά το πέρας της θερμικής επεξεργασίας. Από τα αποτελέσματα μικροσκοπίας S.E.M. παρατηρείται σχηματισμός ορθογώνιων πλακών ποικίλων διαστάσεων. Δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές με την πάροδο του χρόνου.

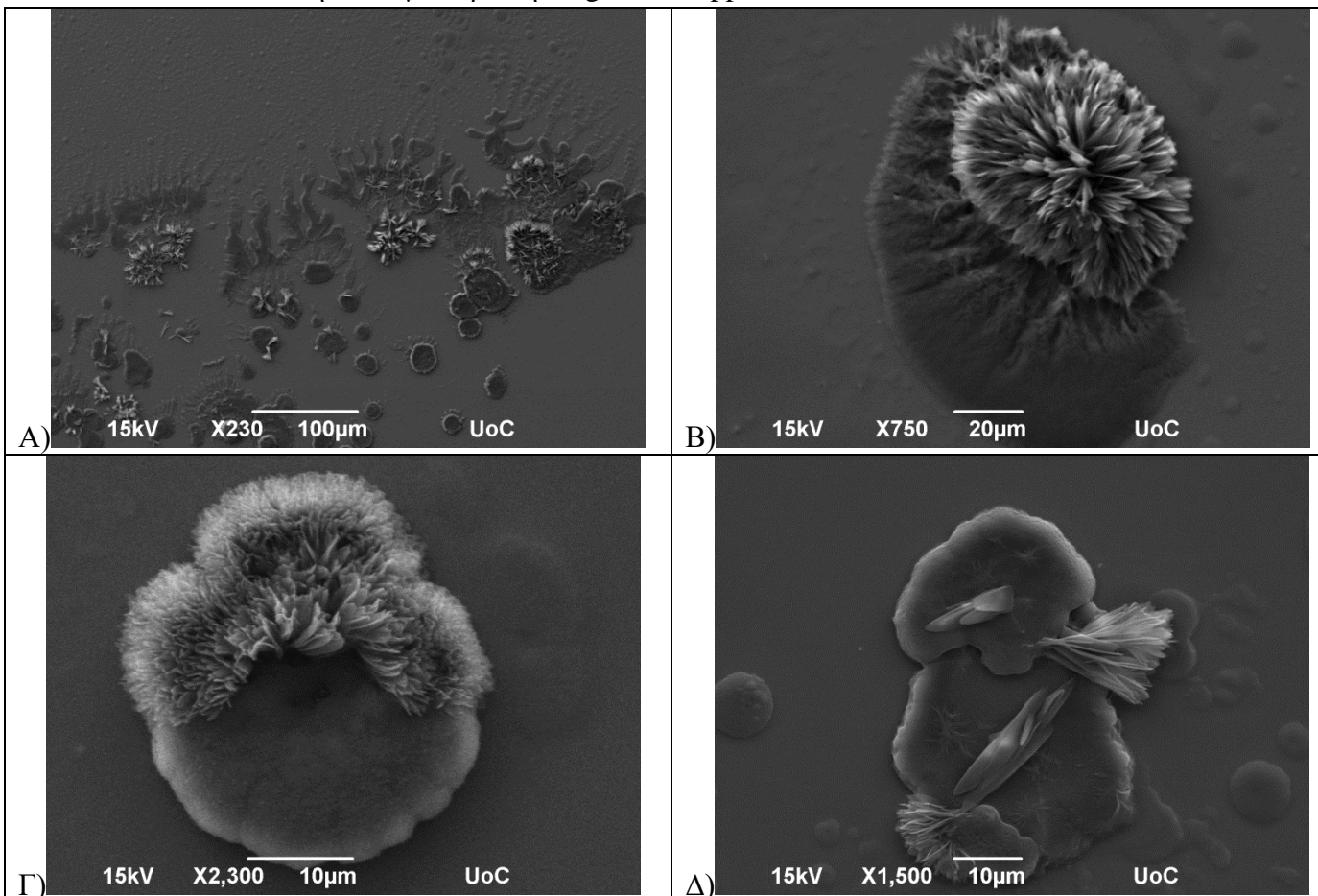
- Fmoc-FF σε THF σε συγκέντρωση 2mg/mL σε eppendorf tube.

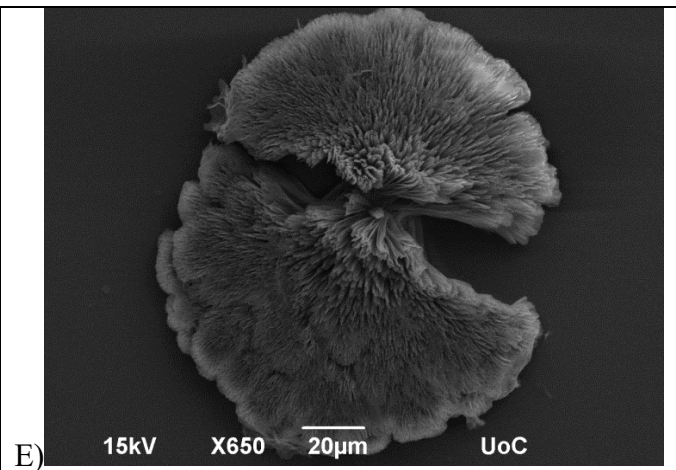


Εικόνα 15: Φωτογραφία μικροσκοπίου S.E.M.. Fmoc-FF σε THF 2mg/mL.

Το Fmoc-FF διαλύεται απευθείας στο THF χωρίς θερμική κατεργασία. Τα αποτελέσματα μικροσκοπίας S.E.M. δε δείχνουν τη δημιουργία δομών, παρά μόνο ένα φιλμ που καλύπτει το γυάλινο υπόστρωμα.

- FF σε αιθανόλη σε συγκέντρωση 2mg/mL σε eppendorf tube.

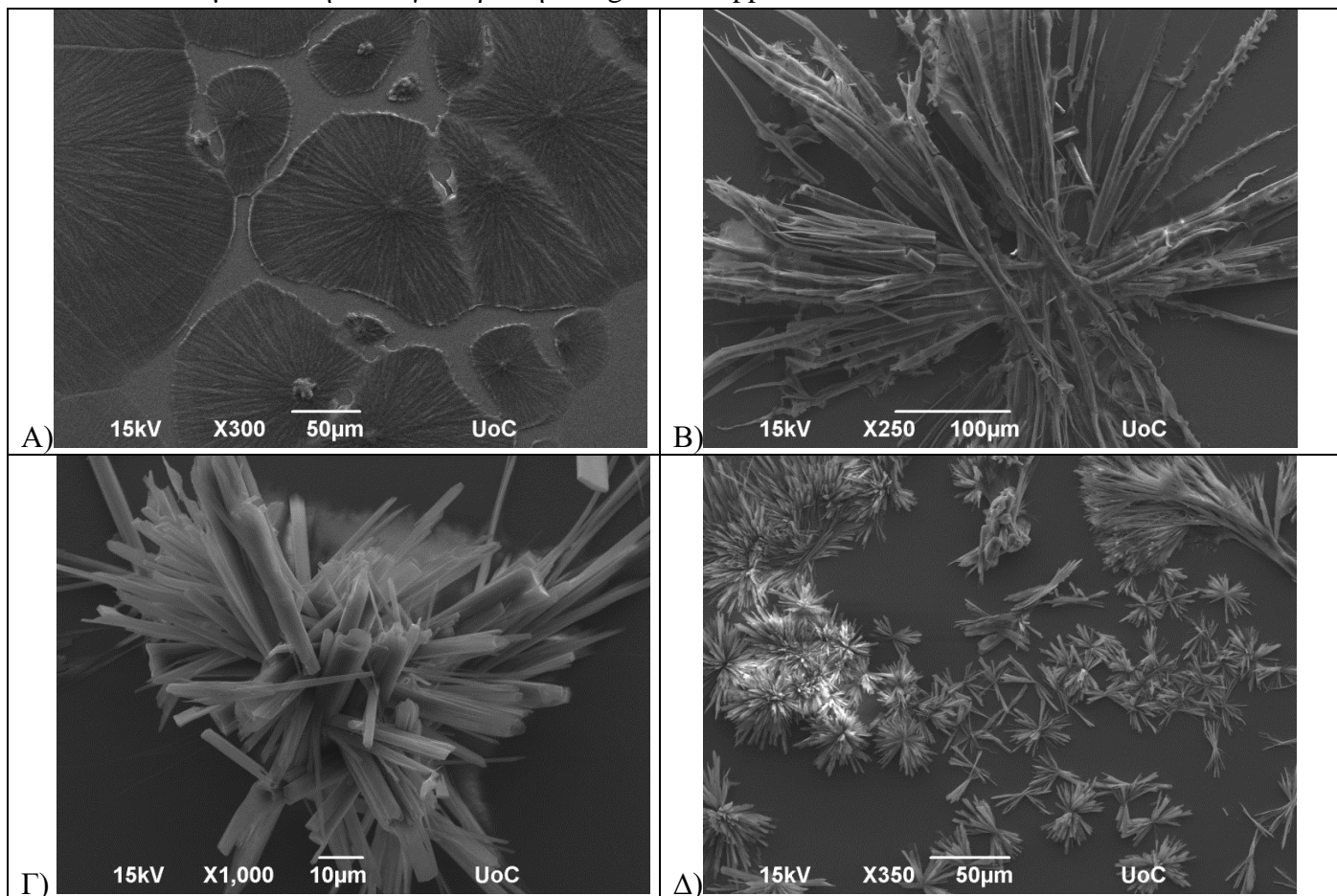




Εικόνα 16: Φωτογραφίες μικροσκοπίου S.E.M.. FF σε αιθανόλη 2mg/mL μετά από θέρμανση στους 65°C με χρήση sonication A) αμέσως μετά τη θέρμανση, B) 30 λεπτά μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, Γ) μία ώρα μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, Δ) δύο ώρες μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, E) μία ημέρα μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου.

Το πεπτίδιο δε διαλύεται εντελώς στο eppendorf tube. Τα αποτελέσματα μικροσκοπίας S.E.M. δείχνουν το σχηματισμό πεπλατυσμένων δομών από τις οποίες προεκτείνονται νιφάδες.

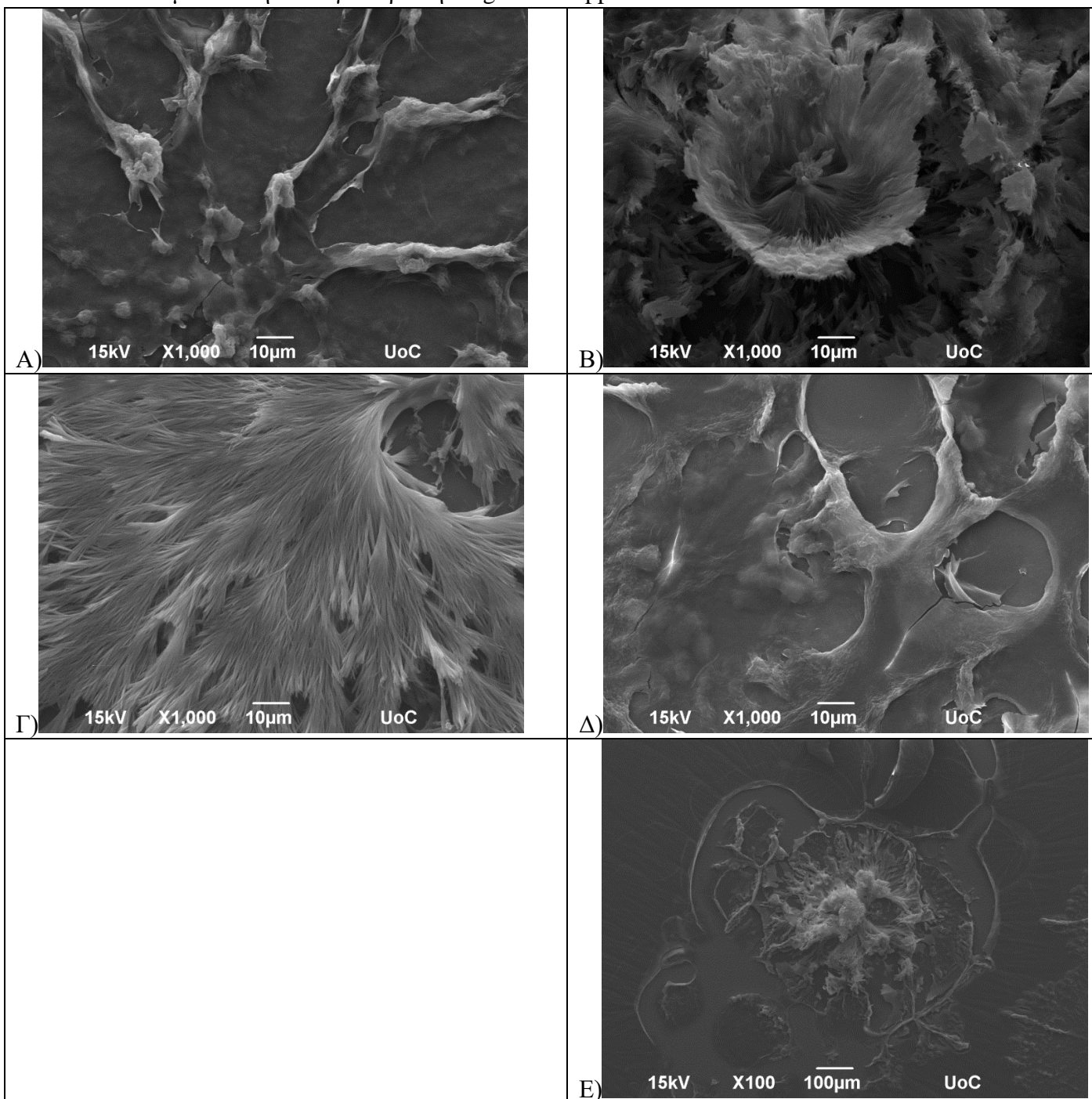
- FF σε μεθανόλη σε συγκέντρωση 10mg/mL σε eppendorf tube.



Εικόνα 17: Φωτογραφίες μικροσκοπίου S.E.M.. FF σε μεθανόλη 10mg/mL μετά από θέρμανση στους 55°C με χρήση sonication A),B) υπερκείμενο , Γ),Δ) ίζημα.

Το πεπτίδιο δε διαλύεται μετά τη θερμική επεξεργασία, οπότε παρατηρήθηκε ξεχωριστά η υπερκείμενη φάση και το ίζημα του δείγματος. Τα αποτελέσματα μικροσκοπίας S.E.M. για την υπερκείμενη φάση του δείγματος δείχνουν την δημιουργία νησίδων από υλικό που καλύπτουν το γυάλινο υπόστρωμα καθώς επίσης και κάποιες ίνες με ανομοιόμορφο σχήμα. Στο ίζημα του δείγματος φαίνονται ίνες και δενδροειδείς δομές.

- FF σε μεθανόλη σε συγκέντρωση 2mg/mL σε eppendorf tube.

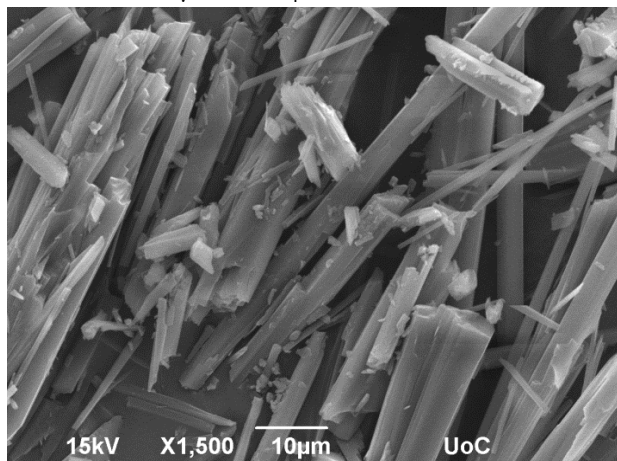


Εικόνα 18: Φωτογραφίες μικροσκοπίου S.E.M.. FF σε μεθανόλη 2mg/mL μετά από θέρμανση στους 56°C με χρήση sonication A) αμέσως μετά τη θέρμανση, B) 30 λεπτά μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, Γ) μία ώρα μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, Δ) τρεις ώρες μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, E) μία ημέρα μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου.

Το πεπτίδιο διαλύεται μετά τη θερμική επεξεργασία και το διάλυμα παραμένει διαυγές, χωρίς να φαίνονται δομές ακόμα και μετά το πέρας δύο ημερών. Τα αποτελέσματα μικροσκοπίας S.E.M. δείχνουν τη δημιουργία δενδροειδών δομών σε ορισμένα σημεία του γυάλινου υποστρώματος που μελετήθηκε, ενώ παράλληλα εμφανίζονται άμορφες νησίδες υλικού και ακαθόριστοι σχηματισμοί. Δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια εξάρτηση από το χρόνο για τη δημιουργία των δομών.

3.3.2 Δείγματα μετά από εξάτμιση του HFIP

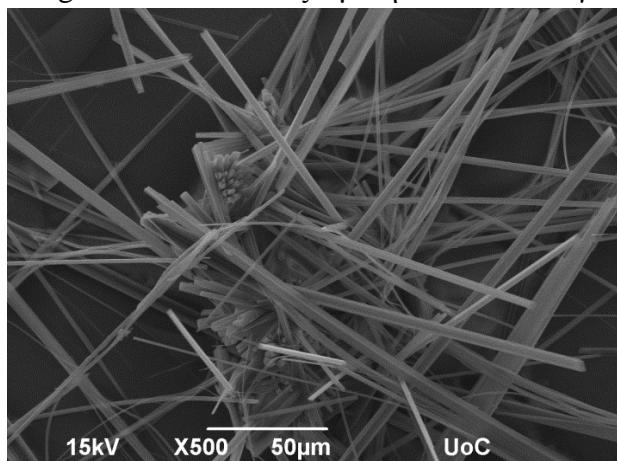
- Ξηρό FF μετά από εξάτμιση του HFIP σε γυάλινο φιαλίδιο.



Εικόνα 19: Φωτογραφία μικροσκοπίου S.E.M.. Ξηρό FF μετά από διάλυση σε HFIP

Μετά την εξάτμιση του HFIP, στο δείγμα φαίνονται δενδροειδείς δομές που εκτείνονται στα τοιχώματα του φιαλιδίου. Οι δομές που σχηματίζονται είναι συμπαγείς ίνες, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της S.E.M. μικροσκοπίας. Τα «θραύσματα» που παρεμβάλλονται μεταξύ των ινών στην Εικόνα 27 πιθανώς έχουν δημιουργηθεί κατά την απόξεση των δομών από το φιαλίδιο με κρικοφόρο στυλεό.

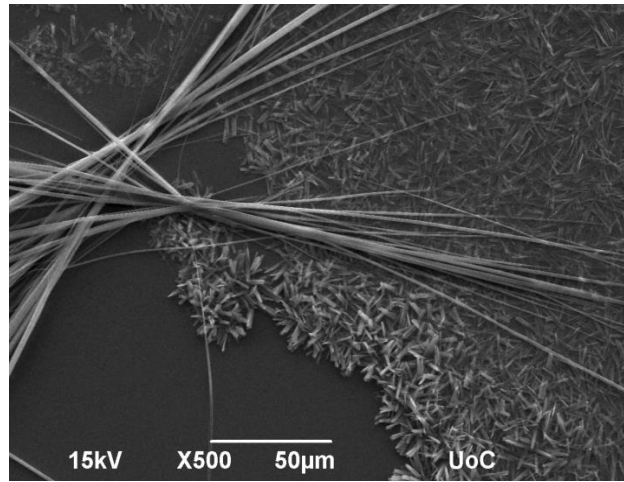
- FF σε νερό σε συγκέντρωση 2 mg/mL έπειτα από εξάτμιση του HFIP σε γυάλινο φιαλίδιο.



Εικόνα 20: Φωτογραφία μικροσκοπίου S.E.M.. FF σε νερό 2mg/mL έπειτα από εξάτμιση του HFIP

Για το δείγμα αυτό είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται vortex ώστε να αποκολληθεί το υλικό από τα τοιχώματα του φιαλιδίου. Επίσης είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται γυάλινο φιαλίδιο αντί για erppendorf tube, διότι στο erppendorf tube το υλικό δεν απομακρύνεται από τα τοιχώματα λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα του πεπτιδίου. Το πεπτίδιο σχηματίζει ίνες ποικίλων διαμέτρων και μηκών.

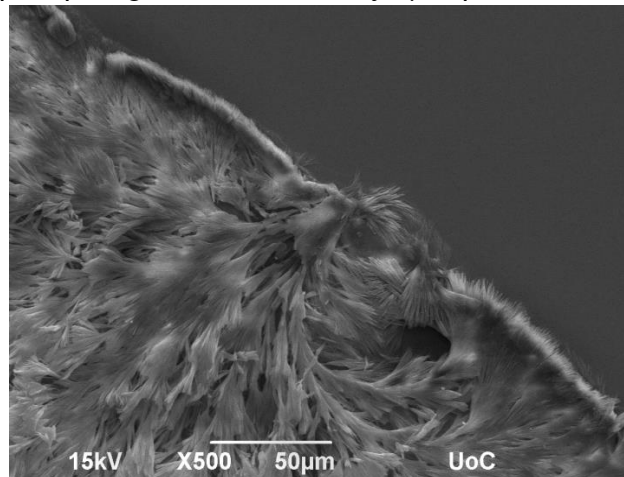
- FF σε αιθανόλη σε συγκέντρωση 2 mg/mL έπειτα από εξάτμιση του HFIP σε γυάλινο φιαλίδιο.



Εικόνα 21: Φωτογραφία μικροσκοπίου S.E.M.. FF σε αιθανόλη 2mg/mL έπειτα από εξάτμιση του HFIP

Το υλικό που είναι κολλημένο στα τοιχώματα του φιαλίδιου μετά την εξάτμιση του HFIP διαλύεται στην αιθανόλη με χρήση vortex. Οι δομές που σχηματίζονται περιλαμβάνουν μεγάλου μήκους ίνες και νανοσωλήνες καθώς επίσης και μικρού μήκους ινίδια με μήκος 10µm που συναντώνται κυρίως στις άκρες του γυάλινου υποστρώματος που μελετήθηκε στο S.E.M. μικροσκόπιο.

- FF σε μεθανόλη σε συγκέντρωση 2 mg/mL έπειτα από εξάτμιση του HFIP σε γυάλινο φιαλίδιο.

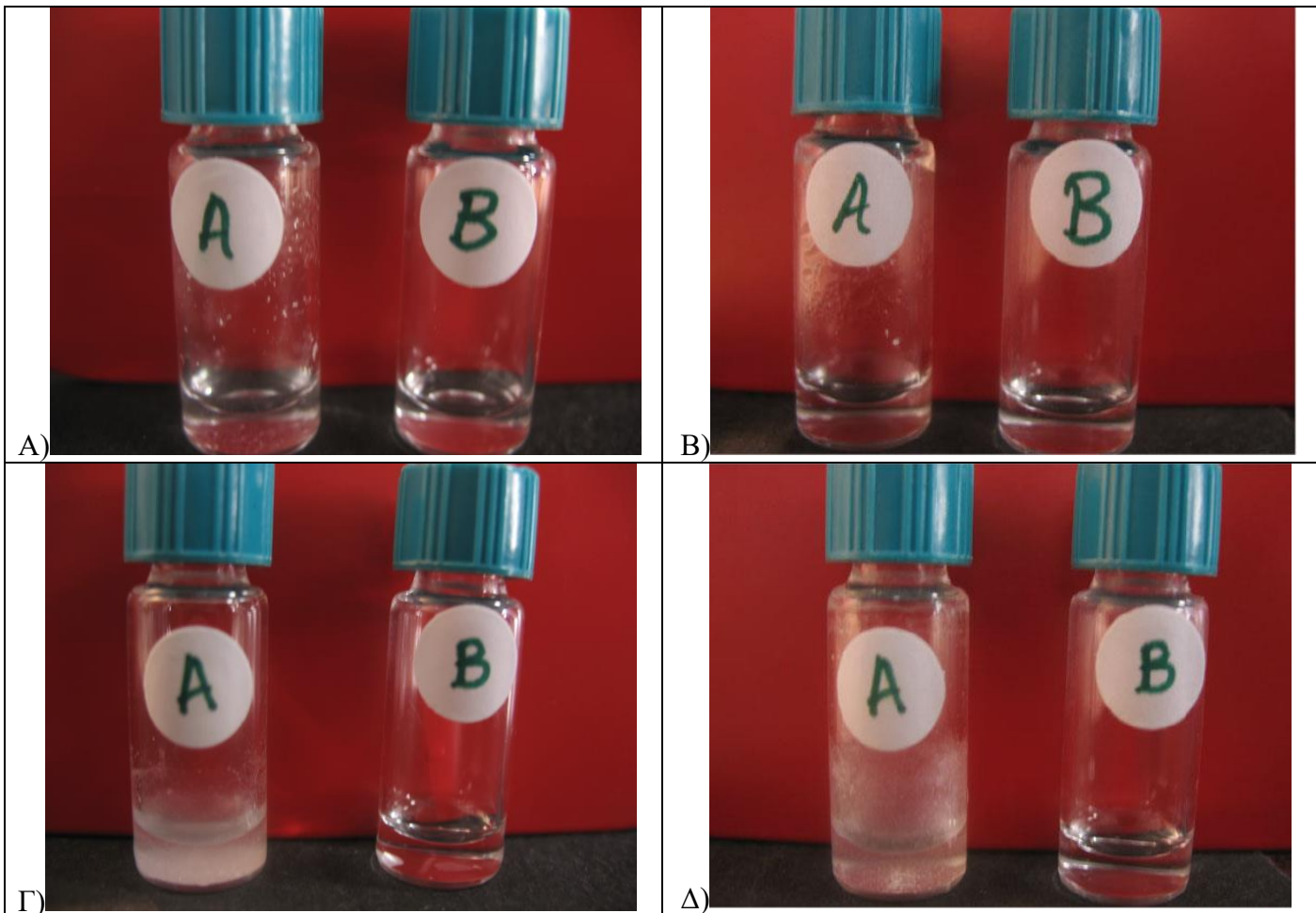


Εικόνα 22: Φωτογραφία μικροσκοπίου S.E.M.. FF σε αιθανόλη 2mg/mL έπειτα από εξάτμιση του HFIP

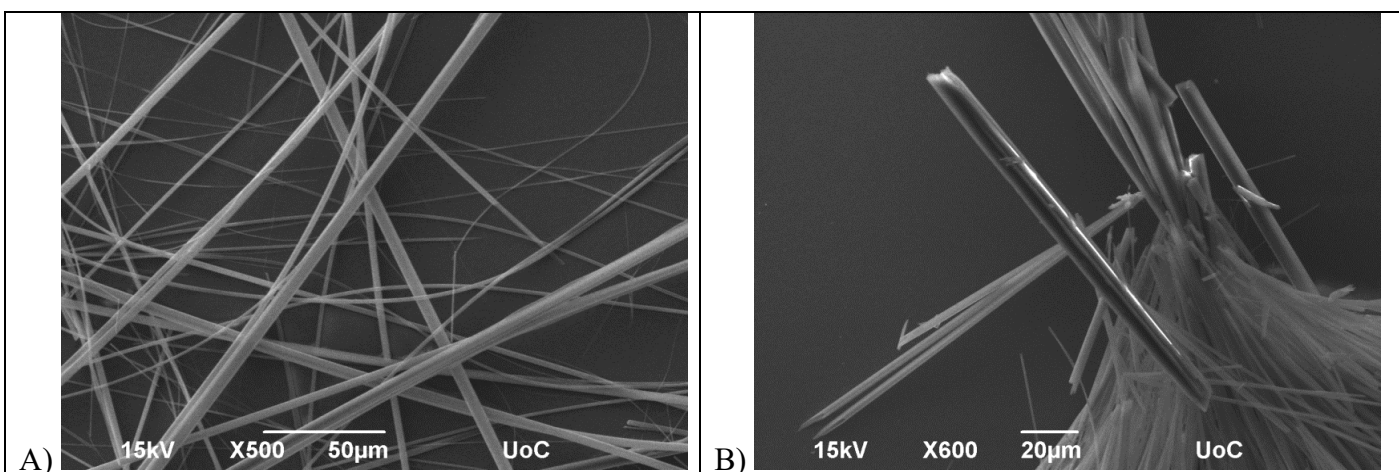
Το υλικό που είναι κολλημένο στα τοιχώματα του φιαλίδιου μετά την εξάτμιση του HFIP διαλύεται στη μεθανόλη με χρήση vortex. Τα αποτελέσματα S.E.M. μικροσκοπίας δείχνουν το σχηματισμό δενδροειδών δομών.

3.3.3 Αυτο-οργάνωση του FF σε νερό και μεθανόλη υπό όμοιες συνθήκες

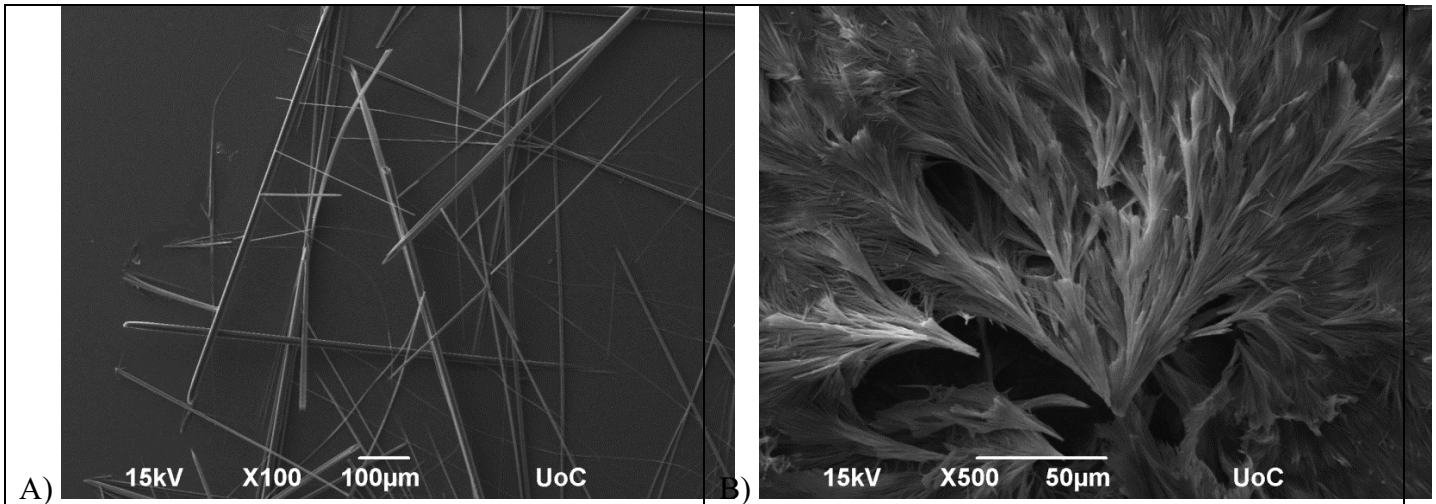
- FF σε νερό σε συγκέντρωση 2 mg/mL σε γυάλινο φιαλίδιο.
- FF σε μεθανόλη σε συγκέντρωση 2 mg/mL σε γυάλινο φιαλίδιο.



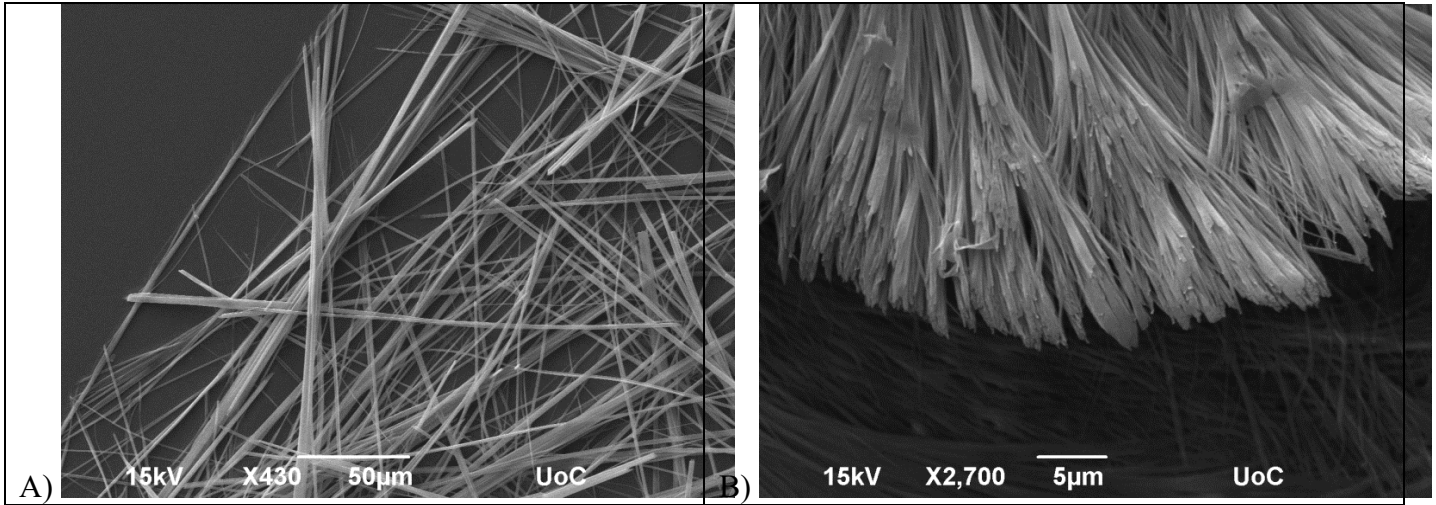
Εικόνα 23: Φωτογραφίες από ψηφιακή φωτογραφική μηχανή. Τα δύο δείγματα A) αμέσως μετά την θερμική επεξεργασία στους 55°C, B) μετά από δύο ώρες επώασης στους 55°C, Γ) αμέσως μετά τη μεταφορά τους στους 27°C, Δ) μετά από δύο ώρες επώασης στους 27°C. Το φιαλίδιο με την ετικέτα A είναι του δείγματος FF σε νερό 2 mg/mL και με την ετικέτα B είναι του δείγματος FF σε μεθανόλη 2 mg/mL.



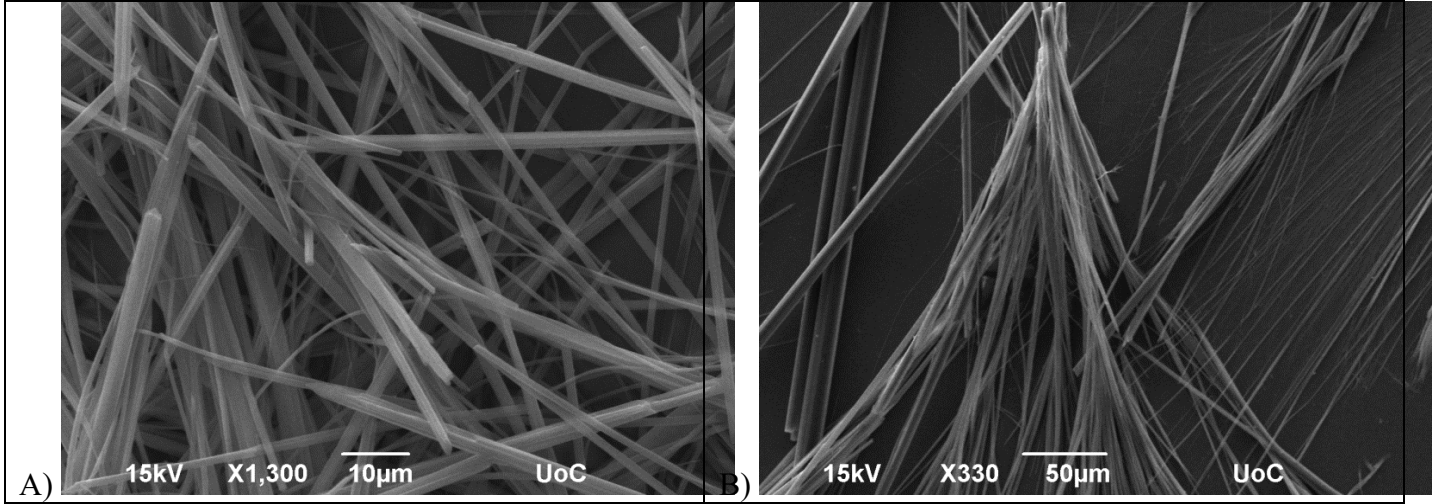
Εικόνα 24: Φωτογραφίες μικροσκοπίου S.E.M.. Δομές του A) FF σε νερό και B) FF σε μεθανόλη 2mg/mL αμέσως μετά τη θερμική επεξεργασία στους 55°C.



Εικόνα 25: Φωτογραφίες μικροσκοπίου S.E.M.. Δομές του A) FF σε νερό και B) FF σε μεθανόλη 2mg/mL μετά από δύο ώρες επώασης στους 55°C.



Εικόνα 26: Φωτογραφίες μικροσκοπίου S.E.M.. Δομές του A) FF σε νερό και B) FF σε μεθανόλη 2mg/mL αμέσως μετά τη θερμική επεξεργασία στους 27°C.



Εικόνα 27: Φωτογραφίες μικροσκοπίου S.E.M.. Δομές του A) FF σε νερό και B) FF σε μεθανόλη 2mg/mL μετά από δύο ώρες επώασης στους 27°C.

Από την οπτική παρατήρηση των δειγμάτων μετά τη θερμική επεξεργασία στους 55°C, φαίνεται ότι το πεπτίδιο είναι διαλυμένο και στους δύο διαλύτες, με λίγους κόκκους υλικού να έχουν μείνει αδιάλυτοι στο δείγμα νερού. Με την πάροδο του χρόνου επώασης στους 55°C, τα δείγματα δεν εμφανίζουν κάποια μεταβολή.

Αισθητή γίνεται η διαφορά μεταξύ των δύο δειγμάτων με τη μεταφορά στους 27°C, όπου το δείγμα νερού θολώνει απευθείας ενώ το δείγμα μεθανόλης παραμένει αμετάβλητο. Επίσης με την πάροδο του χρόνου επώασης στους 27°C δεν φαίνεται κάποια μεταβολή.

Η μελέτη με μικροσκοπία S.E.M. δείχνει το σχηματισμό ιών και νανο-σωλήνων για το δείγμα νερού, ενώ στα δείγματα μεθανόλης δείχνει το σχηματισμό ανομοιομόρφων ιών και δενδροειδών δομών.

Οι παρατηρήσεις συνολικά υποδεικνύουν ότι η μεθανόλη είναι καλύτερος διαλύτης για το πεπτίδιο της διφαινυλαλανίνης σε σχέση με το νερό, συνεπώς η αυτο-οργάνωση του πεπτιδίου στο νερό γίνεται γρηγορότερα και προσφέρει καλά καθορισμένες δομές.

Κεφάλαιο 4: Δομές Υβριδίων Διφαινυλαλανίνης-Πορφυρίνης

4.1 Θεωρητικό Υπόβαθρο

Το μόριο της πορφυρίνης, καθώς επίσης και άλλα χρωμοφόρα μόρια, εμφανίζουν μεγάλο ενδιαφέρον στην έρευνα για ηλιακά κελιά από οργανικές ενώσεις, λόγω της δυνατότητας που έχουν να απορροφούν φως και να προσφέρουν εξιτόνια.

Στη φύση το μόριο της χλωροφύλλης -δομικά παρόμοιο με την πορφυρίνη- συμμετέχει στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης απορροφώντας την ηλιακή ενέργεια. Αυτή η διαδικασία δίνει την έμπνευση ώστε να ερευνηθούν νανοδομές χρωμοφόρων μορίων οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιούν το φως για παραγωγή ρεύματος, προσφέροντας εφαρμογές στον τομέα της μικροηλεκτρονικής και της νανοτεχνολογίας.

Το πεπτίδιο της διφαινυλαλανίνης είναι ένα μόριο το οποίο μπορεί να δώσει πλήθος σταθερών νανοδομών, κυρίως νανο-σωλήνων και ινιδίων, μέσω δεσμών υδρογόνου και π-π* αλληλεπιδράσεων. Συνεπώς η χημική ένωση ενός μορίου πορφυρίνης με το πεπτίδιο της διφαινυλαλανίνης δίνει τη δυνατότητα να αξιοποιηθούν οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις του πεπτιδίου της διφαινυλαλανίνης ως βιολογικό εκμαγείο, το οποίο να μπορεί να κατευθύνει με τη σειρά του τη στοίχιση ομάδων πορφυρίνης και η στοίχιση αυτή να δίνει τη δυνατότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων έπειτα από απορρόφηση φωτός.

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

Τα πειράματα αυτά διεξήχθησαν σε συνεργασία με τον κ. Καθ. Αθανάσιο Κουτσολέλο, Δρ Γεώργιο Χαραλαμπίδη και MSc Κωνσταντίνο Καρίκη από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, οι οποίοι συνέθεσαν όλα τα υβριδικά μόρια Διφαινυλαλανίνης-Πορφυρίνης που χρησιμοποιήθηκαν. Επιπροσθέτως, για τη σειρά πειραμάτων αυτο-οργάνωσης με τη μέθοδο Electrosprinning υπήρξε περαιτέρω συνεργασία με τον Καθ. Alexander Bittner και Δρ. Wiwat Nuansing στις εγκαταστάσεις της CIC nanoGUNE στο San Sebastián, Ισπανία. Η δική μου εργασία σε αυτό το κομμάτι ήταν η μελέτη της αυτο-οργάνωσης των μορίων. Τα υβριδικά πεπτίδια δόθηκαν σε μορφή σκόνης.

4.2.1 Αυτο-οργάνωση εναντιομερών των υβριδίων

Η πρώτη σειρά πειραμάτων στοχεύει στη σύγκριση της αυτο-οργάνωσης των του μορίου Διφαινυλαλανίνης-Πορφυρίνης ανάλογα με τη χειρομορφία του. Γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα δύο εναντιομερή του μορίου διφαινυλαλανίνης-(μονοαμινο-τετραφαινυλο)πορφυρίνης προστατευμένου με ομάδα Fmoc- στο αμινοτελικό άκρο (Fmoc-FF-TPP).

Παρασκευάστηκαν τα εξής δείγματα:

Fmoc-FF-TPP (D,D εναντιομερές) σε διαλύτη 20%HFIP-80%μεθανόλη με συγκέντρωση 7mM.

Fmoc-FF-TPP (D,D εναντιομερές) σε διαλύτη 20%HFIP-80%THF με συγκέντρωση 7mM.

Για την παρασκευή των διαλυμάτων:

- Τοποθετούμε τη σκόνη του υβριδικού μορίου σε γυάλινο φιαλίδιο.
- Διαλύουμε τη σκόνη στην ποσότητα HFIP που αντιστοιχεί.
- Προσθέτουμε το διαλύτη που επιλέξαμε επίσης στην αντίστοιχη ποσότητα.

Για την παρατήρηση των δειγμάτων:

- Μετά την παρασκευή του δείγματος παίρνουμε σταγόνα 10μL του δείγματος και την τοποθετούμε σε γυάλινο υπόστρωμα. Αφήνουμε το υπόστρωμα σε ηρεμία μία μέρα για να εξατμιστεί ο διαλύτης.
- Κάνουμε sputtering χρυσού 15nm και παρατηρούμε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

4.2.2 Αυτο-οργάνωση εναντιομερών των υβριδίων χωρίς τη χρήση (1,1,1,3,3,3)εξαφθορο-ισοπροπανόλης (HFIP)

Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων διερευνάται η δυνατότητα των υβριδικών μορίων (Fmoc-FF-TPP) να μπορούν να αυτο-οργανωθούν χωρίς την προσθήκη HFIP στο διάλυμα, ώστε να έχουμε σύστημα ενός διαλύτη. Ελέγχθηκαν και τα δύο εναντιομερή- (D,D) και (L,L).

Παρασκευάστηκαν τα εξής δείγματα:

- Fmoc-FF-TPP (D,D εναντιομερές) σε νερό με συγκέντρωση 2mg/mL.
- Fmoc-FF-TPP (L,L εναντιομερές) σε νερό με συγκέντρωση 2mg/mL.
- Fmoc-FF-TPP (D,D εναντιομερές) σε αιθανόλη με συγκέντρωση 1mg/mL.
- Fmoc-FF-TPP (L,L εναντιομερές) σε αιθανόλη με συγκέντρωση 1mg/mL.
- Fmoc-FF-TPP (D,D εναντιομερές) σε αιθανόλη με συγκέντρωση 2mg/mL.
- Fmoc-FF-TPP (L,L εναντιομερές) σε αιθανόλη με συγκέντρωση 2mg/mL.
- Fmoc-FF-TPP (D,D εναντιομερές) σε THF με συγκέντρωση 1mg/mL.
- Fmoc-FF-TPP (L,L εναντιομερές) σε THF με συγκέντρωση 1mg/mL.

Για την παρασκευή των διαλυμάτων:

- Τοποθετούμε τη σκόνη του υβριδικού μορίου σε γυάλινο φιαλίδιο. Για τα δείγματα νερού χρησιμοποιήθηκε erpendorf tube.
- Προσθέτουμε το διαλύτη που επιλέξαμε.
- Βάζουμε το φιαλίδιο/erpendorf tube σε θερμό υδατόλουτρο για 30 λεπτά χρησιμοποιώντας ανά 10 λεπτά sonication με διάρκεια 20 δευτερολέπτων για κάθε φορά. Αυτή η διαδικασία δε χρειάστηκε για τα δείγματα THF γιατί σε εκείνη την περίπτωση το πεπτίδιο διαλύθηκε απευθείας.
- Το υδατόλουτρο ήταν σε θερμοκρασία 65°C για τα δείγματα αιθανόλης και 75°C για τα δείγματα νερού.

Για την παρατήρηση των δειγμάτων:

- Βάζουμε σταγόνα 10μL σε γυάλινο υπόστρωμα και αφήνουμε μία μέρα για να εξατμιστεί ο διαλύτης.
- Κάνουμε sputtering χρυσού 15nm και παρατηρούμε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

4.2.3 Αυτο-οργάνωση υβριδίων με ελεύθερο καρβοξυτελικό άκρο

Στην τρίτη σειρά πειραμάτων ελέγχθηκε η δυνατότητα αυτο-οργάνωσης του υβριδικού μορίου (μονοαμινο-τετραφαινυλο)πορφυρίνης-Διφαινυλαλανίνης με ελεύθερο καρβοξυτελικό άκρο (TPP-FF-COOH) και του αντίστοιχου μορίου με προσδεμένο ένα άτομο ψευδαργύρου στην ομάδα της πορφυρίνης ((Zn)TPP-FF-COOH).

Παρασκευάστηκαν τα εξής δείγματα:

- TPP-FF-COOH σε διαλύτη 20%HFIP-80% μεθανόλη με συγκέντρωση 7mM.

(Zn)TPP-FF-COOH σε διαλύτη 20%HFIP-80% μεθανόλη με συγκέντρωση 7mM.

TPP-FF-COOH σε διαλύτη 20%HFIP-80% THF με συγκέντρωση 7mM.

(Zn)TPP-FF-COOH σε διαλύτη 20%HFIP-80% THF με συγκέντρωση 7mM.

Για την παρασκευή των διαλυμάτων ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο:

- Τοποθετούμε τη σκόνη του υβριδικού μορίου σε γυάλινο φιαλίδιο.
- Διαλύουμε τη σκόνη στην ποσότητα HFIP που αντιστοιχεί.
- Προσθέτουμε το διαλύτη που επιλέξαμε επίσης στην αντίστοιχη ποσότητα.

Για την παρατήρηση των δειγμάτων:

- Βάζουμε σταγόνα 10μL σε γυάλινο υπόστρωμα και αφήνουμε μία μέρα για να εξατμιστεί ο διαλύτης.
- Κάνουμε sputtering χρυσού 15nm και παρατηρούμε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

4.2.4 Μείγματα υβριδικών πεπτιδίων

Στην τέταρτη σειρά πειραμάτων ελέγχθηκε η δυνατότητα να έχουμε μία ανάμειξη του πεπτιδίου της διφαινυλαλανίνης με τα υβριδικά πεπτιδία εκμεταλλευόμενοι τις δυνατότητές τους στην αυτο-οργάνωση για να πετύχουμε σύνθετες νανοδομές των δύο πεπτιδίων. Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων είχαμε συνδυασμό του υβριδικού πεπτιδίου διφαινυλαλανίνης-(μονοαμινο-τετραφαινυλο)πορφυρίνης (NH₂-FF-TPP) με το πεπτιδίο της διφαινυλαλανίνης (NH₂-FF-COOH), καθώς επίσης και το συνδυασμό NH₂-FF-TPP με το TPP-FF-COOH για να ελέγξουμε τις αλληλεπιδράσεις φορτισμένων αμινοτελικών και καρβοξυτελικών άκρων (head to tail interactions) μεταξύ των μορίων.

Παρασκευάστηκαν τα εξής δείγματα:

Μείγμα FF-TPP και FF σε διαλύτη 20%HFIP-80%μεθανόλη με συγκέντρωση 7mM και αναλογία mol 1:9.

Αντίστοιχο control δείγμα: FF-TPP σε διαλύτη 20%HFIP-80%μεθανόλη με συγκέντρωση 0,7mM

Μείγμα FF-TPP και FF σε διαλύτη 20%HFIP-80%μεθανόλη με συγκέντρωση 7mM και αναλογία mol 1:50.

Αντίστοιχο control δείγμα: FF-TPP σε διαλύτη 20%HFIP-80%μεθανόλη με συγκέντρωση 0,14mM

Μείγμα NH₂-FF-TPP και TPP-FF-COOH σε διαλύτη 20%HFIP-80%νερό με συγκέντρωση 7mM και αναλογία mol 1:1

Για την παρασκευή των παραπάνω δειγμάτων ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο:

- Τοποθετούμε τις σκόνες των υβριδικών μορίων σε γυάλινο φιαλίδιο.
- Διαλύουμε τις σκόνες στην ποσότητα HFIP που αντιστοιχεί.
- Προσθέτουμε το διαλύτη που επιλέξαμε επίσης στην αντίστοιχη ποσότητα.

Παρατήρηση: για το μείγμα NH₂-FF-TPP και TPP-FF-COOH προηγήθηκε διάλυση των πεπτιδίων σε χλωροφόρμιο και εξάτμισή του μετά το πέρας μιας νύχτας, για να εξασφαλιστεί διάλυση και ανάμειξη των πεπτιδικών σκονών πριν την εισαγωγή των διαλυτών.

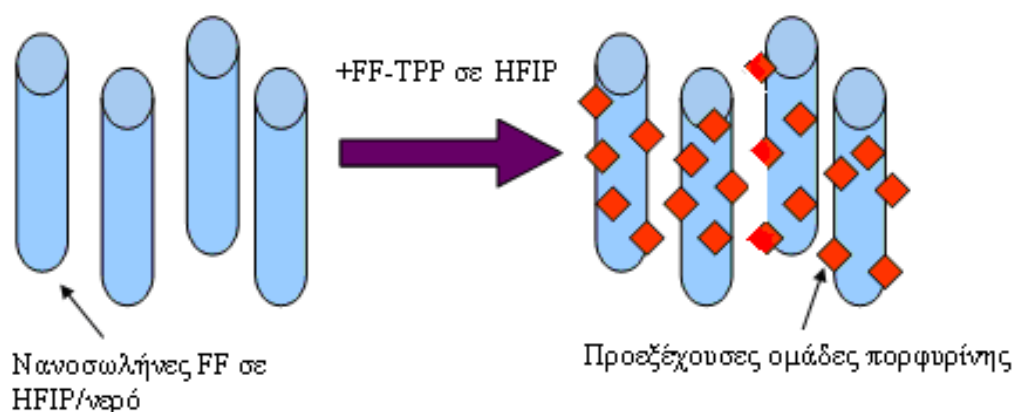
Επίσης παρασκευάστηκε το δείγμα:

Μείγμα FF-TPP και νανοσωλήνων FF σε διαλύτη 20%HFIP-80%νερό με συγκέντρωση 7mM

και αναλογία mol 1:9.

Για την παρασκευή του ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο:

- Διαλύουμε τη σκόνη FF στη μισή από τη συνολική ποσότητα HFIP που θα χρησιμοποιούσαμε για τη συνολική μάζα σε γυάλινο φιαλίδιο.
- Προσθέτουμε όλη την ποσότητα νερού.
- Περιμένουμε 15 λεπτά να σχηματιστούν οι νανοσωλήνες του FF.
- Σε δεύτερο φιαλίδιο χρησιμοποιούμε την υπόλοιπη ποσότητα HFIP για να διαλύσουμε το υβριδικό πεπτίδιο.
- Προσθέτουμε στο διάλυμα νανο-σωλήνων το διάλυμα του υβριδικού πεπτιδίου σε HFIP αναδεύοντας γρήγορα με την πιπέτα και αφήνουμε το φιαλίδιο σε ηρεμία.



Εικόνα 28: Σχηματική απεικόνιση παρασκευής μείγματος FF-TPP και νανοσωλήνων FF

4.2.5 Ίνες υβριδικού πεπτιδίου με τη μέθοδο Electrospinning

Στην πέμπτη σειρά πειραμάτων ελέγχεται η δυνατότητα του μορίου της πορφυρίνης και των υβριδικών μορίων να δημιουργούν ίνες με τη μέθοδο Electrospinning. Χρησιμοποιήθηκε το μόριο της (μονοαμινο-τετραφαινυλο)πορφυρίνης (TPP-NH₂) καθώς επίσης το υβριδικό πεπτίδιο διφαινυλαλανίνης-(μονοαμινο-τετραφαινυλο)πορφυρίνης (NH₂-FF-TPP) και το πεπτίδιο της διφαινυλαλανίνης (NH₂-FF-COOH).

Παρασκευάστηκαν τα εξής δείγματα:

- TPP-NH₂ σε HFIP με συγκέντρωση 8,5% w/w
- TPP-NH₂ σε HFIP με συγκέντρωση 9,09% w/w
- TPP-NH₂ σε HFIP με συγκέντρωση 12% w/w
- TPP-NH₂ σε Τριφθορο-οξικό οξύ (TFA) με συγκέντρωση 9,09% w/w
- FF-TPP σε HFIP με συγκέντρωση 8,5% w/w
- FF-TPP σε HFIP με συγκέντρωση 9,09% w/w
- FF-TPP σε HFIP με συγκέντρωση 12% w/w
- FF-TPP σε TFA με συγκέντρωση 9,09% w/w
- Μείγμα FF και FF-TPP (αναλογία mol 9:1) σε HFIP με συγκέντρωση 8,5% w/w
- Μείγμα FF και FF-TPP (αναλογία mol 9:1) σε HFIP με συγκέντρωση 9,09% w/w
- Μείγμα FF και FF-TPP (αναλογία mol 9:1) σε HFIP με συγκέντρωση 12% w/w

Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν βάζοντας τη σκόνη των μορίων σε eppendorf tube και ανακινώντας το δείγμα σε mixer για τρεις ώρες στους 750rpm και θερμοκρασία δωματίου. 5μL από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία δομών στη διάταξη του Electrospinning για ένα εύρος τάσεων 8-35kV και αποστάσεων ακίδας-στόχου 12-25cm και υγρασία στο θάλαμο της διάταξης μικρότερη-ίση του 19% την οποία ρυθμίζαμε με πιστόλι θερμού αέρα. Μόνο για την περίπτωση των 35kV, συνδέονταν δύο μπαταρίες στη διάταξη, ώστε η μία να δίνει θετικό δυναμικό +25kV και η άλλη αρνητικό δυναμικό -10kV συνδεδεμένη ανάποδα, οπότε $\Delta V = 25 - (-10) = 35\text{kV}$. Η εναπόθεση της δομής που παραγόταν γινόταν πάνω σε γυάλινη καλυπτρίδα μικροσκοπίου που τοποθετούταν πάνω στο στόχο. Ελέγχσαμε την καλυπτρίδα σε οπτικό μικροσκόπιο, μετά την εξάτμιση του διαλύτη.

Για τα δείγματα TPP-NH₂, FF-TPP, και μείγμα FF και FF-TPP (αναλογία mol 9:1) σε HFIP με συγκέντρωση 9,09%wt, απόσταση ακίδας-στόχου 12cm και διαφορά δυναμικού 35kV, έγινε περαιτέρω έλεγχος των δομών με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (S.E.M.). Για να μελετηθούν τα δείγματα σε S.E.M. μικροσκόπιο, στις καλυπτρίδες έγινε sputtering 15nm χρυσού.

Φασματοσκοπία υπερέθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των ινών που παράχθηκαν από τα δείγματα του πεπτιδίου FF-TPP και του μείγματος FF-TPP και FF (αναλογία mol 1:9) με συγκέντρωση 9,09%wt, απόσταση ακίδας-στόχου 12cm και διαφορά δυναμικού 35kV. Για τη φασματοσκοπία FTIR, το electrospinning έγινε τρεις φορές με 10μL δείγματος ώστε να υπάρχει αρκετό υλικό για τη μελέτη, και οι ίνες απομακρύνθηκαν από την γυάλινη καλυπτρίδα με σπάτουλα ώστε να τις τοποθετήσουμε στη βάση του φασματοσκόπιου.

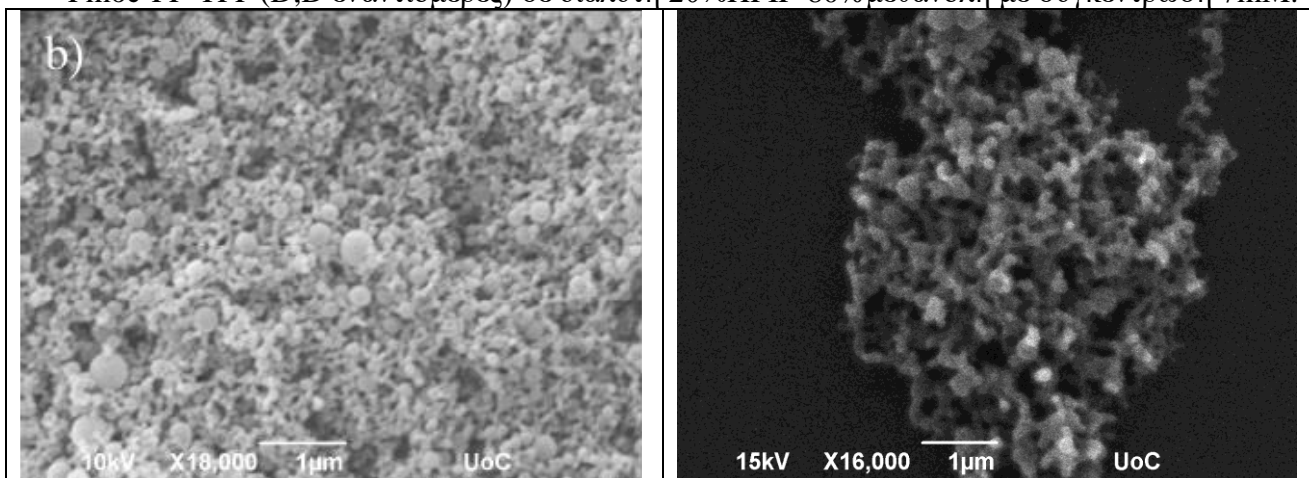
Περίθλαση ακτίνων-X (XRD) έγινε στις σκόνες των πεπτιδίων FF, FF-TPP, μείγματος σκονών FF και FF-TPP και στις ίνες που παράχθηκαν με electrospinning από το δείγμα FF-TPP και FF (αναλογία mol 1:9) με συγκέντρωση 12%wt, απόσταση ακίδας-στόχου 12cm και διαφορά δυναμικού 35kV. Το μείγμα σκονών FF και FF-TPP χρειάστηκε αναμειχθεί, κονιορτοποιώντας με σπάτουλα πάνω στη βάση του περιθλασίμετρου για τη μέτρηση. Για να υπάρχει αρκετό υλικό για τη μέτρηση στο δείγμα ινών, χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση 12%wt, το electrospinning έγινε τρεις φορές με 10μL δείγματος, και οι ίνες απομακρύνθηκαν από την γυάλινη καλυπτρίδα με σπάτουλα και τοποθετήθηκαν στη βάση του περιθλασίμετρου.

AFM μικροσκοπία χρησιμοποιήθηκε για δομικό χαρακτηρισμό δείγματος FF-TPP σε HFIP με συγκέντρωση 9,09% w/w, απόσταση ακίδας-στόχου 12cm και διαφορά δυναμικού 35kV. Η μελέτη έγινε από την κα Aitziber Eleta.

4.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

4.3.1 Αυτο-οργάνωση εναντιομερών των υβριδίων

- Fmoc-FF-TPP (D,D εναντιομερές) σε διαλύτη 20%HFIP-80%μεθανόλη με συγκέντρωση 7mM.

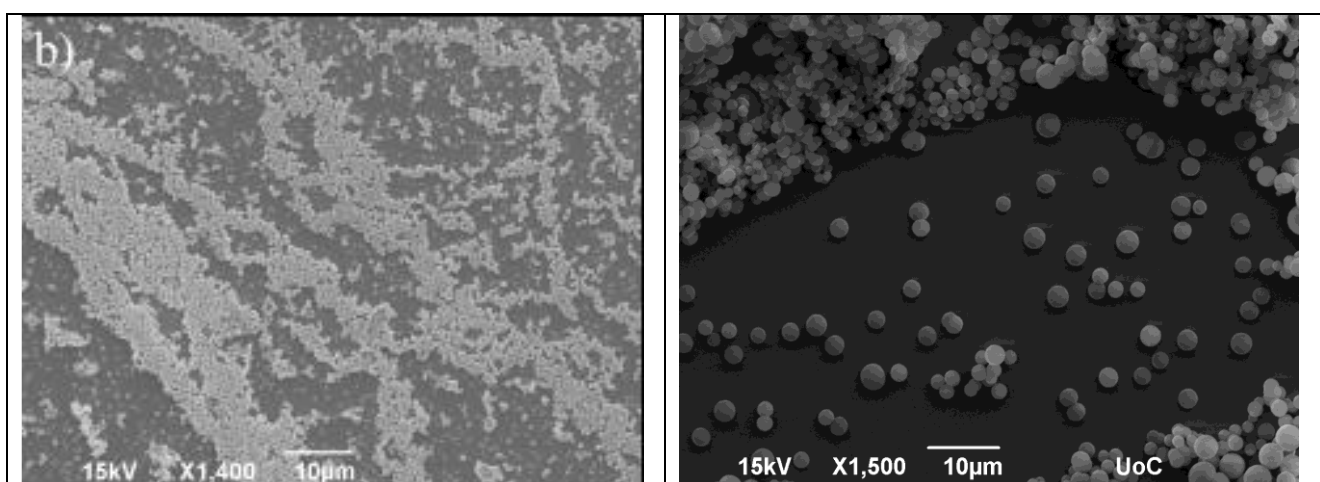


Εικόνα 29: Φωτογραφίες μικροσκοπίου S.E.M.. Fmoc-FF(L,L)-TPP σε 20%HFIP-80%μεθανόλη 7mM (αριστερά), Fmoc-FF(D,D)-TPP σε 20%HFIP-80%μεθανόλη 7mM (δεξιά).

Η αριστερή φωτογραφία είναι από τους Charalambidis et al., Chem. Eur. J., 2011,17, 7213-7219.

Το Fmoc-FF(D,D)-TPP διαλύεται σε HFIP και το διάλυμα αποκτά πράσινο χρώμα. Με την προσθήκη μεθανόλης το διάλυμα γίνεται κόκκινο και απευθείας μετά την παρασκευή του δείγματος παρατηρείται σχηματισμός εναιωρήματος κόκκινων σωματιδίων με γυμνό μάτι. Τα αποτελέσματα από το S.E.M. μικροσκόπιο δείχνουν τη δημιουργία ανομοιόμορφου μεγέθους σφαιρών με διάμετρο μικρότερη από 1µm, και δε φαίνεται να υπάρχει απόκλιση ανάμεσα στα δύο εναντιομερή.

- Fmoc-FF-TPP (D,D εναντιομερές) σε διαλύτη 20%HFIP-80%THF με συγκέντρωση 7mM.



Εικόνα 30: Φωτογραφίες μικροσκοπίου S.E.M.. Fmoc-FF(L,L)-TPP σε 20%HFIP-80%THF 7mM (αριστερά), Fmoc-FF(D,D)-TPP σε 20%HFIP-80%THF 7mM (δεξιά).

Η αριστερή φωτογραφία είναι από τους Charalambidis et al., Chem. Eur. J., 2011,17, 7213-7219.

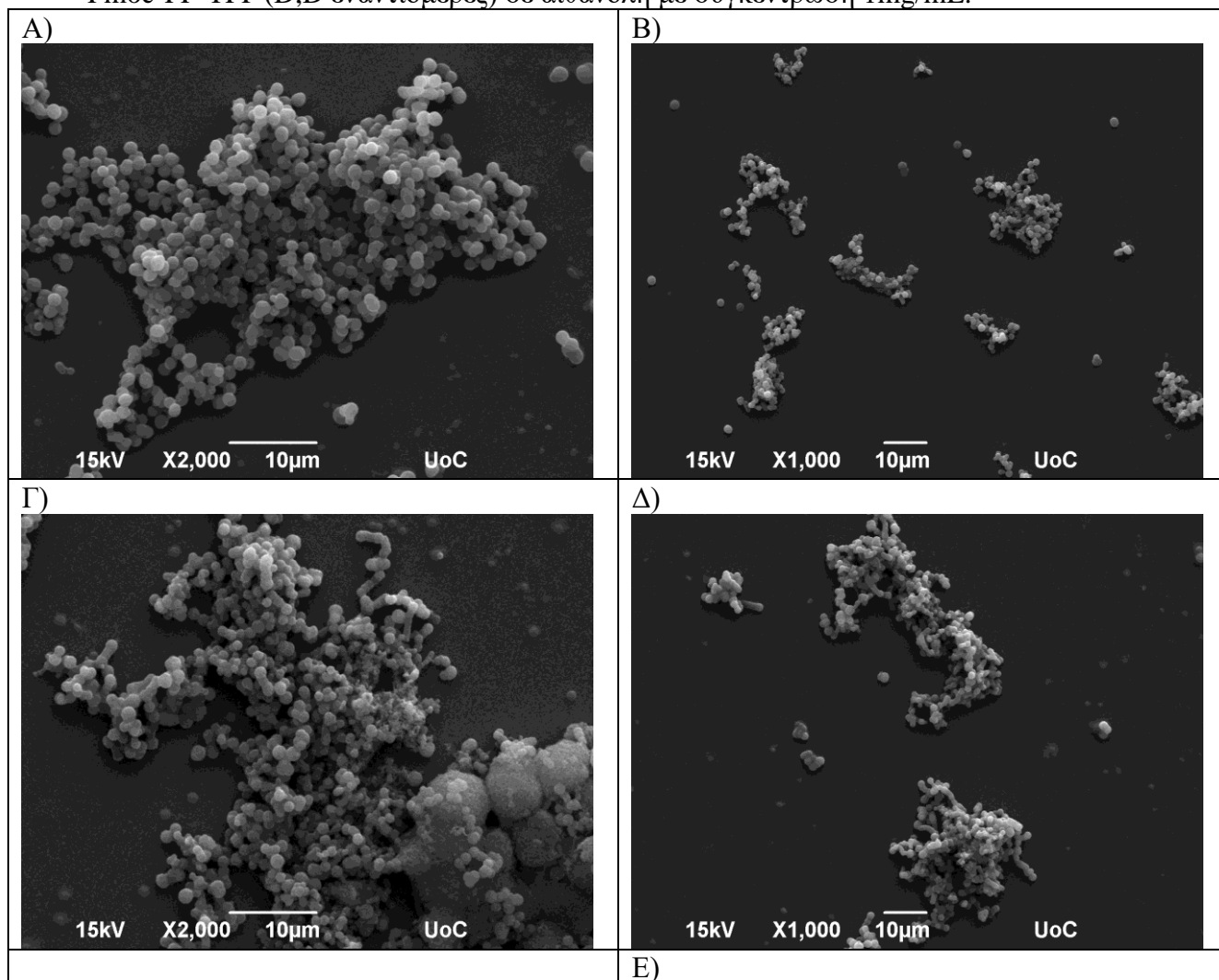
Το Fmoc-FF(D,D)-TPP διαλύεται σε HFIP και το διάλυμα αποκτά πράσινο χρώμα. Με την

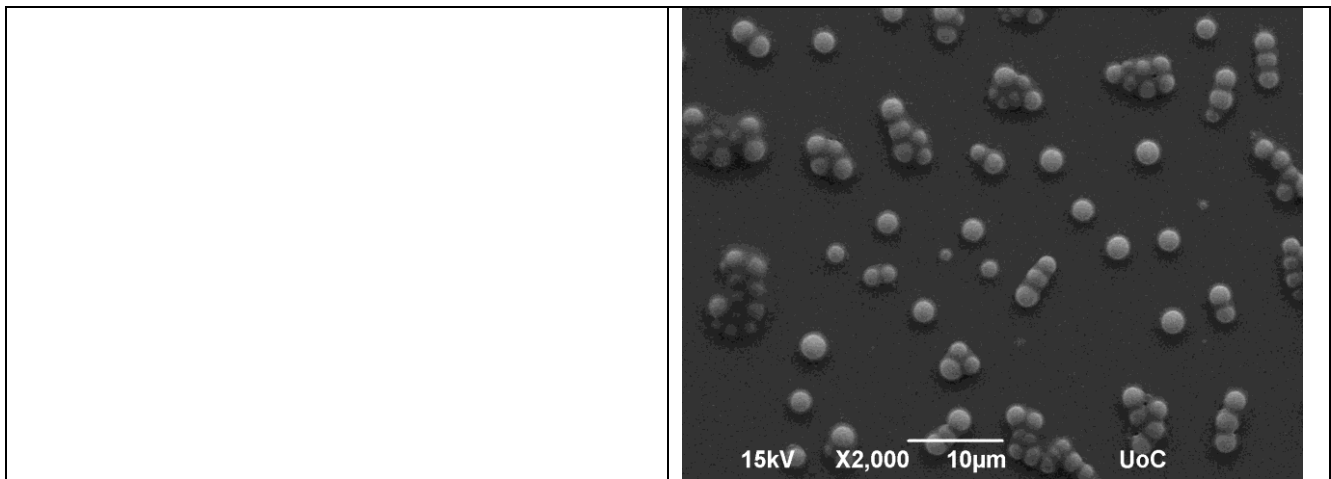
προσθήκη THF το διάλυμα γίνεται διαυγές κόκκινο. Τα αποτελέσματα από το S.E.M. μικροσκόπιο δείχνουν τη δημιουργία σφαιρών οι οποίες είναι περισσότερο ομοιογενείς σε διάμετρο σε σχέση με το προηγούμενο διάλυμα μεθανόλης, με διάμετρο κοντά στα 3μm. Δε φαίνεται να υπάρχει απόκλιση ανάμεσα στα δύο εναντιομερή.

4.3.2 Αυτο-οργάνωση εναντιομερών των υβριδίων χωρίς τη χρήση (1,1,1,3,3,3)-εξαφθορο-ισοπροπανόλης (HFIP)

Τα δείγματα που παρασκευάστηκαν σε διαλύτη νερό δεν έδωσαν δομές γιατί το πεπτίδιο είναι αρκετά υδρόφοβο οπότε και δεν διαλύθηκε, ακόμη και σε θερμοκρασία 75°C.

- Fmoc-FF-TPP (D,D εναντιομερές) σε αιθανόλη με συγκέντρωση 1mg/mL.

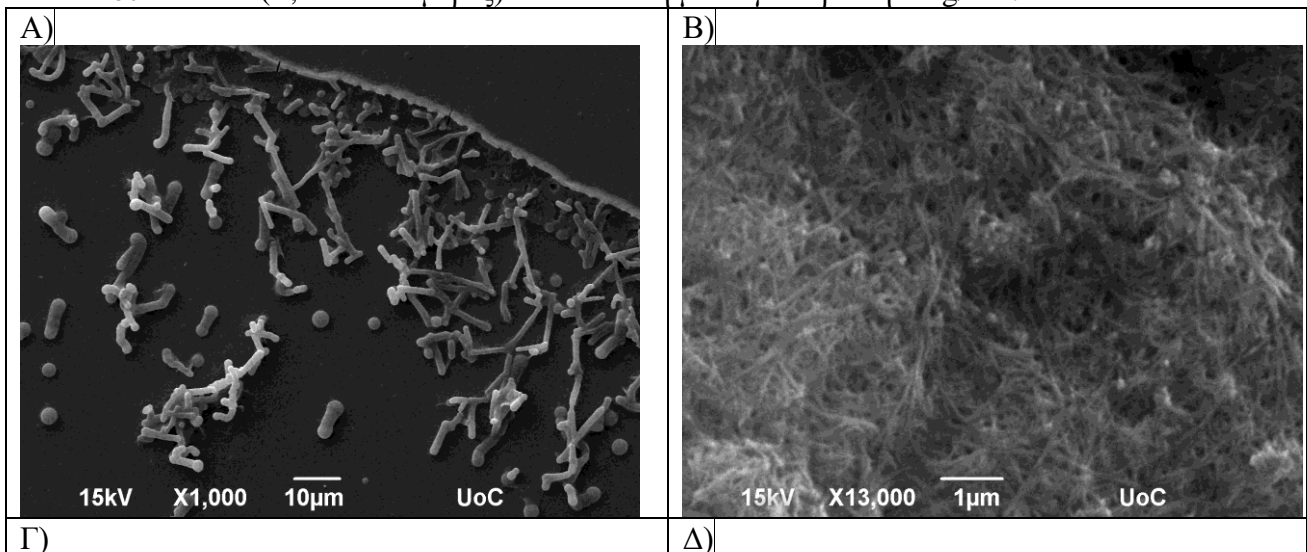


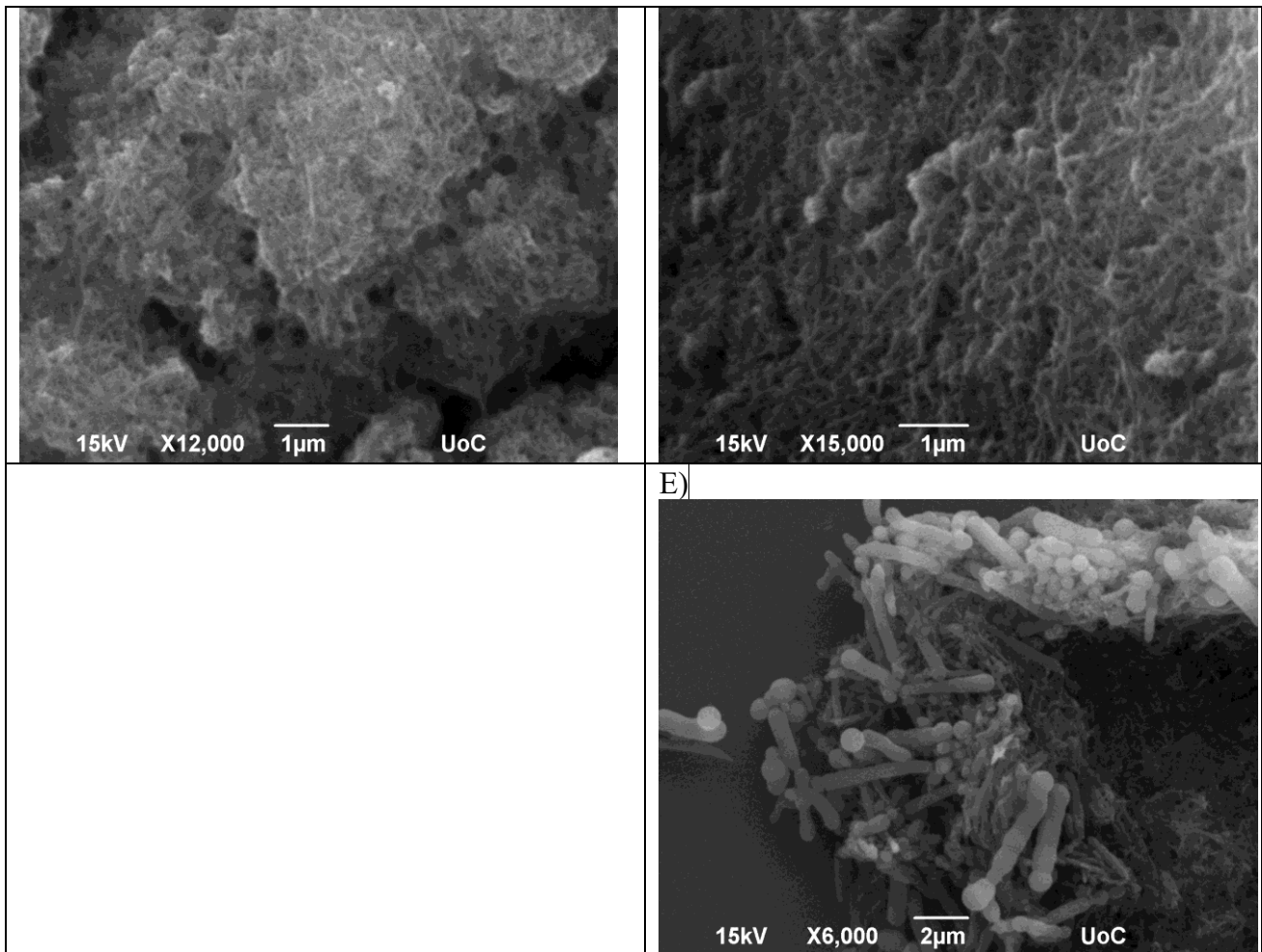


Εικόνα 31: Φωτογραφίες μικροσκοπίου S.E.M.. Fmoc-FF(D,D)-TPP σε αιθανόλη 1mg/mL A) αμέσως μετά την παρασκευή του δείγματος, B) μισή ώρα μετά, Γ) μία ώρα μετά, Δ) δύο ώρες μετά, Ε) είκοσι-τέσσερις ώρες μετά.

Η σκόνη του πεπτιδίου δε διαλύεται εντελώς στην αιθανόλη μετά το πέρας της διαδικασίας θέρμανσης-sonication. Παρόλα αυτά, στο φιαλίδιο το διάλυμα είναι κόκκινο και διαφαίνονται κάποιες δομές. Τα αποτελέσματα από το S.E.M. μικροσκόπιο δείχνουν άμορφες περιοχές και τη δημιουργία σφαιρών με διάμετρο κοντά στα 2µm. Δε φαίνεται να υπάρχει απόκλιση στα μεγέθη των σφαιρών σε σύγκριση με το χρόνο επώασης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

- Fmoc-FF-TPP (L,L εναντιομερές) σε αιθανόλη με συγκέντρωση 1mg/mL.



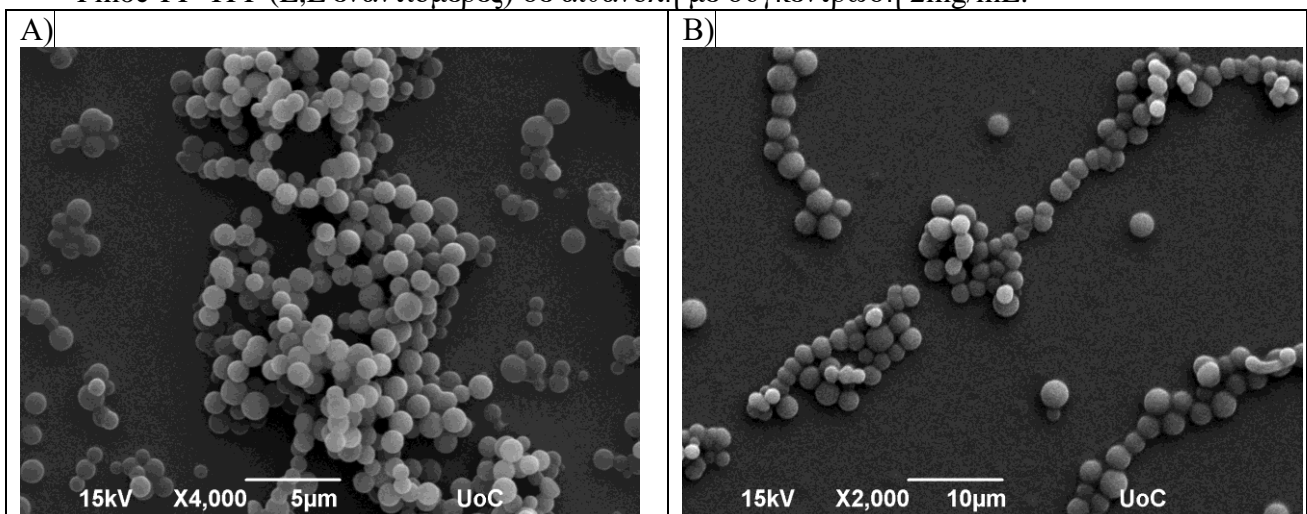


Εικόνα 32: Φωτογραφίες μικροσκοπίου S.E.M.. Fmoc-FF(L,L)-TPP σε αιθανόλη 1mg/mL A) αμέσως μετά την παρασκευή του δείγματος, B) μισή ώρα μετά, Γ) μία ώρα μετά, Δ) δύο ώρες μετά, E) είκοσι-τέσσερις ώρες μετά.

Η σκόνη του πεπτιδίου δε διαλύεται εντελώς στην αιθανόλη μετά το πέρας της διαδικασίας θέρμανσης-sonication. Παρόλα αυτά, στο φιαλίδιο το διάλυμα είναι κόκκινο και διαφαίνονται κάποιες δομές. Τα αποτελέσματα από το S.E.M. μικροσκόπιο δείχνουν το σχηματισμό ινώδους φιλμ και τη δημιουργία συσσωματωμένων σφαιρών.

Fmoc-FF-TPP (D,D εναντιομερές) σε αιθανόλη με συγκέντρωση 2mg/mL.

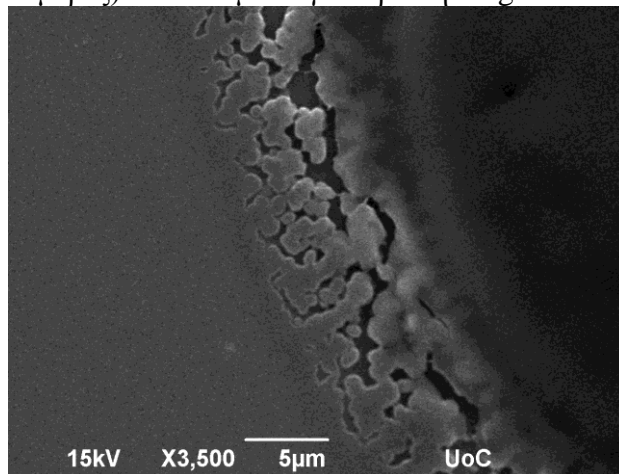
Fmoc-FF-TPP (L,L εναντιομερές) σε αιθανόλη με συγκέντρωση 2mg/mL.



Εικόνα 33: Φωτογραφίες μικροσκοπίου S.E.M.. A) Fmoc-FF(L,L)-TPP και B) Fmoc-FF(D,D)-TPP σε αιθανόλη 2mg/mL

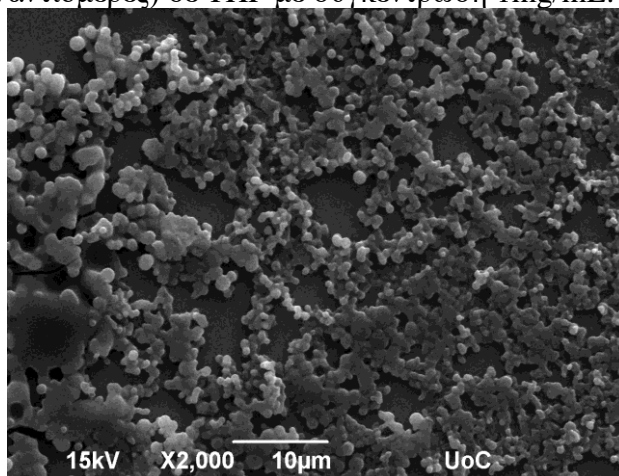
Στα 2mg/mL τα αποτελέσματα φαίνονται πιο ομοιόμορφα για τα δύο εναντιομερή, εμφανίζοντας συσσωματωμένες σφαίρες με διάμετρο περίπου 1μm.

- Fmoc-FF-TPP (D,D εναντιομερές) σε THF με συγκέντρωση 1mg/mL.



Εικόνα 34: Φωτογραφία μικροσκοπίου S.E.M.. Fmoc-FF(D,D)-TPP σε THF 1mg/mL.

- Fmoc-FF-TPP (L,L εναντιομερές) σε THF με συγκέντρωση 1mg/mL.

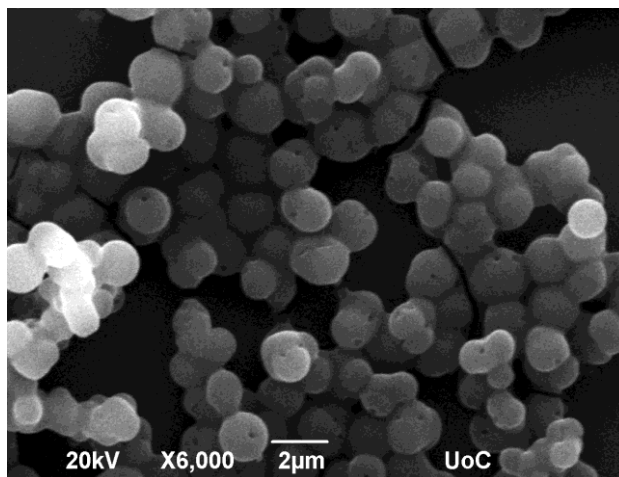


Εικόνα 35: Φωτογραφία μικροσκοπίου S.E.M.. Fmoc-FF(L,L)-TPP σε THF 1mg/mL.

Η σκόνη του πεπτιδίου διαλύεται εντελώς στο THF δίνοντας ένα διαυγές κόκκινο διάλυμα, για αυτό το λόγο δε χρειάστηκε περαιτέρω επεξεργασία με θέρμανση-sonication. Οι δομές που δίνει το πεπτίδιο μ/ετά την εξάτμιση του διαλύτη είναι κυρίως ένα φιλμ του υλικού στις ρωγμές του οποίου προεξέχουν σφαιρικά συσσωματώματα. Η ταχεία εξάτμιση του διαλύτη δεν βοηθά σε έναν καλά καθορισμένο σχηματισμό δομών. Δε φαίνεται κάποια απόκλιση στις δομές που σχηματίζουν τα δύο εναντιομερή.

4.3.3 Αυτο-οργάνωση υβριδίων με ελεύθερο καρβοξυτελικό άκρο

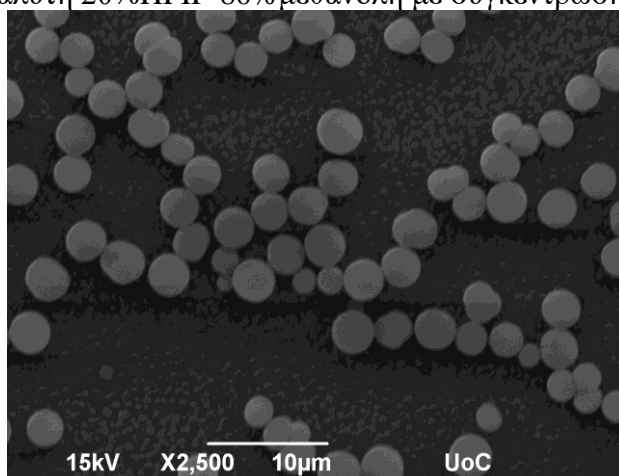
- TPP-FF-COOH σε διαλύτη 20%HFIP-80%μεθανόλη με συγκέντρωση 7mM.



Εικόνα 36: Φωτογραφία μικροσκοπίου S.E.M.. TPP-FF-COOH σε 20%HFIP-80%μεθανόλη 7mM.

Το TPP-FF-COOH διαλύεται σε HFIP και το διάλυμα αποκτά πράσινο χρώμα. Με την προσθήκη μεθανόλης το διάλυμα γίνεται κόκκινο και απευθείας μετά την παρασκευή του δείγματος φαίνονται δομές. Τα αποτελέσματα από το S.E.M. μικροσκόπιο δείχνουν τη δημιουργία συσσωματωμάτων σφαιρών διαμέτρου κοντά στα 2μm με οπές.

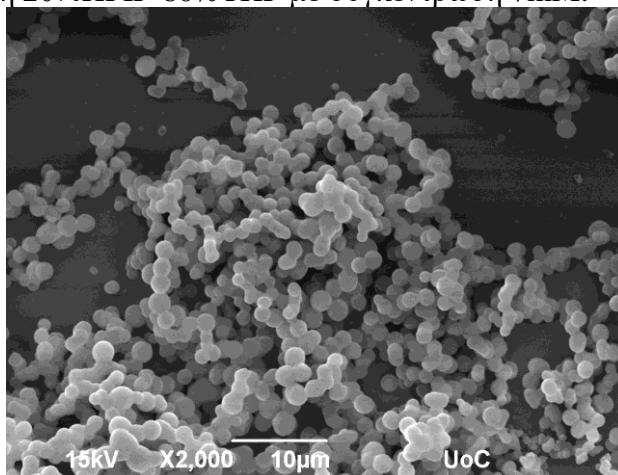
- (Zn)TPP-FF-COOH σε διαλύτη 20%HFIP-80%μεθανόλη με συγκέντρωση 7mM.



Εικόνα 37: Φωτογραφία μικροσκοπίου S.E.M.. (Zn)TPP-FF-COOH σε 20%HFIP-80%μεθανόλη 7mM.

Το (Zn)TPP-FF-COOH διαλύεται σε HFIP και το διάλυμα είναι μάρου χρώματος, διότι δεν μπορεί να γίνει πρωτονίωση της πορφυρίνης. Με την προσθήκη μεθανόλης, το διάλυμα γίνεται κόκκινο και απευθείας μετά την παρασκευή του δείγματος φαίνονται δομές. Τα αποτελέσματα από το S.E.M. μικροσκόπιο δείχνουν τη δημιουργία σφαιρών με διάμετρο περίπου στα 2,5μm. Συγκριτικά με το δείγμα όπου δεν είναι προσδεμένο το άτομο ψευδαργύρου βλέπουμε ότι δεν υπάρχουν οπές στις σφαίρες και η συσσωμάτωση των σφαιρών δεν είναι το ίδιο έντονη.

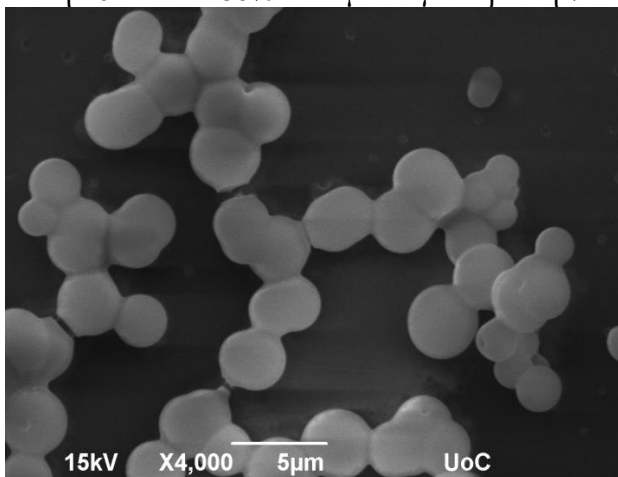
- TPP-FF-COOH σε διαλύτη 20%HFIP-80%THF με συγκέντρωση 7mM.



Εικόνα 38: Φωτογραφία μικροσκοπίου S.E.M.. TPP-FF-COOH σε 20%HFIP-80%THF 7mM.

Το TPP-FF-COOH διαλύεται σε HFIP και το διάλυμα αποκτά πράσινο χρώμα. Με την προσθήκη THF, το διάλυμα γίνεται διαυγές κόκκινο. Τα αποτελέσματα από το S.E.M. μικροσκόπιο δείχνουν τη δημιουργία συσσωματωμένων σφαιρών με διάμετρο κοντά στα 2,5µm.

- (Zn)TPP-FF-COOH σε διαλύτη 20%HFIP-80%THF με συγκέντρωση 7mM.

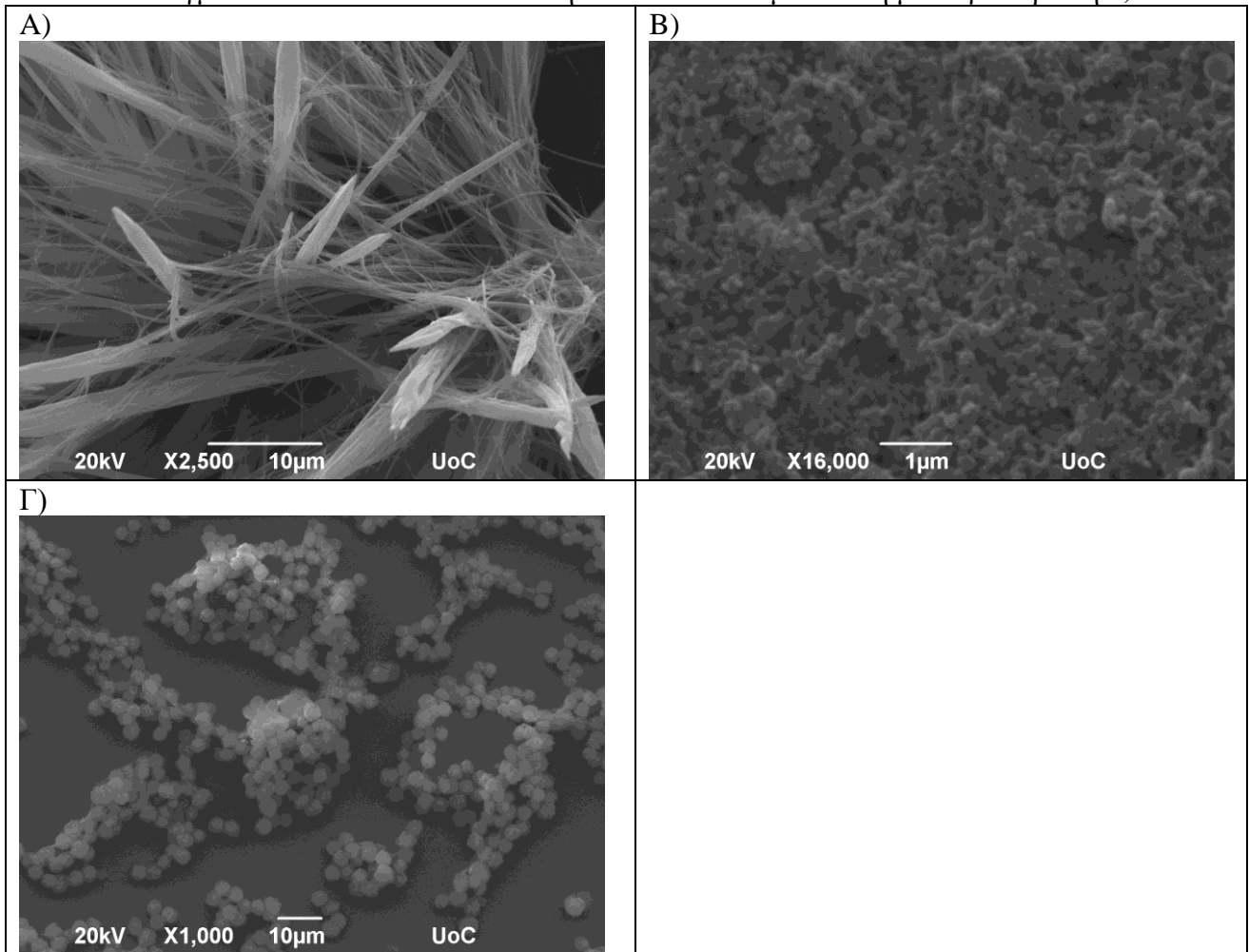


Εικόνα 39: Φωτογραφία μικροσκοπίου S.E.M.. (Zn)TPP-FF-COOH σε 20%HFIP-80%THF 7mM.

Το (Zn)TPP-FF-COOH διαλύεται σε HFIP και το διάλυμα είναι μαύρου χρώματος. Με την προσθήκη THF, το διάλυμα γίνεται διαυγές κόκκινο. Τα αποτελέσματα από το S.E.M. μικροσκόπιο δείχνουν τη δημιουργία σφαιρών με διάμετρο περίπου στα 2,5µm. Συγκριτικά με το δείγμα όπου δεν είναι προσδεμένο το άτομο ψευδαργύρου δεν φαίνεται κάποια διαφορά.

4.3.4 Μείγματα υβριδικών πεπτιδίων.

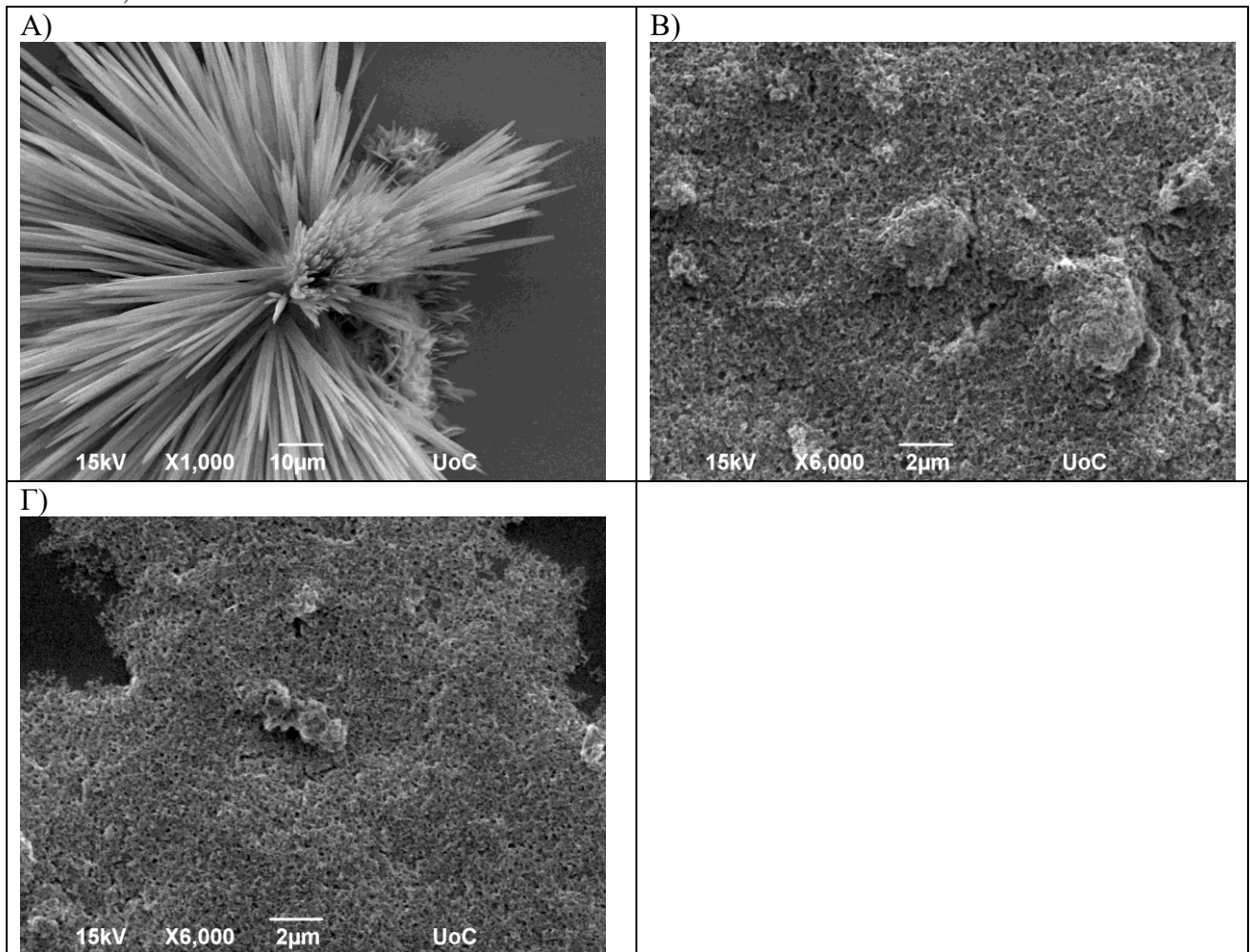
- Μείγμα FF-TPP και FF σε διαλύτη 20%HFIP-80%μεθανόλη με συγκέντρωση 7mM και αναλογία mol 1:9.
Δείγμα control: FF-TPP σε διαλύτη 20%HFIP-80%μεθανόλη με συγκέντρωση 0,7mM



Εικόνα 40: Φωτογραφίες μικροσκοπίου S.E.M.. A), B): Μείγμα FF-TPP και FF 20%HFIP-80%μεθανόλη, 7mM, αναλογία mol 1:9. Γ) FF-TPP 20%HFIP-80%μεθανόλη, 0,7mM.

Το μείγμα πεπτιδίων διαλύεται σε HFIP και το διάλυμα γίνεται ελαφρώς πράσινο-λευκό, με την προσθήκη μεθανόλης καταλήγει σε θολό κόκκινο. Τα αποτελέσματα από το S.E.M. μικροσκόπιο δείχνουν τη δημιουργία ξεχωριστών δομών. Αφενός δημιουργούνται ίνες και αφετέρου σφαίρες. Κρίνοντας από τα αποτελέσματα που δίνει το δείγμα control, οι σφαιρικές δομές του μείγματος πιθανώς δημιουργούνται από το μόριο FF-TPP.

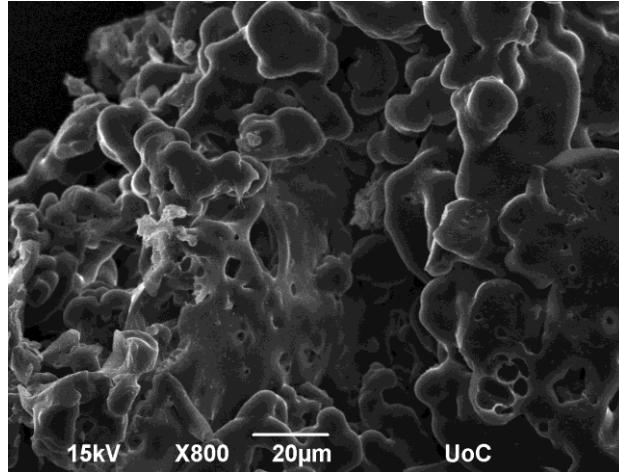
- Μείγμα FF-TPP και FF σε διαλύτη 20%HFIP-80%μεθανόλη με συγκέντρωση 7mM και αναλογία mol 1:50.
Αντίστοιχο control δείγμα: FF-TPP σε διαλύτη 20%HFIP-80%μεθανόλη με συγκέντρωση 0,14mM



Εικόνα 41: Φωτογραφίες μικροσκοπίου S.E.M.. A), B): Μείγμα FF-TPP και FF 20%HFIP-80%μεθανόλη, 7mM, αναλογία mol 1:50. Γ) FF-TPP 20%HFIP-80%μεθανόλη, 0,14mM.

Το μείγμα πεπτιδίων διαλύεται σε HFIP και το διάλυμα γίνεται ελαφρώς πράσινο-λευκό, με την προσθήκη μεθανόλης καταλήγει σε θολό κόκκινο. Μία μέρα μετά την παρασκευή του δείγματος παρατηρείται καθίζηση συσσωματωμάτων από κουκίδες. Τα αποτελέσματα από το S.E.M. μικροσκόπιο δείχνουν τη δημιουργία ξεχωριστών δομών, ινών και σπογγοειδούς δομής από συσσωματωμένες σφαίρες. Κρίνοντας από τα αποτελέσματα που δίνει το δείγμα control, η σπογγοειδής δομή του μείγματος πιθανώς δημιουργείται από το μόριο FF-TPP.

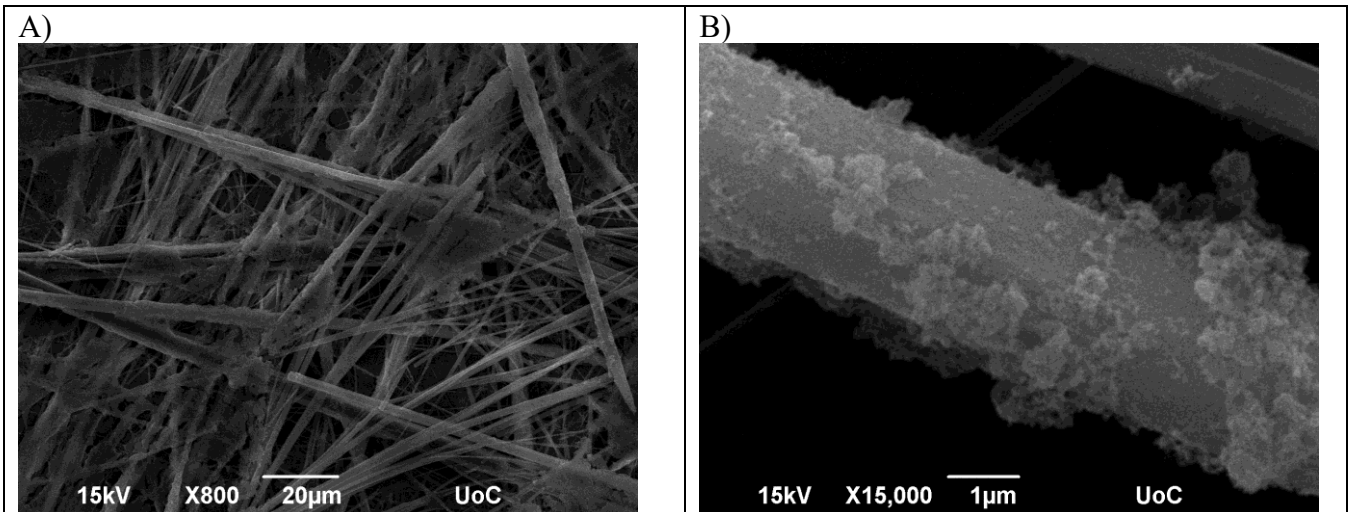
- Μείγμα $\text{NH}_2\text{-FF-TPP}$ και TPP-FF-COOH σε διαλύτη 20%HFIP-80%νερό με συγκέντρωση 7mM και αναλογία mol 1:1

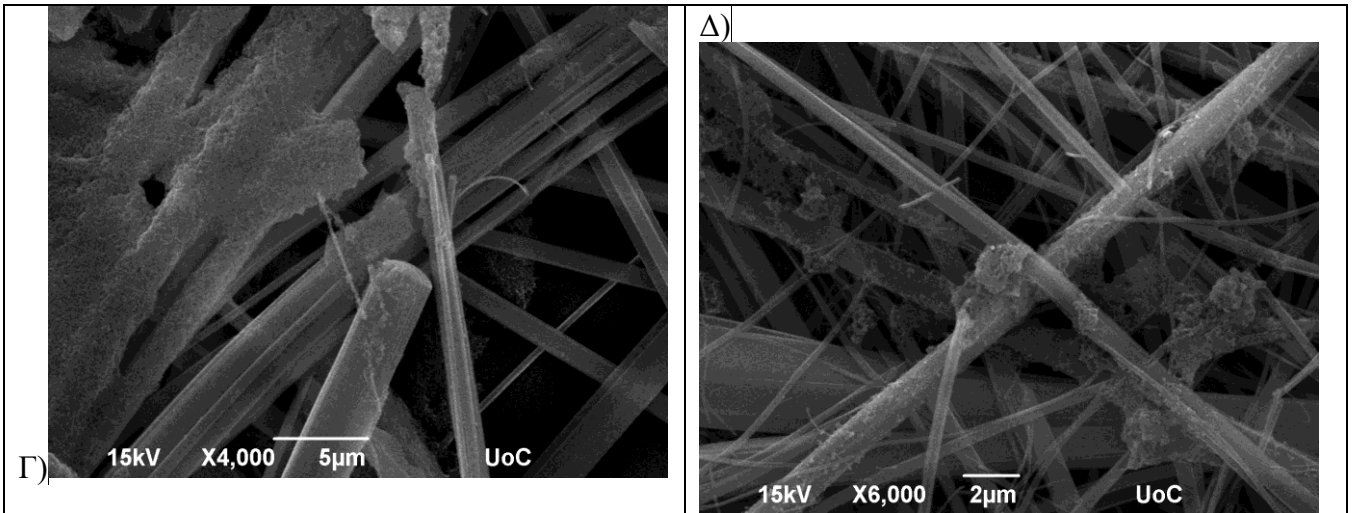


Εικόνα 42: Φωτογραφία μικροσκοπίου S.E.M.. Μείγμα $\text{NH}_2\text{-FF-TPP}$ και TPP-FF-COOH σε 20%HFIP-80%νερό, 7mM, αναλογία mol 1:1.

Τα πεπτίδια διαλύονται σε HFIP και το διάλυμα γίνεται πράσινο. Η προσθήκη νερού στο δείγμα προκαλεί έντονη συσσωμάτωση και τα συσσωματώματα γίνονται μαύρου χρώματος. Τα αποτελέσματα μικροσκοπίου S.E.M. δείχνουν άμορφα συσσωματώματα.

- Μείγμα FF-TPP και νανοσωλήνων FF (με προσθήκη FF-TPP σε προσχηματισμένους νανοσωληνες FF) σε διαλύτη 20%HFIP-80%νερό με συγκέντρωση 7mM και αναλογία mol 1:9.



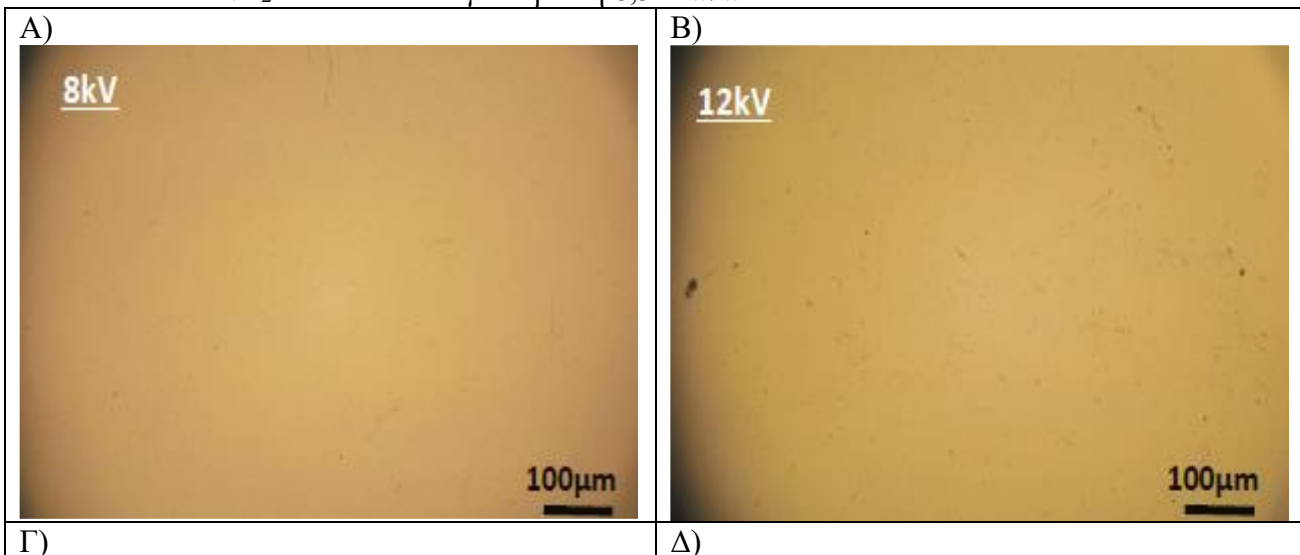


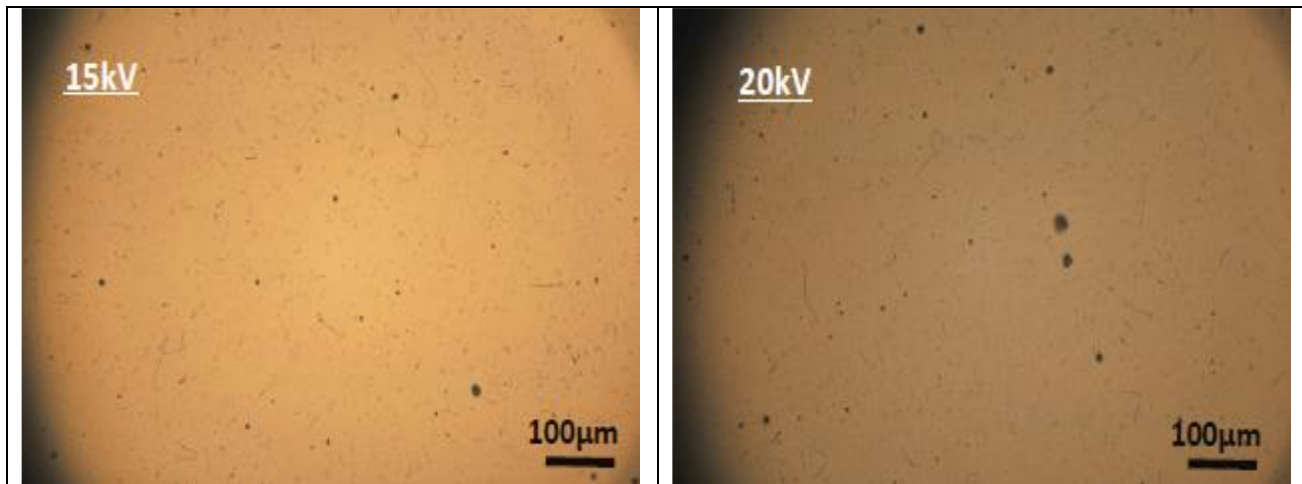
Εικόνα 43: Φωτογραφίες μικροσκοπίου S.E.M.. Μείγμα FF-TPP και νανοσωλήνων FF σε 20%HFIP-80%νερό, 7mM, αναλογία mol 1:9. Α): αμέσως μετά την παρασκευή του δείγματος, Β): μία ώρα μετά Γ): τρεις ώρες μετά, Δ) δύο μέρες μετά.

Με την εισαγωγή του υβριδικού πεπτιδίου στο διάλυμα των νανοσωλήνων, στο δείγμα σχηματίζονται κόκκινα συσσωματώματα τα οποία καθιζάνουν παράλληλα μαζί με τους νανοσωλήνες, αφήνοντας ένα διαυγές υπερκείμενο. Τα αποτελέσματα από το μικροσκόπιο S.E.M. δείχνουν την κάλυψη των νανοσωλήνων κατά τόπους από τα συσσωματώματα του υβριδικού πεπτιδίου. Δεν φαίνεται κάποια μεταβολή στις δομές με το πέρας του χρόνου.

4.3.5 Ίνες υβριδικού πεπτιδίου με τη μέθοδο Electrospinning.

- TPP-NH₂ σε HFIP σε συγκέντρωση 8,5% w/w

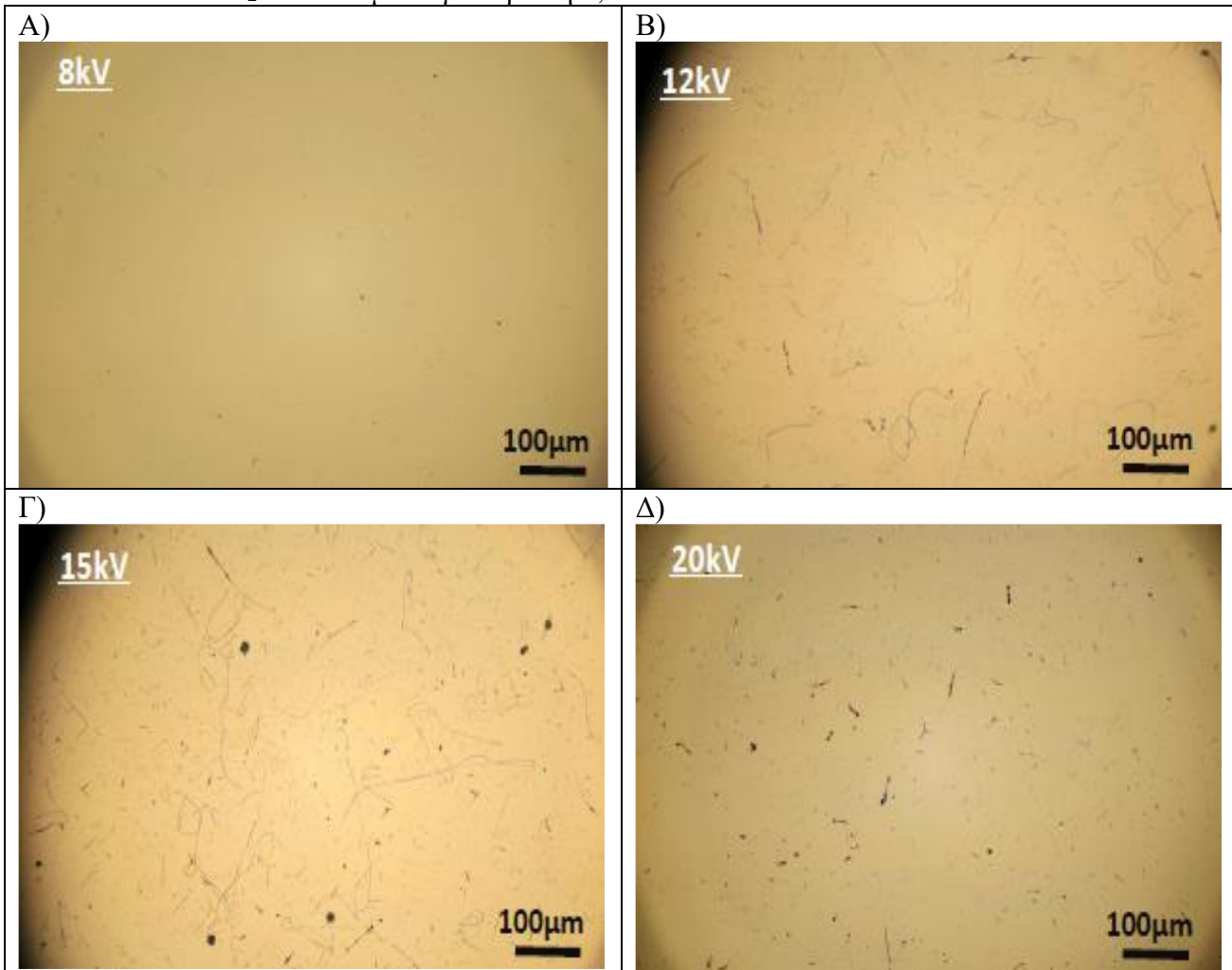




Εικόνα 44: Φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου. Electrospinning TPP-NH₂ σε HFIP σε συγκέντρωση 8,5% w/w. Η απόσταση ακίδας-στόχου είναι 12cm και η διαφορά δυναμικού Α): 8kV, Β): 12kV, Γ): 15kV, Δ) 20kV. Η μεγέθυνση του μικροσκοπίου είναι 200x.

Το διάλυμα TPP-NH₂ σε HFIP είναι πράσινου χρώματος. Με την εξάτμιση του διαλύματος το υλικό στην καλυπτρίδα αποκτά ελαφρώς κόκκινο χρώμα. Τα αποτελέσματα οπτικής μικροσκοπίας δείχνουν τη δημιουργία μικρού μήκους ινών οι οποίες γίνονται μεγαλύτερες σε μήκος και περισσότερες με αύξηση του δυναμικού, φτάνοντας σε μήκος κοντά στα 100µm. Επίσης, οι ίνες με μήκος κοντά στα 100µm εμφανίζουν καμπυλότητα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 14, Φωτογραφίες Γ),Δ).

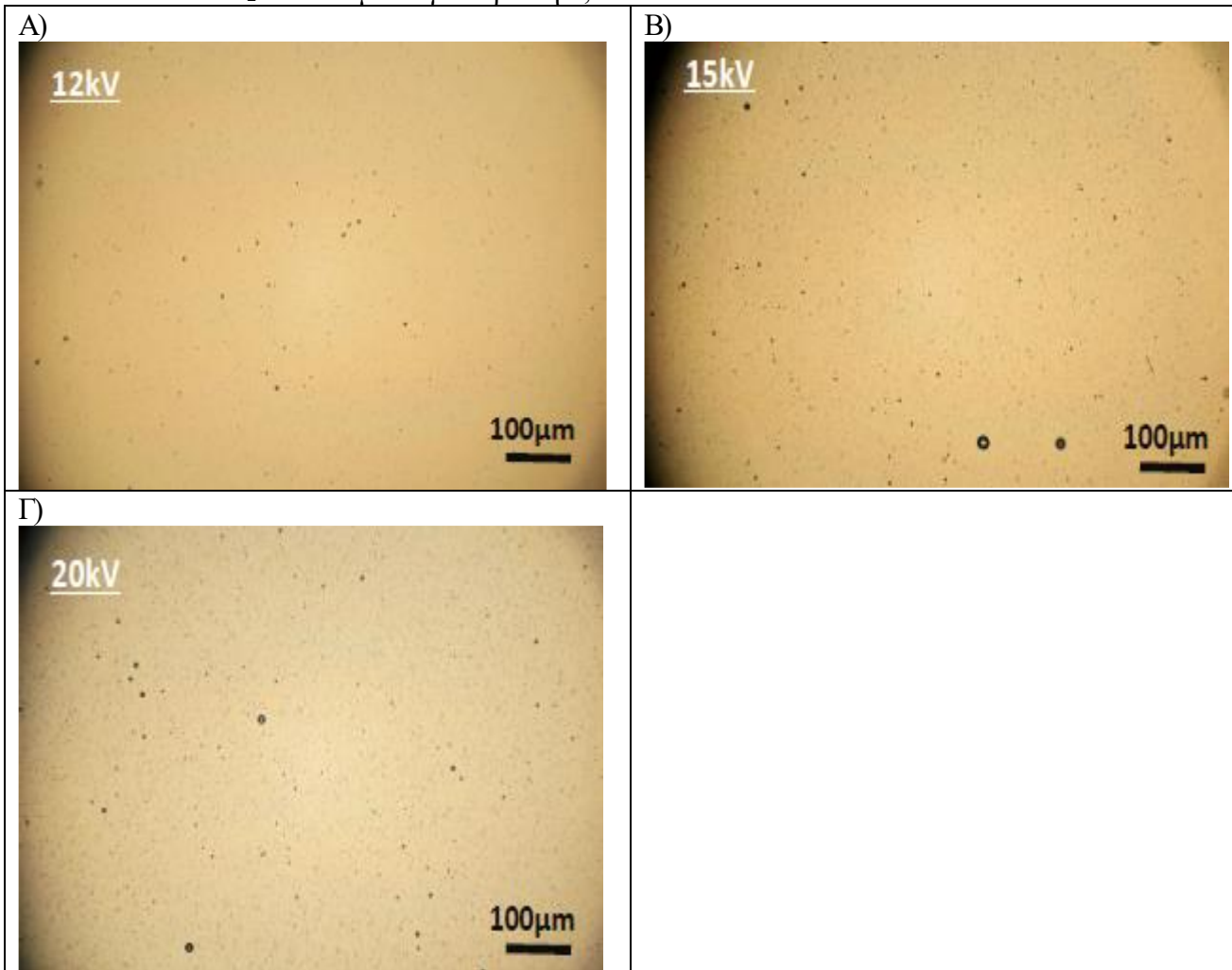
- TPP-NH₂ σε HFIP με συγκέντρωση 9,09% w/w



Εικόνα 45: Φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου. Electrospinning TPP-NH₂ σε HFIP σε συγκέντρωση 9,09% w/w. Η απόσταση ακίδας-στόχου είναι 12cm και η διαφορά δυναμικού A): 8kV, B): 12kV, Γ): 15kV, Δ) 20kV. Η μεγέθυνση του μικροσκοπίου είναι 200x.

Το διάλυμα TPP-NH₂ σε HFIP είναι πράσινου χρώματος. Με την εξάτμιση του διαλύματος το υλικό στην καλυπτρίδα αποκτά ελαφρώς κόκκινο χρώμα. Τα αποτελέσματα οπτικής μικροσκοπίας δείχνουν τη δημιουργία μικρού μήκους ινών οι οποίες γίνονται μεγαλύτερες σε μήκος και περισσότερες με αύξηση του δυναμικού μέχρι τα 15kV, ενώ στα 20kV είναι αρκετά μικρές σε μήκος. Το μέγιστο μήκος των ινών φτάνει περίπου τα 250μm. Στις μεγάλες σε μήκος ίνες του δείγματος, παρατηρείται καμπυλότητα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 15, Φωτογραφίες B),Γ).

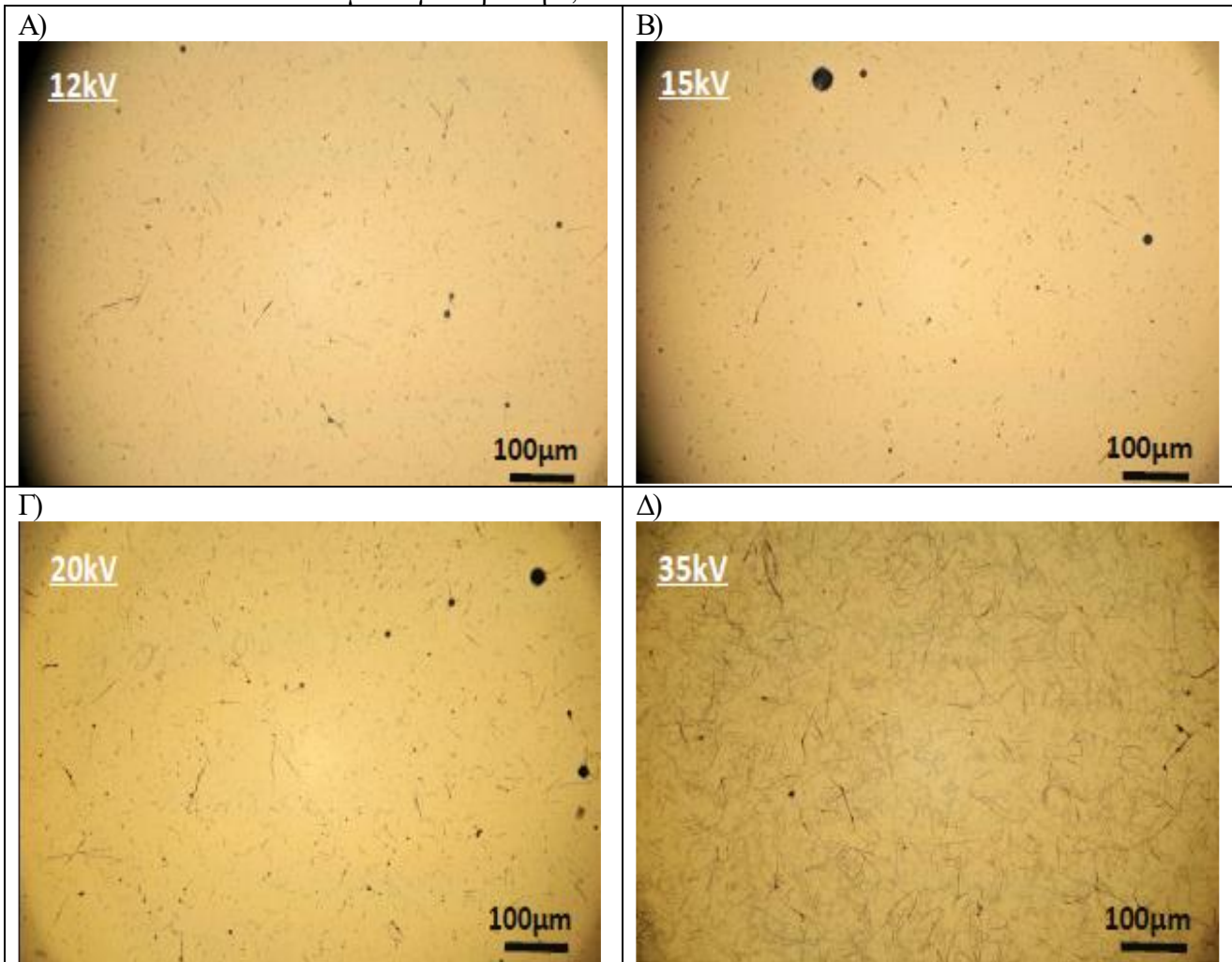
- TPP-NH₂ σε TFA με συγκέντρωση 9,09% w/w



Εικόνα 46: Φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου. Electrospinning TPP-NH₂ σε TFA 9,09% w/w. Η απόσταση ακίδας-στόχου είναι 12cm και η διαφορά δυναμικού A): 12kV, B): 15kV, Γ) 20kV. Η μεγέθυνση του μικροσκοπίου είναι 200x.

Το διάλυμα TPP-NH₂ σε TFA είναι πράσινου χρώματος. Με την εξάτμιση του διαλύματος το υλικό στην καλυπτρίδα αποκτά ελαφρώς κόκκινο χρώμα. Τα αποτελέσματα οπτικής μικροσκοπίας δείχνουν τη δημιουργία σταγόνων οι οποίες γίνονται εντονότερες και περισσότερες με αύξηση του δυναμικού.

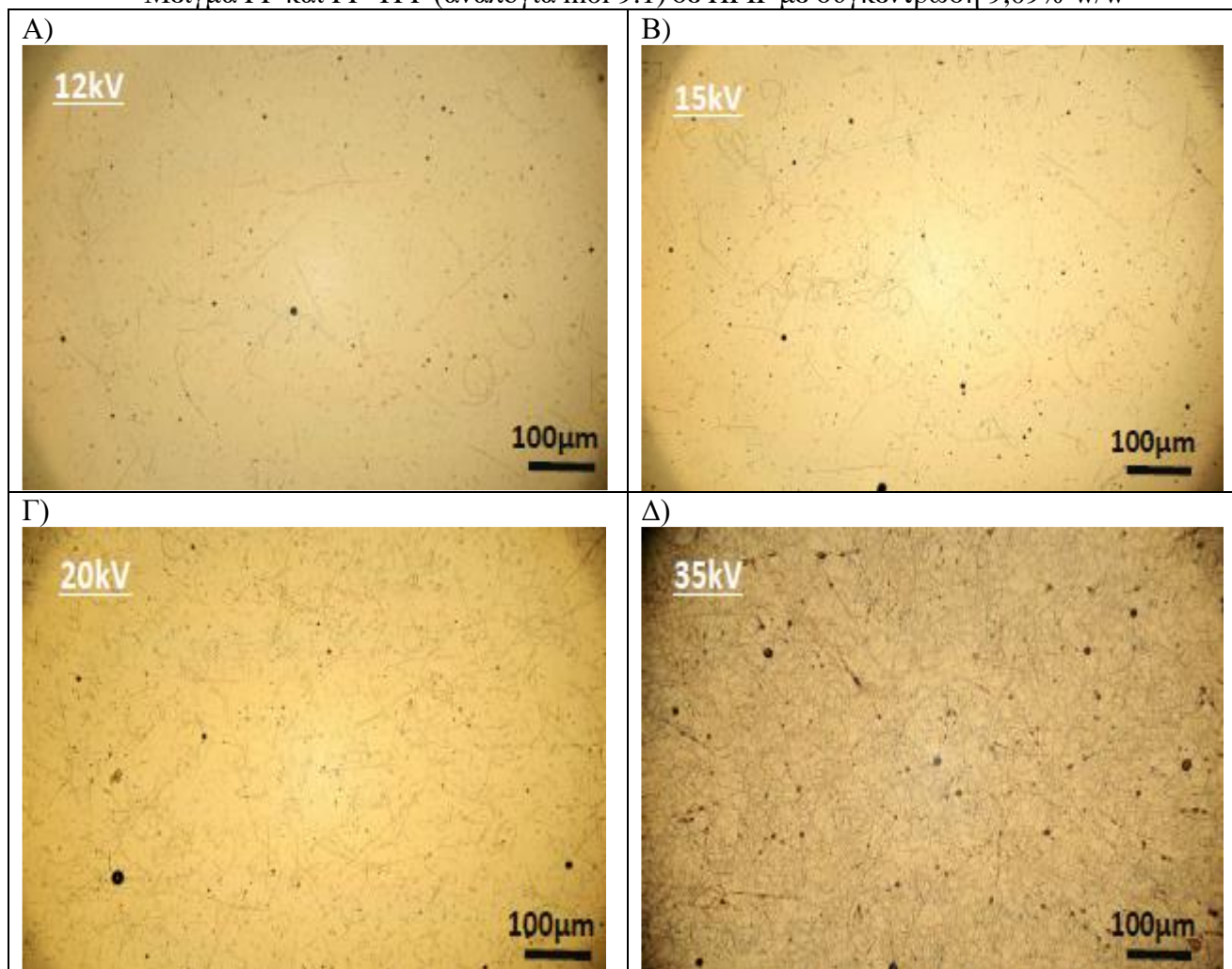
- FF-TPP σε HFIP με συγκέντρωση 9,09% w/w



Εικόνα 47: Φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου. Electrospinning FF-TPP σε HFIP σε συγκέντρωση 9,09% w/w. Η απόσταση ακίδας-στόχου είναι 12cm και η διαφορά δυναμικού A): 12kV, B): 15kV, Γ): 20kV, Δ) 35kV. Η μεγέθυνση του μικροσκοπίου είναι 200x.

Το διάλυμα FF-TPP σε HFIP είναι πράσινου χρώματος. Με την εξάτμιση του διαλύματος, το υλικό στην καλυπτρίδα αποκτά ελαφρώς κόκκινο χρώμα. Τα αποτελέσματα οπτικής μικροσκοπίας δείχνουν τη δημιουργία μικρού μήκους ινών οι οποίες γίνονται μεγαλύτερες σε μήκος και περισσότερες με αύξηση του δυναμικού στα 20 και 35kV. Στα 35kV παρατηρείται επίσης έντονη καμπυλότητα των ινών.

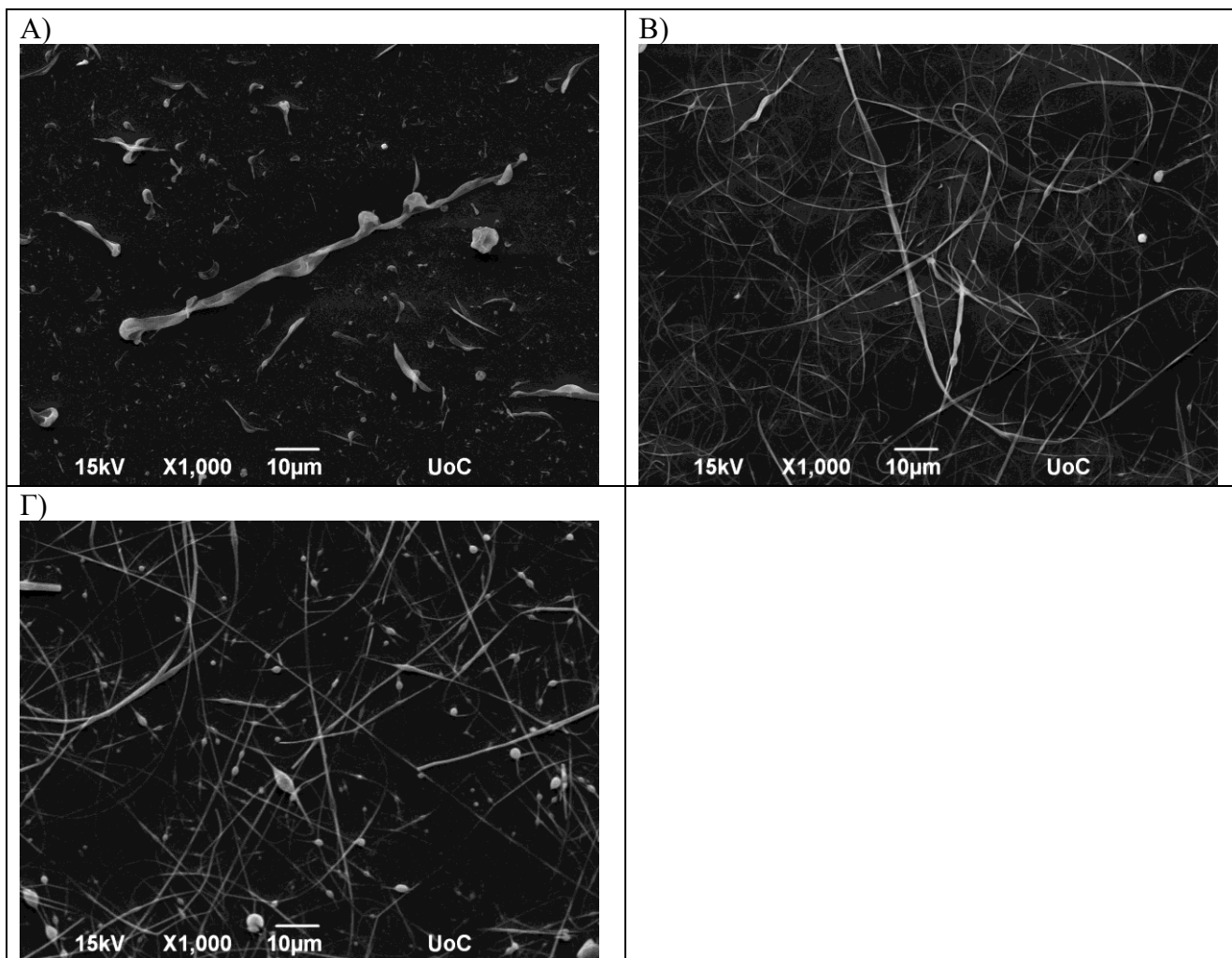
- Μείγμα FF και FF-TPP (αναλογία mol 9:1) σε HFIP με συγκέντρωση 9,09% w/w



Εικόνα 48: Φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου. Electrospinning μείγματος FF και FF-TPP (αναλογία mol 9:1) σε HFIP με συγκέντρωση 9,09% w/w. Η απόσταση ακίδας-στόχου είναι 12cm και η διαφορά δυναμικού A): 12kV, B): 15kV, Γ): 20kV, Δ) 35kV. Η μεγέθυνση του μικροσκοπίου είναι 200x.

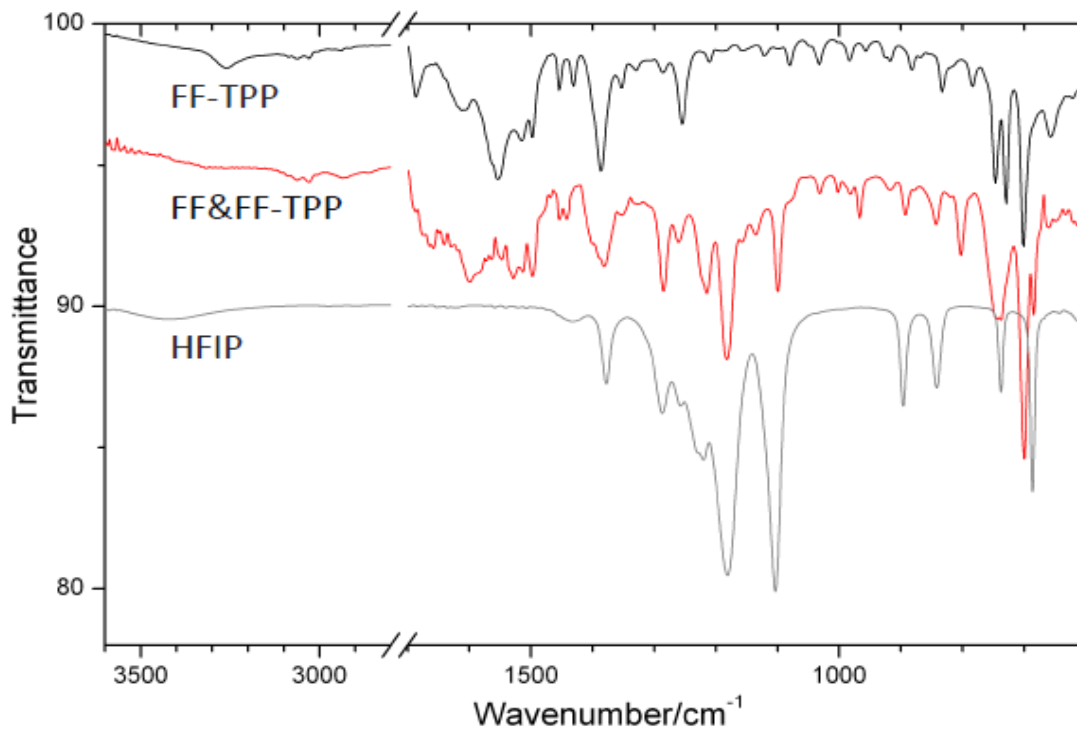
Το διάλυμα των πεπτιδίων σε HFIP έχει ελαφρώς πράσινο χρώμα. Με την εξάτμιση του διαλύματος, το υλικό στην καλυπτρίδα αποκτά ελαφρώς κόκκινο χρώμα. Τα αποτελέσματα οπτικής μικροσκοπίας δείχνουν τη δημιουργία ινών οι οποίες γίνονται περισσότερες με την αύξηση του δυναμικού. Επιπλέον, με την αύξηση του δυναμικού παρατηρείται αύξηση των σταγονιδίων στην έκταση του δείγματος. Έντονη καμπυλότητα των ινών παρατηρείται σε όλα τα δείγματα και δείχνει να αυξάνεται με την αύξηση του δυναμικού.

Έπειτα από τις δοκιμές για να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες Electrospinning για την παραγωγή πολλών και μεγάλου μήκους ινών, καταλήγουμε ότι οι συνθήκες αυτές είναι: η απόσταση ακίδας-στόχου 12cm, συγκέντωση 9,09%wt σε HFIP, διαφορά δυναμικού 15kV για το μόριο TPP-NH₂ και 35kV για το μόριο FF-TPP και το μείγμα FF και FF-TPP. Οπότε ακολούθησε περαιτέρω παρατήρηση με S.E.M. μικροσκοπία για μελέτη της δομής και σύγκριση μεταξύ των μορίων και του μείγματος, όσον αφορά τις ίνες που παράγονται σε απόσταση ακίδας-στόχου 12cm, συγκέντωση 9,09%wt σε HFIP, διαφορά δυναμικού 35kV.

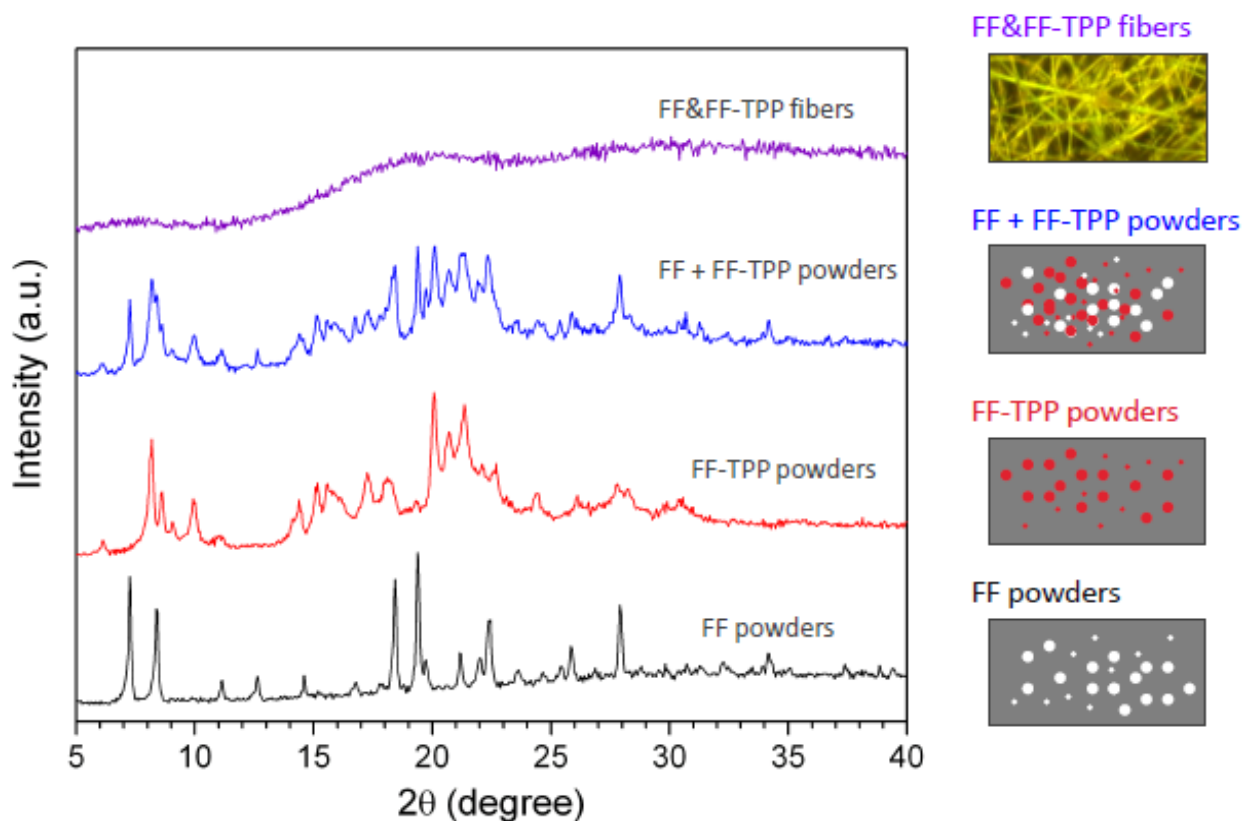


Εικόνα 49: Φωτογραφίες μικροσκοπίου S.E.M.. Electrospinning A): TPP-NH₂, B): FF-TPP, Γ): μείγματος FF-TPP και FF (αναλογία mol 1:9), σε HFIP με συγκέντρωση 9,09% w/w, απόσταση ακίδας-στόχου είναι 12cm και διαφορά δυναμικού 35kV.

Τα αποτελέσματα μικροσκοπίας S.E.M., δείχνουν γενικά τη δημιουργία ιών με ανομοιόμορφο πλάτος. Ειδικότερα, στο δείγμα όπου χρησιμοποιήθηκε το μόριο TPP-NH₂, οι ίνες είναι αρκετά μικρές σε μήκος, ευθείες και ανομοιογενείς σε σχέση με τα δείγματα του μορίου FF-TPP, όπου οι ίνες είναι μεγάλες σε μήκος και κυρτές με μικρή εμφάνιση σταγονιδίων, και του μείγματος FF και FF-TPP, όπου οι ίνες είναι επίσης μεγάλες σε μήκος και κυρτές με μεγαλύτερη εμφάνιση σταγονιδίων.

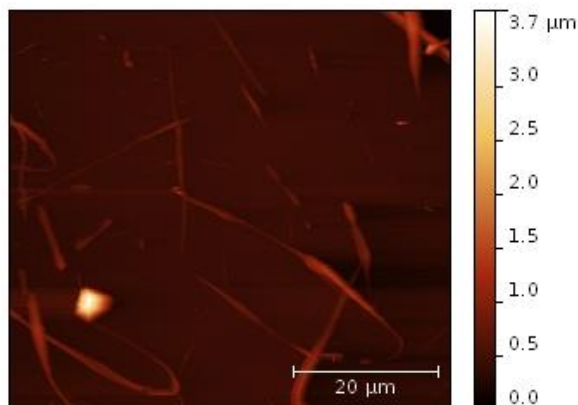


Εικόνα 50: Διάγραμμα Φασματοσκοπίας FTIR. Μαύρη καμπύλη: ίνες που παράχθηκαν με Electrospinning από το δείγμα FF-TPP σε HFIP με συγκέντρωση 9,09% w/w, απόσταση ακίδας-στόχου είναι 12cm και διαφορά δυναμικού 35kV. Κόκκινη καμπύλη: ίνες που παράχθηκαν με Electrospinning από το δείγμα μείγματος FF-TPP και FF με αναλογία mol 1:9 (κόκκινη καμπύλη), σε HFIP με συγκέντρωση 9,09% w/w, απόσταση ακίδας-στόχου είναι 12cm και διαφορά δυναμικού 35kV. Γκρι καμπύλη: μόριο HFIP.



Εικόνα 51: Διαγράμματα Περίθλασης Ακτίνων-X. Ιώδης καμπύλη: ίνες που παράχθηκαν με

Electrospinning από το δείγμα μείγματος FF-TPP και FF με αναλογία mol 1:9 (κόκκινη καμπύλη), σε HFIP με συγκέντρωση 9,09% w/w, απόσταση ακίδας-στόχου είναι 12cm και διαφορά δυναμικού 35kV. Μπλε καμπύλη: Μείγμα σκονών πεπτιδίων FF και FF-TPP. Κόκκινη καμπύλη: σκόνη FF-TPP. Μαύρη καμπύλη: σκόνη πεπτιδίου FF.



Εικόνα 52: Φωτογραφία AFM δείγματος FF-TPP σε HFIP με συγκέντρωση 9,09% w/w, απόσταση ακίδας-στόχου 12cm και διαφορά δυναμικού 35kV

Τα αποτελέσματα μικροσκοπίας AFM δείχνουν ότι έχουν σχηματιστεί ίνες FF-TPP με διακυμάνσεις στο πλάτος και στο μήκος τους. Η διαφορά ύψους ήταν 1μm για τις μεγάλες σε μήκος ίνες και 200nm για τις μικρές σε μήκος ίνες. Επίσης στο δείγμα εμφανίστηκαν μικρές σταγόνες.

Τα αποτελέσματα περίθλασης ακτίνων-X δείχνουν ευρείες κορυφές για τη σκόνη FF-TPP σημαίνει ότι οι κρύσταλλοί της είναι λιγότερο οργανωμένοι. Το μείγμα σκονών εμφανίζει κορυφές της σκόνης του πεπτιδίου FF και του FF-TPP. Οι ίνες του μείγματος πεπτιδίων δεν εμφανίζουν χαρακτηριστικές κορυφές, που σημαίνει είτε ότι ο θόρυβος κατά τη διάρκεια της μέτρησης υπερβαίνει την ένταση των κορυφών, είτε ότι το υλικό που εναποτέθηκε στη βάση του περιθλασίμετρου είναι πολύ λίγο, είτε ότι οι ίνες που παράχθηκαν είναι άμορφες.

Τα αποτυπώματα στα γραφήματα FTIR δείχνουν κοινές κορυφές μεταξύ των ινών FF-TPP και των ινών μείγματος FF και FF-TPP εμφανίζουν κοινές κορυφές. Επίσης εμφανίζονται κάποιες κοινές κορυφές με το αποτύπωμα του HFIP, οπότε πιθανώς το HFIP συμμετέχει στην δομή.

Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα

Αυτή η εργασία εστιάστηκε στη μελέτη των μηχανισμών αυτο-οργάνωσης που αφορούν το υδρόφοβο πεπτίδιο της διφαινυλαλανίνης και υβριδίων της με πορφυρίνη. Τα πειράματα και η έρευνα γύρω από το πεπτίδιο της διφαινυλαλανίνης δίνουν δεδομένα που πιθανώς ξεκαθαρίζουν το τοπίο γύρω από τον μηχανισμό σύμφωνα με τον οποίο αυτό αυτο-οργανώνεται και συνεπώς επηρεάζεται η αμυλοείδωση του Αβ πεπτιδίου του Alzheimer. Επιπλέον, ερευνώντας το υβρίδιο του πεπτιδίου με πορφυρίνες υποδεικνύεται ο τρόπος με τον οποίο μπορούν να συνδυάζονται βιολογικά μόρια με διαφορετικές ιδιότητες ώστε να προκύψουν σύνθετες νανοδομές με πιθανές

μικροηλεκτρονικές εφαρμογές.

Μελετώντας το πεπτιδίο FF, δοκιμάστηκε η δημιουργία νανοδομών από αυτό σε διαλύτες όπως το THF, το νερό, τη μεθανόλη και την αιθανόλη μέσω θέρμανσης και επακόλουθης ψύξης για να ελεγχθεί κατά πόσο είναι δυνατή η δημιουργία νανοδομών με αυτή τη μέθοδο και πόσο καλά σχηματισμένες δομές μπορούμε να πάρουμε. Επίσης δοκιμάστηκε η δημιουργία δομών σε νερό, αιθανόλη και μεθανόλη έπειτα από εξάτμιση του HFIP για να ελεγχθεί κατά πόσο επηρεάζεται η αυτο-οργάνωση όταν συνυπάρχουν στο δείγμα ο διαλύτης που επιλέγεται μαζί με το HFIP. Συγκρίθηκε τέλος η αυτο-οργάνωση του πεπτιδίου FF σε νερό και μεθανόλη υπό όμοιες συνθήκες θέρμανσης-ψύξης ώστε να ελέγξουμε σε ποιον από τους δύο διαλύτες ευνοείται περισσότερο η αυτο-οργάνωση του πεπτιδίου.

Όσον αφορά τα πειράματα γύρω από το πεπτιδίο της διφαινυλαλανίνης, αποδείξαμε ότι δεν είναι απολύτως απαραίτητη η διάλυσή του σε χαοτροπικούς διαλύτες όπως το HFIP προκειμένου να αραιωθεί στο διαλύτη επιλογής και να δημιουργηθούν νανοδομές του πεπτιδίου. Αντί για αυτή τη διαδικασία, η απλή θέρμανση ενός δείγματος στην κατάλληλη θερμοκρασία (που εξαρτάται από τη φύση του κάθε διαλύτη) με συνεπακόλουθη ψύξη είναι μία εναλλακτική μέθοδος για να προκύψουν δομές. Οι δομές που παράχθηκαν εμφανίζουν απόκλιση από τις δομές που παράγονται με χρήση HFIP (Adler-Abramovich et al. 2006), γιατί με χρήση HFIP οι δομές φαίνονται πιο ομοιόμορφες. Η μελέτη της αυτο-οργάνωσης σε νερό και μεθανόλη δείχνει ότι όντως η μεθανόλη είναι καλύτερος διαλύτης για το πεπτιδίο FF, εφόσον τουλάχιστον οπτικά δεν εμφανίζεται αυτο-οργάνωση του πεπτιδίου σε αυτή. Επίσης, η μελέτη μέσω S.E.M. σε δείγματα μεθανόλης όπου χρειάζεται εξάτμιση του διαλύτη ώστε να παρατηρηθούν, οι δενδροειδείς δομές που φαίνονται δεν είναι ομοιόμορφες και συχνά εμφανίζονται άμορφες περιοχές. Οπτική παρατήρηση των δειγμάτων μεθανόλης σε γυάλινο φιαλίδιο μετά το πέρας περίπου μίας εβδομάδας δείχνει ότι δημιουργούνται ινίδια τα οποία όμως μπορεί να προκύπτουν και λόγω εξάτμισης του διαλύτη από το γυάλινο φιαλίδιο, και σίγουρα εμφανίζουν πολύ αργή κινητική σε σχέση με τα δείγματα νερού.

Μελετώντας υβρίδια του πεπτιδίου FF με πορφυρίνες, ελέγχθηκε η αυτο-οργάνωση εναντιομερών των υβριδίων σε μεθανόλη και THF με χρήση HFIP, χρησιμοποιώντας τα υβρίδια Fmoc-(L,L)FF-TPP και Fmoc-(D,D)FF-TPP. Επίσης μελετήθηκε η αυτο-οργάνωση τους σε νερό, αιθανόλη και THF χωρίς τη χρήση HFIP μέσω θέρμανσης και επακόλουθης ψύξης του δείγματος. Έτσι ελέγχθηκε η επιρροή της χειρομορφίας των άλφα-ανθράκων του πεπτιδίου της διφαινυλαλανίνης στην αυτο-οργάνωση καθώς και η δυνατότητα να παραχθούν δομές χωρίς τη χρήση HFIP. Περαιτέρω μελέτη αυτο-οργάνωσης έγινε στα υβριδικά πεπτιδία με ελεύθερο καρβοξυτελικό άκρο TPP-FF-COOH και (Zn)TPP-FF-COOH. Σε μία προσπάθεια δημιουργίας ινώδων δομών από τα υβριδικά πεπτιδία, δοκιμάστηκε η ανάμειξη του υβριδικού μορίου FF-TPP

με το πεπτίδιο FF και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Electrospinning για τα μόρια TPP-NH₂, FF-TPP και μείγμα FF και FF-TPP.

Τα πειράματα που αφορούν το πεπτίδιο της διφαινυλαλανίνης συνδεδεμένο χημικά με πορφυρίνη, δείχνουν ότι το συνηθέστερο μοτίβο αυτο-οργάνωσης που μπορούμε να επιτύχουμε μέσα σε διάλυμα είναι σφαίρες, και αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε χρησιμοποιώντας HFIP είτε όχι. Δε φαίνεται μεγάλη εξάρτηση από τη χειρομορφία των άλφα-ανθράκων του πεπτιδίου της διφαινυλαλανίνης. Τα εναντιομερή (L,L) και (D,D) παρουσιάζουν παρόμοιες μορφολογίες οργάνωσης σε σφαίρες. Αντίστοιχες σφαίρες που δημιουργήθηκαν από τους Charalambidis et al. εμφανίζουν φθορισμό με ενθαρρυντικό χρόνο ζωής, οπότε πιθανώς να μπορεί να επιτευχθεί μεταφορά ενέργειας και μέσω των σφαιρών που παράχθηκαν στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας. Η δοκιμή της ανάμειξης πεπτιδίων για τη δημιουργία μίας σύνθετης ινώδους δομής δεν έδωσε το επιθυμητό αποτέλεσμα, γιατί παράχθηκαν κυρίως ξεχωριστές δομές από τα δύο πεπτίδια. Παρόλα αυτά, μπορούν να επιτευχθούν και δομές ινών με άλλες τεχνικές όπως το Electrospinning. Στις ίνες που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο Electrospinning από τα πρώτα πειράματα XRD και FTIR δε φαίνεται να υπάρχει περιοδική διευθέτηση των μορίων, υποδεικνύοντας ότι πιθανώς είναι άμορφες και η χημική τους σύσταση δείχνει μία πιθανή συμμετοχή του HFIP στην αυτο-οργάνωση. Χρειάζονται όμως περαιτέρω μελέτες για να πιστοποιηθεί ότι αυτά όντως ισχύουν. Παράλληλα, πολύ πρόσφατα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι ίνες αυτές εμφανίζουν υποσχόμενες ηλεκτρικές ιδιότητες (Wiwat Nuansing, προσωπική επικοινωνία).

Συνοψίζοντας, το πεπτίδιο της διφαινυλαλανίνης είναι ένα πολλά υποσχόμενο μόριο στο χώρο της βιοανατεχνολογίας και προσφέρει τη δυνατότητα σχηματισμού νανοδομών με διάφορες μορφολογίες και με πιθανές εφαρμογές σε πολλά επιστημονικά πεδία. Επίσης ο κατάλληλος συνδυασμός του με άλλα μόρια είναι πολύ χρήσιμος ώστε να τροποποιηθούν οι ιδιότητες αυτού του πεπτιδίου και να βρεθούν ακόμα περισσότερες εφαρμογές του.

Κεφάλαιο 6: Ευρετήριο

6.1 Λίστα αναφορών

- [1] Petsko, Protein structure and function, 2004, New Science Press Ltd
- [2] Berg, Tymoczko, Stryer, Βιοχημεία, 2009, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
- [3] Branden, Tooze, Εισαγωγή στη Δομή των Πρωτεϊνών, 2006, Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
- [4] E. Herczenik, M. F. B. G. Gebbink, FASEB Journal, Vol. 22, 2008, 2115-2133
- [5] Mitraki, Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, Vol. 79, 2010, 89-125

- [6] E. Vázquez, J. L. Corchero, J. F. Burgueño, J. Seras-F/ranzoso, A. Kosoy, R. Bossler, R. Mendosa, J. M. Martínez-Láinez, U. Rinas, E. Fernández, L. Ruiz-Avila, E. García-Fruitós, A. Villaverde, *Advanced Materials*, 2012
- [7] J. Labbadia, R. Morimoto, *TIBS*, 2013
- [8] S. Gilead, E. Gazit, *Supramolecular Chemistry*, Vol. 17, 2005, 87-92
- [9] V. A. Iconomidou, G. Vriend, S. J. Hamodrakas, *FEBS Letters*, Vol. 479, 2000, 141-145
- [10] A. Lakshmanan, S. Zhang, C. A. E. Hauser, *Trends In Biotechnology*, Vol.30, 2012, 155-165
- [11] S. Zhang, *Nature Biotechnology*, Vol. 21, 2003, 1171-1178
- [12] E. Gazit, *Chemical Society Reviews* Vol. 36, 2007, 1263-1269
- [13] C. H. Görbitz, *Chemistry- A European Journal*, Vol. 13, 2007, 1022-1031
- [14] L. Adler-Abramovich, M. Reches, V. L. Sedman, S. Allen, S. J. B. Tandler, E. Gazit, *Langmuir*, Vol. 22, 2006, 1313-1320
- [15] Y. Song, S. R. Challa, C. J. Medforth, Y. Qiu, R. K. Watt, Donovan Peña, J. E. Miller, F. van Swol, J. A. Shelnut, *Chemical Communications*, 2004, 1044-1045
- [16] A. N. Rissanou, E. Georgilis, E. Kasotakis, A. Mitraki, V. Harmandaris, *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 117 (15), 2013, 3962-3975
- [17] G. Singh, A. M. Bittner, S. Loscher, N. Malinowski, K. Kern, *Advanced Materials*, Vol. 20, 2008, 2332-2336
- [18] A. Mahler, M. Reches, M. Rechter, S. Cohen, E. Gazit, *Advanced Materials*, Vol. 18, 2006, 1365-1370
- [19] G. Charalambidis, E. Kasotakis, T. Lazarides, A. Mitraki, A. G. Coutsolelos, *Chemistry- A European Journal*, Vol. 17, 2011, 7213-7219
- [20] J. Yang, M.-C. Yoon, H. Yoo, P. Kim, D. Kim, *Chemical Society Reviews*, Vol. 41, 2012, 4808-4826
- [21] G. Pagona, A. S. D. Sandanayaka, Y. Araki, J. Fan, N. Tagmatarchis, G. Charalambidis, A. G. Coutsolelos, B. Boitrel, M. Yudasaka, S. Iijima, O. Ito, *Advanced Functional Materials*, Vol. 17, 2007, 1705-1711
- [22] M. Vinodh, F. H. Alipour, A. A. Mohamod, T. F. Al-Azemi, *Molecules*, Vol. 17, 2012, 11763-11799
- [23] Y. Qiu, P. Chen, M. Liu, *JACS*, Vol 132, 2010, 9644-9652
- [24] Á. Orosz, G. Mező, L. Herényi, J. Habdas, Z. Majer, B. Myśliwa-Kurdziel, K. Tóth, G. Csík, *Biophysical Chemistry*, 2013, 177-178
- [25] J. H. Kim, M. Lee, J. S. Lee, C. B. Park, *Angewandte Chemie*, Vol. 50, 2011, 1-5
- [26] J. R. Dunetz, C. Sandstrom, E. R. Young, P. Baker, S. A. Van Name, T. Cathopolous, R. Fairman, J. C. de Paula, K. S. Åkerfeldt, *Organic Letters*, Vol. 7, 2005, 2559-2561