



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ TTR(105-115) ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ RAMAN**

ΓΑΛΑΤΕΙΑ Κ. ΠΕΡΙΔΟΥ

ΜΑΪΟΣ 2011



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ TTR(105-115) ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ RAMAN**

ΓΑΛΑΤΕΙΑ Κ. ΠΙΕΡΙΔΟΥ

Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) Δρ. Κώστας Σ. Πατρίκιος, Καθηγητής (Εσωτερικό Μέλος, Πρόεδρος)
- 2) Δρ. Ευτυχία Πινακουλάκη, Λέκτορας (Εσωτερικό Μέλος)
- 3) Δρ. Σοφία Χ. Hayes, Επίκουρος Καθηγήτρια (Ερευνητικός Σύμβουλος)
- 4) Δρ. Αφροδίτη Καπουρνιώτου, Καθηγήτρια (Εξωτερικό Μέλος), Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Μονάχου
- 5) Δρ. Γεώργιος Αρχοντής, Αναπληρωτής Καθηγητής (Εξωτερικό Μέλος), Τμήμα Φυσικής Πανεπιστημίου Κύπρου

ΔΗΛΩΣΗ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΠΕΙΡΑΜΤΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή υλοποιήθηκε από την υποφαινόμενη στο Εργαστήριο Μοριακής Φασματοσκοπίας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Δρ. Σοφίας Χαραλάμπους Hayes (Σεπτέμβριος 2005– Μάιος 2011).

Οι υπολογισμοί Μοριακής Δυναμικής πραγματοποιήθηκαν από το Δρ. Φανούριο Ταμάμη της ομάδας βιοφυσικής του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Κύπρου υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Δρ. Γεώργιου Αρχοντή.

Ημερομηνία:

Υπογραφή:

Στην οικογένεια μου,
και στον αγαπημένο μου Γιώργο

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ την επιβλέπουσα Επίκουρη Καθηγήτριά μου Σοφία Χαραλάμπους Hayes τόσο για την επιστημονική καθοδήγηση που μου πρόσφερε, αλλά και για την αρμονική συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια. Την ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο άτομο μου όλα αυτά τα χρόνια, την υποστήριξη και την αμέριστη συμπαράστασή της. Αναμφίβολα, η συμβολή της ήταν καθοριστική για την επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. Της εύχομαι εκ βάθους καρδιάς κάθε προσωπική και οικογενειακή ευτυχία.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Κώστα Πατρίκιο και την Λέκτορα Ευτυχία Πινακουλάκη του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου για τη συμμετοχή τους σε όλες τις μέχρι τώρα επιστημονικές μου αξιολογήσεις, καθώς και για τις πολύτιμες παρατηρήσεις και υποδείξεις τους για τη βελτίωση της εργασίας αυτής.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια Αφροδίτη Καπουρνιώτου του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου του Μονάχου για την ευγενή αποδοχή της να συμμετέχει στη σύνθεση της Εξεταστικής μου Επιτροπής. Ευχαριστώ επίσης και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γεώργιο Αρχοντή του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Κύπρου για τις σημαντικές υποδείξεις και γνώσεις που μου προσέφερε για τη διεκπεραίωση της Διατριβής μου, καθώς και για τη συμμετοχή του στην Εξεταστική Επιτροπή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Δρ. Φανούριο Ταμάμη, μεταδιδακτορικό συνεργάτη της ομάδας Βιοφυσικής του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Κύπρου, για την πραγματοποίηση των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Γεώργιου Αρχοντή, αλλά και για την άριστη συνεργασία που είχαμε.

Σε αυτό το σημείο θέλω να ευχαριστήσω του συναδέλφους – φίλους μου στο Εργαστήριο Μοριακής Φασματοσκοπίας, Μαριλένα Τριμιθιώτου, Βαρβάρα Χρίστου, Νίκο Χριστοφή και Σουλιάννα Κασιουλή για την άριστη συνεργασία και φιλική σχέση που αναπτύξαμε όλα αυτά τα χρόνια.

Ακόμα θέλω να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στα αγαπημένα μου πρόσωπα για την αμέριστη και ουσιαστική συμπαράστασή τους. Ευχαριστώ ιδιαίτερα του γονείς μου Κυριάκο και Μαρία για τη στήριξη και εμπύχωσή τους όλα αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ την αδελφή μου Ήβη και τους μικρούς Χρίστο και Μαρία που ήταν πάντα εκεί για μένα.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στο σύζυγό μου Γιώργο που ήταν υπομονετικά δίπλα μου προσφέροντάς μου στήριξη και αγάπη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κατανόηση των διαφόρων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των καταλοίπων των αμινοξέων τα οποία καθορίζουν τη δομή μιας πρωτεΐνης περιλαμβάνει την εξέταση του τοπικού περιβάλλοντος, το οποίο βιώνουν τα κατάλοιπα κατά τη διαδικασία της αναδίπλωσης. Δεδομένου ότι η δομή που υιοθετούν οι πρωτεΐνες στο διάλυμα διαφέρει από τη δομή που διαθέτουν στη στερεή φάση, η οποία μελετάται κυρίως με την περίθλαση ακτίνων-X, είναι επιτακτική ανάγκη η χρήση ενός εργαλείου που να μπορεί να προσφέρει πληροφορίες για τη δομή των πρωτεϊνών στο φυσικό τους περιβάλλον. Η φασματοσκοπία συντονισμού Raman έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τον προσδιορισμό της δομής και των δομικών αλλαγών σε αρκετά πρωτεϊνικά συστήματα στο διάλυμα.

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή μελετήθηκε η δομή του πεπτιδίου (TTR(105-115)) στο διάλυμα, το οποίο αποτελεί μέρος της πρωτεΐνης thransthyretin χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία UV συντονισμού Raman (UV Resonance Raman, UVRR). Με διέγερση στα 239.5 nm ερευνήθηκε η εκλεκτική ενίσχυση του σκεδασμού Raman από τα δύο κατάλοιπα Tyr με στόχο τη διερεύνηση του τοπικού τους περιβάλλοντος μέσω του υπολογισμού της τιμής pK_a . Με την παρατήρηση της αλλαγής της συχνότητας της δόνησης γ_{8a} (1617 cm^{-1}) συναρτήσει του pH, υπολογίστηκε η τιμή του $pK_a = 10.2 \pm 0.2$. Η τιμή αυτή συγκρίθηκε με το pK_a υδατικού διαλύματος της ελεύθερης Tyr 9.1 ± 0.2 που επίσης έχει υπολογιστεί στην παρούσα Διατριβή. Η διαφορά στην τιμή των pK_a 's που προκύπτει, μαζί με τις παρατηρήσεις στην περιοχή της δόνησης τάσης του φαινολικού OH, συνεπάγονται ότι τα δύο κατάλοιπα Tyr υπόκεινται σε δύο διαφορετικά τοπικά περιβάλλοντα στην υγρή φάση, σε αντίθεση με την ελεύθερη πρόσβαση στο διαλύτη που τους επιτρέπει η εκτεταμένη διαμόρφωση στη στερεά φάση.

Η διέγερση στα ~200 nm προκαλεί εκλεκτική ενίσχυση των δονήσεων της ομάδας αμιδίου και προσφέρει άμεσες πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνικών συστημάτων. Τα φάσματα UVRR σε αυτό το μήκος διέγερσης υποδεικνύουν ότι το πεπτίδιο υιοθετεί μια τυχαία διαμόρφωση με το σχηματισμό β -στροφών σε μερικά τμήματά του. Από τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής που πραγματοποιηθήκαν για ένα “απομονωμένο” πεπτίδιο στη θερμοκρασιακή περιοχή 15-37 °C, προκύπτει ότι η κυρίαρχη διαμόρφωση που υιοθετεί το πεπτίδιο αντιστοιχεί σε σπείρωμα με το σχηματισμό β -στροφών στην κεντρική περιοχή και στο C-τελικό άκρο της ακολουθίας του πεπτιδίου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων UVRR, η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί δομικές αλλαγές οι οποίες σχετίζονται με την αύξηση της

πιθανότητας σχηματισμού β -στροφών και τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων, κυρίως στα τμήματα του πεπτιδίου 8-11 και 4-7.

Επιπλέον, μείγματα γλυκερόλης/νερού διαφόρων συγκεντρώσεων χρησιμοποιήθηκαν ως ένα μεταβαλλόμενο διαλυτικό περιβάλλον με σκοπό να διερευνηθούν συστηματικά αλλαγές στη δομή του TTR(105-115) μέσω αλλαγών των δεσμών υδρογόνου των καταλοίπων Tyr. Η διέγερση στα 239.5 nm έδειξε ότι η τιμή των απόλυτων διατομών σκεδασμού Raman των Tyr αυξάνεται σημαντικά με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης, υποδεικνύοντας ότι τα δύο κατάλοιπα βιώνουν ένα πιο υδρόφοβο περιβάλλον, που με τη σειρά του υποδεικνύει αλλαγή στη δομή του πεπτιδίου.

ABSTRACT

Understanding the various interactions between amino acid residues or backbone groups that determine protein structure involves probing the local environment they experience upon folding. As the structure of a protein in solution might differ from that in the solid state, where it is usually studied by X-ray diffraction, it is critical to possess a tool that provides insights on the structure in the native environment. UV Resonance Raman spectroscopy (UVRR) has been used extensively for the investigation of the structure and the structural changes in a variety of protein systems.

The 11-residue peptide fragment from transthyretin (TTR(105-115)) has been investigated using UVRR. Excitation at 239.5 nm reveals selective enhancement of scattering from the two tyrosine (Tyr) residues. The titration behavior of tyrosine was followed through the change in the ν_{8a} band (1617 cm^{-1}) frequency as a function of pH, and a $pK_a = 10.2 \pm 0.2$ was obtained. This is to be compared to the value of 9.1 ± 0.2 for the pK_a of aqueous monomeric Tyr, also obtained in the present Thesis. The pK_a difference observed here, along with observations in the $\nu(\text{OH})$ region, suggest that the two Tyr residues in the peptide probe two distinct microenvironments, rather than free access to the solvent as suggested by the extended conformation in the solid phase.

Excitation at $\sim 200\text{ nm}$ is known to enhance scattering due to amide vibrations and provides insights as to the secondary structure of a peptide or protein. The UVRR spectra at this excitation wavelength suggest that in solution the peptide assumes a disordered conformation with frequent formation of β -turns. Explicit-solvent replica-exchange MD simulations of the isolated peptide in the temperature range $15\text{ to }37\text{ }^\circ\text{C}$ suggest that the dominant conformation assumed by the peptide corresponds to a coil with β -turns in the central and C-terminal region. In line with the results of the experiments, an increase in temperature induces structural order in the peptide, reflected by an increase in the probability for the formation of β -turns, and hydrophobic side-chain contacts, mainly in the 8-11 moiety, and to a lesser extent in the 4-7 moiety.

Various glycerol/water mixtures were also employed in order to investigate the response of TTR(105-115) conformation to a changing hydrogen bonding environment, as probed by the Tyr residues in the peptide using UVRR. Excitation at 239.5 nm showed a significant increase in the absolute resonance Raman cross section of Tyr with an increase in the glycerol concentration, which denotes an increase in the hydrophobicity of the Tyr local environment, suggesting a conformational change.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Εισαγωγή	1
----------	---

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1	Πρωτεΐνες	5
2.1.1	Θεμελιώδης Μηχανισμός Αναδίπλωσης Πρωτεϊνών	5
2.1.2	Λανθασμένη Αναδίπλωση Πρωτεϊνών	7
2.2	Αμυλοειδή Ινίδια	8
2.2.1	Δομή Αμυλοειδών Ινιδίων	8
2.2.2	Πιθανός Μηχανισμός Σχηματισμού Αμυλοειδών Ινιδίων	10
2.3	Πρωτεΐνη Transthyretin	11
2.3.1	Αμυλοειδή Ινίδια της Πρωτεΐνης TTR	12
2.4	Φασματοσκοπία Συντονισμού Raman	14
2.4.1	Απόλυτες Διατομές Σκεδασμού	15
2.4.2	Εσωτερικά Πρότυπα και Απόλυτες Εντάσεις Raman	17
2.4.3	Λόγος Αποπόλωσης Raman	19
2.5	Εφαρμογές της Φασματοσκοπίας Συντονισμού Raman σε Βιολογικά Συστήματα	21
2.5.1	Μελέτη Δευτεροταγούς Δομής των Πρωτεϊνών	22
2.5.1.1	Ποσοτικός Προσδιορισμός της Δευτεροταγούς Δομής των Πρωτεϊνών	22
2.5.1.2	Χρήση Ισοτοπικής Ανταλλαγής Υδρογόνου/Δευτερίου (H/D) στη Φασματοσκοπία Συντονισμού Raman	27
2.5.2	Μελέτη Τεταρτοταγούς Δομής των Πρωτεϊνών	29
2.5.2.1	Δεσμοί Υδρογόνου Μεταξύ Τυροσίνης και Τοπικού Περιβάλλοντος	29
2.5.2.2	Δονήσεις Αρωματικού Δακτυλίου της Τυροσίνης	30
2.5.2.3	Μελέτη της Μεταβολής της Συχνότητας των Κορυφών της Tyr	31
2.5.2.3.1	Δονήσεις Y_{8a} και Y_{8b}	31
2.5.2.3.2	Δονήσεις Y_{7a} , Y_{9a} και $Y_{7a'}$	32
2.5.2.3.3	Δονήσεις Fermi Doublet	33

2.5.2.4	Μελέτη της Μεταβολής της Έντασης των Κορυφών της Tyr	34
2.5.2.5	Ενίσχυση του Σκεδασμού της Tyr στην Υπεριώδη Περιοχή	35
	<i>Βιβλιογραφία</i>	39

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1	Αντιδραστήρια	44
3.2	Πειραματική Διάταξη Συντονισμού Raman	44
3.2.1	Φασματοσκοπικές Μετρήσεις Προσδιορισμού του pK_a	46
3.2.2	Φασματοσκοπικές Μετρήσεις Προσδιορισμού της Δευτεροταγούς Δομής του Πεπτιδίου Συναρτήσει της Θερμοκρασίας και της Μελέτης Επίδρασης του Διαλυτικού Περιβάλλοντος	47
3.3	Πειραματική Διάταξη Χρονικής Ανάλυσης Συντονισμού Raman	48
3.3.1	Άλμα Θερμοκρασίας	51
3.3.2	Βαθμονόμηση Άλματος Θερμοκρασίας	52
	<i>Βιβλιογραφία</i>	54

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ pK_a ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ RAMAN

4.1	Εισαγωγή	55
4.2	Πειραματικές Συνθήκες	56
4.3	Μεθοδολογία Προσδιορισμού του pK_a	57
4.4	Πειραματικά Αποτελέσματα	59
4.4.1	Φάσματα Απορρόφησης του Πεπτιδίου TTR(105-115)	59
4.4.2	Φάσματα Συντονισμού Raman του Πεπτιδίου TTR(105-115)	59
4.4.3	Φάσματα Συντονισμού Raman Υδατικού Διαλύματος Τυροσίνης	62
4.4.4	Εναλλακτική Προσέγγιση του Προσδιορισμού του pK_a	64
4.4.5	Παρατήρηση Φαινολικού Υδροξυλίου	66
4.5	Συζήτηση Αποτελεσμάτων	67
4.5.1	Προσδιορισμός του pK_a	68
4.5.2	Μελέτη Μετατόπισης Συχνοτήτων	69
4.5.3	Φαινολικό OH	70

4.5.4	Προτεινόμενη Δομή του Πεπτιδίου	71
	<i>Βιβλιογραφία</i>	73
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ TTR(105-115) ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ RAMAN		
5.1	Εισαγωγή	75
5.2	Πειραματικές Συνθήκες	76
5.3	Υπολογιστική Μέθοδος	76
5.4	Πειραματικά Αποτελέσματα	78
5.4.1	Φάσματα Συντονισμού Raman του Πεπτιδίου TTR(105-115) σε Διάλυμα CH ₃ CN/H ₂ O	78
5.4.2	Φάσματα Συντονισμού Raman του Πεπτιδίου TTR(105-115) σε Διάλυμα CD ₃ CN/D ₂ O	80
5.4.3	Δονήσεις Y _{7a} , Y _{9a} , Y _{7a} '	82
5.4.4	Σύγκριση Φασμάτων Συντονισμού Raman Αραιού Διαλύματος Πεπτιδίου και των Αμυλοειδών Ινιδίων του	85
5.5	Υπολογιστικά Αποτελέσματα	86
5.5.1	Ανάλυση Διαμορφώσεων	86
5.5.2	Ανάλυση Αλληλεπιδράσεων Μεταξύ των Πλευρικών Αλυσίδων	87
5.5.3	Ανάλυση Ομαδοποίησης (<i>Cluster Analysis</i>)	88
5.6	Συζήτηση Αποτελεσμάτων	89
5.6.1	Προσδιορισμός της Δομής του Πεπτιδίου	90
5.6.2	Ποσοτικός Προσδιορισμός της Δευτεροταγούς Δομής του Πεπτιδίου	91
	<i>Βιβλιογραφία</i>	95
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ TTR (105-115) ΣΕ ΜΕΙΓΜΑΤΑ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ/ΝΕΡΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ RAMAN		
6.1	Εισαγωγή	98
6.2	Πειραματικές Συνθήκες-Υλικά	99
6.3	Μεθοδολογία Ανάλυσης Φασμάτων Συντονισμού Raman	99
6.4	Αποτελέσματα και Συζήτηση	103

6.4.1	Μείγματα Γλυκερόλης/Νερού	103
6.4.2	Δόνηση Κάμψης Νερού	105
6.4.3	Απόλυτες Διατομές Σκεδασμού Raman της Γλυκερόλης	108
6.4.5	Το Πεπτίδιο TTR(105-115) σε Μείγματα Γλυκερόλης/Νερού	112
	<i>Βιβλιογραφία</i>	119
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	122
	ΜΕΛΛΟΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ	125

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 2.1: Σχηματική απεικόνιση του ενεργειακού τοπίου για τη διαδικασία της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών.

Σχήμα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση μηχανισμού της λανθασμένης πρωτεϊνικής αναδίπλωσης.

Σχήμα 2.3: “Steric zipper” δομή των αμυλοειδών ινιδίων, οι πολικές πλευρικές αλυσίδες από τα αντιπαράλληλα ζεύγη των β -κλώνων συνδέονται κατά μήκος των δύο β -πτυχωτών επιφανειών, αφήνοντας τα μόρια του νερού μακριά. Σχηματίζοντας δύο χαρακτηριστικές διεπιφάνειες μεταξύ των β -επιφανειών. Το κεντρικό βέλος υποδηλώνει τον άξονα των αμυλοειδών ινιδίων και τα μόρια με κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύουν τα μόρια νερού.

Σχήμα 2.4: Μηχανισμός σχηματισμού αμυλοειδών ινιδίων της λυσοζύμης (προσαρμοσμένος από τους Booth *et al.*). Με μωβ αντιπροσωπεύονται οι β -πτυχωτές επιφάνειες, με κόκκινο οι α -έλικες στη δομή και με διακεκομμένη γραμμή συμβολίζονται τα τμήματα της δομής με τυχαία διαμόρφωση.

Σχήμα 2.5: Δομή της πρωτεΐνης TTR, α) Φυσικό μονομερές της TTR, β) Ένωση δύο μονομερών A και B, οι κόκκινες γραμμές δηλώνουν τους δεσμούς υδρογόνου, γ)+δ) Ομοτετραμερές της TTR.

Σχήμα 2.6: Δομές που λήφθηκαν με α) ακτίνες-X του τμήματος της πρωτεΐνης TTR 105-115 στη φυσική του κατάσταση και β) NMR των ινιδίων του πεπτιδίου TTR(105-115).

Σχήμα 2.7: Σχηματική απεικόνιση της χρονικά εξαρτώμενης θεωρίας διαταραχών για το συντονισμό Raman.

Σχήμα 2.8: Γεωμετρία σκέδασης (τα απλά βέλη παριστάνουν τη διεύθυνση διάδοσης και τα διπλά βέλη τη διεύθυνση πόλωσης του φωτός).

Σχήμα 2.9: Τρόποι δόνησης του πεπτιδικού δεσμού.

Σχήμα 2.10: “Καθαρά” φάσματα Raman (PSSRS) για τα δευτεροταγή στοιχεία β -πτυχωτή, α -έλικα, τυχαίο σπείρωμα, τα οποία υπολογίστηκαν από φάσματα UVRR (206 nm) υδατικών διαλυμάτων πρωτεϊνών. Οι περιοχές γύρω στους 1610 και 1450 cm^{-1} εξαιρούνται λόγω παρεμβολών από τις δονήσεις των αρωματικών καταλοίπων.

Σχήμα 2.11: “Καθαρά” φάσματα Raman (PSSRS) για τα δευτεροταγή στοιχεία β -πτυχωτή, α -έλικα, τυχαίο σπείρωμα και β -στροφή, τα οποία υπολογίστηκαν από φάσματα UVRR (197 nm) υδατικών διαλυμάτων πρωτεϊνών. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στις συνεισφορές από τα αρωματικά κατάλοιπα.

Σχήμα 2.12: Φάσματα UVRR πρωτεϊνών, μετά από διέγερση στα 197 nm, και η διαδικασία αφαίρεσης της συνεισφοράς των αρωματικών πλευρικών αλυσίδων, χρησιμοποιώντας τα φάσματα υδατικών διαλυμάτων Phe, Tyr και Trp. Για την κανονικοποίηση των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν δονήσεις των αρωματικών καταλοίπων (η F13 στα 1003 cm^{-1} , η Y1 στα 853 cm^{-1} και η W18 στα 757 cm^{-1}).

Σχήμα 2.13: Μοντέλο πολυπεπτιδικής αλυσίδας A) β -κλώνου και B) α -έλικας. Η απόσταση μεταξύ των υδρογόνων C_{α} -H και N-H εξαρτάται από τη δίεδρη γωνία ψ .

Σχήμα 2.14: (A) Σχηματική απεικόνιση αναπτυσσόμενων αμυλοειδών ινιδίων. Με μωβ γραμμές απεικονίζονται οι β -κλώνοι. (B) Φάσματα UVRR των ινιδίων της λυσοζύμης σε H_2O (μπλε), D_2O (κόκκινο) και 50/50% H_2O/D_2O μείγμα (πράσινο). (C) Φάσμα UVRR της λυσοζύμης σε H_2O (μπλε), D_2O (κόκκινο).

Σχήμα 2.15: Κυριότεροι τρόποι δόνησης της τυροσίνης.

Σχήμα 2.16: Δίεδρη γωνία τ_{CO} (COH).

Σχήμα 2.17: Φάσμα απορρόφησης για την τυροσίνη.

Σχήμα 2.18: Φάσματα UVRR της Tyr, μετά από διέγερση στα 192, 200, 218 και 240 nm.

Σχήμα 3.1: Πειραματική Διάταξη UV Συντονισμού Raman.

Σχήμα 3.2: Φαινόμενο Επαγόμενου Σκεδασμού Raman.

Σχήμα 3.3: Θερμικός Μανδύας.

Σχήμα 3.4: Πειραματική Διάταξη UV Χρονικής Ανάλυσης Συντονισμού Raman.

Σχήμα 3.5: Στατικά Φάσματα UVRR του διαλύματος H_2O/CF_3COONa , μετά από διέγερση στα 199.76 nm. Τα φάσματα κανονικοποιήθηκαν με βάση την κορυφή του τριφθοροοξικού νατρίου 1439 cm^{-1} .

Σχήμα 3.6: Φάσματα διαφοράς UVRR του διαλύματος H_2O/CF_3COONa , στις διάφορες θερμοκρασίες.

Σχήμα 3.7: Καμπύλη βαθμονόμησης της διαφοράς της θερμοκρασίας συναρτήσει της $\Delta I/I_0$ της κορυφής 3400 cm^{-1} του διαλύματος H_2O/CF_3COONa .

Σχήμα 4.1: Φάσμα ηλεκτρονιακής απορρόφησης του πεπτιδίου TTR(105-115) σε pH = 6.2 (.....), 10.5 (-----), 11.7 (—). Η κατακόρυφη γραμμή δηλώνει το μήκος διέγερσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Σχήμα 4.2: Φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) συναρτήσει του pH, μετά από διέγερση στα 239.5 nm. Στα φάσματα παρουσιάζονται οι δονήσεις των καταλοίπων Tyr στο πεπτίδιο.

Σχήμα 4.3: Φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) στην περιοχή της δόνησης Y_{8a} συναρτήσει του pH, μετά από διέγερση στα 239.5 nm.

Σχήμα 4.4: Καμπύλες τιτλοδότησης του TTR(105-115) (αστέρια) και του υδατικού διαλύματος της ελεύθερης Tyr (ανοικτοί κύκλοι). Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της καμπύλης τιτλοδότησης χρησιμοποιώντας την εξίσωση (4.1). Οι τιμές των pK_a είναι 10.2 ± 0.2 και 9.1 ± 0.2 , αντίστοιχα.

Σχήμα 4.5: Φάσματα UVRR υδατικού διαλύματος της ελεύθερης Tyr συναρτήσει του pH, μετά από διέγερση στα 239.5 nm.

Σχήμα 4.6: Αποσυνέλιξη της κορυφής Y_{8a} (a) TTR(105-115) (b) της ελεύθερης Tyr συναρτήσει του pH: (τελεία-διακεκομμένη γραμμή) 1600 cm^{-1} , (διακεκομμένη γραμμή) 1604 cm^{-1} , (τελεία-τελεία-διακεκομμένη γραμμή) 1617 cm^{-1} , (γραμμή) άθροισμα όλων των ειδών.

Σχήμα 4.7: Καμπύλες τιτλοδότησης (a) του πεπτιδίου TTR(105-115) (b) της ελεύθερης Tyr με χρήση των εμβαδών όπως έχουν προκύψει από την αποσυνέλιξη στο Σχ. 4.6. Η τιμή του pK_a σε κάθε περίπτωση αντιστοιχεί στο σημείο τομής των καμπυλών της Y_{8a} και Y_{8a}^- και υποδεικνύεται με τη διακεκομμένη γραμμή (pK_a (TTR(105-115)) = 10.3 και (pK_a (Tyr) = 9.2).

Σχήμα 4.8: Γραφική παράσταση της τιμής του pH συναρτήσει του λογαριθμικού λόγου των εμβαδών για τα είδη Y_{8a}^- και Y_{8a} στο πεπτίδιο TTR(105-115) (κύκλοι) και στο διάλυμα Tyr (τετράγωνα). Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή των δεδομένων με χρήση γραμμικής παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων. Η κάθετη γραμμή δηλώνει τον y άξονα όταν το $x = 0$.

Σχήμα 4.9: Φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων σε (A) pH = 9.1, και (B) pH = 12.1. Οι κορυφές που παρουσιάζονται με αστεράκι αντιστοιχούν σε τυχαία σκέδαση.

Σχήμα 5.1: Φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) σε διάλυμα 40% v/v $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ συναρτήσει της θερμοκρασίας, μετά από διέγερση στα 199.8 nm. Τα φάσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τη δόνηση τάσης CN του ακετονιτριλίου, στους 2258 cm^{-1} .

Σχήμα 5.2: Φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) σε διάλυμα 40% v/v $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$ συναρτήσει της θερμοκρασίας, μετά από διέγερση στα 199.8 nm.

Σχήμα 5.3: Φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) σε διαλύματα: 40% v/v $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$ (μπλε) και 40% v/v $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (κόκκινο) στους $10 \text{ }^\circ\text{C}$, μετά από διέγερση στα 199.8 nm.

Σχήμα 5.4: Αποσυνέλιξη της περιοχής των 1200 cm^{-1} του φάσματος πεπτιδίου TTR(105-115) σε διάλυμα 40% v/v $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, στους $10\text{ }^\circ\text{C}$, μετά από διέγερση στα 200 nm . Με κόκκινο: Y_{9a} (1179 cm^{-1}), Y_{7a} (1209 cm^{-1}), Am III (1239 cm^{-1}) και $\text{Y}_{7a'}$ (1265 cm^{-1}), μπλε: το άθροισμα όλων των ειδών.

Σχήμα 5.5: Αποσυνέλιξη της περιοχής των 1200 cm^{-1} του φάσματος πεπτιδίου TTR(105-115) σε διάλυμα 40% v/v $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, στους $14\text{ }^\circ\text{C}$. Με κόκκινο: Y_{9a} (1179 cm^{-1}), Y_{7a} (1209 cm^{-1}), Am III (1239 cm^{-1}) και $\text{Y}_{7a'}$ (1265 cm^{-1}), μπλε: το άθροισμα όλων των ειδών.

Σχήμα 5.6: Αποσυνέλιξη της περιοχής των 1200 cm^{-1} του φάσματος πεπτιδίου TTR(105-115) σε διάλυμα 40% v/v $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, στους $21\text{ }^\circ\text{C}$. Με κόκκινο: Y_{9a} (1179 cm^{-1}), Y_{7a} (1209 cm^{-1}), Am III (1241 cm^{-1}) και $\text{Y}_{7a'}$ (1265 cm^{-1}), μπλε: το άθροισμα όλων των ειδών.

Σχήμα 5.7: Αποσυνέλιξη της περιοχής των 1200 cm^{-1} του φάσματος πεπτιδίου TTR(105-115) σε διάλυμα 40% v/v $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, στους $28\text{ }^\circ\text{C}$. Με κόκκινο: Y_{9a} (1179 cm^{-1}), Y_{7a} (1209 cm^{-1}), Am III (1242 cm^{-1}) και $\text{Y}_{7a'}$ (1265 cm^{-1}), μπλε: το άθροισμα όλων των ειδών.

Σχήμα 5.8: Ο λόγος των εμβαδών Y_{7a} και Y_{9a} του πεπτιδίου TTR(105-115) σε διάλυμα 40% v/v $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ συναρτήσσει της θερμοκρασίας, μετά από διέγερση στα 239.5 nm (κλειστοί κύκλοι) και 199.8 (ανοικτοί κύκλοι).

Σχήμα 5.9: Φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115). Με κόκκινο: χαμηλής συγκέντρωσης ($\sim 1.5\text{ mM}$) σε διάλυμα 40% v/v $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$, στους $21\text{ }^\circ\text{C}$. Με μπλε: ινίδια ($\sim 10\text{ mM}$) σε D_2O , στους $25\text{ }^\circ\text{C}$, μετά από διέγερση στα 199.8 nm .

Σχήμα 5.10: Πιθανότητα σχηματισμού της δευτεροταγούς δομής των καταλοίπων του πεπτιδίου, όπως υπολογίστηκε μετά από προσομοιώσεις σε θερμοκρασίες 288 , 300 και 310 K . Οι πιθανότητες σχηματισμού διαμόρφωσης polyproline II παρουσιάζονται στο κάτω δεξιά γράφημα, το οποίο περιλαμβάνει επίσης τις πιθανότητες σχηματισμού τυχαίου σπειρώματος που παρουσιάζονται στο πάνω δεξιά γράφημα. Η τυπική απόκλιση παρουσιάζεται στα γραφήματα με γραμμές σφάλματος. Τα κατάλοιπα 1-11 αντιπροσωπεύουν το τμήμα 105-115 της ακολουθίας της TTR.

Σχήμα 5.11: Χάρτες πυκνότητας των αλληλεπιδράσεων των πλευρικών αλυσίδων. Τα γραφήματα από τα αριστερά προς τα δεξιά αντιστοιχούν σε προσομοιώσεις σε θερμοκρασίες 288 , 300 και 310 K , αντίστοιχα. Τα κατάλοιπα 1-11 αντιπροσωπεύουν το τμήμα 105-115 της ακολουθίας της TTR.

Σχήμα 5.12: Διαμορφώσεις των τριών κύριων οικογενειών όπως προέκυψαν από την ανάλυση ομαδοποίησης. Η διαμόρφωση της κύριας αλυσίδας παρουσιάζεται με πορτοκαλί σωλήνα. Τα άτομα C_α των καταλοίπων 1 (105), 8 (112) και 11 (115) εμφανίζονται με σφαιρίδια van der Waals. Τα κατάλοιπα 1 και 11 είναι τοποθετημένα από πάνω προς τα

κάτω στο σχήμα, αντίστοιχα. Οι διαμορφώσεις της κύριας αλυσίδας και των πλευρικών αλυσίδων που παρατηρούνται σχετίζονται με τη χαρακτηριστική δομή για κάθε οικογένεια.

Σχήμα 5.13: Φάσμα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) στους 14 °C, μετά από διέγερση στα 199.8 nm (μαύρο), στο οποίο έγινε προσαρμογή γραμμικού συνδυασμού των φασμάτων PSSRS (ροζ) και του φάσματος υδατικού διαλύματος Tyr (πράσινο). Η προσαρμογή παρουσιάζεται με μπλε. Η αποσυνέλιξη της περιοχής του φάσματος στους 1200 cm^{-1} αποκαλύπτει τη συνεισφορά των δονήσεων Y_{9a} , Y_{7a} , Am III και Y_{7a} (διακεκομμένη κόκκινη γραμμή). Η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύει το άθροισμα όλων των κορυφών της αποσυνέλιξης.

Σχήμα 6.1: Φάσματα UVRR μειγμάτων γλυκερόλης/νερού για συγκεντρώσεις 10% (1.37 M), 25% (3.4 M) και 50% (6.9 M), μετά από διέγερση στα 239.5 nm. Τα φάσματα λήφθηκαν για (II) και (\perp) πόλωση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε σχέση με την πόλωση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Σχήμα 6.2: Φάσμα UVRR μείγματος 50% v/v γλυκερόλης/νερού (3.4 M, $\chi_g=0.196$), μετά από διέγερση στα 239.5 nm. Η κορυφή στους $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ αντιστοιχεί στη δόνηση κάμψης του νερού και έχει χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό πρότυπο. Στο πάνω αριστερό μέρος της γραφικής παρουσιάζεται η δομή της γλυκερόλης με την αρίθμηση των ανθράκων όπως αυτοί αναφέρονται στο κείμενο.

Σχήμα 6.3: Συχνότητα (κλειστοί κύκλοι) και εύρος (ανοικτοί κύκλοι) της δόνησης κάμψης HOH, συναρτήσει του μοριακού κλάσματος της γλυκερόλης.

Σχήμα 6.4: Σχηματική απεικόνιση του δυναμικού της ενέργειας της δόνησης κάμψης, τριατομικού μορίου, απουσία (αριστερά) και παρουσία (δεξιά) αλληλεπιδράσεων δεσμών υδρογόνου.

Σχήμα 6.5: Απόλυτη διατομή σκεδασμού Raman της δόνησης παραμόρφωσης του CH_2 της γλυκερόλης σε μείγμα γλυκερόλης/νερού, συναρτήσει της συγκέντρωσής της, με διέγερση στα 239.5 nm. Η τυπική απόκλιση παρουσιάζεται στα γραφήματα με γραμμές σφάλματος.

Σχήμα 6.6: Φάσματα ηλεκτρονικής απορρόφησης μειγμάτων γλυκερόλης με συγκεντρώσεις γλυκερόλης 10%, 25%, 37%, 50% και 70% v/v. Η κάθετη γραμμή δηλώνει το μήκος διέγερσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Σχήμα 6.7: Μέσος αριθμός δεσμών H ανά μόριο νερού συναρτήσει του μοριακού κλάσματος της γλυκερόλης χ_{gly} . Τα σύμβολα αντιπροσωπεύουν το συνολικό μέσο αριθμό δεσμών H ανά μόριο νερού (διαμάντι) καθώς και συνεισφορές από δεσμούς H:

αλληλεπιδράσεις νερού-νερού (τετράγωνα), αλληλεπιδράσεις της στιβάδας επιδιαλύτωσης (τρίγωνα) και αλληλεπιδράσεις γλυκερόλης-νερού (κύκλοι).

Σχήμα 6.8: Μέσος αριθμός δεσμών H ανά μόριο γλυκερόλης συναρτήσει του μοριακού κλάσματος της γλυκερόλης χ_{gly} . Τα σύμβολα αντιπροσωπεύουν το συνολικό μέσο αριθμό δεσμών H ανά μόριο γλυκερόλης (διαμάντι) καθώς και συνεισφορές από δεσμούς H: γλυκερόλης-νερού (κύκλοι), ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις γλυκερόλης-γλυκερόλης (τετράγωνα), αλληλεπιδράσεις γλυκερόλης-γλυκερόλης (τρίγωνα).

Σχήμα 6.9: Φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) σε μείγματα γλυκερόλης/νερού, με συγκεντρώσεις γλυκερόλης v/v 10% (1.37 M), 25% (3.4 M), 37% (5.1 M), 50% (6.9 M), και 70% (9.6 M), μετά από διέγερση στα 239.5 nm. Οι κορυφές που οφείλονται στις δονήσεις της Tyr και της γλυκερόλης προέκυψαν μετά από αποσυνέλιξη του ολικού φάσματος.

Σχήμα 6.10: Εξάρτηση της απόλυτης διατομής σκεδασμού Raman της συμμετρικής δόνησης τάσης γ_{8a} των καταλοίπων Tyr στο πεπτίδιο TTR(105-115) σε μείγματα γλυκερόλης/νερού, συναρτήσει της συγκέντρωσης της γλυκερόλης, στα 239.5 nm.

Σχήμα 6.11: Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου της επιλεκτικής επιδιαλύτωσης της λυσοζύμης σε μείγμα γλυκερόλης/νερού. Αριστερά: οι κύκλοι με σκούρο και ανοικτό μπλε αντιστοιχούν στα μόρια νερού που βρίσκονται στην πρώτη στιβάδα επιδιαλύτωσης και στο διάλυμα, αντίστοιχα. Οι κύκλοι με σκούρο και ανοικτό χρώμα αντιστοιχούν στα μόρια της γλυκερόλης. Δεξιά: η κίτρινη γραμμή αντιστοιχεί στην πρώτη στιβάδα επιδιαλύτωσης.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1: Συχνότητες (cm^{-1}) των κορυφών αμιδίου, για τα δευτεροταγή είδη.

Πίνακας 2.2: Ταυτοποίηση των κορυφών Raman για την Tyr και Tyr⁻.

Πίνακας 6.1: Απόλυτες διατομές σκεδασμού Raman (σ_R) και λόγοι αποπόλωσης (ρ) για τη δόνηση της γλυκερόλης στους 1468 cm^{-1} και απόλυτες RR διατομές για τη δόνηση κάμψης του νερού και τις δονήσεις της Tyr σε διαλύματα γλυκερόλης/νερού, σε μήκος διέγερσης 239.5 nm.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΩΝ

Ala	Alanine
Am I	Αμίδιο I
Am II	Αμίδιο II
Am III	Αμίδιο III
Asp	Asparagine
c	Συγκέντρωση
CCD	Charge-Coupled Device
CD	Circular Dichroism
CHARMM	Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics
Cys	Cysteine
D(t)	Ομοιογενής Συνάρτηση Απόσβεσης
DUVRR	Deep Ultraviolet Resonance Raman
E₀₀	Ανομοιογενής Διαπλάτωση
E₁	Ενέργεια Πρόσπτωσης
E_s	Ενέργεια Σκέδασης
FAP	Familial Amyloid Polyneuropathy
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
I	Ένταση
ICA	Independent Component Analysis
Ile	Isoleucine
IR	Infrared
K_a	Σταθερά Διάσταση Οξέως
Leu	Leucine
Lys	Lysine
MCR	Multivariate Curve Resolution
MD	Molecular Dynamics
M_{eg}	Διπολική Ροπή Μετάπτωσης e→g
Met	Methionine

<i>n</i>	Δείκτης Διάθλασης
2D-NMR	Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PCA	Principal Component Analysis
Phe (F)	Phenylalanine
PPII	Polyproline II
Pro	Proline
PSSRS	Pure Secondary Structure Raman Spectra
RR	Resonance Raman
SCA	Senile Cardiac Amyloidosis
Ser	Serine
SSA	Senile Systemic Amyloidosis
TEM	Transmission Electron Microscopy
Thr	Threonine
T-jump	Temperature jump
Trp (W)	Tryptophan
TRRR	Time Resolved Resonance Raman
TTR	Transthyretin
Tyr (Y)	Tyrosine
UV	Ultraviolet
UVRR	Ultraviolet Resonance Raman
UV-vis	Ultraviolet-Visible
Val	Valine
VIS	Visible
ν_0	Συχνότητα Προσπίπτουσας Ακτινοβολίας
α	Πολωσιμότητα
Γ	Ομοιογενές Γραμμικό Πλάτος
λ_0	Μήκος Κύματος
ρ	Λόγος Αποπόλωσης
σ	Διατομή Σκεδασμού Raman
χ	Μοριακό Κλάσμα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τρισδιάστατη δομή που αναπτύσσουν οι πρωτεΐνες είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την καλή λειτουργία τους και αποτελεί αντικείμενο ενδελεχούς μελέτης από τους κλάδους της βιολογίας και της βιοφυσικής. Τυχόν λανθασμένη αναδίπλωση των πρωτεϊνών οδηγεί αρχικά στη συσσωμάτωσή τους και τελικά στο σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων τα οποία είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση θανατηφόρων ασθενειών όπως αυτές του Alzheimer και των Creutzfeldt-Jacob. Επομένως, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη της πλήρους διευκρίνησης του μηχανισμού σχηματισμού ινιδίων που παίρνει προτεραιότητα στην αλυσίδα κατανόησης της προέλευσης, έναρξης, πρόληψης και/ή θεραπείας αυτών των ασθενειών.

Τα αμυλοειδή ινίδια αποτελούν υψηλά οργανωμένες δομές που σχηματίζονται μέσω αυτοσυναρμολόγησης πολυπεπτιδίων. Από πειραματικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί έχει παρατηρηθεί ότι τα αμυλοειδή ινίδια που σχηματίζονται *in vivo* από τουλάχιστον 30 πεπτίδια και πρωτεΐνες με διαφορετική ακολουθία αμινοξέων εμφανίζουν τα ίδια δομικά γνωρίσματα. Συγκεκριμένα, υιοθετούν τη χαρακτηριστική β -σταυρωτή (cross- β) δομή και σταθεροποιούνται από ένα εκτεταμένο δίκτυο ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσεται μεταξύ των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Επομένως, έχει προταθεί ότι δυνατότητα σχηματισμού ινιδίων αποτελεί γενική ιδιότητα όλων των πρωτεϊνών και δεν εξαρτάται από την πρόδρομη ακολουθία τους. Εντούτοις, ο μηχανισμός που οδηγεί στην αυτοσυναρμολόγηση πολυπεπτιδίων δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως.

Λαμβάνοντας υπόψη το γενικότερο στόχο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής για τη διευκρίνιση του μηχανισμού σχηματισμού ινιδίων, είναι πολύ σημαντικός ο προσδιορισμός των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των καταλοίπων ενός πρωτεϊνικού συστήματος, καθώς και η μελέτη του τοπικού τους περιβάλλοντος που αποκτούν κατά τη διαδικασία της αναδίπλωσης. Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού ινιδίων, οι πρωτεΐνες αναμένεται να παρουσιάσουν σημαντικές δομικές αλλαγές και κατ' επέκταση μεγάλη αλλαγή στο τοπικό περιβάλλον που περικλείουν τα κατάλοιπά τους.

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εστιάστηκε στη μελέτη ενός πρότυπου πεπτιδίου, 11 αμινοξέων, το οποίο είναι μέρος της αλληλουχίας της ανθρώπινης αμυλοειδούς πρωτεΐνης

Transthyretin (TTR) (105-115). Το πεπτίδιο αυτό αποτελεί το β -κλώνο G της φυσικής δομής της TTR και έχει βρεθεί ότι συσσωματώνεται εύκολα σε αμυλοειδή ινίδια *in vitro*. Η TTR είναι μια πρωτεΐνη του αίματος που παράγεται στο συκώτι, και μεταφέρει τη θυρεοειδή πρωτεΐνη και τη βιταμίνη A. Το ενδιαφέρον για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη TTR πηγάζει από το γεγονός ότι η μεταλλαγμένη μορφής της, (Val30Met) TTR, συνδέεται άμεσα με την εκδήλωση της θανατηφόρας ασθένειας Familial Amyloid Polyneuropathy (FAP). Μελέτες έδειξαν ότι συγκεκριμένα τμήματα της πρωτεΐνης είναι περισσότερο αμυλοειδογενή από άλλα, με τα πιο αμυλοειδογενή από αυτά να αντιστοιχούν στον A (10-19) και G (105-115) κλώνο, αντίστοιχα. Τα αμυλοειδή ινίδια που σχηματίζονται από το πεπτίδιο TTR(105-115) είναι καλά χαρακτηρισμένα και επομένως το πεπτίδιο αυτό μπορεί να αποτελέσει ιδανικό σύστημα για την απομόνωση και μελέτη των αλληλεπιδράσεων που οδηγούν στο σχηματισμό ινιδίων.

Μέχρι στιγμής, οι δομικές μελέτες του πεπτιδίου TTR(105-115) έκαναν χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και φθορισμού, και εστιάστηκαν στη μελέτη της διαμόρφωσης των σχηματιζόμενων ινιδίων. Εντούτοις, με βάση τη βιβλιογραφία, καμία μελέτη ακτίνων X δεν ασχολήθηκε με τη διακρίβωση της δομής του πεπτιδίου TTR(105-115), ενώ μόνο μια μελέτη NMR μελέτησε τη δομή του στην υγρή φάση, όπου τα αποτελέσματα δεν ήταν αρκετά ξεκάθαρα.

Στα πλαίσια της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, έχει χαρακτηριστεί για πρώτη φορά εκτενώς η δομή του πεπτιδίου TTR(105-115) στην υγρή φάση και η συμπεριφορά του κάτω από συστηματικές συνθήκες με τη χρήση της φασματοσκοπίας συντονισμού Raman (UVRR), αποτελώντας το πρώτο βήμα για την κατανόηση των δομικών αλλαγών που ενδέχεται να συμβούν κατά το σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων.

Η φασματοσκοπία UVRR αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για την εξασφάλιση χρήσιμων πληροφοριών σχετικά με την πρωτεϊνική δομή στην υγρή φάση. Γενικά έχει τη δυνατότητα παρακολούθησης δευτεροταγών δομικών αλλαγών και τη διερεύνηση τοπικών δομικών αλλαγών που οφείλονται στις ομάδες αμιδίου, αρωματικές πλευρικές αλυσίδες, και πρωτεϊνικά συνένζυμα, με την εκλεκτική διέγερση των διάφορων χρωμοφόρων ομάδων. Συγκεκριμένα, με διέγερση στη βαθιά υπεριώδη περιοχή, γύρω στα 200 nm, ενισχύεται ο σκεδασμός Raman από το χρωμοφόρο αμιδίο, ο οποίος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στις διέδρες γωνίες ϕ και ψ , δίνοντας ποσοτικές πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών. Επίσης, η διέγερση γύρω στα ~230 nm επιτρέπει τη μελέτη του περιβάλλοντος των αρωματικών καταλοίπων, εφόσον η διατομή σκεδασμού

των αμινοξέων αυτών δίνει άμεσες πληροφορίες για την έκταση της έκθεσής τους στο διαλύτη.

Το πεπτίδιο TTR(105-115) περιέχει δύο κατάλοιπα τυροσίνης (Tyr105 και Tyr114), τα οποία μπορούν να προσφέρουν χρήσιμες δομικές πληροφορίες. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η Tyr έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μελέτες Raman για την εξέταση του τοπικού περιβάλλοντος μιας πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, οι δονήσεις που συνδέονται με το φαινολικό δακτύλιο φαίνονται να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην αλλαγή του τοπικού περιβάλλοντος λόγω της συμμετοχής του φαινολικού OH στην ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου.

Επομένως, για την επίτευξη του βασικού στόχου της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, της διευκρίνισης της δομής του πεπτιδίου TTR(105-115) στην υγρή φάση, ακολουθήθηκε μια σειρά από συστηματικές πειραματικές μελέτες. Δεδομένου ότι το pK_a αποτελεί γενική ιδιότητα των αμινοξέων, η οποία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στις αλλαγές του τοπικού περιβάλλοντος, πραγματοποιήθηκε μελέτη της δομής του πεπτιδίου σε αραιό διάλυμα με τιτλοδότηση των καταλοίπων Tyr, προκειμένου να υπολογιστεί το μέσο ολικό pK_a των αρωματικών πλευρικών της αλυσίδων. Σύγκριση του pK_a -R της ελεύθερης Tyr με αυτό που λαμβάνεται για το πεπτίδιο έδωσε μια ένδειξη για την έκταση της αλληλεπίδρασης του Tyr-OH με το νερό και συνεπώς της ελεύθερης επιφάνειας των καταλοίπων της Tyr στο διαλύτη. Αυτή η πειραματική μελέτη επιλέγηκε να πραγματοποιηθεί με τη χρήση της φασματοσκοπίας UVRR λόγω της ταυτόχρονης λήψης άμεσων πληροφοριών σχετικά με τη δομή του πεπτιδίου στην υγρή φάση. Συγκεκριμένα, μπορεί να εξεταστεί η δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου των αρωματικών πλευρικών αλυσίδων Tyr και να μελετηθούν αλλαγές στο τοπικό τους περιβάλλον. Η μελέτη αυτή θα περιγραφεί εκτενέστερα στο Κεφάλαιο 4.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι τα αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου TTR(105-115) σχηματίζονται σε θερμοκρασίες γύρω στους 37 °C, επομένως είναι σημαντικό να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στη δομή του πεπτιδίου. Στο Κεφάλαιο 5 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα που εξήχθησαν μετά από διέγερση στα 200 nm. Η παρατήρηση των χαρακτηριστικών ζωνών αμιδίου παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη δευτεροταγή δομή (α -έλικας, β -πτυχωτής επιφάνειας, β -στροφής ή τυχαίου σπειρώματος) που υιοθετεί το πεπτίδιο συναρτήσει της θερμοκρασίας. Για την εξαγωγή μιας πιο ολοκληρωμένης εικόνας της δομής του πεπτιδίου συναρτήσει της θερμοκρασίας, πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής, μετά από συνεργασία με την

ομάδα Βιοφυσικής του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Κύπρου, που επίσης παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 5.

Με βάση προηγούμενη θερμοκρασιακή μελέτη του πεπτιδίου TTR(105-115) που έγινε στο εργαστήριο Μοριακής Φασματοσκοπίας, διαπιστώθηκε ότι στην περιοχή 10 μέχρι 28 °C παρατηρείται αύξηση των εντάσεων και κατ' επέκταση των απόλυτων διατομών σκεδασμού των δονήσεων της Tyr. Επομένως, για τη διακρίβωση αν η αύξηση της απόλυτης διατομής σκεδασμού της Tyr οφείλεται στο αυξημένο υδροφοβικό περιβάλλον, μελετήθηκε άμεσα η επίδραση του διαλυτικού περιβάλλοντος, χρησιμοποιώντας μείγματα γλυκερόλης/νερού μεταβαλλόμενης σύστασης. Η πειραματική αυτή μελέτη παρουσιάζεται στο Κεφάλαιο 6.

Η μελέτη της δομής του πεπτιδίου TTR(105-115) στην υγρή φάση με χρήση της φασματοσκοπίας UVRR αποτελεί τη βάση για την κατανόηση των δομικών αλλαγών που πρόκειται να συμβούν κατά τη διάρκεια συσσωμάτωσης του πεπτιδίου και επιπλέον παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την κατανόηση της δυναμικής και του μηχανισμού σχηματισμού αμυλοειδών ινιδίων. Για την πλήρη εικόνα του μηχανισμού, η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εισηγείται τη χρήση της φασματοσκοπίας χρονικής ανάλυσης συντονισμού Raman (TRRR) αφότου προκληθεί η διαδικασία συσσωμάτωσης μέσω ενός επαγόμενου με laser άλματος θερμοκρασίας (T-jump). Τέτοιες φασματοσκοπικές μελέτες επιτρέπουν επίσης την ανίχνευση των ενδιάμεσων ειδών κατά τη διαδικασία συσσωμάτωσης. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι μερικώς αναδιπλωμένες αλυσίδες πολυπεπτιδίων μπορούν να συνδεθούν με άλλες παρόμοιες αλυσίδες, σχηματίζοντας συσσωματώματα προ-ινιδίων τα οποία είναι περισσότερο τοξικά στα κύτταρα παρά τα τελικά ινίδια. Επομένως, ο χαρακτηρισμός τέτοιων ενδιάμεσων θα ήταν σημαντικός για την αναζήτηση κατάλληλων φαρμακευτικών αγωγών ώστε να αποτραπεί η αναδίπλωση αυτή σε ασθενείς με προδιάθεση σε αμυλοειδείς ασθένειες όπως και τρόπων στόχευσης τέτοιων συσσωματωμάτων σε ασθενείς υπό θεραπεία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Πρωτεΐνες

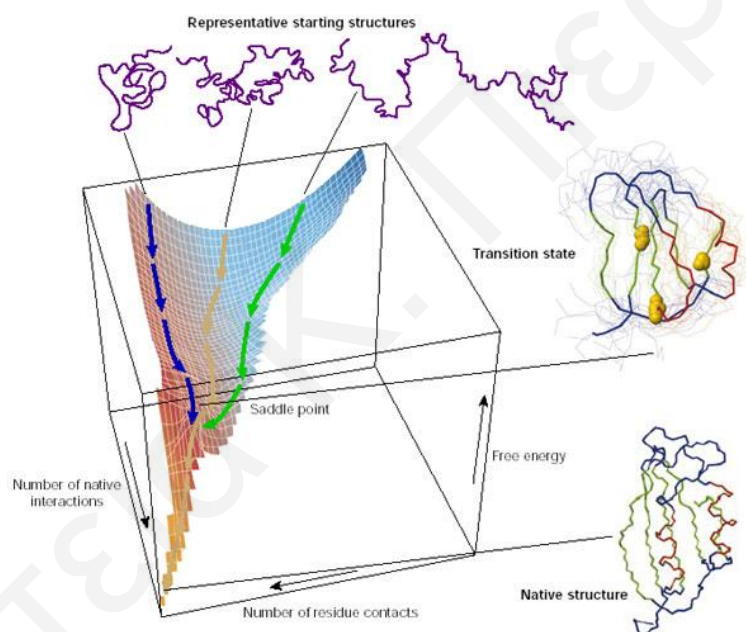
2.1.1 Θεμελιώδης Μηχανισμός Αναδίπλωσης Πρωτεϊνών

Η αυθόρμητη αναδίπλωση των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών οδηγεί στην υιοθέτηση μίας μοναδικής και εξαιρετικά οργανωμένης τρισδιάστατης δομής και αποτελεί ένα από τα πιο ενδιαφέροντα ερωτήματα στο ενεργό πεδίο της έρευνας. Η εις βάθος κατανόηση της διαδικασίας αναδίπλωσης των πρωτεϊνών είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση της λειτουργίας όλων των βιολογικών συστημάτων. Η τρισδιάστατη δομή που αναπτύσσουν οι πρωτεΐνες κατά τη διαδικασία της αναδίπλωσης είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την καλή λειτουργία τους.^{1,2}

Οι σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες διαθέτουν συμπαγείς δομές, των οποίων τα δομικά χαρακτηριστικά της επιφάνειας καθορίζουν τη λειτουργία τους. Γενικά, η διαμόρφωση μιας τέτοιας δομής κατευθύνεται από τη δυναμική των υδρόφοβων καταλοίπων να μειώσουν την επιφάνεια επαφής τους με το νερό. Συγκεκριμένα, η πολυπεπτιδική αλυσίδα αναδιπλώνεται αυθόρμητα, έτσι ώστε οι υδροφοβικές αλυσίδες να εισέρχονται στο εσωτερικό της τελικής δομής ενώ οι πολικές αλυσίδες να παραμένουν στην επιφάνεια επαφής.³

Η αυξημένη ερευνητική δραστηριότητα στο πεδίο της βιοφυσικής οδήγησε στην αποτελεσματική εφαρμογή νέων υπολογιστικών προσεγγίσεων προσομοίωσης της δομής των πρωτεϊνών, δεδομένης της προσβάσιμης σε ατομικό επίπεδο πληροφορίας περί της δομής των πρωτεϊνών. Σημαντική είναι επίσης η συνεισφορά της, καθώς έχει αποκαλύψει πως τα στοιχεία της δευτεροβάθμιας δομής των πρωτεϊνών σχηματίζονται σε πολύ μικρές χρονοκλίμακες. Για παράδειγμα, η α -έλικα σχηματίζεται σε λιγότερο από 100 ns, ενώ η β -στροφή σε 1 μ s. Πράγματι, η διαδικασία αναδίπλωσης ορισμένων μικρών πρωτεϊνών ολοκληρώνεται στο χρονικό διάστημα των 50 μ s.^{2,4} Στο Σχήμα 2.1 παρουσιάζεται το ενεργειακό τοπίο για τη διαδικασία της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης.¹ Μια σειρά από προσομοιώσεις της διαδικασίας αναδίπλωσης σε μικρές πρωτεΐνες (60-100 κατάλοιπα) οδήγησαν σε διασαφήνιση των βασικών σταδίων του θεμελιώδους μηχανισμού αναδίπλωσης.^{1,4} Η κρίσιμη περιοχή στην επιφάνεια αντιστοιχεί στη μεταβατική

κατάσταση, δηλαδή στο ενεργειακό χάσμα όπου όλα τα μόρια πρέπει να υπερπηδήσουν για να αναδιπλωθούν στη φυσική τους κατάσταση. Η διαδικασία αναδίπλωσης περιλαμβάνει αρχικά το σχηματισμό ενός αναδιπλωμένου πυρήνα που αποτελείται από ένα σχετικά μικρό αριθμό καταλοίπων (~15 καταλοίπων), και στη συνέχεια το υπόλοιπο της δομής συμπυκνώνεται πολύ γρήγορα. Μόλις καθοριστεί η σωστή τοπολογία της μεταβατικής κατάστασης, η φυσική δομή θα δημιουργηθεί κατά τη διάρκεια των τελικών σταδίων της διαδικασίας αναδίπλωσης. Οι κίτρινες σφαίρες αντιπροσωπεύουν τα τρία βασικά κατάλοιπα στη δομή, όπου όταν πάρουν τη σωστή τους θέση, η γενική τοπολογία της φυσικής μορφής καθιερώνεται. Η δομή της σταθερότερης κατάστασης παρουσιάζεται στο κατώτατο σημείο της επιφάνειας, ενώ στην κορυφή υποδεικνύονται κάποιες αρχικές ξετυλιγμένες δομές που αντιπροσωπεύουν την αφετηρία για την αναδίπλωση.^{1,4}



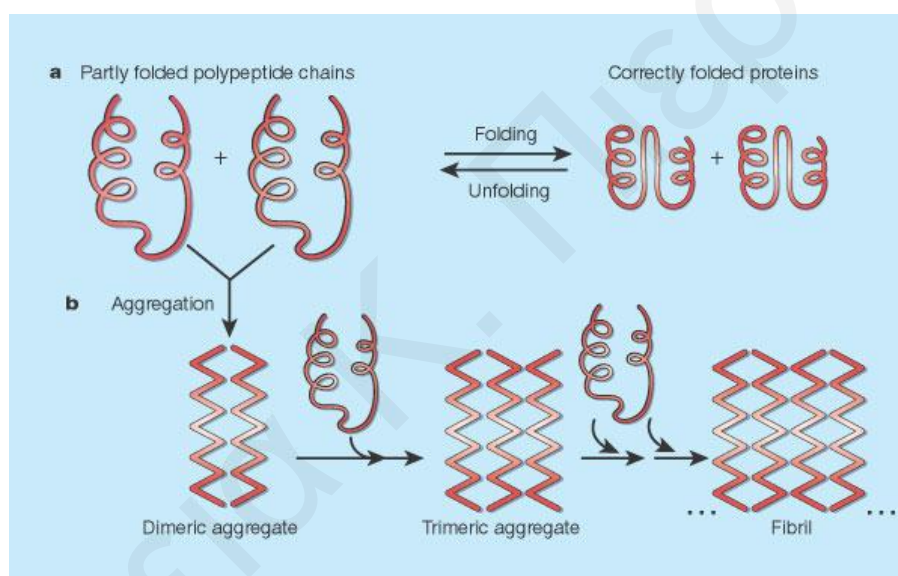
Σχήμα 2.1: Σχηματική απεικόνιση του ενεργειακού τοπίου για τη διαδικασία της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών.¹

Εντούτοις, η διαδικασία της αναδίπλωσης είναι ιδιαίτερα επιρρεπής σε λάθη τα οποία μπορούν να μετατρέψουν τις πρωτεΐνες και τα πεπτίδια από τις κανονικά διαλυμένες μορφές τους σε αδιάλυτα συσσωματώματα και τελικά στο σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων.⁵ Τα αμυλοειδή ινίδια συσσωρεύονται σε ποικίλα όργανα και ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού, καθιστώντας τα υπεύθυνα για την εκδήλωση θανατηφόρων ασθενειών όπως η Alzheimer's και Creutzfeldt-Jacob's.^{3,5} Επομένως, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη της πλήρους διεκρίνησης του μηχανισμού σχηματισμού ινιδίων που

είναι πρώτιστης σημασίας για την κατανόηση της προέλευσης, έναρξης, πρόληψης και/ή θεραπείας των αμυλοειδών ασθενειών.

2.1.2 Λανθασμένη Αναδίπλωση Πρωτεϊνών

Στο Σχήμα 2.2 παρουσιάζεται σχηματικά ο μηχανισμός της λανθασμένης αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Σε αυτό το μηχανισμό, τα αδιάλυτα συσσωματώματα προκύπτουν όταν ορισμένες ενδιάμεσες δομές που διαμορφώνονται κατά τη διάρκεια της αναδίπλωσης εκθέτουν τις υδρόφοβες περιοχές τους στην επιφάνεια, οι οποίες μπορούν να δεσμευτούν από άλλες παρόμοιες επιφάνειες άλλων γειτονικών αναδιπλωμένων μορίων, αντί να εισέλθουν στο εσωτερικό της τελικής τους δομής.^{3,6}



Σχήμα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού λανθασμένης πρωτεϊνικής αναδίπλωσης.³

Εκτός από την υδρόφοβη δυναμική των πεπτιδίων ή των καταλοίπων των πρωτεϊνών, οι πρωτεΐνες μπορούν να γίνουν επιρρεπείς στη συσσωμάτωση και λόγω άλλων παραγόντων όπως η θερμοκρασία, το pH, η συγκέντρωση, η ιοντική ισχύς και η παρουσία μεταουσιακών ουσιών (ουρία).^{2,5}

Η νόσος του Alzheimer, του Parkinson, οι ασθένειες «prion», η Familial Amyloid Polyneuropathy (FAP), οι σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες όπως η ασθένεια του Creutzfeldt-Jakob, ο διαβήτης τύπου II και πολλές άλλες εκφυλιστικές παθήσεις συνδέονται με την εμφάνιση τέτοιων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, που ονομάζονται αμυλοειδή ινίδια

(amyloid fibrils) ή πλάκες, τα οποία εναποτίθενται σε ποικίλα όργανα και ιστούς του οργανισμού (καρδία, εγκέφαλο, συκώτι) και προκαλούν παθολογικά προβλήματα.^{3,5}

2.2 Αμυλοειδή Ινίδια

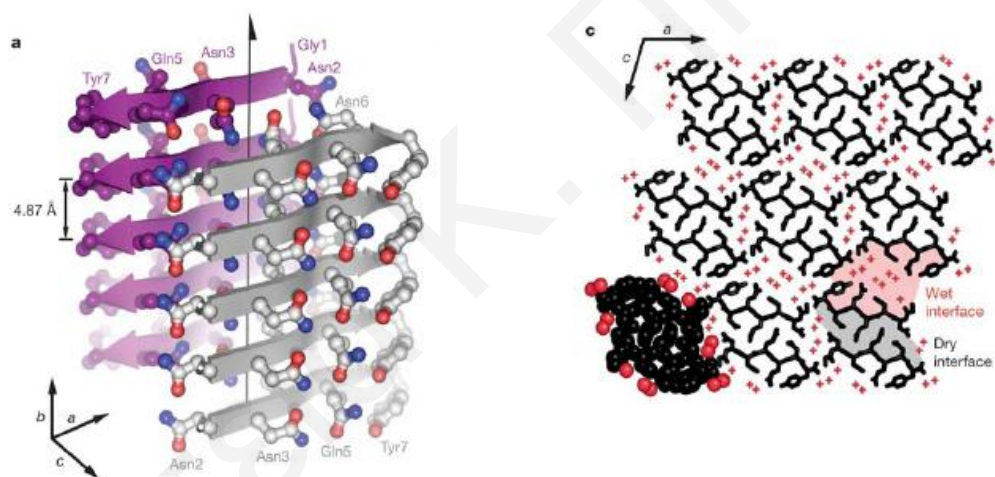
2.2.1 Δομή Αμυλοειδών Ινιδίων

Τα αμυλοειδή ινίδια είναι πολύ οργανωμένες ινώδεις δομές, που σχηματίζονται μέσω αυτοσυσσωμάτωσης πολυπεπτιδίων (Σχήμα 2.2).³ Περίπου τριάντα διαφορετικά πεπτίδια και πρωτεΐνες συσσωρεύονται σε αμυλοειδή ινίδια *in vivo* και συνδέονται με τις ανθρώπινες αμυλοειδείς ασθένειες.^{3,5,6}

Οι πρόδρομες πρωτεΐνες που σχηματίζουν τα αμυλοειδή ινίδια δεν έχουν συγκεκριμένο μέγεθος, ακολουθία αμινοξέων ή δευτεροταγή δομή. Εντούτοις, τα ινίδια που σχηματίζουν εμφανίζουν τα ίδια δομικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα.⁷ Συγκεκριμένα, από μελέτες της δομής των ινιδίων με ηλεκτρονιακή μικροσκοπία διέλευσης (TEM) βρέθηκε ότι παρουσιάζουν μη διακλαδωμένη μορφολογία, με διάμετρο 70 έως 120 Å, ανεξαρτήτως του μήκους τους.^{7,8} Η μορφολογία αυτή, το χαρακτηριστικό πράσινο του μήλου που δίνει η διαθλαστικότητα μετά από τη δέσμευσή τους με τη χρωστική ουσία ερυθρό του Congo και η μετατόπιση του φθορισμού μετά από τη δέσμευσή τους με θειοφλαβίνη T (Thioflavin T), μπορούν να προσδιορίσουν τη χαρακτηριστική β-σταυρωτή δομή (cross-β) των ινιδίων.^{8,9} Η δομή αυτή δίνει χαρακτηριστικό σχηματόγραμμα περίθλασης ακτίνων X με μια διάχυτη αντανάκλαση μεταξύ των 10-11 Å και μια οξεία αντανάκλαση στα 4.7 Å, οι οποίες αντιστοιχούν στα διαστήματα μεταξύ των β-πτυχωτών επιφανειών που τοποθετούνται παράλληλα ως προς τον άξονα της ίνας και των β-κλώνων που είναι διευθετημένοι κάθετα στον άξονα της ίνας, αντίστοιχα.^{8,10,11}

Ένας πυρήνας ινιδίου αποτελείται από τέσσερις β-πτυχωτές επιφάνειες, οι οποίες έχουν παράλληλο προσανατολισμό προς τον άξονα του ινιδίου. Οι β-κλώνοι που αποτελούν την κάθε επιφάνεια και που περιλαμβάνουν περίπου 10 κατάλοιπα ο κάθε ένας, κατευθύνονται κάθετα προς στον άξονα του ινιδίου. Κάθε β-κλώνος περιστρέφεται κατά 15° σε σχέση με τον αμέσως επόμενο β-κλώνο. Με την περιστροφή, επομένως, των 24 β-κλώνων δημιουργείται μια πλήρης ελικοειδής στροφή (360°) των β-επιφανειών γύρω από ένα κοινό άξονα, ο οποίος συμπίπτει με τον άξονα της ίνας. Το τμήμα του ινιδίου που περιέχει 24 β-κλώνους αποτελεί μια επαναλαμβανόμενη μονάδα μήκους 115 Å και πλάτος 20 Å.^{8,11}

Η κοινή αυτή δομή δε μελετήθηκε εκτενέστερα σε ατομικό επίπεδο κατά το παρελθόν, λόγω της δυσκολίας που παρουσιάζει η απομόνωση κρυσταλλικών ινιδίων που να μπορούν να μελετηθούν με την κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ.^{12,13} Πρόσφατα, οι Nelson *et al.* μελέτησαν τη δομή cross- β με την κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ, χρησιμοποιώντας μικροκρυστάλλους των ινιδίων που σχηματίστηκαν *in vitro* από ένα τμήμα επτά καταλοίπων της πρωτεΐνης Sup35.¹² Η ατομική δομή του πεπτιδίου αυτού αποκάλυψε ότι οι πολικές πλευρικές αλυσίδες από τα αντιπαράλληλα ζεύγη των β -κλώνων συνδέονται μέσω δεσμών υδρογόνου κατά μήκος των δύο β -πτυχωτών επιφανειών, αφήνοντας τα μόρια του νερού μακριά και σχηματίζοντας δύο χαρακτηριστικές διεπιφάνειες μεταξύ των παράλληλων β -επιφανειών (Σχήμα 2.3).^{12,13} Αυτή η συμπαγής διάταξη των β -επιφανειών ονομάστηκε από τους Eisenberg *et al.* ως “steric zipper”.¹² Η ίδια χαρακτηριστική δομή παρατηρήθηκε και σε άλλους μικροκρυστάλλους ινιδίων που σχηματίζονται από πεπτίδια και πρωτεΐνες, που συνδέονται με αμυλοειδείς ασθένειες.¹³

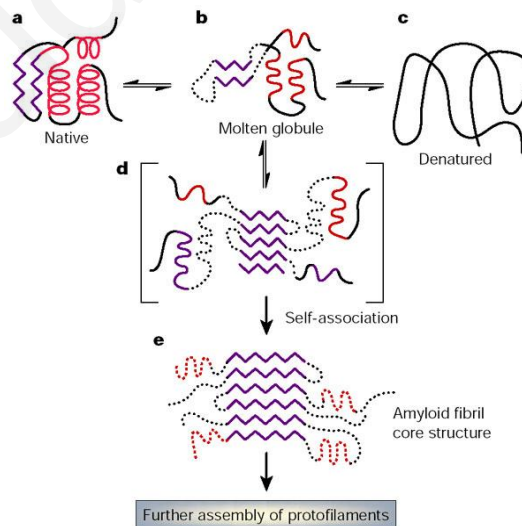


Σχήμα 2.3: “Steric zipper” δομή των αμυλοειδών ινιδίων, οι πολικές πλευρικές αλυσίδες από τα αντιπαράλληλα ζεύγη των β -κλώνων συνδέονται κατά μήκος των δύο β -πτυχωτών επιφανειών, αφήνοντας τα μόρια του νερού μακριά. Σχηματίζοντας δύο χαρακτηριστικές διεπιφάνειες μεταξύ των β -επιφανειών. Το κεντρικό βέλος υποδηλώνει τον άξονα των αμυλοειδών ινιδίων και τα μόρια με κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύουν τα μόρια νερού.¹²

Με βάση τη χαρακτηριστική δομή “steric zip”, μπορεί να εξηγηθεί η εξαιρετική ακαμψία και σταθερότητα που παρουσιάζουν τα αμυλοειδή ινίδια. Επομένως, η μελέτη των αμυλοειδών ινιδίων είναι απαραίτητη και για την αξιολόγησή τους ως πιθανά βιοϋλικά, τα οποία θα μπορούν να βρουν χρήση στο πεδίο της νανοτεχνολογίας και στην επιστήμη των υλικών.¹⁴ Η ακαμψία και σταθερότητα των ινιδίων βρίσκει εφαρμογές κυρίως στους κλάδους της κατάλυσης, της ηλεκτρονικής και στη χρήση τους ως πλαστικά για υποστηρικτικά στοιχεία.⁷

2.2.2 Πιθανός Μηχανισμός Σχηματισμού Αμυλοειδών Ινιδίων

Η διευκρίνιση του επακριβούς μηχανισμού σχηματισμού αμυλοειδών ινιδίων είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στη σύγχρονη βιολογία. Τα αμυλοειδή ινίδια αν και συνδέονται με ποικίλες ανθρώπινες εκφυλιστικές ασθένειες, εντούτοις ο μοριακός μηχανισμός σχηματισμού τους, δηλαδή ο επακριβής τρόπος με τον οποίο οι πρωτεΐνες μετατρέπονται από τη φυσική τους μορφή στην υψηλά οργανωμένη β -σταυρωτή δομή, βρίσκεται ακόμη υπό ενεργό μελέτη. Η διαδικασία μετατροπής των πρωτεϊνών σε ινίδια *in vitro* συνοδεύεται από σημαντικές αλλαγές στις μακροσκοπικές ιδιότητες τους, όπως η ζελατινώδης υφής και ο σχηματισμός αδιάλυτων άμορφων σωματιδίων.¹⁵⁻¹⁷ Οι αλλαγές αυτές που παρατηρούνται, περιορίζουν την εφαρμογή των κλασικών μεθόδων μελέτης βιολογικών συστημάτων, όπως η φασματοσκοπία NMR, οι ακτίνες X, ο κυκλικός διχροϊσμός (CD), για το χαρακτηρισμό των διαμορφωτικών αλλαγών που συμβαίνουν κατά τη διαδικασία της συσσωμάτωσης των πρωτεϊνών.^{15,16} Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι η φασματοσκοπία Raman, και ειδικότερα η φασματοσκοπία συντονισμού Raman επιτρέπει τον ποσοτικό χαρακτηρισμό της δομής που υιοθετούν οι πρωτεΐνες σε όλα τα στάδια της συσσωμάτωσης, προσφέροντας συμπληρωματικές πληροφορίες.¹⁸ Οι Lednev *et al.* χρησιμοποίησαν για πρώτη φορά τη φασματοσκοπία UVRR σε συνδυασμό με στατιστική ανάλυση των φασμάτων για την εκτενέστερη ποσοτική μελέτη και πρότειναν ένα πιθανό μηχανισμό σχηματισμού των αμυλοειδών ινιδίων της λυσοζύμης, ο οποίος μπορεί να αποτελέσει βάση κατανόησης του γενικότερου μηχανισμού σχηματισμού ινιδίων.¹⁸ Στο Σχήμα 2.4 περιγράφεται βήμα προς βήμα αυτός ο μηχανισμός σχηματισμού των ινιδίων.

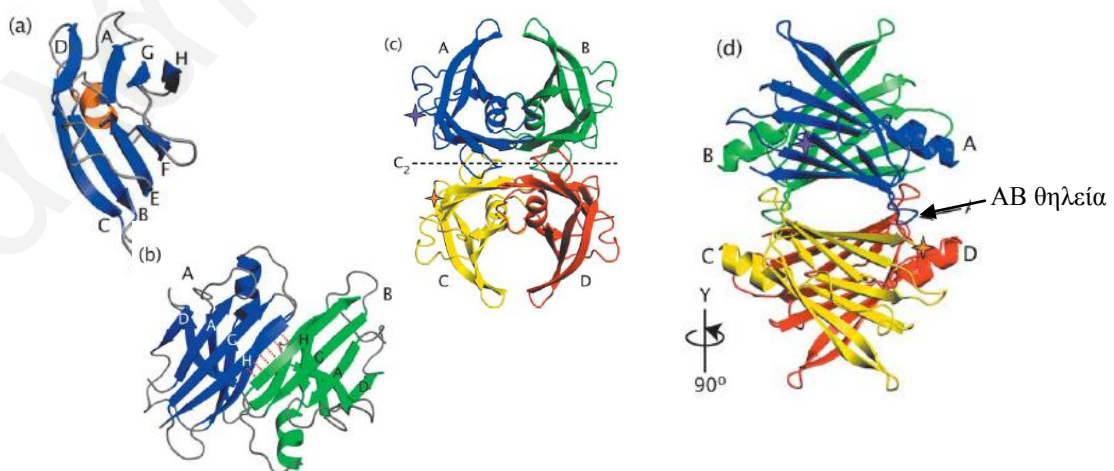


Σχήμα 2.4: Μηχανισμός σχηματισμού αμυλοειδών ινιδίων της λυσοζύμης (προσαρμοσμένος από τους Booth *et al.*). Με μωβ αντιπροσωπεύονται οι β -πτυχωτές επιφάνειες, με κόκκινο οι α -έλικες στη δομή και με διακεκομμένη γραμμή συμβολίζουν τα τμήματα της δομής με τυχαία διαμόρφωση.¹⁸

Μετά από παρατεταμένη επώαση, η λυσοζύμη αρχικά ξεδιπλώνεται λαμβάνοντας τυχαία διαμόρφωση. Στη συνέχεια, σχηματίζεται ένα μερικώς ξεδιπλωμένο ενδιάμεσο με δευτεροταγή δομή β -πτυχωτής επιφάνειας και τυχαίου σπειρώματος και ακολούθως αναδιοργανώνεται στη χαρακτηριστική β -σταυρωτή δομή των αμυλοειδών ινιδίων.¹⁸ Ο προτεινόμενος αυτός μηχανισμός έρχεται σε πλήρη συμφωνία με το μηχανισμό που είχαν προτείνει παλαιότερα ο Booth *et al.*^{17,19} Επομένως, κατά τη διαδικασία σχηματισμού αμυλοειδών ινιδίων πρώτο στάδιο αποτελεί ο σχηματισμός μιας ενδιάμεσης κατάστασης, που ανεξάρτητα από τη δομή της πρόδρομης πρωτεΐνης, εμφανίζει δομή β -πτυχωτής επιφάνειας με μερικά τμήματα της δομής να είναι σε τυχαία διαμόρφωση που ακολούθως συσσωματώνεται στη χαρακτηριστική β -σταυρωτή δομή των αμυλοειδών.

2.3 Πρωτεΐνη Transthyretin

Η ανθρώπινη αμυλοειδής πρωτεΐνη Transthyretin (TTR), γνωστή παλαιότερα ως prealbumin ή thyroxine binding prealbumin (TBPA), είναι μια συμπαγής σφαιρική πρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 55 kDa. Είναι ένα ομοτετραμερές (Σχήμα 2.5) και η κάθε υπομονάδα της αποτελείται από 127 αμινοξέα, με μια εκτεταμένη β -πτυχωτή διαμόρφωση, όπως αποκαλύφθηκε με την κρυσταλλογραφία ακτίνων X από τους Blake *et al.* το 1974.²⁰ Η δομή αυτή σχηματίζεται όταν οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες που είναι σχεδόν πλήρως εκτεταμένες, τοποθετούνται με τέτοιο τρόπο ώστε να σταθεροποιούνται από τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ NH και CO σε διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες.^{21,22} Η TTR παράγεται στο συκώτι και μεταφέρει τη θυροειδή πρωτεΐνη και τη βιταμίνη A (ρετινόλη) στους ιστούς, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη σωστή λειτουργία του μεταβολισμού στον οργανισμό.^{11,20}



Σχήμα 2.5: Δομή της πρωτεΐνης TTR, α) Φυσικό μονομερές της TTR, β) Ένωση δύο μονομερών A και B, οι κόκκινες γραμμές δηλώνουν τους δεσμούς υδρογόνου, γ)+δ) Ομοτετραμερές της TTR.²¹

Περισσότερες από εβδομήντα φυσικές μεταλλάξεις της πρωτεΐνης TTR έχουν καταγραφεί. Οι περισσότερες από τις οποίες έχουν παθογενή χαρακτήρα και σχετίζονται με ανθρώπινες αμυλοειδείς ασθένειες. Συγκεκριμένα, η συσσωμάτωση της πρωτεΐνης σε ινίδια συνδέεται με την εμφάνιση της θανατηφόρας ασθένειας Familial Amyloid Polyneuropathy (FAP), στην οποία τα ινίδια εναποτίθενται στα απομακρυσμένα νεύρα του εγκεφάλου. Η πιο συχνή μετάλλαξη που εντοπίζεται στην ασθένεια αυτή είναι η αντικατάσταση της μεθειονίνης από βαλίνη στη θέση 30 (TTRV30M), με μόνη θεραπεία μέχρις στιγμής τη μεταμόσχευση του ήπατος. Επιπλέον, η TTR εμπλέκεται και σε άλλες θανατηφόρες ασθένειες τις Senile Cardiac Amyloidosis (SCA) και Senile Systemic Amyloidosis (SSA), όπου η εναπόθεση των ινιδίων συμβαίνει στην καρδιά.^{11,20}

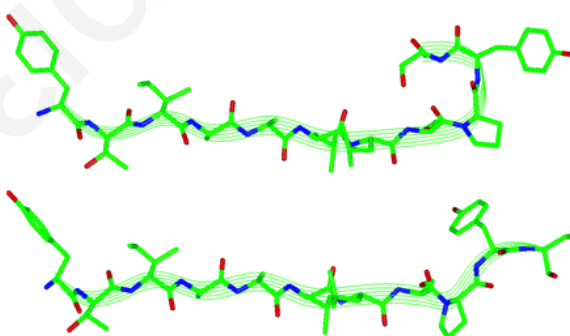
2.3.1 Αμυλοειδή Ινίδια της Πρωτεΐνης TTR

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στις μελέτες που αφορούν τα αμυλοειδή ινίδια της πρωτεΐνης TTR χρησιμοποιήθηκε είτε ολόκληρη η πρωτεΐνη, ή κάποια τμήματα από την ακολουθία της. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα πεπτίδια TTR(10-19) και TTR(105-115) με την αλληλουχία Cys-Pro-Leu-Met-Val-Lys-Val-Leu-Asp-Ala (CPLMVKVLDA) και Tyr-Thr-Ile-Ala-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-Tyr-Ser (YTIAALLSPYS), αντίστοιχα. Τα πεπτίδια αυτά αντιστοιχούν στους β-κλώνους A και G, της φυσικής μορφής της πρωτεΐνης.²³⁻²⁶ Έχει βρεθεί ότι μπορούν να συσσωματώνονται εύκολα σε αμυλοειδή ινίδια *in vitro* και να παρουσιάζουν τα ίδια δομικά γνωρίσματα όπως στην περίπτωση των ανιχνευμένων ινιδίων στα όργανα ασθενών που πάσχουν από την ασθένεια FAP.²⁴⁻²⁶

Μέχρις στιγμής, τα αμυλοειδή ινίδια της πρωτεΐνης TTR έχουν χαρακτηριστεί με διάφορες μεθόδους ως προς τη δευτεροταγή τους δομή, όπως με τη φασματοσκοπία κυκλικού διχροϊσμού (CD),^{27,28} φθορισμό,^{28,29} τη φασματοσκοπία ακτίνων X^{7,10} και τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).^{23,24} Η ιώδης μορφολογία τους χαρακτηρίστηκε με τη χρήση της ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας διέλευσης (TEM)^{24,28} ενώ μόνο δύο μελέτες χρησιμοποίησαν τη φασματοσκοπία FTIR για σύγκριση της δομής των ινιδίων σε σχέση με τη φυσική μορφή.^{30,31} Συγκεκριμένα, οι Zandomenighi *et al.* χρησιμοποίησαν την τεχνική FTIR για σύγκριση της δομής των ινιδίων της TTR σε σχέση με τη φυσική δομή της πρωτεΐνης μέσω των μεταπτώσεων του αμιδίου I',³⁰ ενώ οι Dirix *et al.* παρακολούθησαν την περιοχή αμιδίου I στο φάσμα IR του πεπτιδίου TTR(105-115) κατά τη διάρκεια σχηματισμού των ινιδίων, ούτως ώστε να αξιολογήσουν τις επιπτώσεις της υδροστατικής πίεσης στη σταθερότητα των ινιδίων.³¹ Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι

πλήρως ανεπτυγμένες ινώδεις δομές σε αντίθεση με τα πρωτοϊνίδια, είναι εξαιρετικά σταθερές ως προς την πίεση λόγω της συμπαγούς δομής που σχηματίζεται μέσω των δεσμών υδρογόνου.³¹ Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν το μεγάλο ενδιαφέρον που παρατηρείται στη χρήση των υψηλά οργανωμένων ινωδών δομών στο πεδίο της ναυτοτεχνολογίας και γενικά στην επιστήμη των υλικών.¹⁴ Επιπλέον, η ομάδα του Kelly έχει μελετήσει την πορεία της όξινης αποικοδόμησης της TTR με χρήση της φασματοσκοπίας CD. Οι τελευταίοι εισηγήθηκαν την παρουσία αμυλοειδογενών ενδιάμεσων ειδών στη διαδικασία σχηματισμού ινιδίων.^{32,33} Παρόλα αυτά, οι μελέτες αυτές δεν ασχολήθηκαν με τη δυναμική του σχηματισμού των αμυλοειδών ινιδίων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη NMR των Jaroniec *et al.* στην οποία έγινε σύγκριση της δομής του πεπτιδίου TTR(105-115) μέσα στη φυσική δομή της πρωτεΐνης σε σχέση με την ινώδη του δομή.²⁴ Ο υπολογισμός των διεδρων γωνιών φ και ψ έδειξε ότι η δομή του πεπτιδίου στη φυσική του κατάσταση, δηλαδή στη δομή της πρωτεΐνης, αλλάζει όταν συσσωματώνεται σε αμυλοειδή ινίδια. Συγκεκριμένα, η στροφή που σχηματίζεται από τα κατάλοιπα 112-114 (Ser-Pro-Tyr), με την προλίνη στη θέση 113 (Pro113) να βρίσκεται στην ελικοειδή περιοχή, δεν παρουσιάζεται στην ινώδη δομή.²⁴ Οι προτεινόμενες δομές για το τμήμα 105-115 της TTR και τα αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου TTR (105-115) παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.6.



Σχήμα 2.6: Δομές που λήφθηκαν με α) ακτίνες-X του τμήματος της πρωτεΐνης TTR 105-115 στη φυσική του κατάσταση και β) NMR των ινιδίων του πεπτιδίου TTR(105-115).²⁴

Δεδομένου ότι το πεπτίδιο TTR(105-115) σχηματίζει ινίδια *in vitro*, μπορεί να αποτελέσει ιδανικό πρότυπο για τη μελέτη σχηματισμού αμυλοειδών ινιδίων. Εντούτοις, καμία μελέτη ακτίνων X δεν ασχολήθηκε με τη δομή του “απομονωμένου” πεπτιδίου στο φυσικό του περιβάλλον, ενώ μόνο μια μελέτη πρότεινε μια πιθανή δομή του πεπτιδίου στο διάλυμα χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία NMR.³⁴ Συγκεκριμένα οι Jarvis *et al.* πρότειναν ότι

σε μια πιθανή δομή περιλαμβάνεται ο σχηματισμός στροφής ή έλικας, σε αντίθεση με την εκτεταμένη διαμόρφωση που παρουσιάζει το πεπτίδιο καθώς συσσωματώνεται στην ινώδη δομή.³⁴

2.4 Φασματοσκοπία Συντονισμού Raman

Το φαινόμενο στο οποίο παρατηρείται αύξηση στην ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας όταν η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου (ν_0) συμπέσει με την ενέργεια διέγερσης του συστήματος σε κάποια ανώτερη ηλεκτρονιακή κατάσταση ονομάζεται *φαινόμενο συντονισμού Raman*. Ο συντονισμός που προκαλείται έχει σαν αποτέλεσμα την επιλεκτική ενίσχυση μιας συγκεκριμένης χρωμοφόρας ομάδας του μορίου (ομάδα ατόμων που απορροφούν ακτινοβολία σε κάποια περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος) που σχετίζεται με τη συγκεκριμένη μετάπτωση. Στην περίπτωση αυτή, η ένταση των κορυφών Raman που οφείλονται στις χρωμοφόρες ομάδες ενισχύεται κατά ένα παράγοντα 10^3 και 10^5 .³⁵ Η επιλεκτική ενίσχυση ορισμένων δονήσεων που επιτυγχάνεται με τη χρήση της φασματοσκοπίας συντονισμού Raman (RR) είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ταυτοποίηση δονήσεων σε πολύπλοκα φάσματα καθώς επίσης για τον εντοπισμό των ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων στα φάσματα απορρόφησης. Η φασματοσκοπία RR τυγχάνει ευρείας εφαρμογής στη μελέτη βιολογικών συστημάτων. Γενικότερα, αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για την εξασφάλιση χρήσιμων πληροφοριών σχετικά με την πρωτεϊνική δομή και τη διαδικασία αναδίπλωσης.

Η κατανόηση της δομής, της δυναμικής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών απαιτεί τον προσδιορισμό της δευτεροταγούς τους δομής. Για τη διερεύνηση της δευτεροταγούς δομής και της διαδικασίας αναδίπλωσης των πρωτεϊνών, χρησιμοποιούνται κυρίως η περίθλαση ακτίνων-X, και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Η περίθλαση ακτίνων-X αναμφισβήτητα αποτελεί ένα πολύ καλό εργαλείο για μελέτες πρωτεϊνικής δομής στη στερεή κατάσταση. Εντούτοις η δομή που αναπτύσσουν οι πρωτεΐνες στο φυσικό τους περιβάλλον μπορεί να διαφέρει από τη δομή που διαθέτουν στη στερεή φάση. Η φασματοσκοπία NMR είναι κατάλληλη για τη μελέτη πρωτεϊνικών διαλυμάτων υψηλής συγκέντρωσης σε πρωτεΐνη εάν η δυναμική της διεργασίας αναδίπλωσής τους είναι της τάξης των msec. Αντίθετα, άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται επιτρέπουν τη μελέτη των πρωτεϊνών σε χαμηλές συγκεντρώσεις καθώς και την παρακολούθηση γρήγορων δυναμικών διεργασιών αναδίπλωσης. Σε αυτές τις φασματοσκοπικές τεχνικές περιλαμβάνονται η υπεριώδης (UV), η ορατή (VIS) και η

υπέρυθρη (IR) απορρόφηση, ο κυκλικός διχροϊσμός (CD), ο φθορισμός και η φασματοσκοπία Raman.³⁶⁻³⁸

Η φασματοσκοπία RR αποτελεί ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη της πρωτεϊνικής δομής στην υγρή φάση. Η ικανότητα της RR να εξετάζει επιλεκτικά τις δονήσεις μιας συγκεκριμένης χρωμοφόρας ομάδας απλοποιεί τη φασματική ανάλυση. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου σε σχέση με άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές περιλαμβάνονται επίσης η μικρή ποσότητα απαιτούμενου δείγματος και η φασματική ευαισθησία που παρουσιάζει στις περιβαλλοντικές αλλαγές (pH, θερμοκρασίας). Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας RR σε σχέση με τη φασματοσκοπία IR είναι η ελάχιστη παρεμπόδιση από το νερό καθιστώντας δυνατή τη λήψη φασμάτων από υδατικά διαλύματα.³⁵

2.4.1 Απόλυτες Διατομές Σκεδασμού

Η σχέση μεταξύ της δομικής εξέλιξης της διεγερμένης κατάστασης και της απόλυτης διατομής Raman παρουσιάστηκε από τους Lee και Heller, οι οποίοι έκαναν χρήση της χρονικά εξαρτώμενης θεωρίας διαταραχών. Με αυτή τους την προσέγγιση, η εξίσωση που συνδέει τη διατομή σκεδασμού Raman (σ_R) με τη δομική εξέλιξη της διεγερμένης κατάστασης δίνεται από την Εξίσωση 2.1.^{39,40}

$$\sigma_R(E_1) = \frac{8\pi E_s^3 E_1 e^4 M_{eg}^4}{9\hbar^6 c^4} \int_{-\infty}^{\infty} \partial E_{00} H(E_{00}) \left| \int_0^{\infty} \langle f | i(t) \rangle e^{i(E_1 + E_i)t/\hbar} D(t) dt \right|^2 \quad (2.1)$$

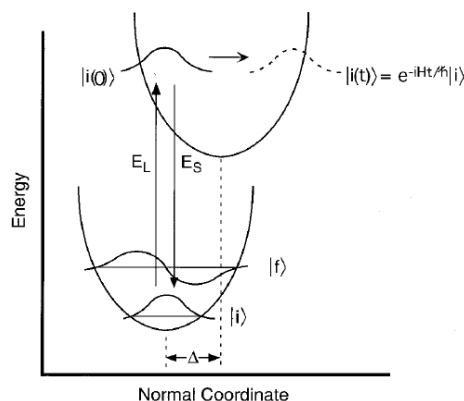
Στην πιο πάνω έκφραση, M_{eg} είναι η διπολική ροπή μετάπτωσης και E_1 και E_s είναι οι ενέργειες πρόσπτωσης και σκέδασης, αντίστοιχα. Επιπλέον E_i είναι η ενέργεια δόνησης και E_{00} είναι η διαφορά της ενέργειας μεταξύ της θεμελιώδους και της διεγερμένης κατάστασης. Η $H(E_{00})$ σχετίζεται με την ανομοιογενή διαπλάτυνση που αντιστοιχεί στην κατανομή Gauss των ενεργειών μετάπτωσης E_{00} μεταξύ των θεμελιωδών δονητικών επιπέδων στη βασική και διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση και που σχετίζεται με περιβαλλοντικές αλληλεπιδράσεις. Η ομοιογενής διαπλάτυνση που αντιστοιχεί στη διεγερμένη κατάσταση δίνεται από τη συνάρτηση $D(t)$ ($e^{-\Gamma^2 t^2/\hbar^2}$, όπου Γ είναι με το ομοιογενές γραμμικό πλάτος) στην περίπτωση της Λορεντζιανής κατανομής. Η ομοιογενής διαπλάτυνση μπορεί να περιγραφεί επίσης από κατανομή Gauss. Το ομοιογενές γραμμικό πλάτος περιλαμβάνει συνεισφορές από την αποδιέγερση πληθυσμού

της διεγερμένης κατάστασης που οφείλεται σε μοριακές συγκρούσεις ή στο μικρό χρόνο ημιζωής των διεγερμένων καταστάσεων, καθώς και της αλλαγής φάσης. Επομένως, η απόλυτη διατομή σκεδασμού Raman εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και από το χρόνο ημιζωής των διεγερμένων καταστάσεων. Η σημαντικότερη όμως έκφραση στη σχέση της διατομής σκεδασμού είναι το ολοκλήρωμα χρονικής συσχέτισης $\langle f|i(t)\rangle$, μία πολυδιάστατη συνάρτηση. Οι εντάσεις συντονισμού Raman εξαρτώνται από το ολοκλήρωμα επικάλυψης $\langle f|i(t)\rangle$ το οποίο αντιστοιχεί στην επικάλυψη των κυματοσυναρτήσεων της τελικής κατάστασης της διαδικασίας Raman και της αρχικής κατάστασης που εξελίσσεται υπό την επίδραση της Χαμιλτωνειανής της διεγερμένης κατάστασης. Μια απλούστερη προσέγγιση για την αξιολόγηση των πολυδιάστατων όρων Franck-Condon είναι να υποθέσουμε ότι η θεμελιώδης και βασική κατάσταση μιας δυναμικής επιφάνειας είναι πανομοιότυπες και η μόνη διαφορά τους είναι η θέση ισορροπίας τους. Οι συχνότητες δόνησης και οι κανονικές συντεταγμένες είναι πανομοιότυπες και στη βασική και στη διεγερμένη κατάσταση, και επομένως ένα σύστημα με N τρόπους δόνησης μπορεί να αναπαρασταθεί ως ένα άθροισμα από ανεξάρτητα ζεύγη αρμονικών ταλαντωτών, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.7. Κάθε βαθμός ελευθερίας περιγράφεται από ένα ζεύγος με συχνότητα ν και διαφορά ως προς τη θέση ισορροπίας Δ .³⁹

Επομένως οι επικαλύψεις Franck-Condon μπορούν να οριστούν ως απλοί μονοδιάστατοι όροι σύμφωνα με την Εξίσωση 2.2:

$$\langle f|i(t)\rangle = \langle f|i(t)\rangle \cdot \prod_{i=1}^N \langle i|i(t)\rangle \quad (2.2)$$

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.7, ο όρος αυτός δίνεται συναρτήσει του χρονικά εξαρτώμενου παράγοντα Franck-Condon, παράγοντας που γίνεται πεπερασμένος εξαιτίας της διαφοράς της γεωμετρίας μεταξύ της θεμελιώδους και διεγερμένης κατάστασης. Επομένως, η παρατήρηση των εντάσεων συντονισμού Raman αποτελεί ένδειξη της δομικής εξέλιξης της διεγερμένης κατάστασης.⁴⁰



Σχήμα 2.7: Σχηματική απεικόνιση της χρονικά εξαρτώμενης θεωρίας διαταραχών για το συντονισμό Raman.⁴⁰

Πειραματικά η διατομή σκεδασμού για κάθε δόνηση του εξεταζόμενου δείγματος σε σχέση με ένα εσωτερικό πρότυπο υπολογίζεται μέσω της Εξίσωσης 2.3:⁴¹

$$\frac{\sigma_x}{\sigma_{standard}} = \frac{I_x c_{standard} \left[\frac{(1+2\rho)}{(1+\rho)} \right]_x}{I_{standard} c_x \left[\frac{(1+2\rho)}{(1+\rho)} \right]_{standard}} \quad (2.3)$$

όπου σ_R η διατομή σκεδασμού Raman της δόνησης $\nu(x)$, ρ ο λόγος αποπόλωσης για τη συγκεκριμένη μετάπτωση, C είναι η συγκέντρωση του δείγματος και του εσωτερικού προτύπου, και $I_{\nu(x)}$ και I_i είναι οι πειραματικές εντάσεις της εξεταζόμενης κορυφής και του εσωτερικού προτύπου, αντίστοιχα.

2.4.2 Εσωτερικά Πρότυπα και Απόλυτες Εντάσεις Raman

Σημαντικές πληροφορίες σχετικά με το τοπικό περιβάλλον των πρωτεϊνικών αρωματικών καταλοίπων μπορούν να ληφθούν μέσω του υπολογισμού των διατομών σκεδασμού, οι οποίες σχετίζονται άμεσα με τις εντάσεις των κορυφών στα φάσματα Raman.^{38,42} Ο υπολογισμός των διατομών σκεδασμού συγκεκριμένων δονήσεων επιτυγχάνεται μέσω της σύγκρισης της έντασης των εξεταζόμενων κορυφών σε σχέση με την κορυφή ενός εσωτερικού προτύπου που περιέχεται στο υπό ανάλυση δείγμα.⁴³ Ο υπολογισμός μπορεί να μετατραπεί σε απόλυτη κλίμακα εφόσον η απόλυτη διατομή σκεδασμού της συγκεκριμένης κορυφής του εσωτερικού προτύπου είναι ήδη γνωστή.

Η επιλογή ενός κατάλληλου εσωτερικού προτύπου βασίζεται στην παρουσία τουλάχιστον μιας οξείας κορυφής στην περιοχή του φάσματος που εξετάζεται. Ένα ιδανικό εσωτερικό

πρότυπο πρέπει να βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, να μην παρουσιάζει οποιαδήποτε φασματική επικάλυψη ή φασματική αλληλεπίδραση προκαλώντας αλλαγή στη δομή των πρωτεϊνών ή στη δραστηρότητά τους. Επιπλέον, τα εσωτερικά πρότυπα δεν πρέπει να είναι φωτοχημικά ενεργά και να απορροφούν στο μήκος κύματος διέγερσης των φασμάτων Raman.^{41,43}

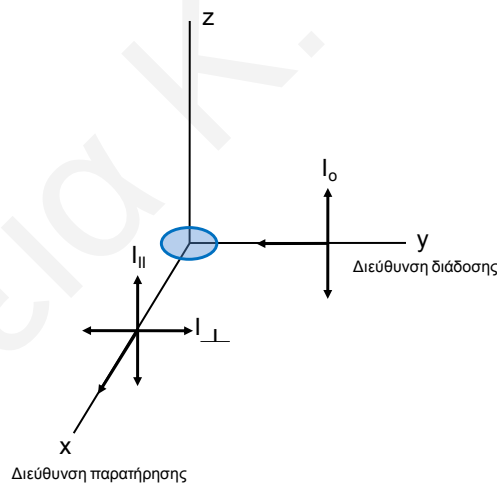
Τα εσωτερικά πρότυπα που χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στις βιολογικές μελέτες είναι συνήθως τα άλατα ClO_4^- , NO_3^- , SO_4^{2-} .^{38,42,44} Τα εσωτερικά πρότυπα αυτά εμφανίζουν κορυφές στα φάσματα Raman, οι οποίες είναι ήδη γνωστές από τη βιβλιογραφία και επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι παραμένουν αμετάβλητες ως προς τη συχνότητα ή έντασή τους σε οποιαδήποτε αλλαγή στις πειραματικές συνθήκες (θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση, ιοντική ισχύς).⁴¹ Οι απόλυτες διατομές σκεδασμού Raman για τα ClO_4^- και SO_4^{2-} έχουν προσδιοριστεί από αρκετές ερευνητικές ομάδες.^{41,45,46} Μερικές από αυτές τις μελέτες παρουσίασαν πειραματικές τιμές για τις διατομές σκεδασμού, ενώ άλλες προσδιόρισαν με θεωρητικές μελέτες τις διατομές σκεδασμού χρησιμοποιώντας προσομοίωση του όρου A (όρος συντονισμού) σε ήδη γνωστές τιμές.^{47,48} Επιπλέον, οι Song και Asher υπολόγισαν τις διατομές σκεδασμού εσωτερικών προτύπων σε μήκη κύματος από 218 μέχρι 514.5 nm και έδειξαν ότι τα cacodylic acid ($(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{H}$) και sodium selenate (SeO_4^{2-}) μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως εσωτερικά πρότυπα στην περιοχή του υπεριώδους, δεδομένου ότι παρουσιάζουν πέντε φορές μεγαλύτερη διατομή σκεδασμού σε σχέση με τα ClO_4^- , SO_4^{2-} που επίσης υπολογίστηκαν στην ίδια μελέτη.⁴¹ Επομένως τα $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2^-$ και SeO_4^{2-} μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εσωτερικά πρότυπα για τη μελέτη της πρωτεϊνικής δομής αφού η συγκέντρωσή τους στο διάλυμα μπορεί να κρατηθεί σε χαμηλά επίπεδα, επιδρώντας έτσι λιγότερο στην ιοντική ισχύ του πρωτεϊνικού διαλύματος.

Σε μερικές μελέτες βιολογικών συστημάτων έχει παρατηρηθεί ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό πρότυπο κανένα από τα συνήθη άλατα όπως ClO_4^- και SO_4^{2-} , αφού έχει παρατηρηθεί ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις των προτύπων αυτών προκαλούν αλλαγή στην ιοντική ισχύ του δείγματος και επιπλέον επιταχύνουν τη διαδικασία της συσσωμάτωσης του πρωτεϊνικού δείγματος. Επομένως, στις περιπτώσεις αυτές είναι αναγκαία η χρήση του ίδιου του διαλύτη ως εσωτερικό πρότυπο αν και εφόσον παρουσιάζει κορυφή στην περιοχή η οποία μελετάται. Σε υδατικά διαλύματα πρωτεϊνικών συστημάτων χρησιμοποιείται συχνά ως εσωτερικό πρότυπο η δόνηση τάσης OH ή κάμψης του νερού στα ~ 3400 και $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$, αντίστοιχα.⁴⁵

2.4.3 Λόγος Αποπόλωσης Raman

Μετά από την αλληλεπίδραση του φωτός με ένα σύστημα, η σκεδαζόμενη ακτινοβολία έχει πολλές φορές διαφοροποιημένες ιδιότητες πόλωσης από αυτές της προσπίπτουσας. Η συμπεριφορά του συστήματος σε μια καθορισμένη προσπίπτουσα ακτινοβολία εξαρτάται από τη συμμετρία του μορίου που σκεδαρίζει. Ένα μέγεθος που ποσοτικοποιεί τις αλλαγές στην πόλωση του φωτός είναι ο λόγος αποπόλωσης (*depolarization ratio*) ρ . Ο λόγος αποπόλωσης μιας κορυφής Raman παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τη συμμετρία της δόνησης που αντιστοιχεί στην κορυφή και η οποία είναι απαραίτητη στην απόδοση της κορυφής σε έναν από τους κανονικούς τρόπους δόνησης του μορίου.³⁵

Για τον ορισμό του λόγου αποπόλωσης πρέπει να οριστεί το επίπεδο πόλωσης (yz) ως το επίπεδο που καθορίζουν η διεύθυνση διάδοσης της προσπίπτουσας στο σύστημα ακτινοβολίας με τη διεύθυνση παρατήρησης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Στο Σχήμα 2.8 παρουσιάζεται ένα σύστημα καρτεσιανών συντεταγμένων που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των λόγων αποπόλωσης.



Σχήμα 2.8: Γεωμετρία σκέδασης (τα απλά βέλη παριστάνουν τη διεύθυνση διάδοσης και τα διπλά βέλη τη διεύθυνση πόλωσης του φωτός).³⁵

Αν η προσπίπτουσα ακτινοβολία είναι γραμμικά πολωμένη με διεύθυνση πόλωσης κάθετη στον άξονα y και στο επίπεδο yz τότε ο λόγος αποπόλωσης ρ ορίζεται ως το πηλίκο της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας συγκεκριμένου μήκους κύματος με πόλωση κάθετη στο επίπεδο yz προς την ένταση της ακτινοβολίας του ίδιου μήκους κύματος με πόλωση παράλληλη στο επίπεδο yz . Ο λόγος αποπόλωσης ρ δίνεται από την ακόλουθη Εξίσωση:

$$\rho_p = \frac{I_{\perp}(I_y)}{I_{\parallel}(I_z)} \quad (2.4)$$

Πειραματικά, ο λόγος αποπόλωσης μπορεί να μετρηθεί με την παρεμβολή ενός πολωτή φωτός μεταξύ δείγματος και laser. Τα φάσματα λαμβάνονται με τοποθέτηση του άξονα του πολωτή παράλληλα αρχικά ως προς το επίπεδο xz και στη συνέχεια ως προς το xy . Στη συνήθη σκέδαση Raman, όταν δηλαδή η συχνότητα διέγερσης του μορίου είναι μακριά από τη ζώνη απορρόφησης, ο τανυστής της πολωσιμότητας a είναι συμμετρικός (π.χ. $a_{xy}=a_{yx}$). Ο τανυστής a χαρακτηρίζεται από δύο ποσότητες, οι οποίες δεν μεταβάλλονται με τον προσανατολισμό του μορίου στο χώρο, τη μέση πολωσιμότητα g^o και τη ανισοτροπία g^s . Η πρώτη αποτελεί το ισοτροπικό μέρος του τανυστή, ενώ η δεύτερη αποτελεί μέτρο του βαθμού απόκλισης του ελλειψοειδούς πολωσιμότητας από μια σφαίρα:

$$g^o = \frac{1}{3}(a_{xx} + a_{yy} + a_{zz})^2$$

$$g^s = \frac{1}{3}[(a_{xx} - a_{yy})^2 + (a_{yy} - a_{zz})^2 + (a_{zz} - a_{xx})^2] + \frac{1}{2}[(a_{xy} + a_{yx})^2 + (a_{yz} + a_{zy})^2 + (a_{xz} + a_{zx})^2]$$

Η απεικόνιση του συνόλου των τυχαία προσανατολισμένων μορίων με ένα μέσο μόριο προσανατολισμένο σύμφωνα με τους κατάλληλα επιλεγμένους άξονες δίνει τη δυνατότητα ταυτοποίησης δύο τύπων προσανατολισμένης σκέδασης. Συγκεκριμένα, παρατηρείται η ισοτροπική σκέδαση η οποία προέρχεται από τα επαγόμενα δίπολα που είναι προσανατολισμένα στην ίδια κατεύθυνση με το άνυσμα του ηλεκτρικού πεδίου της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (I_{\perp}) και την ανισοτροπική σκέδαση που προέρχεται από τα επαγόμενα δίπολα που είναι προσανατολισμένα σε κάθετο επίπεδο από αυτό του ανύσματος του ηλεκτρικού πεδίου της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (I_{\parallel}). Ο λόγος αποπόλωσης ρ δίνεται από την Εξίσωση 2.5:

$$\rho_p = \frac{3g^s}{10g^o + 4g^s} \quad (2.5)$$

Για μια μη εντελώς συμμετρική δόνηση όπου το $g^o = 0$, ο λόγος αποπόλωσης παίρνει τη μέγιστη τιμή $\rho = 3/4$ και η αντίστοιχη κορυφή Raman χαρακτηρίζεται ως αποπολωμένη. Για τις περιπτώσεις εντελώς συμμετρικών κανονικών τρόπων δόνησης για τις οποίες $g^o \neq 0$, ο λόγος αποπόλωσης παίρνει τιμές στο διάστημα $0 \leq \rho < 3/4$ και οι δονήσεις χαρακτηρίζονται ως πολωμένες.^{35,49}

Όταν η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ν_0 συμπίπτει με αυτήν της ηλεκτρονιακής μετάπτωσης του μορίου από όπου προκύπτει ο συντονισμός Raman, ο τανυστής της πολωσιμότητας γίνεται ασύμμετρος (π.χ. $a_{xy} \neq a_{yx}$). Στην περίπτωση αυτή απαιτείται και ένας τρίτος όρος g^a για να εκφράσει την αντισυμμετρικότητα του τανυστή της πολωσιμότητας a :

$$g^a = \frac{1}{2} \left[(a_{xy} - a_{yx})^2 + (a_{xz} - a_{zx})^2 + (a_{yz} - a_{zy})^2 \right]$$

Στην περίπτωση αυτή ο λόγος αποπόλωσης εκφράζεται από την Εξίσωση 2.6:

$$\rho_p = \frac{3g^s + 5g^a}{10g^0 + 4g^s} \quad (2.6)$$

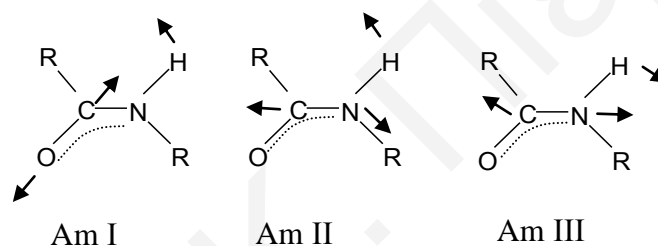
Κατά το φαινόμενο του συντονισμού Raman είναι δυνατό να διακριθούν δύο γενικές περιπτώσεις ενίσχυσης των εντάσεων των κορυφών Raman. Στην πρώτη περίπτωση όταν στο φαινόμενο συντονισμού εμπλέκεται μόνο μία ηλεκτρονιακή κατάσταση, η ενίσχυση αυτή της έντασης αφορά μόνο στις εντελώς συμμετρικές δονήσεις του μορίου. Ο λόγος αποπόλωσης των κορυφών αυτών προβλέπεται να έχει την τιμή $\rho = 1/3$. Στη δεύτερη περίπτωση όταν στο φαινόμενο συντονισμού εμπλέκονται δύο διεγερμένες ηλεκτρονιακές καταστάσεις, η ενίσχυση αυτής της έντασης αφορά όλες τις δονήσεις του μορίου. Ο λόγος αποπόλωσης των κορυφών αυτών προβλέπεται να έχει την τιμή $\rho = 1/8$. Πρέπει να σημειωθεί ότι από τον κανόνα επιλογής στα φάσματα συντονισμού Raman οι τρόποι δόνησης που κυρίως παρατηρούνται είναι οι εντελώς συμμετρικοί.^{35,49}

2.5 Εφαρμογές της Φασματοσκοπίας Συντονισμού Raman σε Βιολογικά Συστήματα

Η φασματοσκοπία συντονισμού Raman χρησιμοποιείται εκτεταμένα στη μελέτη βιολογικών συστημάτων. Με τη φασματοσκοπία συντονισμού μπορούν να μελετηθούν συγκεκριμένες περιοχές των μακρομορίων με εκλεκτική διέγερση των ηλεκτρονίων των χρωμοφόρων ομάδων που ανήκουν στις περιοχές αυτές. Συγκεκριμένα, μπορούν να διερευνηθούν τοπικές δομικές αλλαγές που οφείλονται στις ομάδες αμιδίου, αρωματικές πλευρικές αλυσίδες, και πρωτεϊνικά συνένζυμα, με διέγερση στο υπεριώδες.^{18,36-38,50-57} Η φασματοσκοπία συντονισμού Raman επιτρέπει τη μελέτη του τοπικού περιβάλλοντος των αρωματικών καταλοίπων των πρωτεϊνών/πεπτιδίων, αφού η διατομή σκεδασμού των αμινοξέων αυτών δίνει άμεσες πληροφορίες σε σχέση με την έκθεσή τους στο διαλύτη.^{36,38,42}

2.5.1 Μελέτη Δευτεροταγούς Δομής των Πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνικών συστημάτων επιτυγχάνεται με διέγερση στη βαθιά υπεριώδη περιοχή, δηλαδή γύρω στα ~200 nm, ενισχύοντας συντονιστικά το σκεδασμό Raman από το χρωμοφόρο αμίδιο (η κορυφή απορρόφησης $\pi \rightarrow \pi^*$ βρίσκεται στα 195 nm), ο οποίος είναι ευαίσθητος στις διεδρες γωνίες φ και ψ , δίνοντας άμεσες ποσοτικές πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών. Η παρατήρηση των συχνοτήτων των χαρακτηριστικών κορυφών Am I, II, ή III και C_{α} -H στο φάσμα Raman παρέχει ενδείξεις σχετικά με το είδος της δευτεροταγούς δομής μιας πρωτεΐνης (α -έλικα, β -πτυχωτή επιφάνεια, β -στροφή, τυχαίο σπείρωμα).^{18,36,53,58-61} Στο Σχήμα 2.9 παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικοί τρόποι δόνησης του αμιδίου που μπορούν να παρατηρηθούν στα φάσματα Raman.⁶²



Σχήμα 2.9: Τρόποι δόνησης του πεπτιδικού δεσμού.⁶²

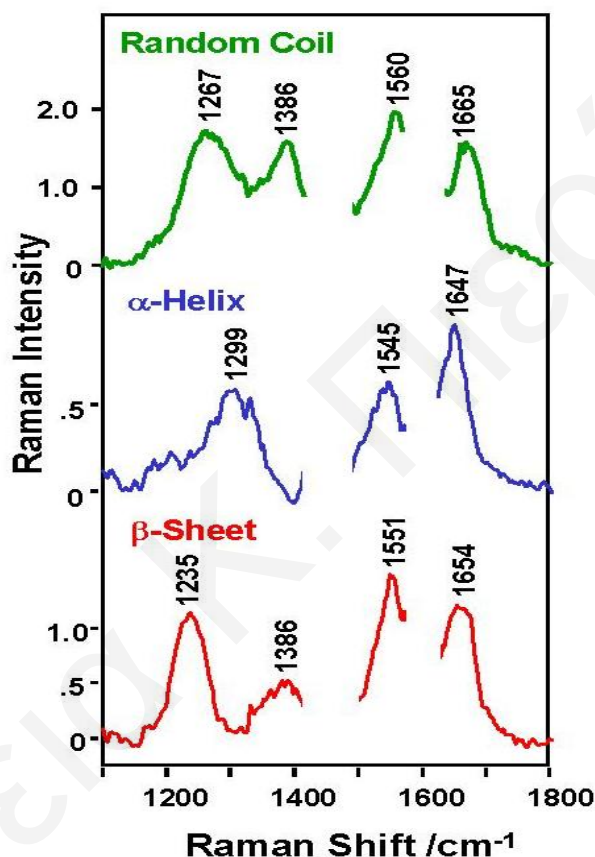
Η δόνηση του Am I προκύπτει κυρίως από τη δόνηση τάσης του $C=O$ με μικρότερη συνεισφορά από τη δόνηση τάσης του δεσμού $C-N$ και τη δόνηση κάμψης του δεσμού $N-H$. Η αμιδική ζώνη II εμφανίζεται πολύ ασθενής στα φάσματα Raman και οφείλεται στην εντός φάσης τάση του δεσμού $N-H$ και στην κάμψη του δεσμού $C-N$, ενώ το Am III οφείλεται στην εκτός φάσης τάση του δεσμού $N-H$ και στην κάμψη του δεσμού $C-N$.^{53,61,62}

2.5.1.1 Ποσοτικός Προσδιορισμός της Δευτεροταγούς Δομής των Πρωτεϊνών

Η πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει την ανάλυση των φασμάτων συντονισμού Raman μιας πρωτεΐνης οφείλεται στην ταυτόχρονη συνεισφορά των διαφορετικών δευτεροταγών δομικών στοιχείων. Η συνεισφορά αυτή παρεμποδίζει τη λήψη ξεκάθαρης εικόνας για τη δευτεροταγή δομή μιας πρωτεΐνης, η οποία απαιτεί περισσότερες ποσοτικές πληροφορίες.

Μια μέθοδος που μπορεί να προσφέρει ποσοτικές πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών προτάθηκε από τους Chi *et al.*³⁶ Συγκεκριμένα, η σύνθεση της δευτεροταγούς δομής μιας πρωτεΐνης μπορεί να καθοριστεί μετά από προσαρμογή ενός

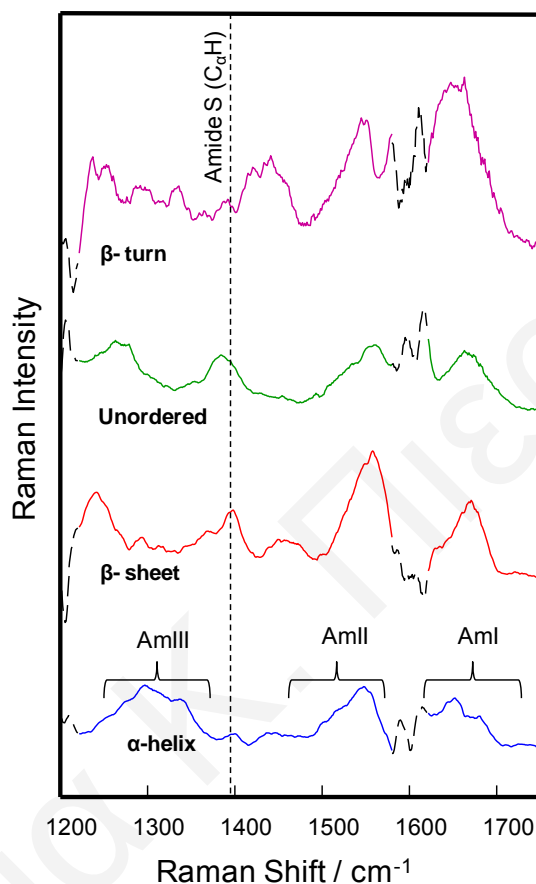
γραμμικού συνδυασμού πρότυπων φασμάτων που αντιστοιχούν στα “καθαρά” δευτεροταγή δομικά στοιχεία στο φάσμα Raman της πρωτεΐνης, με χρήση της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων. Τα πρότυπα φάσματα Raman για τις δευτεροταγείς δομές (*pure secondary structure Raman spectra (PSSRS)*) (Σχήμα 2.10) β-πτυχώσης, α-έλικας και τυχαίου σπειρώματος, έχουν εξαχθεί από φάσματα UVR (στα 206 nm) 13 πρωτεϊνών των οποίων η δευτεροταγής δομή έχει χαρακτηριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X.



Σχήμα 2.10: “Καθαρά” φάσματα Raman (PSSRS) για τα δευτεροταγή στοιχεία β-πτυχωτή, α-έλικα, τυχαίο σπείρωμα, τα οποία υπολογίστηκαν από φάσματα UVR (206 nm) υδατικών διαλυμάτων πρωτεϊνών. Οι περιοχές γύρω στους 1610 και 1450 cm^{-1} εξαιρούνται λόγω παρεμβολών από τις δονήσεις των αρωματικών καταλοίπων.³⁶

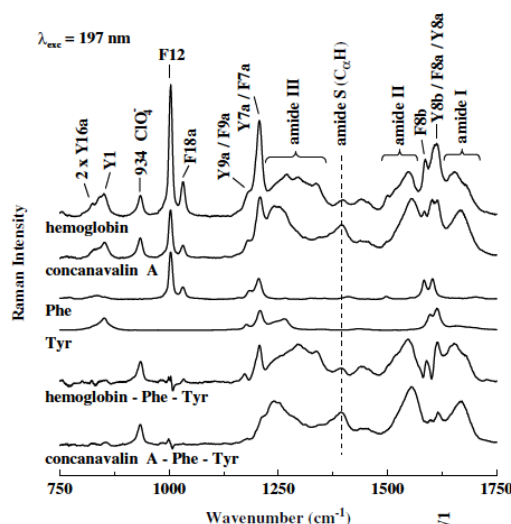
Ο προσδιορισμός των φασμάτων PSSRS έχει καταστεί δυνατός μετά την αφαίρεση της συνεισφοράς των πλευρικών αλυσίδων των αρωματικών καταλοίπων, οι οποίες εμφανίζουν ισχυρή απορρόφηση σε αυτό το μήκος διέγερσης. Αργότερα, οι Huang *et al.*⁵³ αναπτύσσοντας την ίδια μεθοδολογία και χρησιμοποιώντας ένα διαφορετικό σύνολο 12 πρωτεϊνών, προσδιόρισαν τα φάσματα PSSRS για τη β-πτυχωτή, την α-έλικα, το τυχαίο σπείρωμα καθώς και για τη β-στροφή (Σχήμα 2.11). Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν μετά από διέγερση στα 197 nm όπου παρατηρείται σημαντική αύξηση της έντασης των

κορυφών αμιδίου λόγω αύξησης της διατομής σκεδασμού τους, δεδομένου ότι η διέγερση πλησιάζει την ενέργεια μετάπτωσης του αμιδίου $\pi \rightarrow \pi^*$. Ωστόσο, με τη διέγερση στα 197 nm παρατηρείται περαιτέρω αύξηση της συνεισφοράς από τα αρωματικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών.



Σχήμα 2.11: “Καθαρά” φάσματα Raman (PSSRS) για τα δευτεροταγή στοιχεία β -πτυχωτής, α -έλικας, τυχαίου σπειρώματος και β -στροφής, τα οποία υπολογίστηκαν από φάσματα UVRR (197 nm) υδατικών διαλυμάτων πρωτεϊνών. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στις συνεισφορές από τα αρωματικά κατάλοιπα.⁵³

Επομένως, για την ελαχιστοποίηση της ισχυρής συνεισφοράς των αρωματικών καταλοίπων έγινε αφαίρεση των φασμάτων UVRR των υδατικών διαλυμάτων των αντίστοιχων ελεύθερων αμινοξέων (τυροσίνη (Y), φαινυλαλανίνη (F), τρυπτοφάνη (W)) από τα αρχικά φάσματα των πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας χαρακτηριστικές δονήσεις των αμινοξέων για την κανονικοποίηση των φασμάτων ((F12 (1003 cm^{-1}), Y1 (853 cm^{-1}), W18 (757 cm^{-1})). Στο Σχήμα 2.12 παρουσιάζονται ενδεικτικά φάσματα μετά από διέγερση στα 197 nm, καθώς και η διαδικασία αφαίρεσής τους.⁵³



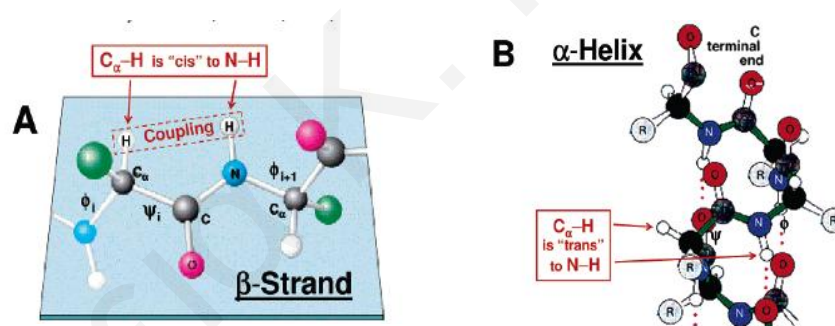
Σχήμα 2.12: Φάσματα UVRR πρωτεϊνών, μετά από διέγερση στα 197 nm, και η διαδικασία αφαίρεσης της συνεισφοράς των αρωματικών πλευρικών αλυσίδων, χρησιμοποιώντας τα φάσματα υδατικών διαλυμάτων Phe, Tyr και Trp. Για την κανονικοποίηση των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν δονήσεις των αρωματικών καταλοίπων (η F13 στα 1003 cm^{-1} , η Y1 στα 853 cm^{-1} και η W18 στα 757 cm^{-1}).⁵³

Είναι γενικά αποδεκτό ότι κατά τις αναλύσεις ποσοτικοποίησης της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών μεγάλο εμπόδιο αποτελεί η πολύ ισχυρή ενίσχυση των αρωματικών καταλοίπων. Ως εκ τούτου, η διαδικασία αφαίρεσης της συνεισφοράς των αρωματικών καταλοίπων δεν είναι τελείως αποτελεσματική γιατί ο βαθμός ενίσχυσής τους εξαρτάται ισχυρά από το τοπικό περιβάλλον των πλευρικών αλυσίδων τους μέσα στη δομή της αναδιπλωμένης πρωτεΐνης. Τα αρωματικά κατάλοιπα που βρίσκονται πλήρως εκτεθειμένα στο διαλύτη εμφανίζουν μικρότερη ενίσχυση από τα κατάλοιπα που είναι “θαμμένα” στην πρωτεϊνική δομή.⁵³ Εντούτοις, η μη αποτελεσματική διαδικασία αφαίρεσης απλοποιεί σε κάποιο βαθμό την επεξεργασία των κορυφών αμιδίου για τον προσδιορισμό της δευτεροταγούς δομής ενός πρωτεϊνικού συστήματος. Στο Πίνακα 2.1 παρουσιάζονται οι συχνότητες των χαρακτηριστικών δονήσεων των διαφόρων δευτεροταγών δομικών στοιχείων, που λήφθηκαν μετά από αποσυνέλιξη των φασμάτων PSSRS (Σχήμα 2.11) .

Πίνακας 2.1: Συχνότητες (cm^{-1}) των κορυφών αμιδίου, για τα δευτεροταγή είδη.^{53,63}

Vibrational modes	α -Helix (cm^{-1})	β -Sheet (cm^{-1})	β -Turn (cm^{-1})	Unordered (cm^{-1})	Fibril core β -sheet (cm^{-1})
Amide III₁	1254	1241	1244	1240-1260	1220-1230
Amide III₂	1290-1310	1300	1297	1279	
Amide S (Cα-H)		1399	1374	1380-1390	1395-1405
Amide II	1545-1555	1537	1542	1548-1561	1550-1563
Amide I	1645-1655	1630	1652	1660-1670	1673-1675

Από τον Πίνακα 2.1 φαίνεται ότι όλες οι δευτεροταγείς δομές, εκτός της α -έλικας, εμφανίζουν ισχυρή κορυφή στην περιοχή $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$, κορυφή η οποία αντιστοιχεί στο αμιδίο S (για *structure-sensitive*).⁵³ Η κορυφή αυτή μετά από ισοτοπική ανταλλαγή $C_a-H(D)$ δεν παρατηρείται στα φάσματα Raman, δηλώνοντας έτσι τη συσχέτισή της με τη δόνηση κάμψης C_a-H . Η ενίσχυση του αμιδίου S έχει βρεθεί ότι σχετίζεται άμεσα με την αλληλεπίδραση του C_a-H και του Am III. Η αλληλεπίδραση αυτή επαληθεύεται από τη μετατόπιση της κορυφής Am III από τους ~ 1335 στους $\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ μετά από ισοτοπική ανταλλαγή H/D. Οι δονήσεις αυτές είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στις δομικές αλλαγές και χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών. Η απουσία του αμιδίου S στη δομή της α -έλικας οφείλεται στο γεγονός ότι δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ των υδρογόνων των δεσμών C_a-H και N-H επειδή βρίσκονται σε *trans* θέση ($\psi \sim 60^\circ$), (Σχήμα 2.13). Αντίθετα, στη δομή β -πτυχωτής και τυχαίου σπειρώματος παρατηρείται ισχυρή σύζευξη των υδρογόνων αφού οι δεσμοί βρίσκονται σε *cis* θέση ($\psi \sim 120^\circ$) και επομένως στα φάσματα Raman γίνεται δυνατή η παρατήρηση της κορυφής του αμιδίου S .^{58,64}



Σχήμα 2.13: Μοντέλο πολυπεπτιδικής αλυσίδας A) β -κλώνου και B) α -έλικας. Η απόσταση μεταξύ των υδρογόνων C_a-H και N-H εξαρτάται από τη διεδρη γωνία ψ .⁶⁴

Το σχήμα (Σχήμα 2.12) και η συχνότητα της κορυφής του AmI της α -έλικας, της β -πτυχωτής και του τυχαίου σπειρώματος (Πίνακας 2.1) είναι διαφορετική και επομένως η κορυφή αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση αυτών των δευτεροταγών δομικών στοιχείων. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες με τυχαία διαμόρφωση δίνουν μια Γκαουσιανή κορυφή του Am I, ενώ οι πρωτεΐνες με δομή β -πτυχωτής παράγουν πιο οξεία Λορεντζιανή κορυφή.^{37,65} Οι κορυφές του Am II παρουσιάζουν ισχυρή ενίσχυση στις περιπτώσεις του τυχαίου σπειρώματος και της β -πτυχωτής.⁶⁶ Η συχνότητα του Am II φαίνεται να μην επηρεάζεται αρκετά από τις αλλαγές στη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών και επηρεάζεται μόνο στους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζει η ομάδα -N-H της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.⁶⁷

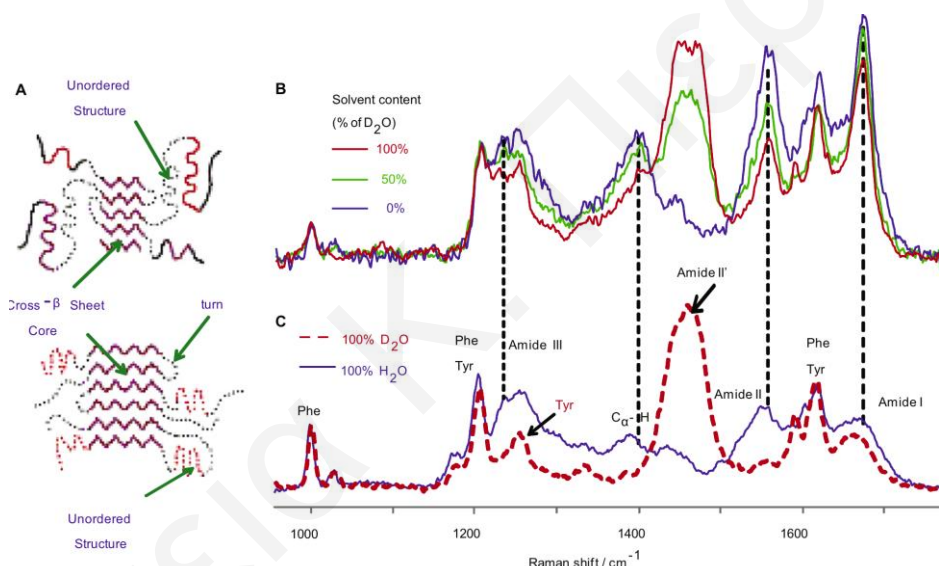
Σημαντική είναι η ανάπτυξη στατιστικών μεθόδων οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ποσοτική ανάλυση των φασμάτων UVRR των πρωτεϊνών. Σκοπός των μεθόδων αυτών είναι η εξαγωγή των κυρίαρχων δομικών συστατικών που συνθέτουν ένα φάσμα Raman μιας πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, οι κλασσικές στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι οι *principal component (PCA) analysis* και *multivariate curve resolution (MCR)*.⁶⁸ Μια νέα προσέγγιση δόθηκε από τον Lednev και τους συνεργάτες του, οι οποίοι έδειξαν ότι με τη χρήση της μεθόδου *independent component (ICA) analysis* μπορεί υπάρξει καλύτερη επίλυση των επιμέρους δευτεροταγών δομικών συστατικών.^{15,18,68} Το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου ICA έναντι των κλασσικών μεθόδων ανάλυσης είναι ότι η ICA επιτρέπει την εξαγωγή ανεξάρτητων φασμάτων που αντιστοιχούν στα δομικά στοιχεία που συνθέτουν τη δομή μιας πρωτεΐνης καθώς και την αναλογία τους, χωρίς να είναι απαραίτητη προϋπόθεση η εκ των προτέρων γνώση της δομικής σύστασης του πρωτεϊνικού συστήματος.⁶⁸

Οι Shashilov *et al.* χρησιμοποίησαν τη μέθοδο ICA προκειμένου να επιλύσουν τα φάσματα DUVRR της λυσοζύμης, τα οποία λήφθηκαν σε διάφορους χρόνους επώασης κατά τη διαδικασία αλλοίωσης και συσσωμάτωσης της πρωτεΐνης, ώστε να μελετηθεί το πρώτο στάδιο του μηχανισμού σχηματισμού αμυλοειδών ινιδίων. Η εφαρμογή της προηγμένης στατιστικής ανάλυσης ICA έδωσε τη δυνατότητα του εντοπισμού του μερικώς ξεδιπλωμένου ενδιάμεσου που σχηματίζεται κατά τη διαδικασία της ινιδοποίησης και του προσδιορισμού του ρυθμού που αντιστοιχεί στη διαδικασία συσσωμάτωσης. Επιπλέον, η ανάλυση αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα αρχικά στάδια της ινιδοποίησης της λυσοζύμης είναι μια μη αναστρέψιμη διεργασία και ο σχηματισμός του πυρήνα που θα οδηγήσει τελικά στο σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων είναι μια διαμοριακή διεργασία.^{18,63} Επομένως, με τη χρήση της μεθόδου ICA λήφθηκαν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό σχηματισμού αμυλοειδών ινιδίων, όπως αναφέρεται και προηγουμένως στο τμήμα του Κεφαλαίου 2.2.2.

2.5.1.2 Χρήση Ισοτοπικής Ανταλλαγής Υδρογόνου/Δευτερίου (H/D) στη Φασματοσκοπία Συντονισμού Raman

Η ισοτοπική ανταλλαγή (H/D) στη φασματοσκοπία συντονισμού Raman αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για το χαρακτηρισμό της πρωτεϊνικής δομής. Με χρήση της ισοτοπικής ανταλλαγής H/D μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ των δονήσεων των αμιδίων και των αρωματικών καταλοίπων οι οποίες ενισχύονται επιλεκτικά μετά από διέγερση στη βαθιά υπεριώδη περιοχή.^{37,53,69} Οι Copeland και Spiro έδειξαν ότι καθώς το πρωτόνιο του

δεσμού N-H ανταλλάσσεται με δευτέριο, τα Am II και Am III μετατοπίζονται στους ~ 1450 (Am II') και ~ 1005 cm^{-1} (Am III'), αντίστοιχα, λόγω της αποσύζευξης της δόνησης τάσης του δεσμού C-N και της δόνησης κάμψης του δεσμού N-H, με το Am II' να χαρακτηρίζεται μόνο από τη δόνηση τάσης του δεσμού C-N.^{69,70} Στο Σχήμα 2.14 C παρουσιάζεται το φάσμα UVRR της λυσοζύμης σε H_2O και D_2O .⁶³ Στο φάσμα κυριαρχούν οι δονήσεις των Am I, Am II, Am III, της κάμψης $\text{C}_\alpha\text{-H}$ και της συνεισφοράς από τα αρωματικά κατάλοιπα τυροσίνης και φαινυλαλανίνης. Μετά την ισοτοπική ανταλλαγή H/D η κορυφή του Am III δεν παρουσιάζεται στο φάσμα, ενώ αντίθετα η κορυφή που οφείλεται στο Am II ενισχύεται σε χαμηλότερη συχνότητα. Επιπλέον, η ισοτοπική ανταλλαγή ελαχιστοποιεί την επικάλυψη μεταξύ της δόνησης του Am III και της δόνησης της Tyr, Y_{7a} , που εμφανίζεται περίπου στην ίδια συχνότητα (~ 1260 cm^{-1}).^{37,63}



Σχήμα 2.14: (A) Σχηματική απεικόνιση αναπτυσσόμενων αμυλοειδών ινιδίων. Με μωβ γραμμές απεικονίζονται οι β -κλώνοι. (B) Φάσματα UVRR των ινιδίων της λυσοζύμης σε H_2O (μπλε), D_2O (κόκκινο) και 50/50% $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ μείγμα (πράσινο). (C) Φάσμα UVRR της λυσοζύμης σε H_2O (μπλε), D_2O (κόκκινο).⁶³

Πρόσφατα, η ισοτοπική ανταλλαγή H/D σε συνδυασμό με τη φασματοσκοπία UVRR, χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη των αμυλοειδών ινιδίων και ειδικότερα των ενδιάμεσων ειδών που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ινιδοποίησης.^{37,63} Τα ενδιάμεσα είδη είναι πολύ οργανωμένες β -πτυχωτές επιφάνειες που περιβάλλονται από τμήματα με τυχαία διαμόρφωση με προσβάσιμη επιφάνεια στο διαλύτη (Σχήμα 2.14 A). Επομένως, κατά την ισοτοπική ανταλλαγή, το υδρογόνο των αμιδικών δεσμών N-H των τμημάτων αυτών μπορεί να ανταλλάσσεται γρήγορα, ενώ ο πυρήνας του ινιδίου (*cross-β core*) που βρίσκεται σε υδρόφοβο περιβάλλον να παραμένει πλήρως πρωτονιωμένος. Στο Σχήμα

2.14 Β παρουσιάζονται τα φάσματα UVRR των προϊνιδίων της λυσοζύμης σε υδατικό διάλυμα σε D₂O και σε διάλυμα 50/50% H₂O/D₂O, αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτονιωμένα αμίδια και στη δομή β-πτυχωτής παραμένουν αμετάβλητες με την ισοτοπική ανταλλαγή, ενώ αντίθετα οι κορυφές των τμημάτων των προϊνιδίων, με δομή τυχαίας διαμόρφωσης και β-στροφής, μετατοπίζονται.⁶³ Επομένως, με τη χρήση της μεθόδου H/D-UVRR μπορούν να ανιχνευτούν τα ενδιάμεσα είδη της διαδικασίας συσσωμάτωσης πρωτεϊνών, τα οποία έχει βρεθεί ότι είναι περισσότερο τοξικά από τις πλήρως αναπτυγμένες ινώδεις δομές.^{71,72}

2.5.2 Μελέτη Τεταρτοταγούς Δομής των Πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός της τεταρτοταγούς δομής των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με διέγερση στην περιοχή 229 με 280 nm, ενισχύοντας το σκεδασμό Raman από το δονητικό αποτύπωμα των αρωματικών αμινοξέων (τυροσίνη, θρεπτοφάνη, φαινυλαλανίνη). Οι δονητικές μεταπτώσεις και οι εντάσεις των αρωματικών αμινοξέων είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στις αλλαγές του τοπικού περιβάλλοντος και στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με το διαλύτη, και άρα μπορούν να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών.^{54-57,73-75} Ο υπολογισμός της διατομής σκεδασμού των αμινοξέων αυτών δίνει άμεσες πληροφορίες σχετικά με την έκταση της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης και διαλύτη και συνεπώς της προσβάσιμης επιφάνειας των αρωματικών καταλοίπων στο διαλύτη.^{38,42}

2.5.2.1 Δεσμοί Υδρογόνου Μεταξύ Τυροσίνης και Τοπικού Περιβάλλοντος

Οι δεσμοί υδρογόνου αποτελούν αναμφισβήτητα το κλειδί για τη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών στη φυσική τους δομή. Ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων μιας πρωτεΐνης παίζει καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση της τεταρτοταγούς δομής της και επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τον ενζυματικό μηχανισμό της ίδιας της πρωτεΐνης.

Η τυροσίνη αποτελεί ένα από τα αμινοξέα, των οποίων οι πλευρικές τους αλυσίδες μπορούν να λάβουν μέρος στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου και να επηρεάσουν το περιβάλλον μιας πρωτεΐνης.^{54-57,73-75} Συγκεκριμένα, η πλευρική φαινολική αλυσίδα της μπορεί να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου, είτε ως δότης είτε ως δέκτης πρωτονίου.⁷³ Για αυτό το λόγο, η Tyr έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε μελέτες συντονισμού Raman, για τη διερεύνηση του τοπικού περιβάλλοντος των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, οι δονήσεις που

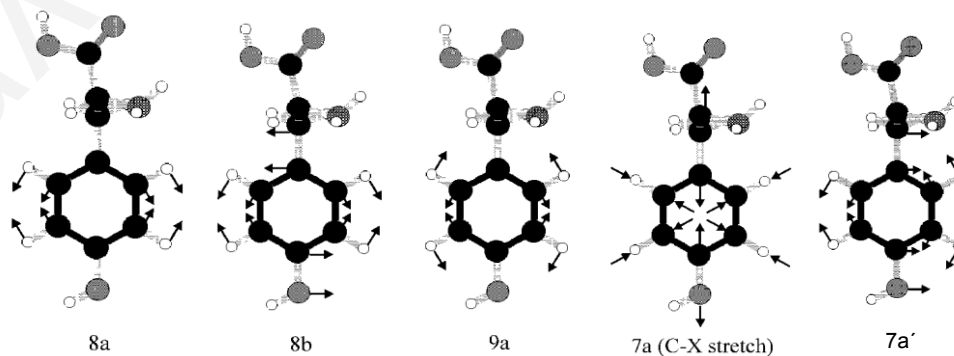
σχετίζονται με το φαινολικό δακτύλιο φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στις αλλαγές του τοπικού περιβάλλοντος και ειδικότερα στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με το φαινολικό OH.^{51,73,77}

2.5.2.2 Δονήσεις Αρωματικού Δακτυλίου της Τυροσίνης

Η ομοιότητα της π -κρεσόλης (4-μεθυλοφαινόλη) με τη φαινολική ρίζα της Tyr, την καθιστά το απλούστερο ιδανικό μοντέλο για την κατανόηση των δονήσεων της πλευρικής αλυσίδας της Tyr.^{54,78} Οι Takeuchi *et al.* ερεύνησαν τα φάσματα Raman και IR της π -κρεσόλης και διάφορων δευτεριωμένων ισομερών της στο διάλυμα και υπολόγισαν τους κανονικούς τρόπους δόνησής τους.⁷⁸ Τα αποτελέσματά τους έγιναν ευρέως αποδεκτά και χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό του τοπικού περιβάλλοντος των Tyr σε πρωτεϊνικά συστήματα. Η ταυτοποίηση και οι συχνότητες των κυριοτέρων τρόπων δόνησης της Tyr/Tyr⁻ παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.⁶⁷ Στο Σχήμα 2.15 παρουσιάζονται οι πιο χαρακτηριστικοί τρόποι δόνησης της Tyr.⁷⁹

Πίνακας 2.2: Ταυτοποίηση των κορυφών Raman για την Tyr και Tyr⁻.^{67,77}

Tyr $\nu(\text{cm}^{-1})$	Tyr ⁻ $\nu(\text{cm}^{-1})$	Ταυτοποίηση δόνησης
1617	1601	V_{8a} συμμετρική τάση C-C του αρωματικού δακτυλίου
1601	1558	V_{8b} αντισυμμετρική τάση C-C του αρωματικού δακτυλίου
1263-1320	1266	$V_{7a'}$ τάση C-O
1210	1208	V_{7a} τάση $C_{\text{ring}}-C_{\text{ext}}$
1180	1174	V_{9a} κάμψη C-H στο επίπεδο του δακτυλίου
852	850	Fermi doublet: σύζευξη της ν_1 (ring breathing) 832 cm^{-1} και
	830	ν_{16a} , (out-of -plane ring deformation)



Σχήμα 2.15: Κυριότεροι τρόποι δόνησης της τυροσίνης.⁷⁹

2.5.2.3 Μελέτη της Μεταβολής της Συχνότητας των Κορυφών της Tyr

2.5.2.3.1 Δονήσεις Y_{8a} και Y_{8b}

Οι δονήσεις της Tyr (Y_{8a} και Y_{8b}) που σχετίζονται με το φαινολικό δακτύλιο προέρχονται από τη διπλά εκφυλισμένη δόνηση ν_8 του βενζολίου που εμφανίζεται στην περιοχή των $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$. Για μονοϋποκατεστημένο ή παραϋποκατεστημένο βενζόλιο, όπως στην περίπτωση της Tyr, οι δείκτες a και b προσδιορίζουν τις συμμετρικές και αντισυμμετρικές δονήσεις, αντίστοιχα, σε σχέση με τον άξονα περιστροφής του μορίου.⁷³ Οι δονήσεις της Tyr Y_{8a} και Y_{8b} οφείλονται κατά κύριο λόγο στη δόνηση τάσης των δεσμών C-C του αρωματικού δακτυλίου, με πολύ μικρή συνεισφορά του φαινολικού υδροξυλίου OH.^{61,78} Οι συχνότητες των δονήσεων Y_{8a} (1618 cm^{-1}) και Y_{8b} (1600 cm^{-1}) είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην αλλαγή της κατάστασης της φαινολικής ομάδας (πρωτονιωμένη, αποπρωτονιωμένη), και συνεπώς εξαρτώνται από το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου του φαινολικού OH. Η αντισυμμετρική δόνηση τάσης Y_{8b} κατά την ισοτοπική ανταλλαγή H/D μετατοπίζεται στους 1587 cm^{-1} . Η μεγάλη ερυθρή μετατόπιση που παρατηρείται οφείλεται στην αποσύζευξη της δόνησης κάμψης του νερού και της Y_{8b} δεδομένου ότι η δόνηση κάμψης του δεσμού D_2O που σχηματίζεται μετά την ισοτοπική ανταλλαγή H/D εμφανίζεται πολύ πιο χαμηλά (1200 cm^{-1} vs 1650 cm^{-1}).⁷³ Όταν το φαινολικό υδροξύλιο OH αποπρωτονιωθεί (Tyr^-), η σύζευξη μεταξύ της Y_{8b} και $\nu_{d(HOH)}$ παύει να υφίσταται. Σε αυτή την περίπτωση η Y_{8b} παρουσιάζει ακόμα μεγαλύτερη ερυθρή μετατόπιση στους 1555 cm^{-1} .^{61,78}

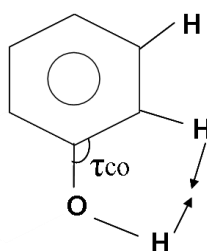
Η μεγάλη ενίσχυση που παρουσιάζουν στα φάσματα UVRR οι δονήσεις Y_{8a} και Y_{8b} αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα για τη χρήση τους ως δείκτη για τη μελέτη των δεσμών υδρογόνου.^{51,73,77} Οι Hildebrandt *et al.* μελετώντας την π -κρεσόλη, ως μοντέλο της Tyr, σε διαφορετικά συστήματα διαλυτών (ακετόνη, διαιθυλαιθέρας, τριαιθυλαμίνη), παρατήρησαν μείωση της συχνότητας της Y_{8b} με την αύξηση της ισχύος των δεσμών υδρογόνου με το διαλύτη, καταλήγοντας σε μια γραμμική συσχέτιση μεταξύ της ισχύος του δεσμού υδρογόνου και της συχνότητας της δόνησης Y_{8b} .⁷³ Η συσχέτιση αυτή επιβεβαιώθηκε αργότερα από τους Rodgers *et al.* οι οποίοι επίσης διαπίστωσαν μια μικρή γραμμική συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας της δόνησης Y_{8a} και της ισχύος των δεσμών υδρογόνου.⁸⁰

2.5.2.3.2 Δονήσεις Y_{7a} , Y_{9a} και Y_{7a}'

Οι δονήσεις της Tyr Y_{7a} , Y_{9a} και Y_{7a}' , παρουσιάζονται στα φάσματα UVRR στην περιοχή $1300-1500\text{ cm}^{-1}$ και σχετίζονται με τη δόνηση τάσης C-C του αρωματικού δακτυλίου και της μεθυλομάδας, τη δόνηση κάμψης στο επίπεδο του δεσμού C-H και τη δόνηση τάσης του δεσμού C-O, αντίστοιχα.^{61,77,81} Οι δονήσεις αυτές μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζει το φαινολικό OH και να προσφέρουν πληροφορίες για τη δράση του OH ως δότη ή δέκτη πρωτονίων.

Συχνότητα Δόνησης Y_{7a} : Η συχνότητα της κορυφής Y_{7a} παρέχει ενδείξεις για την τάση του φαινολικού OH να ενεργεί ως δότης ή δέκτης πρωτονίου. Σύμφωνα τους Takeuchi *et al.*,⁷⁷ όταν η συχνότητα της Y_{7a} εμφανίζεται στους $\sim 1210\text{ cm}^{-1}$ η Tyr δρα ως δέκτης, ενώ αν μετατοπίζεται γύρω στους 1205 cm^{-1} δρα ως δότης πρωτονίων.

Συχνότητα Δόνησης Y_{9a} : Η συχνότητα της κορυφής Y_{9a} αλλά και η μετατόπισή της εξαρτάται από τη δίεδρη γωνία τ_{CO} . Η δίεδρη γωνία τ_{CO} σχηματίζεται μεταξύ του COH της πλευρικής αλυσίδας και του φαινολικού δακτυλίου (Σχήμα 2.16) και σχετίζεται με την απωστική δύναμη μεταξύ του υδρογόνου του φαινολικού δακτυλίου και του υδρογόνου του OH. Οι Takeuchi *et al.* έδειξαν ότι αν η τιμή της γωνίας τ_{CO} είναι μικρή, τότε η απώθηση μεταξύ των υδρογόνων είναι μεγάλη και η κορυφή Y_{9a} εμφανίζεται σε μεγαλύτερες συχνότητες ($\sim 1179\text{ cm}^{-1}$). Αντίστοιχα, όταν η γωνία τ_{CO} μεγαλώνει, οι δυνάμεις van der Waals μεταξύ των υδρογόνων εξασθενούν, παρατηρείται χαλάρωση της απώθησης μεταξύ των υδρογόνων και η κορυφή της Y_{9a} μετατοπίζεται σε μικρότερους κυματαριθμούς.⁷⁷



Σχήμα 2.16: Δίεδρη γωνία τ_{CO} (COH).⁷⁷

Συχνότητα Δόνησης Y_{7a}' : Η δόνηση Y_{7a}' είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, και οι μετατοπίσεις της σε διαφορετικές θέσεις στα φάσματα UVRR υποδεικνύουν το είδος του δεσμού υδρογόνου που σχηματίζει το φαινολικό OH.^{57,77} Οι Takeuchi *et al.* πρότειναν ότι η φαινολική ομάδα σχηματίζει ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου

με ένα βασικό άτομο όταν η συχνότητα της δόνησης $Y_{7a'}$ εμφανίζεται σε υψηλότερες συχνότητες ($1265-1275\text{ cm}^{-1}$) και στην περίπτωση αυτή η φαινολική ομάδα ενεργεί ως δότης πρωτονίου. Αντίθετα, όταν ένας ισχυρός δότης πρωτονίου σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το άτομο του οξυγόνου του φαινολικού OH (Tyr-δέκτης πρωτονίου), η συχνότητα της δόνησης $Y_{7a'}$ μετατοπίζεται σε χαμηλότερη συχνότητα ($1230-1240\text{ cm}^{-1}$). Οι ίδιοι ερευνητές πρότειναν επίσης ότι η κορυφή $Y_{7a'}$ εμφανίζεται περισσότερο οξεία και με μεγαλύτερη ένταση στα φάσματα UVRR, όταν η αρωματική πλευρική αλυσίδα της Tyr βρίσκεται σε υδρόφοβο περιβάλλον, ενώ αντίθετα όταν βρίσκεται σε υδρόφιλο περιβάλλον η κορυφή $Y_{7a'}$ είναι πιο ευρεία με πολύ χαμηλή ένταση, που τις περισσότερες φορές δεν είναι ευδιάκριτη στα φάσματα Raman όταν η διέγερση είναι στην περιοχή $>230\text{ nm}$.⁷⁷

Το κυριότερο πρόβλημα που παρουσιάζει η κορυφή $Y_{7a'}$ στα φάσματα UVRR είναι ότι στην περίπτωση που το πρωτεϊνικό σύστημα περιέχει κατάλοιπα φαινυλαανίνης τότε επικαλύπτεται από τη δόνηση W10 (1240 cm^{-1}) της. Επιπλέον, κατά τη διέγερση στη βαθιά υπεριώδη περιοχή ($\sim 200\text{ nm}$) που παρατηρείται ενίσχυση και από τις δονήσεις που οφείλονται στο χρωμοφόρο αμιδίο, η κορυφή $Y_{7a'}$ επικαλύπτεται από την κορυφή του Am III. Η επικάλυψη αυτή μπορεί ελαχιστοποιηθεί μετά από ισοτοπική ανταλλαγή H/D όπου η κορυφή του αμιδίου μετατοπίζεται αρκετά σε αντίθεση με τη κορυφή $Y_{7a'}$ που είναι λιγότερο ευαίσθητη στη δευτερίωση, αφού μετατοπίζεται μόνο $5-6\text{ cm}^{-1}$.^{37, 69}

2.5.2.3.3 Δονήσεις Fermi Doublet

Οι χαρακτηριστικές κορυφές 830 και 850 cm^{-1} της Tyr προκύπτουν από το συντονισμό Fermi μεταξύ της δόνησης του δακτυλίου Y_1 (*ring-breathing*) και της υπέρτονης της εκτός επιπέδου παραμόρφωσης του δακτυλίου, Y_{16a} (*ring-deformation*).^{54,73,74} Αν η αλληλεπίδραση Fermi είναι πολύ ασθενής ή δεν υφίσταται, στα φάσματα Raman εμφανίζεται μόνο η δόνηση Y_1 στην περιοχή μεταξύ $820-860\text{ cm}^{-1}$.⁵⁴ Οι Siamwiza *et al.* έχουν αποδείξει ότι ο λόγος των σχετικών εντάσεων των κορυφών αυτών I_{830}/I_{850} εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζει το φαινολικό OH.⁸² Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι όταν η φαινολική ομάδα ενεργεί ως δότης πρωτονίου, ο λόγος I_{850}/I_{830} είναι ίσος με 0.30 , ενώ αντίθετα όταν το φαινολικό οξυγόνο δρα ως αποδέκτης πρωτονίου ο λόγος προσεγγίζει το 2.5 . Επίσης, αν η φαινολική ομάδα ενεργεί τόσο ως δότης όσο και ως αποδέκτης πρωτονίου, στην περίπτωση που τα

κατάλοιπα της Tyr σε ένα πρωτεϊνικό σύστημα είναι πλήρως εκτεθειμένα στο διαλύτη, ο λόγος I_{830}/I_{850} γίνεται ίσος με 1.25.^{73,82}

Επομένως, όλες οι δονήσεις της Tyr μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη των δεσμών υδρογόνου της Tyr, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για την επίδραση των περιβαλλοντικών συνθηκών.

2.5.2.4 Μελέτη της Μεταβολής της Έντασης των Κορυφών της Tyr

Η αλλαγή στην ένταση των κορυφών της Tyr (Y_{8a} , Y_{8b} , Y_{7a} και Y_{9a}), σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σχετίζεται άμεσα με την αλληλεπίδραση της πλευρικής αλυσίδας της Tyr και του τοπικού της περιβάλλοντος.^{42,51,52,55,57,81} Οι Takeuchi *et al.* μελέτησαν την επίδραση του διαλύτη στο σκεδασμό Raman της AcTyrEE, προκειμένου να εξηγήσουν τη σημαντική αύξηση των κορυφών Raman όταν τα πεπτίδια Met-enkephalin και Leu-enkephalin συνδέονται σε επιφάνειες φωσφολιπιδίων.⁵¹ Οι μεγαλύτερες αλλαγές στην ένταση των κορυφών παρατηρήθηκαν μετά από διέγερση των πρότυπων ενώσεων στα 240 nm, όπου οι αρωματικές πλευρικές αλυσίδες της Tyr εμφανίζουν ασθενή απορρόφηση. Επομένως, κάθε διαλύτης που προκαλεί ερυθρή μετατόπιση της κορυφής απορρόφησης των αρωματικών αμινοξέων L_a (~220 nm), λόγω αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου ή διπόλου πολικών αλληλεπιδράσεων αυξάνει την ενίσχυση των κορυφών που αντιστοιχούν στις δονήσεις των αρωματικών πλευρικών αλυσίδων. Ο βαθμός αύξησης της έντασης των κορυφών εξαρτάται από την ισορροπία των αλληλεπιδράσεων διπόλου, οι οποίες σχετίζονται με τις ηλεκτρονιακές ιδιότητες του διαλύτη και της διαλυμένης ουσίας, όπως στην περίπτωση της Tyr, η οποία είναι πολική λόγω της παρουσίας του φαινολικού OH. Επομένως, η αύξηση της υδροφοβικότητας του τοπικού περιβάλλοντος των πλευρικών αλυσίδων της Tyr προκαλεί αύξηση στην ένταση των κορυφών που συνδέονται με τις δονήσεις του αρωματικού δακτυλίου.^{51,81}

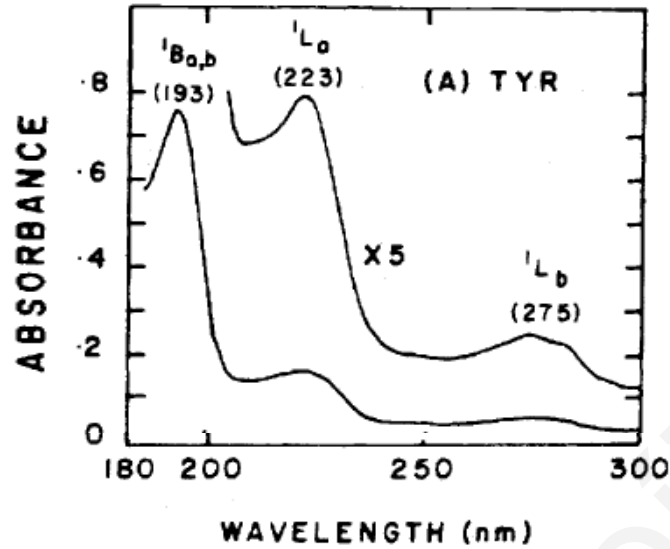
Η εξάρτηση των τιμών των διατομών σκεδασμού Raman των κορυφών της Tyr με το τοπικό περιβάλλον και ως επακόλουθο της προσβάσιμης επιφάνειας των αρωματικών καταλοίπων στο διαλύτη, έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές.^{38,42} Οι Chi και Asher μελέτησαν την εξάρτηση των απολύτων διατομών σκεδασμού Raman της Tyr συναρτήσει της διαλυτικής της έκθεσης, υπολογίζοντας τις διατομές σκεδασμού σε διάφορα μείγματα νερού/προπανόλης σε διάφορες αναλογίες,⁴² όπου επιβεβαιώθηκε ότι η αύξηση της υδροφοβικότητας του διαλύτη προκαλεί αύξηση στην τιμή της διατομής σκεδασμού

Raman. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από υπολογισμούς διατομών σκεδασμού της Tyr που πραγματοποιήθηκαν για συγκεκριμένα κατάλοιπα, τα οποία βρίσκονται “θαμμένα” ή πλήρως εκτεθειμένα στο διαλύτη στην πρωτεϊνική δομή του κυτοχρώματος c στον τόνο, καθώς και στο σπέρμα της φάλαινας και της μυογλοβίνης του αλόγου, πρωτεΐνες των οποίων οι δομές είναι ήδη γνωστές και ο υπολογισμός της προσβάσιμης επιφάνειας των αρωματικών καταλοίπων στο διαλύτη είναι εφικτός.⁴²

Η αλλαγή στην ένταση των κορυφών της Tyr μπορεί να προκαλέσει και η επίδραση της θερμοκρασίας, εξαιτίας της κατανομής Boltzmann του πληθυσμού των δονητικών καταστάσεων.⁸³ Οι Boyden και Asher μελετώντας διαμορφωτικές αλλαγές συναρτήσεως της θερμοκρασίας με χρήση της φασματοσκοπίας UVRR, μετά από διέγερση στα 229 nm, έδειξαν ότι οι εντάσεις των δονήσεων της Tyr μειώνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας.⁸⁴

2.5.2.5 Ενίσχυση του Σκεδασμού της Tyr στην Υπεριώδη Περιοχή

Οι διεγερμένες καταστάσεις της αρωματικής πλευρικής αλυσίδας της Tyr συνδέονται άμεσα με το μόριο του βενζολίου. Η πρώτη επιτρεπτή (εκφυλισμένη) μετάπτωση $\pi \rightarrow \pi^*$ $B_{a,b}$ του βενζολίου παρατηρείται στα ~183 nm, και οι δύο απαγορευμένες μεταπτώσεις λόγω συμμετρίας, L_a , L_b στα 203 και 253 nm, αντίστοιχα. Με την υποκατάσταση του βενζοϊκού δακτυλίου με το υδροξύλιο, η συμμετρία του βενζολίου D_{6h} αλλάζει σε C_{2v} και επομένως οι απαγορευμένες μεταπτώσεις L_a και L_b , επιτρέπονται. Με την υποκατάσταση του δακτυλίου, οι ενέργειες μετάπτωσης $B_{a,b}$, L_a και L_b , επιδεικνύουν ερυθρή μετατόπιση.^{85,85} Οι κορυφές L_a και L_b εμφανίζονται στα 223 και 275 nm, ενώ η κορυφή $B_{a,b}$ μετατοπίζεται στα 193 nm (Σχήμα 2.17).⁸⁶



Σχήμα 2.17: Φάσμα απορρόφησης για την τυροσίνη.⁸⁶

Επιλέγοντας ακτινοβολία διέγερσης (ν_0) της οποίας η ενέργεια συμπίπτει με την ενέργεια για μια ηλεκτρονιακή μετάπτωση (ν_{vi}) στο μόριο της Tyr, ο σκεδασμός Raman ενισχύεται μόνο από τον όρο A (Franck-Condon) της πολωσιμότητας, όπως δίνεται από την Εξίσωση 2.7,^{39,85,86}

$$A \cong Me^2 \frac{1}{h} \sum_v \frac{\langle j|v\rangle \langle v|j\rangle}{\nu_{vi} - \nu_0 + i\Gamma_v} \quad (2.7)$$

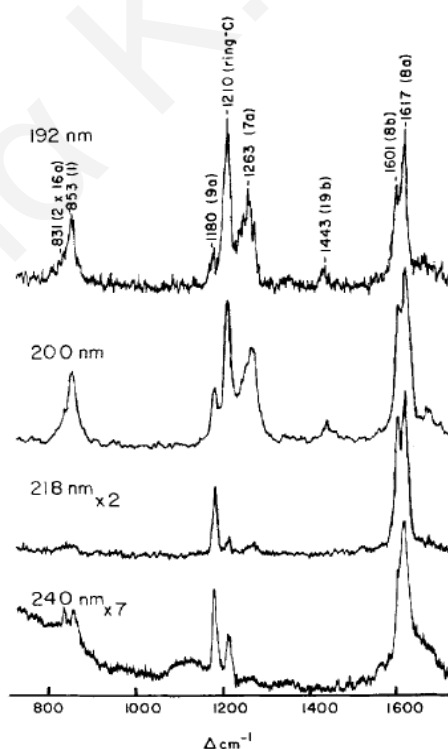
όπου Me είναι η διπολική ροπή μετάπτωσης, οι ν_{vi} και ν_0 είναι η συχνότητα της θεμελιώδους στάθμης και η συχνότητα διέγερσης, αντίστοιχα, και $\langle j|v\rangle \langle v|j\rangle$ είναι τα ολοκληρώματα επικάλυψης Franck-Condon. Ο όρος A σχετίζεται με μια μοναδική διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση μέσω ολοκληρωμάτων αλληλοεπικάλυψης Franck-Condon. Το γινόμενο των ολοκληρωμάτων αυτών είναι ίσο με μηδέν λόγω της ορθογωνικότητας των κυματοσυναρτήσεων δόνησης, εκτός αν υπάρχει μετατόπιση της θέσης ισορροπίας στη διεγερμένη ηλεκτρονιακή διέγερση. Τέτοια μετατόπιση προκαλούν μόνο οι εντελώς συμμετρικές δονήσεις, και για αυτό η αύξηση των εντάσεων Raman λόγω αυτού του όρου, απαντάται μόνο από αυτές τις δονήσεις.^{39,8,86} Στην περίπτωση της Tyr οι δονήσεις Y_{8a} , Y_{9a} και Y_{7a} ενισχύονται στα φάσματα UVRR μέσω του όρου A.

Στην περίπτωση που οι μεταπτώσεις μεταξύ της θεμελιώδους και δύο ηλεκτρονιακών διεγερμένων καταστάσεων είναι επιτρεπτές, τότε παρατηρείται ενίσχυση του B όρου της πολωσιμότητας όπως δίνεται από της Εξίσωση 2.8.

$$B \cong MeMe' \frac{1}{h} \sum_v \frac{\langle j|Q|v\rangle\langle v|i\rangle + \langle i|v\rangle\langle v|Q|i\rangle}{\nu_{vi} - \nu_0 + i\Gamma_v} \quad (2.8)$$

Ο όρος αυτός καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ένταση των κορυφών Raman που σχετίζονται με μη-εντελώς συμμετρικές δονήσεις. Η ανάλυση των ιδιοτήτων του όρου B καθιστά σαφή το ρόλο της ηλεκτρονιακής σύζευξης (*vibronic coupling*) στην ενίσχυση των εντάσεων Raman. Οι δονήσεις οι οποίες μπορούν να συνδυάζουν δύο διεγερμένες ηλεκτρονιακές καταστάσεις υφίστανται μεγάλη ενίσχυση στην έντασή τους. Ενίσχυση B όρου παρουσιάζεται στην περίπτωση της Tyr όπου στα φάσματα UVRR μπορεί να παρατηρηθεί η δόνηση Y_{8b} , λόγω της σύζευξης των ηλεκτρονιακών καταστάσεων $B_{a,b}$ και L_a .^{85,86}

Οι Spiro *et al.* μελέτησαν την ενίσχυση του σκεδασμού Raman των δονήσεων του φαινολικού δακτυλίου της Tyr στην υπεριώδη περιοχή. Συγκεκριμένα, στη μελέτη τους λήφθηκαν φάσματα UVRR της Tyr, μετά από διέγερση στην περιοχή 192-240 nm (Σχήμα 2.18).^{85,86} Οι μεγάλες αλλαγές που παρατηρούνται στις εντάσεις των κορυφών συναρτήσει του μήκους διέγερσης μπορούν να εξηγηθούν από τη συνεισφορά των όρων A και B.



Σχήμα 2.18: Φάσματα UVRR της Tyr, μετά από διέγερση στα 192, 200, 218 και 240 nm.⁸⁶

Τα μήκη διέγερσης 200, 218 και 240 nm γειτνιάζουν με τη μετάπτωση L_a (Σχήμα 2.18) και στα φάσματα UVRR μπορούν να παρατηρηθούν οι δονήσεις Y_{8a} , Y_{8b} και Y_{9a} , λόγω της ενίσχυσης των όρων A και B, αφού παρατηρείται σύζευξη των ηλεκτρονιακών καταστάσεων $B_{a,b}$ και L_a . Διέγερση στα 192 nm που βρίσκεται άμεσα σε συντονισμό με την επιτρεπόμενη μετάπτωση $B_{a,b}$, στο φάσμα Raman οι εντάσεις των κορυφών Y_{8a} και Y_{8b} είναι συγκρίσιμες με τις εντάσεις των συμμετρικών δονήσεων Y_{7a} και Y_1 στους 1210 και 853 cm^{-1} , αντίστοιχα. Η συμπεριφορά αυτή οφείλεται στην ενίσχυση των όρων A και B. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο λόγος της έντασης των κορυφών Y_{8b}/Y_{8a} είναι σημαντικά μικρότερος στο μήκος διέγερσης 192 nm σε σχέση με το 218 nm, το οποίο είναι σε απευθείας συντονισμό με την L_a . Όμοια, η Y_{9a} παρουσιάζεται ασθενέστερη σε σχέση με την Y_{8a} στα 192 nm σε σχέση με τα 218 nm. Επομένως, η ενίσχυση του όρου A είναι μεγαλύτερη για την Y_{8a} σε σχέση με τις δύο άλλες δονήσεις, οι οποίες κυριαρχούν στο φάσμα στα 218 nm.

Βιβλιογραφία

- (1) Dobson, C. M. *Methods* **2004**, 34, 4.
- (2) Volk, M. *European Journal of Organic Chemistry* **2001**, 2605.
- (3) Ellis R. J.; Pinheiro J. T. *Nature* **2002**, 416, 483.
- (4) Dobson, C. M. *Nature* **2003**, 426, 884.
- (5) Dobson, C. M. *Trends in Biochemical Sciences* **1999**, 24, 329.
- (6) Selkoe, D. J. *Nature* **2003**, 426, 900.
- (7) Markin, O. S.; Serpell, L. O. *The FEBS Journal* **2005**, 272, 5950.
- (8) Sunde, M.; Serpell, L. C.; Bartlam, M.; Fraser, P. E.; Pepys, M. B.; Blake, C. C. F. *Journal of Molecular Biology* **1997**, 273, 729.
- (9) Nilsson, M. R. *Methods* **2004**, 34, 151.
- (10) Bouchard, M.; Zurdo, J.; Nettleton, E. J.; Dobson, C. M.; Robinson, C. V. *Protein Science* **2000**, 9, 1960.
- (11) Blake, C.; Serpell, L. *Structure* **1996**, 4, 989.
- (12) Nelson, R.; Sawaya, M. R.; Balbirnie, M.; Madsen, A.; Riek, C.; Grothe, R.; Eisenberg, D. *Nature* **2005**, 435, 773.
- (13) Borman, S. *Chemical Engineering News* **2005**, 83, 9.
- (14) MacPhee, C. E.; Dobson, C. M. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 12707.
- (15) Xu, M.; Ermolenkov, V. V.; He, W.; Uversky, V. N.; Fredriksen, L.; Lednev, I. K. *Biopolymers* **2005**, 79, 58.
- (16) Lednev, I. K.; Shashilov, V.; Xu, M. *Current Science* **2009**, 97, 180.
- (17) Booth, D. R.; Sunde, M.; Bellotti, V.; Robinson, C. V.; Hutchinson, W. L.; Frase, P. E.; Hawkins, P. N.; Dobson, C. M.; Radford, S. E.; Blake, C. C. F.; Papys, M. B. *Nature* **1997**, 385, 787.
- (18) Shashilov, V.; Xu, M.; Ermolenkov, V. V.; Fredriksen, L.; Lednev, I. K. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, 6972.
- (19) Dobson, C. M. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **2001**, 356, 133.
- (20) Damas, A. M.; Saraiva, M. J. *Journal of Structural Biology* **2000**, 130, 290.
- (21) Foss, T. R.; Kelker, M.; S.; Wiseman, R.; L.; Wilson, I. A.; Kelly, J. W. *Journal of Molecular Biology* **2005**, 347, 841.
- (22) Thirumalai, D.; Klimov, D. K.; Dima, R. I. *Current Opinion in Structural Biology* **2003**, 13, 146.

- (23) Jaroniec, C. P.; MacPhee, C. E.; Bajaj, V. S.; McMahon, M. T.; Dobson, C. M.; Griffin, R. G. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **2004**, *101*, 711.
- (24) Jaroniec, C. P.; MacPhee, C. E.; Astrof, N. S.; Dobson, C. M.; Griffin, R. G. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **2002**, *99*, 16748.
- (25) Jarvis, J. A.; Craik, D.; Wilce, M. C. J. *Biochememical and Biophysical Research Communications* **1993**, *192*, 991.
- (26) Gustavsson, A.; Engstrom, U.; Westermark, P. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1991**, *175*, 1159.
- (27) MacPhee, C. E.; Dobson, C. M. *Journal of Molecular Biology* **2000**, *297*, 1203.
- (28) Lindgren, M.; Sörgjerd, Hammarström, P. *Biophysical Journal* **2005**, *88*, 4200.
- (29) Deng, W.; Cao, A.; Lai, L. *Biochemical and Biophysical Communications* **2007**, *362*, 689.
- (30) Zandomenighi, G.; Krebs, M. R. H.; Mccammon, M. G.; Fändrich, M. *Protein Science* **2004**, *13*, 3314.
- (31) Dirix, C.; Meersman, F.; MacPhee, C. E.; Dobson, C. M.; Heremans, K. *Journal of Molecular Biology* **2005**, *347*, 903.
- (32) Colon, W.; Kelly, J. W. *Biochemistry* **1992**, *31*, 8654.
- (33) Lai, Z.; Colon, W.; Kelly, J. W. *Biochemistry* **1996**, *35*, 6470.
- (34) Jarvis, J. A.; Kirkpatrick, A.; Craik, D. J. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1994**, *44*, 388.
- (35) Ferraro J. R. *Introductory Raman Spectroscopy*, **2002**, 2nd edition, Academic Press.
- (36) Chi, Z.; Chen, X. G.; Holtz, J. S. W.; Asher, S. *Biochemistry* **1998**, *37*, 2854.
- (37) Xu, M.; Shashilov, V.; Lednev, I. K. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 11002.
- (38) Chi, Z.; Asher, S. A. *Biochemistry* **1998**, *37*, 2865.
- (39) Myers, A. B.; Mathies, R. A. *Resonance Raman Intensities: A Probe of Excited-State Structure and Dynamics*, Department of Chemistry, University of California.
- (40) Hayes, S. C.; Wallace, P. M.; Bolinger, J. C.; Reid P. J. *International Reviews in Physical Chemistry* **2002**, *21*, 3, 405.
- (41) Song, S.; Asher, S. A. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *30*, 1205.
- (42) Chi, Z.; Asher, S. A. *Journal Physical Chemistry B* **1998**, *102*, 9595.

- (43) Favors, R. N.; Jiang, Y.; Loethen, Y. L.; Ben-Amotz, D. *Review of Scientific Instruments* **2005**, *76*, 033108.
- (44) Ludwig, M.; Asher, S. A. *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 1005.
- (45) Fodor, S. P. A.; Copeland, R. A.; Grygon, C. A.; Spiro, T. G. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 5509.
- (46) Dudik, J. M.; Johnson, C. R.; Asher, S. A. *Journal of Chemical Physics* **1985**, *82*, 1732.
- (47) Li, B.; Myers, A. B. *Journal of Physical Chemistry* **1990**, *94*, 4051.
- (48) Trulson, M. O.; Mathies, R. A. *Journal of Chemical Physics* **1986**, *84*, 2068.
- (49) Reid, P. J.; Esposito, A. P.; Foster, C. E.; Beckman, R. A. *Journal of Chemical Physics* **1997**, *107*, 8262.
- (50) Shashilov, V. A.; Lednev, I. K. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 309.
- (51) Takeuchi, H.; Ohtsuka, Y.; Harada, I. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 5321.
- (52) Overman, S. A.; Bondre, P.; Maiti, N. C.; Thomas, G. J. *Biochemistry* **2005**, *44*, 3091.
- (53) Huang, C. Y.; Balakrishnan, G.; Spiro, T. G. *Journal of Raman Spectroscopy* **2006**, *37*, 277.
- (54) Arp, Z.; Autrey, D.; Laane, J.; Overman, S. A.; Thomas, G. J. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2522.
- (55) Rodriguez-Mendieta, I. R.; Spence, G. R.; Gell, C.; Radford, S. E.; Smith, D. A. *Biochemistry* **2005**, *44*, 3306.
- (56) Hu, X.; Spiro, T. G. *Biochemistry* **1997**, *36*, 15701.
- (57) Cho, M.; Asher, A. *Biospectroscopy* **1996**, *2*, 71.
- (58) Asher, S. A.; Ianoul, A.; Mix, G.; Boyden, M. N.; Karnoup, A.; Diem, Max.; Schweitzer-Stenner, R. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 11775.

- (59) Mikhonin A. V.; Bykov, S. V.; Myshakina N. S.; Asher S. A. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 1928.
- (60) Mikhonin A. V.; Asher, S. A. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 3047.
- (61) Austin, J. C.; Jordan, T.; Spiro, T. G. *Ultraviolet Resonance Raman Studies of Proteins and Related Model Compounds*, Chapter 2, Department of Chemistry, Princeton University, USA.
- (62) Gremlich, U.; Yan, B.; *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*, 54-57, 217-219, 421-428.
- (63) Shashilov, V. A.; Sikirzhitski, V.; Popova, L. A.; Lednev, I. K. *Methods* **2010**, *52*, 23.
- (64) Mikhonin, A. V.; Bykov, S. V.; Myshakina N. S.; Asher, S. A. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *110*, 1943.
- (65) Sikirzhitsky, V.; Topilina, I. N.; Higashiya, S.; Welch, T. J.; Lednev, K. I *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 5852.
- (66) Balakrishnan, G.; Hu, Y.; Case, M. A.; Spiro, T. G.; *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 19877.
- (67) Myshakina, N. S.; Ahmed, Z.; Asher, S. A. J. *Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112*, 11877.
- (68) Shashilov, V. A.; Xu, M.; Ermolenkov, V. V.; Lednev, I. K. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* **2006**, *102*, 46.
- (69) Copeland, R. A.; Spiro, T. G. *Biochemistry* **1985**, *24*, 4960.
- (70) Sugawara, Y.; Harada, I.; Matsuura, H.; Shimanouchi, T. *Biopolymers* **1978**, *17*, 1405
- (71) Bucciantini, M.; Giannoni, E.; Chiti, F.; Baroni, F.; Formigli, L.; Zurdos, J.; Taddei, N.; Ramponi, G.; Dobson, C. M.; Stefani, M. *Nature* **2002**, *416*, 507.
- (72) Walsh, D. M.; Klyubin, I.; Fadeeva, J. V.; Cullen, W. K.; Anwyl, R.; Wolfe, M. S.; Rowan, M. J.; Selkoe, D. J. *Nature* **2002**, *416*, 535.
- (73) Hildebrandt, P. G.; Copeland, R. A.; Spiro, T. G.; Otlewski, J.; Laskowski, M. J.; Prendergast, F. G. *Biochemistry* **1988**, *27*, 5426.

- (74) Reid, P. J.; Loftus, C.; Beeson, C. C. *Biochemistry* **2003**, *42*, 2441.
- (75) Welfle, H.; Misselwitz, R.; Fabian, H.; Damerau, W.; Hoelzer, W.; Gerlach, D.; Kalnin, N. N.; Venyaminov, S. Yu. *International Journal of Biological Macromolecules* **1992**, *14*, 9.
- (76) Johnson, C. R.; Ludwig, M.; O'Donnell, S.; Asher, S. A. *Journal of the American Chemical Society* **1984**, *106*, 5008.
- (77) Takeuchi, H.; Watanabe, N.; Satoh, Y.; Harada, I. *Journal of Raman Spectroscopy* **1989**, *20*, 233.
- (78) Takeuchi, H.; Watanabe, N.; Harada, I. *Spectrochimica Acta*, **1988**, *44A*, 749.
- (79) Grace, L. I.; Cohen, R.; Dunn, T. M.; Lubman, D. M.; de Vries, M. S. *Journal of Molecular Spectroscopy* **2002**, *215*, 204.
- (80) Rodgers, K. R.; Subramanian, S. S.; Spiro, T. G. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 3697.
- (81) Hashimoto, S.; Miura, K.; Yamagishi, T.; Takeuchi, H.; Harada, I. *Photochemistry and Photobiology* **1992**, *56*, 1097.
- (82) Siamwiza, M. N.; Lord, R. C.; Chen, M. C.; Takamatsu, T.; Harada, I.; Matsuura, H.; Shimanouchi, T. *Biochemistry* **1975**, *14*, 4870.
- (83) Shreve, A. P.; Mathies, R. A. *Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99*, 7285.
- (84) Boyden, M. N.; Asher, S. A. *Biochemistry* **2001**, *40*, 13723.
- (85) Rava, R. P.; Spiro, T. G. *Journal of Physical Chemistry* **1985**, *89*, 1856.
- (86) Fodor, S. P. A.; Rava, R. P.; Copeland, R. A.; Spiro, T. G. *Journal of Raman Spectroscopy* **1986**, *17*, 471.

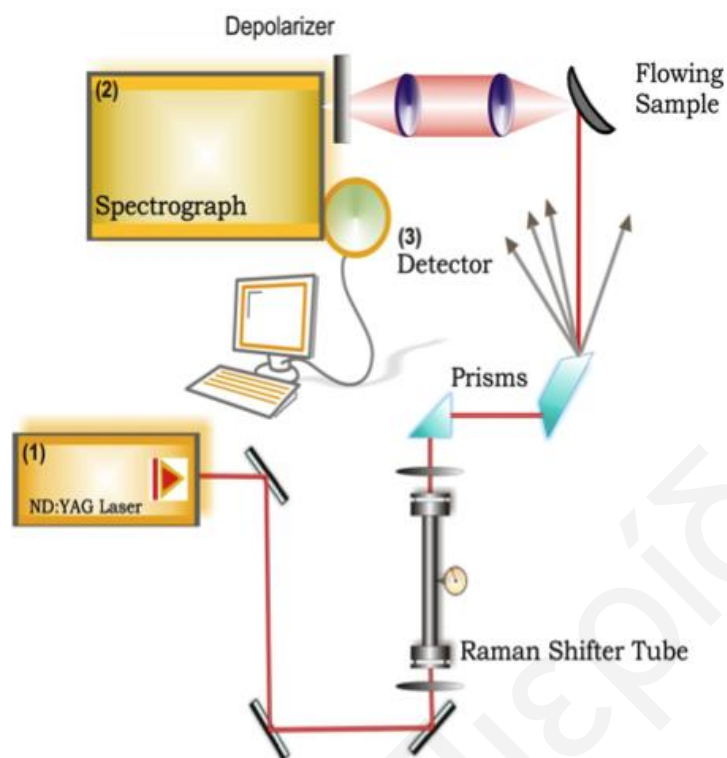
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Αντιδραστήρια

Το πεπτίδιο TTR(105-115) με την ακολουθία Tyr-Thr-Ile-Ala-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-Tyr-Ser (YTIAALLSPYS), που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή αγοράστηκε από την εταιρεία AnaSpec και χρησιμοποιήθηκε χωρίς καμία περαιτέρω επεξεργασία. Το πεπτίδιο αυτό έχει συντεθεί χρησιμοποιώντας την τυποποιημένη μέθοδο σύνθεσης στερεάς φάσης και ο καθαρισμός του έγινε με χρήση χρωματογραφίας HPLC (καθαρότητα >95%). Η L-Τυροσίνη την οποία μας την έχει προμηθεύσει η εταιρεία Merck χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Για την παρασκευή των διαλυμάτων που μελετήθηκαν στη φασματοσκοπική μελέτη του Κεφαλαίο 5 χρησιμοποιήθηκαν: ακετονιτρίλιο (99.9%, Merck), ακετονιτρίλιο-d₃ (99.96 atom % D, Aldrich) και οξείδιο του δευτερίου (99.9%, Merck), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Για την παρασκευή των διαλυμάτων που μελετήθηκαν στη φασματοσκοπική μελέτη του Κεφαλαίου 6 χρησιμοποιήθηκαν: Γλυκερόλη ($\geq 99.5\%$, Merck) και θειικό νάτριο ($\geq 99\%$, Merck), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία.

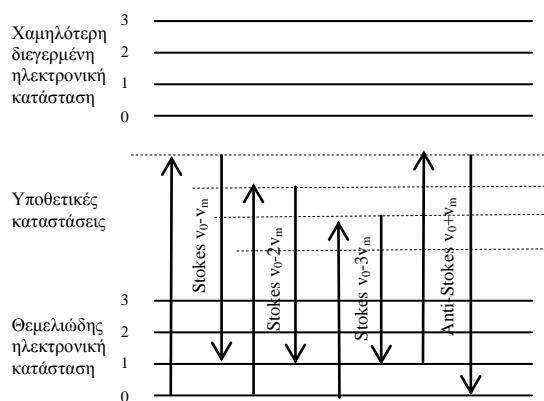
3.2 Πειραματική Διάταξη Συντονισμού Raman

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τις φασματοσκοπικές μετρήσεις που έγιναν στα πλαίσια της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής περιγράφεται στο Σχήμα 3.1.¹ Η πειραματική διάταξη αποτελείται από μια πηγή μονοχρωματικής ακτινοβολίας η οποία είναι ένα παλμικό laser Q-switched Nd:YAG (PRO-230, 30 Hz, Spectra Physics) μεγάλης ισχύος, εξοπλισμένο με κρυστάλλους για την παραγωγή όλων των αρμονικών συχνοτήτων. Η δυνατότητα αυτή παρέχει την ευελιξία επιλογής κατάλληλου μήκους κύματος για τη διέγερση των υπό μελέτη δειγμάτων, ανάλογα με το αντικείμενο μελέτης τους. Συγκεκριμένα, η δεύτερη, τρίτη και τέταρτη αρμονική συχνότητα του Nd:YAG laser (532, 355 και 266 nm αντίστοιχα) καθοδηγούνται μέσα από ένα σωλήνα παραγωγής συχνοτήτων (*Raman Shifter*) όπου μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή επιπλέον συχνοτήτων διέγερσης του δείγματος. Αυτή η δυνατότητα επιλογής μήκους κύματος (*tunability*) του συστήματος δίνεται μέσω του φαινομένου του επαγόμενου σκεδασμού Raman (*Stimulated Raman Scattering*), όπου μια ισχυρή δέσμη laser εστιάζεται σε ένα σωλήνα 1 m, κατασκευασμένο από ανοξείδωτο χάλυβα, που περιέχει αέριο H₂, πίεσης 1.5 bar. Ο σωλήνας έχει διάμετρο 1 in και διαθέτει στα δύο άκρα του παράθυρα κατασκευασμένα από UV-grade fused silica.



Σχήμα 3.1: Πειραματική Διάταξη UV Συντονισμού Raman.¹

Η ακτινοβολία διαπερνώντας το σωλήνα παράγει μια δέσμη φωτός σε φάση και με κατευθυντικότητα, η οποία περιέχει τις Stokes και anti-Stokes συχνότητες της πιο έντονης δόνησης Raman του αερίου μαζί με τις υπέρτονές τους. Συγκεκριμένα, η γραμμή Stokes $\nu_0 - \nu_m$ που αντιστοιχεί στο μοναδικό τρόπο δόνησης του μορίου του H_2 ($\nu_m = 4155 \text{ cm}^{-1}$) είναι τόσο ισχυρή που ενεργεί ως δευτερογενής πηγή διέγερσης της δεύτερης γραμμής Stokes $\nu_0 - 2\nu_m$, και αυτή της τρίτης, κ.ο.κ., οδηγώντας έτσι στην παραγωγή των συχνοτήτων Stokes και anti-Stokes (Σχήμα 3.2). Χρησιμοποιώντας τον επαγόμενο σκεδασμό Raman επιτυγχάνεται η παραγωγή ακτινοβολίας με μήκος κύματος στην περιοχή 229 με 280 nm καθώς επίσης και στη βαθιά υπεριώδη περιοχή 185 με 209 nm, μήκη κύματος κατάλληλα για τη μελέτη των βιολογικών συστημάτων.



Σχήμα 3.2: Φαινόμενο Επαγόμενου Σκεδασμού Raman.

3.2.1 Φασματοσκοπικές Μετρήσεις Προσδιορισμού του pK_a

Για τις φασματοσκοπικές μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν για τη μελέτη προσδιορισμού της τιμής του pK_a των καταλοίπων Tyr στο πεπτιδίο TTR(105-115) και της ελεύθερης Tyr, στο πλαίσιο του Κεφαλαίου 4, χρησιμοποιήθηκε ως συχνότητα ακτινοβολίας διέγερσης των δειγμάτων τα 239.5 nm, η οποία παράγεται από την τέταρτη αρμονική συχνότητα του Q-switched Nd:YAG laser $\lambda_0=266$ nm. Με τη βοήθεια κατάλληλης διάταξης καθρεπτών και πρισμάτων, η ακτινοβολία laser εστιάζεται στην κυψελίδα που περιέχει το δείγμα (Σχήμα 3.1). Η κυψελίδα UV quartz (Starna) που χρησιμοποιήθηκε στις παρούσες μετρήσεις έχει οπτικό πάχος (*path length*) 200- μm . Επειδή, όμως, η ισχυρή απορρόφηση μπορεί να προκαλέσει τοπική θέρμανση και κατ' επέκταση τη διάσπαση του δείγματος, δείγμα όγκου 250 μL ανατροφοδοτείται με τη βοήθεια μιας περισταλτικής αντλίας με επαρκή ρυθμό ροής για την εξασφάλιση νέου όγκου για κάθε παλμό laser. Επιπλέον, η ενέργεια διέγερσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν αρκετά μειωμένη (2 $\mu\text{J}/\text{παλμό}$) προκειμένου να αποφευχθεί η φωτοδιάσπαση/συσσωμάτωση του δείγματος του πεπτιδίου ή των υδατικών διαλυμάτων της ελεύθερης Tyr. Η σκεδαζόμενη ακτινοβολία στη συνέχεια συλλέγεται μέσω διάταξης που χρησιμοποιεί τη γεωμετρία backscattering (135°) και κατευθύνεται σε ένα φασματογράφο Czerny-Turner, εστιακού μήκους 0.75 m (SpectraPro-2750, Princeton Instruments) χρησιμοποιώντας οπτικά ποιότητας UV (Σχήμα 3.1).

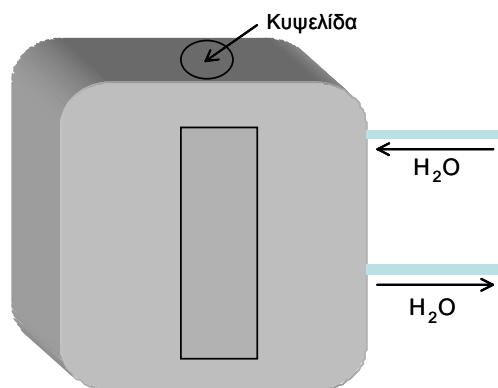
Στο φασματογράφο τοποθετήθηκε ολογραφικό φράγμα περίθλασης με 2400 εγκοπές ανά mm, ενώ το πλάτος των σχισμών στην είσοδο του φασματογράφου ορίστηκε στα 100 μm που παρέχουν διακριτική ικανότητα 9 cm^{-1} στο συγκεκριμένο μήκος κύματος που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη. Το σκεδαζόμενο φως είναι γραμμικά πολωμένο και για το λόγο αυτό πριν από την είσοδο στο φασματογράφο τοποθετήθηκε ένας αποπολωτής (fused silica and crystal quartz wedge) (CVI) ο οποίος αναιρεί την πόλωση του φωτός. Αυτό είναι αναγκαίο επειδή το φράγμα περίθλασης έχει διαφορετική απόδοση συναρτήσει της κατεύθυνσης πόλωσης του εισερχομένου φωτός. Τέλος, η σκεδαζόμενη δέσμη φωτός αναλύεται και ανιχνεύεται μέσω μιας κάμερας CCD (back-illuminated Charge Coupled Device) 1340x100 pixel, η οποία ψύχεται με υγρό άζωτο (LN_2 -cooled) (Spec10:100B-Pro-2750, Princeton Instruments).

3.2.2 Φασματοσκοπικές Μετρήσεις Προσδιορισμού της Δευτεροταγούς Δομής του Πεπτιδίου Συναρτήσεως της θερμοκρασίας και της Μελέτης Επίδρασης του Διαλυτικού Περιβάλλοντος

Για τις φασματοσκοπικές μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν για τη μελέτη των αλλαγών στη δομή του πεπτιδίου συναρτήσεως της θερμοκρασίας (Κεφάλαιο 5) καθώς και τη μελέτη της επίδρασης του διαλυτικού περιβάλλοντος των Tyr (Κεφάλαιο 6), χρησιμοποιήθηκαν τα μήκη κύματος 199.8 και 239.5 nm, αντίστοιχα. Τα μήκη κύματος αυτά παράγονται μέσω του επαγόμενου φαινομένου Raman από την τέταρτη αρμονική συχνότητα του Q-switched Nd:YAG laser στα 266 nm. Η κύρια διαφορά στην πειραματική διάταξη (Σχήμα 3.1) που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αυτά σε σχέση με την προηγούμενη μελέτη (προσδιορισμός pK_a) αφορούν τη υποδοχή του δείγματος και τη CCD κάμερα.

Και στις δύο μελέτες, δείγμα όγκου 100 μ l τοποθετήθηκε σε περιστρεφόμενη κυψελίδα που αποτελείται από ένα σωλήνα EPR quartz (διάμετρος: 4 mm) και συνδέεται με ένα κινητήρα με ρεοστάτη, για την επιλογή της ταχύτητας περιστροφής. Η χρήση της περιστρεφόμενης κυψελίδας συντελεί στην παράταση του χρόνου ζωής των δειγμάτων και επιπλέον ελαχιστοποιεί την απώλεια του ακετονιτριλίου (διαλύτη) λόγω εξάτμισης.

Η θερμοκρασία των δειγμάτων μπορεί να ελεγχτεί με δύο διαφορετικούς τρόπους. Αρχικά, στα πειράματα μελέτης της επίδρασης του διαλυτικού περιβάλλοντος (Κεφάλαιο 6), τα δείγματα θερμοστατούνται σε θερμοκρασία 10 °C μέσω ροής παγωμένου αέριου N_2 στην όψη της κυψελίδας, το οποίο διέρχεται από πηνίο κατασκευασμένο από ανοξείδωτο χάλυβα που ήταν καταβυθισμένο σε υγρό άζωτο. Η θερμοκρασία ελεγχόταν μέσω του ρυθμού ροής του αέριου αζώτου, μέσω του πηνίου. Αργότερα, τα πειράματα αυτά επαναλήφθηκαν και για τον καλύτερο έλεγχο της θερμοκρασίας του δείγματος σχεδιάστηκε θερμικός μανδύας με κυκλική υποδοχή έτσι ώστε να τοποθετείται ο σωλήνας EPR (Σχήμα 3.3). Ο θερμικός μανδύας είναι κατασκευασμένος από μπρούντζο με εσωτερικούς αγωγούς για τη ροή του νερού που παρέχεται από ένα κυκλοφορητή νερού (FB51709, Fisher Scientific) για τον έλεγχο της θερμοκρασίας.² Η ακριβής θερμοκρασία του δείγματος μετρήθηκε με χρήση θερμομέτρου επαφής (Fluke, 80PK-26, Sure Grip), όπου και διαπιστώθηκε ότι ο δεύτερος τρόπος ελέγχου της θερμοκρασίας ήταν περισσότερο αξιόπιστος.



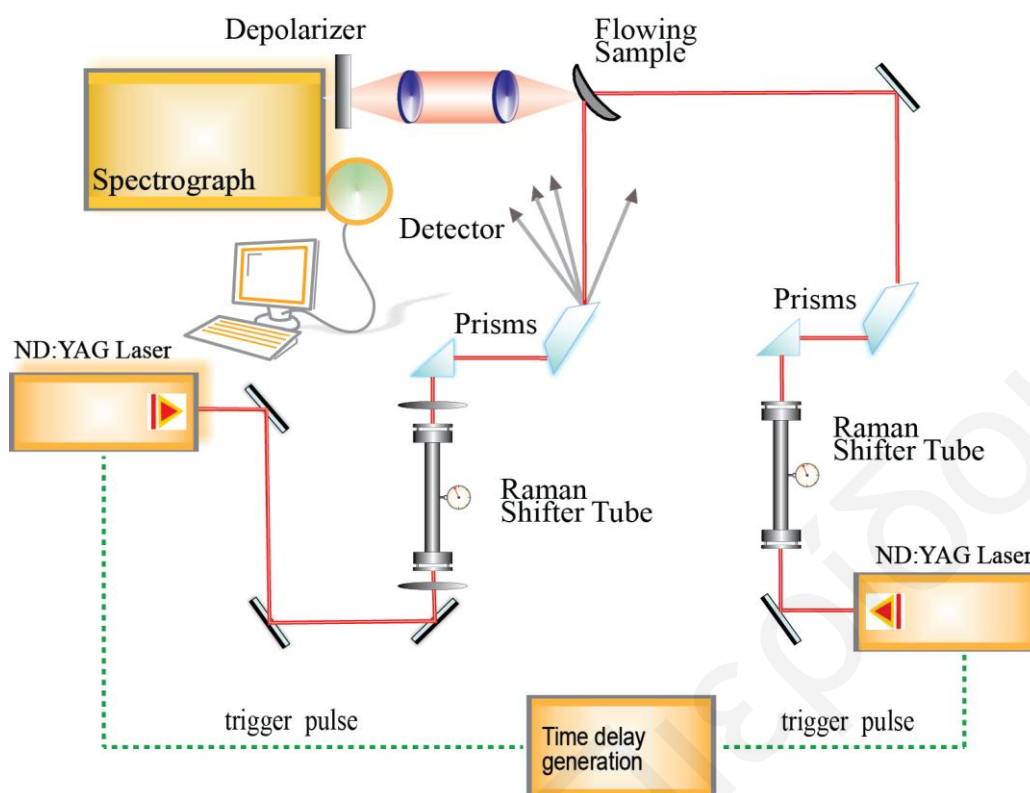
Σχήμα 3.3: Θερμικός Μανδύας.

Για τα πειράματα μελέτης της επίδρασης της θερμοκρασίας στη δομή του πεπτιδίου (Κεφάλαιο 5), χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός μανδύας για τη διατήρηση των δειγμάτων σε σταθερή θερμοκρασία. Η ενέργεια διέγερσης ήταν στα ίδια επίπεδα όπως και στην προηγούμενη μελέτη (2 $\mu\text{J}/\text{παλμό}$).

Σε αυτές τις φασματοσκοπικές μελέτες η σκεδαζόμενη ακτινοβολία ανιχνεύτηκε μέσω μιας καινούργιας κάμερας CCD (back-illuminated UV-enhanced) 2048-512 pixel, με μεγαλύτερο εύρος ψηφιοποίησης και μεγαλύτερη κβαντική απόκριση στη βαθιά υπεριώδη περιοχή (200 nm). Επομένως, με τη χρήση της συγκεκριμένης CCD κάμερας έγινε κατορθωτή η λήψη φασμάτων Raman σε μεγαλύτερη δυναμική περιοχή και επιπλέον μειώθηκε ο χρόνος καταγραφής δεδομένων.

3.3 Πειραματική Διάταξη Χρονικής Ανάλυσης Συντονισμού Raman

Η παρακολούθηση της δυναμικής συσσωμάτωσης του πεπτιδίου TTR (105-115) μπορεί να επιτευχθεί με την εισαγωγή ενός άλματος θερμοκρασίας (*temperature jump*) στο δείγμα χρησιμοποιώντας ένα υπέρυθρο παλμό laser νανοδευτερολέπτου και παρακολουθώντας έπειτα τη διαδικασία χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία χρονικής ανάλυσης συντονισμού Raman (TRRR). Στα πλαίσια της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής επιτεύχθηκε η κατασκευή της βέλτιστης οπτικής διάταξης με την οποία μπορεί να ανιχνευθεί άλμα θερμοκρασίας στο νερό, το μοριακό θερμόμετρο των δειγμάτων του πεπτιδίου, και η απαραίτητη βαθμονόμηση. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε μια τροποποιημένη πειραματική διάταξη, όπως περιγράφεται στο Σχήμα 3.4.



Σχήμα 3.4: Πειραματική Διάταξη UV Χρονικής Ανάλυσης Συντονισμού Raman.

Ο θερμικός παλμός που προκαλεί το άλμα θερμοκρασίας στο δείγμα επιτεύχθηκε μέσω της παραγωγής ενός υπέρυθρου παλμού (IR) από το Q-switched Nd:YAG laser. Συγκεκριμένα, η παραγωγή του υπέρυθρου θερμικού παλμού επιτεύχθηκε μέσω του φαινομένου επαγόμενου σκεδασμού Raman (Stimulated Raman Scattering, SR) στο αέριο H_2 , μέσω ενός δεύτερου σωλήνα 1 m. Σε αυτή την περίπτωση, το αέριο H_2 διεγείρεται χρησιμοποιώντας το βασικό μήκος κύματος ενός Nd:YAG laser στα 1064 nm και παίρνοντας την πρώτη μετατόπιση Stokes (κατά 4155 cm^{-1}) στα $1.9\text{ }\mu\text{m}$ ως το θερμικό παλμό. Για την παραγωγή αυτού του μήκους κύματος, υψηλές ενέργειες του laser και μεγάλες πιέσεις (40 bar) του αερίου είναι αναγκαίες. Κατά τη διαδικασία SR, μεγάλη ποσότητα θερμότητας μεταφέρεται στο αέριο H_2 , κάτι που μπορεί να προκαλέσει έκρηξη. Επίσης, με τη χρήση υψηλής ισχύος της δέσμης του laser, η θερμο-οπτική παραμόρφωση του δείκτη διάθλασης καταστρέφει την ποιότητα της οπτικής δέσμης, μειώνοντας την απόδοση μετατροπής της συχνότητας. Συνεπώς, ήταν αναγκαία η αγορά εμπορικού σωλήνα (Light Age Inc.) με δυνατότητα ανακύκλωσης του αερίου για την πιο αποδοτική και ασφαλή μετατροπή στα $1.9\text{ }\mu\text{m}$.

Στα πειράματα χρονικής ανάλυσης, ο υπέρυθρος παλμός παίρνει το ρόλο του παλμού διέγερσης (pump probe) ενώ ο παλμός διερεύνησης (probe pulse) που χρησιμοποιήθηκε είναι ένας υπεριώδης παλμός γύρω στα 200 nm και για παρακολούθηση αλλαγής της

δευτεροταγούς δομής. Ο χρόνος καθυστέρησης του παλμού διερεύνησης σε αυτά τα πειράματα στη χρονοκλίμακα νανοδευτερολέπτου σε σχέση με το θερμικό παλμό προσδιορίζεται με τη χρήση ψηφιακής γεννήτριας καθυστέρησης (Digital Delay Generator).

Με τη βοήθεια κατάλληλης διάταξης καθρεπτών και πρισμάτων οι δύο παλμοί εστιάζονται στην κυψελίδα που περιέχει το δείγμα. Ένα μεγάλο χρονικό διάστημα καταναλώθηκε στην εύρεση της βέλτιστης διάταξης για την καλύτερη διεξαγωγή των πειραμάτων, για αυτό και είναι σημαντικό να αναφερθούν εκτενέστερα αυτές οι προσπάθειες. Ένα πρώτο πρακτικό πρόβλημα στη διαδικασία αυτή ήταν παρακολούθηση της πορείας της δέσμης στα 1.9 μm , η οποία βρίσκεται στην υπέρυθρη περιοχή και δεν είναι ορατή. Συνήθως το πρόβλημα αυτό λύνεται με τη χρήση ενός μικρού laser He:Ne, το οποίο εκπέμπει στην κόκκινη περιοχή, και το οποίο ευθυγραμμίζεται ούτως ώστε να ακολουθεί ακριβώς την ίδια πορεία με το υπέρυθρο. Μετά από διάφορες διατάξεις και προσπάθειες, ορίστηκε η πορεία του υπέρυθρου χρησιμοποιώντας τη δέσμη στα 527 nm που εξέρχεται από το σωλήνα παραγωγής συχνοτήτων μαζί με το υπέρυθρο, και με τη στρέψη του πρίσματος Pellin Broca ο υπέρυθρος παλμός ο οποίος μπορεί να παρακολουθηθεί με ένα μετρητή ισχύος, και να διανύσει την ίδια πορεία. Η ευθυγράμμιση του υπέρυθρου και του υπεριώδους παλμού στα 200 nm έγινε με τη χρήση ενός καθρέφτη που αντανακλά στα 193 nm και αφήνει το υπέρυθρο να το διαπεράσει. Ένα δεύτερο πρακτικό πρόβλημα που εντοπίστηκε κατά τη διαδικασία ήταν το διαφορετικό μήκος εστίασης των τόσο διαφορετικών μηκών κύματος. Το πρόβλημα αυτό λύθηκε με την εισδοχή ενός μεγάλου μήκους εστίασης φακού στην υπέρυθρη δέσμη για να φέρει το μήκος εστίασης στο ίδιο σημείο με το υπεριώδες.

Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν την πρόκληση ενός μεγάλου άλματος θερμοκρασίας σε ένα δείγμα. Αυτοί είναι η ισχύς του laser, το μέγεθος της δέσμης φωτός στο δείγμα (*spot size*) και το πάχος του δείγματος. Το μεγαλύτερο άλμα θερμοκρασίας παράγεται με την αύξηση της ισχύος του υπέρυθρου παλμού, τη μείωση του *spot size* και πάχους του δείγματος. Εφόσον, όμως, η ένταση της δέσμης στο δείγμα αυξάνεται περισσότερο με τη μείωση του μεγέθους της δέσμης του φωτός, παρά με την αύξηση της ισχύος, επικεντρωθήκαμε στους δύο τελευταίους παράγοντες, εφόσον ο πρώτος παράγοντας μπορούσε εύκολα να ελεγχθεί από το ίδιο το laser. Η εύρεση κατάλληλου φακού μεγάλου μήκους εστίασης έπαιξε καθοριστικό ρόλο, όπως και ο σχεδιασμός του κατάλληλου δοχείου για το δείγμα. Κάτω από τις συνθήκες του πειράματος, είναι απαραίτητη η ανακύκλωση του δείγματος, ούτως ώστε ο παλμός του laser να προσπίπτει σε φρέσκο όγκο του δείγματος. Διάφορες παραλλαγές έχουν δοκιμαστεί. Η χρήση του περιστρεφόμενου σωλήνα, η οποία προσφέρεται για δείγματα που υπόκεινται αλλαγές φάσης, δεν ήταν

εφικτή, λόγω του μεγάλου πάχους του, που οδηγεί στην απορρόφηση του υπέρυθρου παλμού από το νερό και στη δημιουργία μιας ανομοιόμορφης κατανομής της θερμοκρασίας του δείγματος κάτι που αποτρέπει τις ακριβείς μετρήσεις. Η βέλτιστη διάταξη επομένως βρέθηκε να αποτελείται από ένα λεπτό υμένιο (*film*) δείγματος, το οποίο δημιουργείται λόγω της δύναμης της επιφανειακής τάσης όταν το δείγμα οδηγείται διαμέσου δύο λεπτών μεταλλικών συρμάτων (*wire-guided jet*). Έτσι το άλμα θερμοκρασίας διατηρήθηκε σταθερό σε όλο τον όγκο του δείγματος. Λόγω όμως της ανατροφοδότησης του δείγματος με αυτό τον τρόπο, και λόγω της μη αντιστρέψιμης διαδικασίας συσσωμάτωσης, αποφασίστηκε ο περιορισμός του άλματος θερμοκρασίας ώστε να είναι αρκετό για να ξεκινήσει τη διαδικασία αλλά να μείνει στην αντιστρέψιμη περιοχή.

Για τη διεξαγωγή πειραμάτων με χρονική ανάλυση είναι σημαντικός ο προσδιορισμός του χρόνου μηδέν, όπου ο παλμός διέγερσης (1.9 μm) και ο παλμός διερεύνησης (200 nm) φθάνουν ταυτοχρόνως στο δείγμα. Αυτό έγινε εφικτό με τη χρήση ψηφιακής γεννήτριας καθυστέρησης, η οποία ελέγχει τη στιγμή που απομακρύνεται ο κάθε παλμός από το laser, σε συνδυασμό με μια φωτοδίοδο ευαίσθητη και στις δύο περιοχές του φάσματος για την ανίχνευση και των δύο παλμών ταυτοχρόνως. Η φωτοδίοδος ενωμένη με έναν ψηφιακό παλμογράφο βοηθά στην απεικόνιση των δύο παλμών και στο συγχρονισμό τους. Έτσι, στη συνέχεια, ο παλμός διερεύνησης μπορεί να καθυστερηθεί χρονικά σε σχέση με το θερμικό παλμό στη χρονοκλίμακα νανοδευτερολέπτου και να κάνει δυνατή τη μέτρηση φασμάτων Raman σε διάφορες χρονικές στιγμές για την παρακολούθηση οποιωνδήποτε δομικών αλλαγών στο δείγμα.

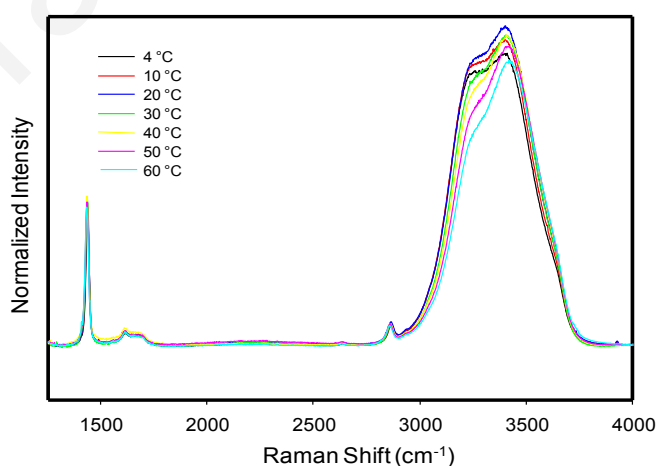
3.3.1 Άλμα Θερμοκρασίας

Γενικά το άλμα θερμοκρασίας δουλεύει ως μία αναστρέψιμη ώθηση για την αναδίπλωση ενός πρωτεϊνικού συστήματος, μέσω ακτινοβολίας ενός υδατικού δείγματος με έναν υπέρυθρο παλμό laser νανοδευτερολέπτου με μήκος κύματος $> 1.6 \mu\text{m}$. Ο παλμός απορροφάται απευθείας από αδύνατες υπέρτονες δονήσεις του νερού και στη συνέχεια διαχέεται μέσω δονητικής χαλάρωσης αυξάνοντας τη θερμοκρασία στον όγκο του νερού υπό διέγερση μέσα σε 100 πικοδευτερόλεπτα.³ Η θερμικά επαγόμενη αναδίπλωση/ξετύλιγμα έχει το πλεονέκτημα ότι δεν απαιτεί καθόλου αποικοδομητικά υλικά για την έναρξη της διαδικασίας, δίνοντας έτσι την ικανότητα της παρακολούθησης της διαδικασίας, κάτω από φυσικές συνθήκες διαλύτη. Μετά το άλμα θερμοκρασίας οι δομικές αλλαγές στα δείγματα ανιχνεύονται με τη μέθοδο TRRR. Αυτή η μέθοδος συνδυάζει όλα τα πλεονεκτήματα μιας δονητικής φασματοσκοπικής τεχνικής με την

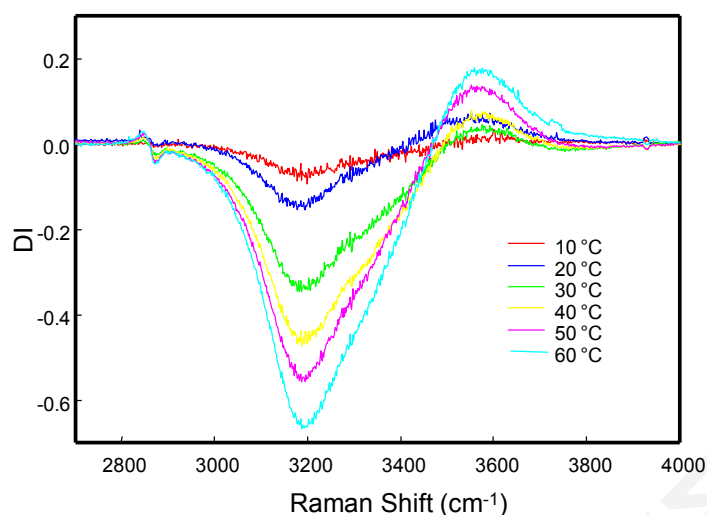
ικανότητα απευθείας παρακολούθησης της δυναμικής αντίδρασης. Παρέχει απευθείας κινητικές πληροφορίες σχετικά με την εμφάνιση και απόσβεση προϊόντων μέσω της χρονικής εξέλιξης των εντάσεων των κορυφών Raman. Επειδή το φάσμα Raman είναι ευαίσθητο στη μοριακή δομή, η TRRR μπορεί επίσης να προσφέρει πληροφορίες σχετικά με τη δομή φωτοπροϊόντων και την εξέλιξη της διαμόρφωσής τους (conformation) από τις συχνότητες μετάπτωσης ως προς το χρόνο.^{4,5} Σε ένα συνηθισμένο πείραμα TRRR, ένας παλμός διεγείρει τη φωτοχημεία υπό μελέτη και ο σκεδασμός από ένα δεύτερο χρονικά καθυστερημένο παλμό ακολουθείται χρονικά.⁵ Αφότου το πατρικό μόριο διεγερθεί, μια ποικιλία μηκών κύματος διερεύνησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για επιλεκτική ενίσχυση του σκεδασμού των προϊόντων.

3.3.3 Βαθμονόμηση Άλματος Θερμοκρασίας

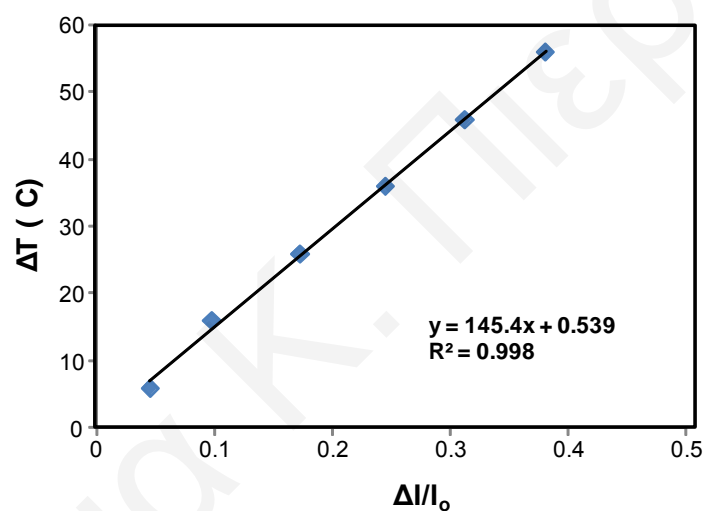
Ένα σημαντικό βήμα για τη διακρίβωση της έκτασης του άλματος θερμοκρασίας είναι η βαθμονόμηση του μεγέθους μετατροπής της θερμοκρασίας. Επομένως, για τη βαθμονόμηση λήφθηκαν στατικά φάσματα συντονισμού Raman του διαλύματος $\text{H}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COONa}$ συναρτήσει της θερμοκρασίας (4-60 °C). Όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.5, η συχνότητα και η μορφή της κορυφής που εμφανίζεται στους $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$, η οποία αντιστοιχεί στη συμμετρική και αντισυμμετρική δόνηση τάσης του OH του νερού, εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία.³ Επομένως, σχεδιάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης της διαφοράς της έντασης της κορυφής $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ του διαλύματος $\text{H}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COONa}$ στις διάφορες θερμοκρασίες σε σχέση με την ένταση στη χαμηλότερη θερμοκρασία, (Σχήμα 3.6) συναρτήσει της διαφοράς της θερμοκρασίας (Σχήμα 3.7). Ο υπολογισμός αυτός θα βοηθήσει στον υπολογισμό του άλματος θερμοκρασίας.



Σχήμα 3.5: Στατικά Φάσματα UVRR του διαλύματος $\text{H}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COONa}$, μετά από διέγερση στα 199.76 nm. Τα φάσματα κανονικοποιήθηκαν με βάση την κορυφή του τρι-φθοροοξικού νατρίου 1439 cm^{-1} .



Σχήμα 3.6: Φάσματα διαφοράς UVRR του διαλύματος $\text{H}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COONa}$, στις διάφορες θερμοκρασίες.



Σχήμα 3.7: Καμπύλη βαθμονόμησης της διαφοράς της θερμοκρασίας συναρτήσει της $\Delta I/I_0$ της κορυφής 3400 cm^{-1} του διαλύματος $\text{H}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COONa}$.

Λόγω του μεγάλου χρόνου που αναλώθηκε για την προετοιμασία της όλης οπτικής διάταξης, μόνο μερικά αρχικά πειράματα χρονικής ανάλυσης έχουν πραγματοποιηθεί στα πλαίσια αυτής της Διδακτορικής Διατριβής, με αποτελέσματα που συμφωνούν με τις προσδοκίες μας.

Βιβλιογραφία

- (1) Pieridou, G.; Hayes, S. C. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2009**, *11*, 5302.
- (2) Yamamoto, K.; Mizutani, Y.; Kitigawa, K. *Biophysical Journal* **2000**, *79*, 485.
- (3) Lednev I. K.; Karnoup A. S.; Sparrow M. C.; Asher S. A. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 8074.
- (4) Lawless, M. K.; Reid, P. J.; Mathies, R. A. In *Ultrafast Dynamics of Chemical Systems*; D.Simon, J., Ed.; Kluwer: Amsterdam, 1994; pp 267.
- (5) Thompson, P. A; Mathies, R. A.; A. B. Myers, Ed., John Wiley & Sons, Inc. New York, **1995**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ pK_a ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ RAMAN

4.1 Εισαγωγή

Στο παρόν κεφάλαιο παρατίθενται και συζητούνται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη της διαμόρφωσης του πεπτιδίου TTR(105-115) στην υγρή φάση, χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία συντονισμού Raman. Ο εκτενής χαρακτηρισμός της δομής του πεπτιδίου αυτού στην υγρή φάση, που πραγματοποιείται για πρώτη φορά στα πλαίσια της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, αποτελεί το πρώτο βήμα για την κατανόηση των δομικών αλλαγών που ενδέχεται να λάβουν χώρα κατά το σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων του πεπτιδίου.

Συγκεκριμένα, λήφθηκαν φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) στην υγρή φάση, μετά από διέγερση στα 239.5 nm που βρίσκεται σε συντονισμό με τη διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση L_a των δυο καταλοίπων Tyr στο πεπτίδιο. Η εκλεκτική ενίσχυση των χαρακτηριστικών δονήσεων της Tyr εξετάστηκε συναρτήσει του pH, επιτυγχάνοντας τον προσδιορισμό της τιμής του pK_a της πλευρικής αλυσίδας των καταλοίπων Tyr στο πεπτίδιο. Επιπρόσθετα, σύγκριση της τιμής του με την τιμή του pK_a του υδατικού διαλύματος της ελεύθερης Tyr που επίσης μελετήθηκε στην παρούσα Διατριβή αποκάλυψε σημαντικές πληροφορίες για το τοπικό περιβάλλον των δύο καταλοίπων Tyr στο πεπτίδιο.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η δομή και η λειτουργία των πρωτεϊνών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ισορροπία πρωτονίωσης των ιονιζόμενων καταλοίπων. Το pK_a των ιονιζόμενων καταλοίπων ενός πρωτεϊνικού συστήματος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στις αλλαγές του τοπικού περιβάλλοντος και επομένως η μελέτη του παρέχει σημαντικές ενδείξεις για δομικές αλλαγές στις οποίες υπόκειται το πρωτεϊνικό σύστημα.¹⁻⁷ Η τιμή του pK_a επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως οι δεσμοί υδρογόνου, η επιδιαλύτωση και οι αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου.⁸ Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα γειτονικά αμινοξέα δημιουργούν διαφορετικό μικροπεριβάλλον σε ένα ιονιζόμενο κατάλοιπο, αλλάζοντας την τιμή του pK_a του. Όταν τα κατάλοιπα διαθέτουν μεγάλη προσβάσιμη επιφάνεια στο διαλύτη, η τιμή του pK_a δεν επηρεάζεται σημαντικά, ενώ αντίθετα η τιμή του pK_a των καταλοίπων που είναι “θαμμένα” στην πρωτεϊνική δομή παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση και μπορεί να διαφέρει 4 με 5 μονάδες.^{2,9,10}

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μεγάλη δραστηριότητα στους κλάδους της υπολογιστικής βιολογίας και χημείας με στόχο την ανάπτυξη θεωρητικών μεθόδων για τον υπολογισμό της τιμής του pK_a των ιονιζόμενων καταλοίπων σε μια πρωτεΐνη.^{2,8,11-13} Η πρόβλεψη και θεωρητική ερμηνεία της τιμής του pK_a δίνει ενθαρρυντικά αποτελέσματα που μπορούν παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τη δομή και τις ιδιότητες των πρωτεϊνών.

Έχει παρατηρηθεί ότι η σύγκριση της τιμής του pK_a -R (pK_a της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος) των αμινοξέων σε ένα πεπτίδιο ή μια πρωτεΐνη με την τιμή του pK_a των υδατικών διαλυμάτων των αντίστοιχων ελεύθερων αμινοξέων, δίνει ενδείξεις για την έκταση της αλληλεπίδρασης με το νερό και συνεπώς της προσβάσιμης επιφάνειας των καταλοίπων στο διαλύτη μέσα σε ένα πεπτίδιο ή μια πρωτεΐνη.^{6,10} Η τιμή του pK_a των αρωματικών καταλοίπων μπορεί να προσδιοριστεί πειραματικά με πολλές μεθόδους, συμπεριλαμβανομένης της φασματοσκοπίας φθορισμού.^{3,4,14} Εντούτοις, η χρήση της φασματοσκοπίας Raman μπορεί να προσφέρει επιπλέον πληροφορίες σχετικά με τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών, όπως το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, καθιστώντας την μια ιδανική μέθοδο.

4.2 Πειραματικές Συνθήκες

Στην παρούσα φασματοσκοπική μελέτη παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα του πεπτιδίου TTR(105-115) και της L-Τυροσίνης σε συγκεντρώσεις 1.4 και 2.8 mg/mL κατά μέσο όρο, αντίστοιχα. Η ακριβής συγκέντρωση για κάθε διάλυμα υπολογίστηκε με τη χρήση της Φασματοσκοπίας Ορατού-Υπεριώδους (UV-vis), χρησιμοποιώντας το μοριακό συντελεστή απορρόφησης της Tyr στα 274 nm ($1.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) και της αποπρωτονιωμένης μορφής της Tyr⁻ στα 293 nm ($2.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), αντίστοιχα. Τα φάσματα απορρόφησης λήφθηκαν με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου Shimadzu. Τα υδατικά διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν αμέσως μετά τη σταθεροποίηση της τιμής του pH, ρυθμίζοντάς την με την προσθήκη μικρών ποσοτήτων HCl και NaOH. Η μέτρηση του pH πραγματοποιήθηκε με χρήση pH-μέτρου εφοδιασμένον με εξειδικευμένο ηλεκτρόδιο Minitrode (Hamilton), κατάλληλο για μικρές ποσότητες δείγματος. Μετά την έκθεση των διαλυμάτων στο laser, δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στην τιμή του pH. Η θερμοκρασία των διαλυμάτων διατηρήθηκε σταθερή στους 10 °C σε όλη τη διάρκεια συλλογής δεδομένων. Κάθε φάσμα που παρουσιάζεται στο παρόν κεφάλαιο αποτελεί άθροισμα 12 φασμάτων με χρόνο συλλογής δεδομένων δέκα λεπτών ανά φάσμα. Η βαθμονόμηση της συχνότητας των φασμάτων έγινε με τη χρήση εξωτερικού προτύπου και συγκεκριμένα του κυκλοεξανίου.

Η επεξεργασία και η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με χρήση των προγραμμάτων Matlab και Origin.

Στα υδατικά διαλύματα του πεπτιδίου δεν χρησιμοποιήθηκε κανένα εσωτερικό πρότυπο, όπως θειικό άλας, λόγω επιτάχυνσης της διαδικασίας συσσωμάτωσης του πεπτιδίου. Επομένως, η τιμή του pK_a προσδιορίστηκε από τις μετατοπίσεις της δόνησης Y_{8a} της Tyr. Είναι γνωστό ότι στην πρωτονιωμένη μορφή της Tyr, η κορυφή Y_{8a} εμφανίζεται στους 1617 cm^{-1} , ενώ η αντίστοιχη κορυφή στην αποπρωτονιωμένη μορφή εμφανίζεται στους 1603 cm^{-1} .¹⁵ Από την αλλαγή στη συχνότητα της κορυφής Y_{8a} συναρτήσει του pH, σχεδιάστηκε η καμπύλη τιτλοδότησης για την Tyr. Η τιμή του pK_a υπολογίστηκε μετά από προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στην Εξίσωση (4.1).

$$v_{\text{obs}} = \frac{(v_{\text{HA}} + v_{\text{A}^-} \times 10^{(\text{pH}-\text{pKa})})}{(1 + 10^{(\text{pH}-\text{pKa})})} \quad (4.1)$$

4.3 Μεθοδολογία Προσδιορισμού του pK_a

Η συνάρτηση (4.1) προκύπτει από την εξίσωση Henderson - Hasselbach, όπου v_{HA} και v_{A^-} είναι οι πειραματικές συχνότητες της πρωτονιωμένης και της αποπρωτονιωμένης μορφής της Tyr, αντίστοιχα.

Η Εξίσωση 4.1 παράγεται από τη διαδικασία που ακολουθείται συνήθως για τον υπολογισμό του ισοηλεκτρικού σημείου πολυπεπτιδίων.¹⁶ Η όξινη σταθερά διάστασης (K_a) σε κατάσταση ισορροπίας είναι η εξής:



$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (4.3)$$

Οι παρενθέσεις που χρησιμοποιούνται στην Εξίσωση 4.3 δηλώνουν τις συγκεντρώσεις των ειδών. Ο βαθμός διάστασης του οξέος, α , μπορεί να περιγραφεί ως ο λόγος του αριθμού των αρνητικά φορτισμένων ειδών, A^- , ως προς το συνολικό αριθμό των ουδέτερων και των αρνητικά φορτισμένων ειδών A που περιέχονται ανά μόριο:

$$\alpha = \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}] + [\text{A}^-]} \quad (4.4)$$

Η αναλογία αυτή μπορεί επίσης να εκφραστεί όσον αφορά τη συχνότητα και στη συνέχεια να συνδυαστεί με την έκφραση K_a . Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση μιας κλίμακας για τη συχνότητα, τα όρια της οποίας να είναι η συχνότητα της πρωτονιωμένης και της αποπρωτονιωμένης μορφής του οξέος. Σε αυτή την κλίμακα συμπεριλαμβάνεται και η παρατηρούμενη συχνότητα v_{obs} , η οποία εμπίπτει μεταξύ των δύο οριακών τιμών. Επομένως, ο βαθμός διάστασης α μπορεί να εκφραστεί ως:

$$\alpha = \frac{v_{obs} - v_{HA}}{v_{A^-} - v_{HA}} \quad (4.5)$$

Η ορθή οριακή συμπεριφορά της πιο πάνω εξίσωσης μπορεί να ελεγχθεί σε υψηλές και χαμηλές τιμές pH. Αν $v_{obs} = v_{HA}$, π.χ. σε χαμηλές τιμές pH, τότε $\alpha = 0$ (δηλαδή δεν παρατηρείται καθόλου διάσταση). Σε υψηλές τιμές pH, $v_{obs} = v_{A^-}$, τότε $\alpha = 1$, που αντιστοιχεί σε πλήρη διάσταση του οξέος. Ο συνδυασμός των Εξισώσεων (4.4) και (4.5) οδηγεί σε:

$$\alpha = \frac{v_{obs} - v_{HA}}{v_{A^-} - v_{HA}} = \frac{[A^-]}{[HA] + [A^-]} = \frac{\frac{[A^-]}{[HA]}}{1 + \frac{[A^-]}{[HA]}} = \frac{\frac{K_a}{[H^+]}}{1 + \frac{K_a}{[H^+]}} \quad (4.6)$$

Λύνοντας ως προς την παρατηρούμενη συχνότητα v_{obs} :

$$v_{obs} = \frac{v_{HA} + (v_{A^-}) \frac{K_a}{[H^+]}}{1 + \frac{K_a}{[H^+]}} \quad (4.7)$$

Και με χρήση των ταυτοτήτων:

$$\frac{1}{[H^+]} = 10^{pH}, \text{ όπου } pH = -\log[H^+] \quad (4.8)$$

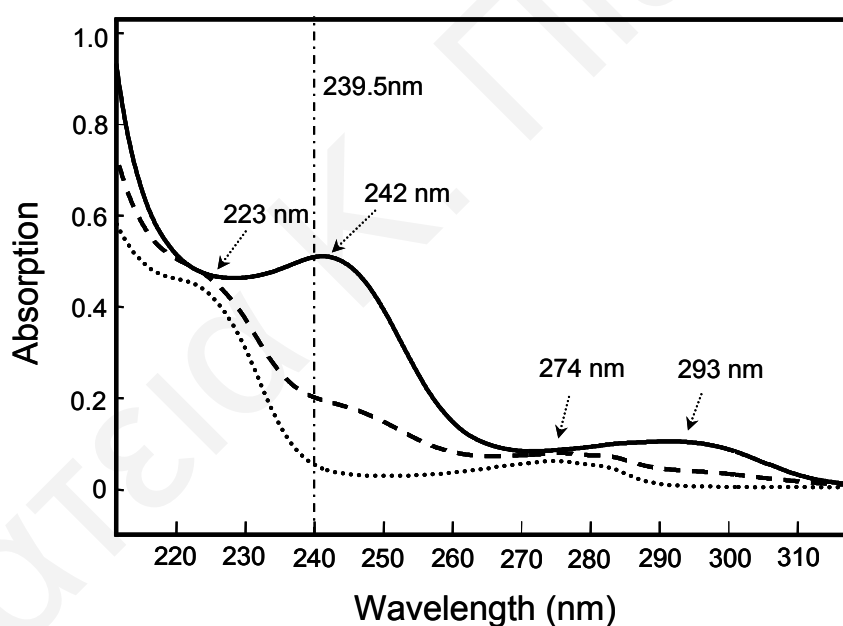
$$K_a = 10^{-pK_a}, \text{ όπου } pK_a = -\log K_a \quad (4.9)$$

προκύπτει η τελική μορφή της Εξίσωσης 4.1.

4.4 Πειραματικά Αποτελέσματα

4.4.1 Φάσματα Απορρόφησης του Πεπτιδίου TTR(105-115)

Το Σχήμα 4.1 παρουσιάζει το φάσμα ηλεκτρονιακής απορρόφησης του πεπτιδίου TTR(105-115), συναρτήσει του pH. Σε pH 6.2, εμφανίζονται δύο ισχυρές κορυφές στα 223 και 274 nm οι οποίες σχετίζονται με τις μεταπτώσεις $\pi \rightarrow \pi^*$ των διεγερμένων ηλεκτρονιακών καταστάσεων L_a και L_b , αντίστοιχα, των δύο καταλοίπων Tyr στο πεπτίδιο. Η ερυθρή μετατόπιση που παρατηρείται στις κορυφές στα 242 και 293 nm με την αύξηση του pH και συγκεκριμένα σε τιμή 11.7 οφείλεται στη μετατροπή της πρωτονιωμένης μορφής της Tyr (Tyr-OH) στην αποπρωτονιωμένη της μορφή (Tyr-O⁻).^{6,15} Σε pH 10.5, παρατηρείται μια ενδιάμεση κατάσταση και με τις τέσσερις κορυφές να είναι εμφανείς στο φάσμα απορρόφησης, δηλώνοντας έτσι τη συνύπαρξη των δύο μορφών Tyr/Tyr⁻.

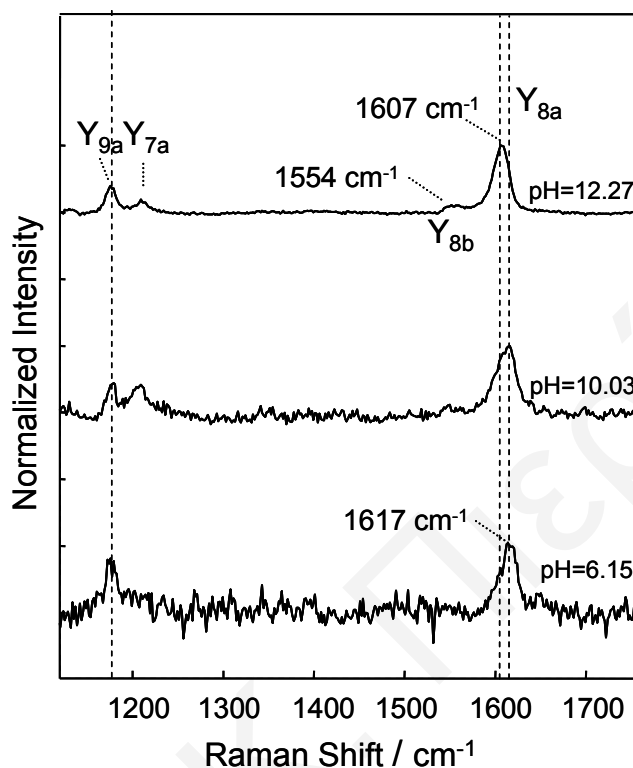


Σχήμα 4.1: Φάσμα ηλεκτρονιακής απορρόφησης του πεπτιδίου TTR(105-115) σε pH = 6.2 (—), 10.5 (.....), 11.7 (---). Η κατακόρυφη γραμμή δηλώνει το μήκος διέγερσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

4.4.2 Φάσματα Συντονισμού Raman του Πεπτιδίου TTR(105-115)

Η διέγερση στα 239.5 nm ενισχύει το σκεδασμό Raman από τις δονήσεις που σχετίζονται με τη φαινολική πλευρική αλυσίδα των καταλοίπων Tyr στο πεπτίδιο που όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στις αλλαγές του τοπικού περιβάλλοντος και στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με το διαλύτη, παρέχοντας

σημαντικές πληροφορίες για τη δομή του πεπτιδίου.¹⁷⁻²³ Στο Σχήμα 4.2 παρουσιάζονται τα φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) σε τιμές pH 6.2, 10, και 12.3, μετά από διέγερση στα 239.5 nm.²⁴

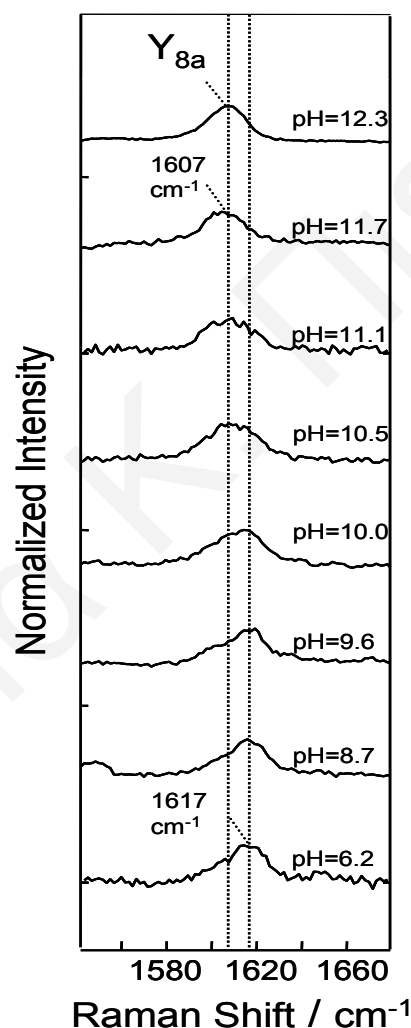


Σχήμα 4.2: Φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) συναρτήσεως του pH, μετά από διέγερση στα 239.5 nm. Στα φάσματα παρουσιάζονται οι δονήσεις των καταλοίπων Tyr στο πεπτίδιο.²⁴

Σε χαμηλές τιμές pH, παρατηρούνται δονήσεις στα 1178 (Y_{9a}), 1208 (Y_{7a}) και 1617 cm^{-1} (Y_{8a}), οι οποίες σχετίζονται με τη συνεισφορά της δόνησης κάμψης C-H του αρωματικού δακτυλίου, της δόνησης τάσης των ατόμων του άνθρακα και της συμμετρικής δόνησης τάσης του αρωματικού δακτυλίου, αντίστοιχα. Η αντισυμμετρική δόνηση τάσης του αρωματικού δακτυλίου Y_{8b} λόγω της μικρής διατομής σκεδασμού της δεν παρατηρείται σε χαμηλές τιμές pH, ενώ αντίθετα σε υψηλές τιμές pH η κορυφή Y_{8b} γίνεται εμφανής στο φάσμα λόγω της ερυθρής μετατόπισης που υπόκειται η κορυφή απορρόφησης L_a , ενισχύοντας ακόμη περισσότερο το σκεδασμό Raman στα 239.5 nm. Η αύξηση του σκεδασμού σε υψηλές τιμές pH αντικατοπτρίζεται και στα φάσματα όπου παρατηρείται βελτίωση του σήματος σε σχέση με το θόρυβο. Η αύξηση του pH προκαλεί επίσης μετατόπιση των κορυφών Y_{8a} και Y_{8b} στους 1607 και 1554 cm^{-1} , αντίστοιχα, δηλώνοντας την παρουσία της αποπρωτονιωμένης μορφής της Tyr (Σχήμα 4.2). Επιπλέον,

παρατηρείται μικρή ερυθρή μετατόπιση στη συχνότητα της κορυφής Y_{9a} ($\sim 2 \text{ cm}^{-1}$), ενώ αντίθετα η συχνότητα της Y_{7a} εμφανίζεται λιγότερο ευαίσθητη στις αλλαγές του pH.

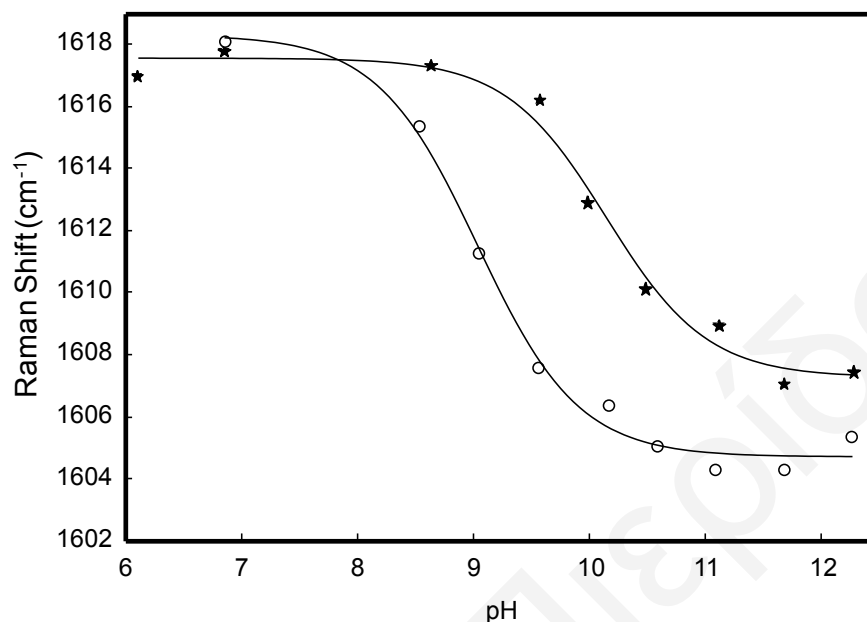
Στο Σχήμα 4.3 παρουσιάζεται η εξέλιξη της κορυφής Y_{8a} συναρτήσει του pH στα φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115). Με την αύξηση του pH γίνεται ευδιάκριτος ένας ώμος στην πλευρά της χαμηλότερης συχνότητας της κορυφής Y_{8a} . Η εμφάνιση της ευρείας αυτής κορυφής αποτελεί ένδειξη της ταυτόχρονης ύπαρξης της πρωτονιωμένης και αποπρωτονιωμένης μορφής της Tyr. Σε $\text{pH} = 12.3$, η κορυφή Y_{8a} γίνεται πιο οξεία και μετατοπίζεται στους 1607 cm^{-1} .



Σχήμα 4.3: Φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) στην περιοχή της δόνησης Y_{8a} συναρτήσει του pH, μετά από διέγερση στα 239.5 nm.

Η αλλαγή της συχνότητας της κορυφής Y_{8a} συναρτήσει του pH παράγει την καμπύλη τιλοδότησης για τα κατάλοιπα Tyr στο πεπίδιο, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.4. Με προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας την Εξίσωση 4.1,

υπολογίστηκε η τιμή του pK_a της πλευρικής αλυσίδας των καταλοίπων Tyr και η καλύτερη εφαρμογή ολοκληρώθηκε με τιμή του pK_a 10.2 ± 0.2 .²⁴

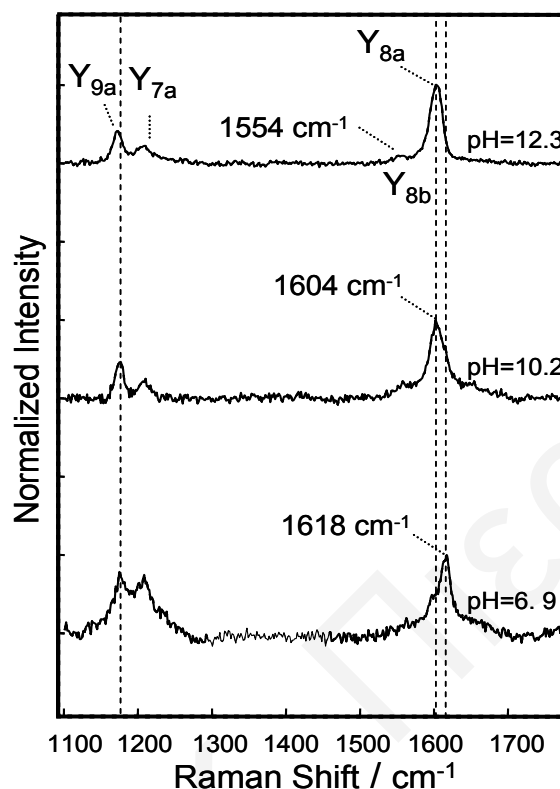


Σχήμα 4.4: Καμπύλες τιτλοδότησης του TTR(105-115) (αστέρια) και του υδατικού διαλύματος της ελεύθερης Tyr (ανοικτοί κύκλοι). Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της καμπύλης τιτλοδότησης χρησιμοποιώντας την Εξίσωση (4.1). Οι τιμές των pK_a είναι 10.2 ± 0.2 και 9.1 ± 0.2 , αντίστοιχα.²⁴

4.4.3 Φάσματα Συντονισμού Raman Υδατικού Διαλύματος Τυροσίνης

Ο προσδιορισμός της τιμής του pK_a των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων σε πρωτεΐνες και πεπτίδια και η σύγκρισή του με το pK_a στην υδατική τους μορφή, βοηθούν σε σημαντικό βαθμό τις δομικές τους μελέτες. Παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με το πώς η αλλαγή στο τοπικό περιβάλλον των καταλοίπων επηρεάζει τη διαδικασία αναδίπλωσης και συνεπώς συμβάλλουν σημαντικά στον προσδιορισμό της δομής που υιοθετούν οι πρωτεΐνες. Επομένως, στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε η τιμή του pK_a υδατικού διαλύματος της ελεύθερης Tyr ώστε να αποτελέσει μέτρο σύγκρισης για τη μελέτη των καταλοίπων Tyr στο πεπτίδιο. Ενδεικτικά, στο Σχήμα 4.5 παρουσιάζονται φάσματα UVRR υδατικού διαλύματος της ελεύθερης Tyr συναρτήσει του pH, μετά από διέγερση στα 239.5 nm. Από τα φάσματα παρατηρείται ότι η δόνηση Y_{8a} εμφανίζει όμοια συμπεριφορά όπως στην περίπτωση του πεπτιδίου TTR(105-115) (Σχήμα 4.2). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε υψηλές τιμές pH, η κορυφή Y_{8a} μετατοπίζεται σε χαμηλότερη συχνότητα (1604 cm^{-1}) εν αντιθέσει με το πεπτίδιο (1607 cm^{-1}). Επιπρόσθετα, με την αύξηση του pH η κορυφή Y_{9a} υπόκειται σε ερυθρή μετατόπιση από τους 1178 στους 1173 cm^{-1} , η οποία

σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οφείλεται στην παρουσία της αποπρωτονιωμένης μορφής της Tyr^- .^{15,25}



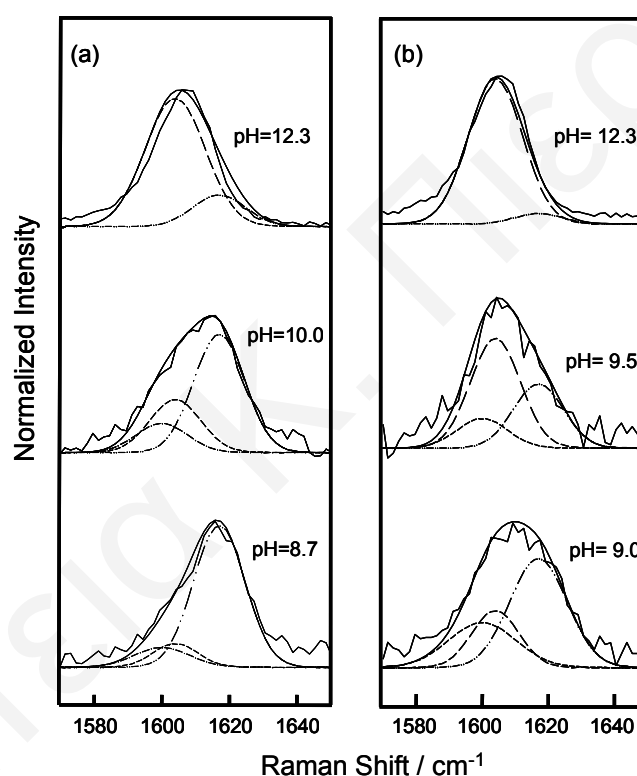
Σχήμα 4.5: Φάσματα UVRR υδατικού διαλύματος της ελεύθερης Tyr συναρτήσει του pH, μετά από διέγερση στα 239.5 nm.

Οι Takeuchi *et al.*, οι οποίοι μελέτησαν την π -κρεσόλη ως μοντέλο της Tyr, πρότειναν ότι η μετατόπιση στη συχνότητα της κορυφής Y_{9a} οφείλεται στην αποπρωτονίωση του φαινολικού OH ή στην αλλαγή της διεδρής γωνίας COH.²⁶ Επομένως, η μετατόπιση που εμφανίζει η κορυφή Y_{9a} της Tyr οφείλεται στην απώλεια του πρωτονίου του OH του δακτυλίου, ή στον απεντοπισμό του αρνητικού φορτίου του φορτισμένου οξυγόνου (O^-) του αρωματικού δακτυλίου. Η συζήτηση αυτή θα πραγματοποιηθεί εκτενέστερα στη συνέχεια.

Η καμπύλη τιτλοδότησης της ελεύθερης Tyr όπως εξάχθηκε από την αλλαγή της συχνότητας της κορυφής Y_{8a} συναρτήσει του pH, παρουσιάζεται στο γράφημα του Σχήματος 4.4. Η τιμή του pK_a για την ελεύθερη Tyr που υπολογίστηκε μετά από την προσαρμογή της καμπύλης τιτλοδότησης στην Εξίσωση (4.1) έχει βρεθεί να είναι ίση με 9.1 ± 0.2 .²⁴

4.4.4 Εναλλακτική Προσέγγιση του Προσδιορισμού του pK_a

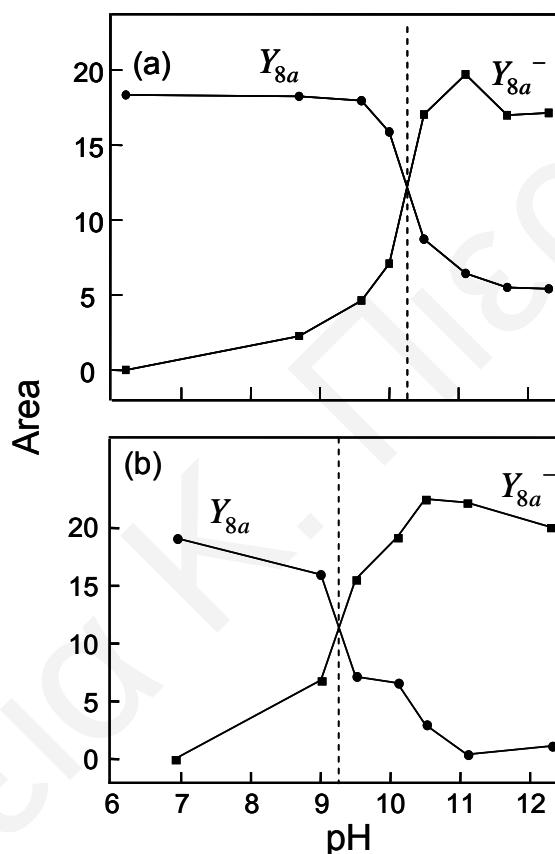
Η τιμή του pK_a της πλευρικής αλυσίδας της Tyr στο πεπτίδιο TTR(105-115) και στο υδατικό διάλυμα της προσδιορίστηκε εκτός από τις μετατοπίσεις της κορυφής Y_{8a} , με τη χρήση μιας εναλλακτικής προσέγγισης. Συγκεκριμένα, λήφθηκαν υπόψη οι συγκεντρώσεις των διαφόρων ειδών που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της τιτλοδότησης, όπως προέκυψαν από τη διαδικασία κατάλληλης αποσυνέλιξης της κορυφής που αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης του αρωματικού δακτυλίου στους $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$. Στο Σχήμα 4.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αποσυνέλιξης συναρτήσεως του pH για το πεπτίδιο και το υδατικό διάλυμα της Tyr.



Σχήμα 4.6: Αποσυνέλιξη της κορυφής Y_{8a} (a) TTR(105-115), (b) της ελεύθερης Tyr συναρτήσεως του pH: (τελεία-διακεκομμένη γραμμή) 1600 cm^{-1} , (διακεκομμένη γραμμή) 1604 cm^{-1} , (τελεία-τελεία-διακεκομμένη γραμμή) 1617 cm^{-1} , (γραμμή) άθροισμα όλων των ειδών.

Σε χαμηλές τιμές pH ($\sim \text{pH } 6$), φάσματα των οποίων δεν παρουσιάζονται εδώ, η κορυφή αυτή αποτελείται από δύο είδη τα οποία αντιστοιχούν στη συμμετρική (Y_{8a} , 1617 cm^{-1}) και αντισυμμετρική (Y_{8b} , 1600 cm^{-1}) δόνηση τάσης του αρωματικού δακτυλίου της πρωτονιωμένης μορφής της Tyr. Με την αύξηση όμως της τιμής του pH παρατηρείται ο σχηματισμός ενός τρίτου είδους το οποίο αντιστοιχεί στη συμμετρική δόνηση τάσης του αρωματικού δακτυλίου της αποπρωτονιωμένης μορφής της Tyr (Y_{8a}^- , 1604 cm^{-1}). Η

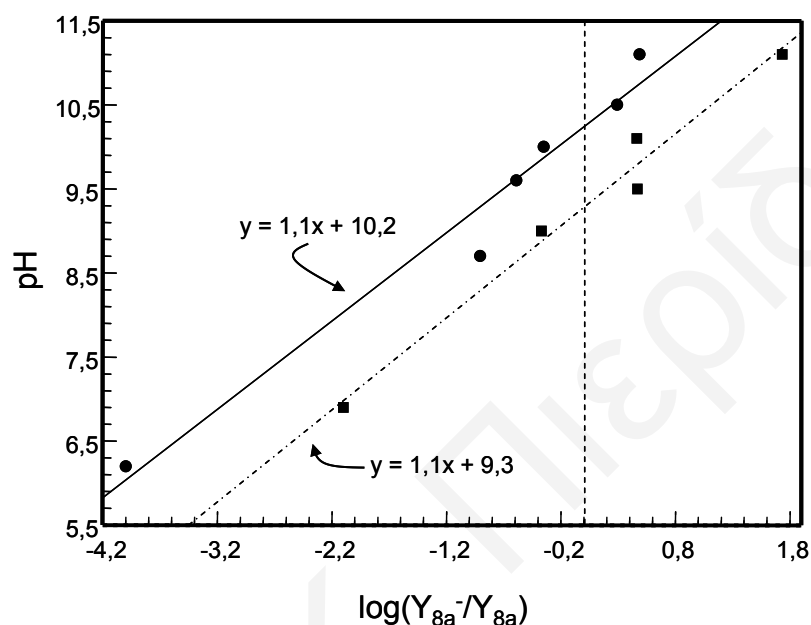
συνύπαρξη των τριών ειδών είναι ιδιαίτερα σημαντική, και αποτελεί κλειδί για την εξήγηση των αποτελεσμάτων. Σε υψηλές τιμές του pH (~ pH 12), η αντισυμμετρική δόνηση Y_{8b} μετατοπίζεται στους 1555 cm^{-1} και επομένως δεν λαμβάνει μέρος στη διαδικασία της αποσυνέλιξης. Το εμβαδόν των κορυφών που αντιστοιχούν στα είδη Y_{8a} και Y_{8a}^- , όπως έχει υπολογιστεί από την αποσυνέλιξη σε συνάρτηση με την τιμή του pH αποτελούν τις καμπύλες τιτλοδότησης (a) για το πεπτιδίο TTR(105-115) και (b) για το υδατικό διάλυμα της Tyr (Σχήμα 4.7).



Σχήμα 4.7: Καμπύλες τιτλοδότησης (a) του πεπτιδίου TTR(105-115) (b) της ελεύθερης Tyr με χρήση των εμβαδών όπως έχουν προκύψει από την αποσυνέλιξη στο Σχ. 4.6. Η τιμή του pK_a σε κάθε περίπτωση αντιστοιχεί στο σημείο τομής των καμπυλών της Y_{8a} και Y_{8a}^- και υποδεικνύεται με τη διακεκομμένη γραμμή (pK_a (TTR(105-115)) = 10.3 και (pK_a (Tyr) = 9.2).

Η τιμή του pK_a σε κάθε περίπτωση αντιστοιχεί στο σημείο τομής των καμπυλών της Y_{8a} και Y_{8a}^- και υποδεικνύεται με τη διακεκομμένη γραμμή (pK_a (TTR(105-115)) = 10.3 και (pK_a (Tyr) = 9.2). Οι τιμές αυτές επιβεβαιώθηκαν από το γράφημα της τιμής του pH συναρτήσει του λογαριθμικού λόγου των εμβαδών των ειδών Y_{8a}^-/Y_{8a} στο πεπτιδίο και στο διάλυμα της Tyr, αντίστοιχα (Σχήμα 4.8). Η προσαρμογή των δεδομένων με χρήση γραμμικής παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων έδωσε καμπύλη μορφής Henderson-Hasselbach, στην οποία η τομή της με τον άξονα y αντιστοιχεί στην τιμή του pK_a για κάθε

περίπτωση (pK_a (TTR (105-115)) = 10.2, pK_a (Tyr) = 9.3). Η προσεγγιστική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε έδειξε ότι τα κατάλοιπα Tyr στο πεπτίδιο εμφανίζουν μεγαλύτερη τιμή pK_a της τάξης της μιας μονάδας σε σύγκριση με την τιμή της ελεύθερης Tyr, παρατήρηση που συμφωνεί πλήρως με τα αποτελέσματα που προέκυψαν χρησιμοποιώντας τις αλλαγές στη συχνότητα συναρτήσεως του pH.

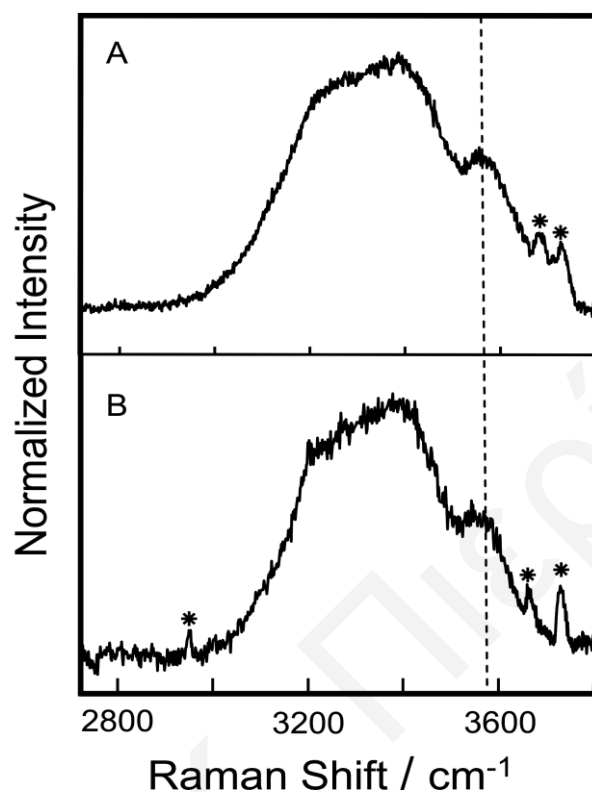


Σχήμα 4.8: Γραφική παράσταση της τιμής του pH συναρτήσεως του λογαριθμικού λόγου των εμβαδών για τα είδη Y_{8a}^- και Y_{8a} στο πεπτίδιο TTR(105-115) (κύκλοι) και στο διάλυμα Tyr (τετράγωνα). Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή των δεδομένων με χρήση γραμμικής παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων. Η κάθετη γραμμή δηλώνει τον y άξονα όταν το $x = 0$.

4.4.5 Παρατήρηση Φαινολικού Υδροξυλίου

Για περαιτέρω μελέτη της επίδρασης του τοπικού περιβάλλοντος στη διαμόρφωση του πεπτιδίου στην υγρή φάση, λήφθηκαν φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων, συναρτήσεως του pH. Με τη μελέτη της περιοχής αυτής μπορεί να διερευνηθεί άμεσα η συμπεριφορά της δόνησης τάσης του φαινολικού υδροξυλίου OH της πλευρικής αλυσίδας των καταλοίπων Tyr στο πεπτίδιο. Στο Σχήμα 4.9 παρουσιάζονται τα φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) (A) σε pH 9.1 και (B) σε pH 12.1. Η ευρεία κορυφή που παρουσιάζεται στην περιοχή μεταξύ $3000 - 3700 \text{ cm}^{-1}$ οφείλεται στη δόνηση τάσης του OH του νερού, ενώ ο ευδιάκριτος ώμος που εμφανίζεται στους 3558 cm^{-1} αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης του φαινολικού OH της Tyr.¹⁷ Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η κορυφή αυτή παρατηρείται σε όλο το εύρος των τιμών pH που έχει χρησιμοποιηθεί στην παρούσα μελέτη, γεγονός που υποδεικνύει ότι η

φαινολική πλευρική αλυσίδα OH παραμένει πρωτονιωμένη σε όλη τη διάρκεια της τιτλοδότησης.



Σχήμα 4.9: Φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων σε (A) $pH = 9.1$, και (B) $pH = 12.1$. Οι κορυφές που παρουσιάζονται με αστεράκι αντιστοιχούν σε τυχαία σκέδαση.

4.5 Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Στο κεφάλαιο αυτό, έγινε χαρακτηρισμός της δομής του πεπτιδίου TTR(105-115) στην υγρή φάση, με τη χρήση της φασματοσκοπίας συντονισμού Raman. Η διέγερση στα 239.5 nm επιτρέπει τη μελέτη των αρωματικών καταλοίπων Tyr στο πεπτίδιο. Η Tyr όπως έχει αναφερθεί, χρησιμοποιείται εκτεταμένα σε μελέτες συντονισμού Raman, ως ένα πολύ καλό σημείο ελέγχου για τη διερεύνηση του τοπικού περιβάλλοντος των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, οι δονήσεις που σχετίζονται με το φαινολικό δακτύλιο είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στις αλλαγές του τοπικού περιβάλλοντος και ειδικότερα στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με το φαινολικό OH.^{19,26-29}

Το πεπτίδιο TTR(105-115) περιέχει δύο κατάλοιπα τυροσίνης. Το κατάλοιπο Tyr105 βρίσκεται στο N-τελικό άκρο και γειτνιάζει με τη Thr106, ενώ το κατάλοιπο Tyr114 βρίσκεται ανάμεσα στα κατάλοιπα Ser112 και Ser115, των οποίων οι πλευρικές αλυσίδες έχουν δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και επομένως μπορούν να ενεργήσουν

ως δότες ή δέκτες πρωτονίου. Επιπλέον, το κατάλοιπο Tyr114 γειτνιάζει με τη Pro113 που στη φυσική μορφή της πρωτεΐνης έχει βρεθεί ότι λαμβάνει μέρος στο σχηματισμό στροφής,³⁰ που είναι πιθανό να εξακολουθεί να σχηματίζεται και στο “απομονωμένο” πεπτίδιο.

4.5.1 Προσδιορισμός του pK_a

Η μελέτη των χαρακτηριστικών δονήσεων της Tyr στο πεπτίδιο TTR(105-115) συναρτήσεως του pH έδειξε ότι τα κατάλοιπα Tyr εμφανίζουν υψηλότερη τιμή pK_a σε σχέση με το υδατικό διάλυμα της ελεύθερης Tyr. Η υψηλότερη τιμή του pK_a υποδεικνύει την παρουσία ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων που εμποδίζουν την αποπρωτονίωση του φαινολικού OH. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές πιθανόν να οφείλονται στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου και μπορεί να διακρίνονται σε (α) αλληλεπιδράσεις μεταξύ πλευρικών αλυσίδων και (β) αλληλεπιδράσεις με την κύρια αλυσίδα του πεπτιδίου. Τα κατάλοιπα Ser112 και Ser115 που γειτνιάζουν με το κατάλοιπο Tyr114 μπορούν να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το φαινολικό OH, προστατεύοντάς το από την απώλεια του πρωτονίου, όταν η τιμή του pH αυξάνεται. Επιπρόσθετα, το κατάλοιπο Thr106 μπορεί να εμπλέκεται στο σχηματισμό δεσμού υδρογόνου με το φαινολικό OH του Tyr114, εάν η διαμόρφωση του πεπτιδίου είναι τέτοια ώστε οι πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων αυτών να βρίσκονται σε κοντινή απόσταση. Μια άλλη πιθανότητα είναι η αλληλεπίδραση με καρβονυλικές ομάδες της κύριας αλυσίδας στην παρουσία στροφών κατά μήκος της αλληλουχίας του πεπτιδίου, προστατεύοντας επίσης την αποσύνδεση του πρωτονίου του OH. Εξάλλου, οι Jarvis *et al.*, μελετώντας τη δομή του πεπτιδίου μετά από ισοτοπική ανταλλαγή H/D με φασματοσκοπία NMR,²⁹ έδειξαν ότι το πρωτόνιο NH που αντιστοιχεί στο κατάλοιπο Tyr114, μαζί με αυτό από τη Leu110, παρουσιάζουν το μικρότερο ρυθμό ανταλλαγής, γεγονός που δηλώνει τη μικρή έκθεσή τους στο διαλύτη και συνεπώς τη συμμετοχή τους στο σχηματισμό στροφής ή έλικας στη δομή του πεπτιδίου.³¹

Το δεύτερο κατάλοιπο Tyr105 βρίσκεται στο N-τελικό άκρο του πεπτιδίου, και είναι σε ένα διαφορετικό τοπικό περιβάλλον από το κατάλοιπο Tyr114, έχοντας μεγαλύτερη προσβάσιμη επιφάνεια στο διαλύτη. Στην περίπτωση αυτή, το κατάλοιπο Tyr105 είναι περισσότερο επιρρεπές στην αλλαγή του pH και παρουσιάζει όμοια συμπεριφορά με το υδατικό διάλυμα της ελεύθερης Tyr. Επομένως, σε υψηλές τιμές pH, η πλευρική αλυσίδα του Tyr105 αποπρωτονιώνεται με αποτέλεσμα οι κορυφές που εμφανίζονται στο φάσμα του Σχήματος 4.2 να αντιστοιχούν στις δονήσεις της αποπρωτονιωμένης μορφής του καταλοίπου αυτού.

Είναι λοιπόν πιθανό τα δύο κατάλοιπα Tyr105 και Tyr114 να υπόκεινται σε δύο ξεχωριστά μικροπεριβάλλοντα μέσα στο ίδιο πεπτίδιο, με την τιμή pK_a να αντιστοιχεί σε ένα μέσο όρο μεταξύ των δύο. Εντούτοις, η καμπύλη βαθμονόμησης που παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.4 δεν αποδεικνύει την ύπαρξη δύο διαφορετικών pK_a , πιθανόν λόγω της μικρής διαφοράς μεταξύ των δύο μικροπεριβάλλοντων, η οποία δεν είναι εφικτό να διακριθεί με την παρούσα διακριτική ικανότητα σε συχνότητα που χαρακτηρίζει την τεχνική της φασματοσκοπίας συντονισμού Raman στην περιοχή του υπεριώδους.

4.5.2 Μελέτη Μετατόπισης Συχνοτήτων

Για την επιβεβαίωση της διαφορετικής συμπεριφοράς που παρουσιάζουν τα κατάλοιπα Tyr στο πεπτίδιο σε σχέση με την ελεύθερη Tyr, μελετήθηκαν οι μεταβολές στις συχνότητες των δονήσεων της Tyr στα φάσματα UVRR. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η αύξηση του pH οδηγεί σε μεγαλύτερη ερυθρή μετατόπιση την κορυφή Y_{8a} στην ελεύθερη Tyr (1604 cm^{-1} σε pH 12.3) σε σύγκριση με το πεπτίδιο (1607 cm^{-1}) (Σχήμα 4.4). Η διαφορά στη μεταβολή της συχνότητας θα μπορούσε να οφείλεται σε (α) ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μέσω δεσμών υδρογόνου ή (β) σε τιτλοδότηση άλλων καταλοίπων στο τοπικό περιβάλλον των καταλοίπων τυροσίνης.

(α) Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσει το φαινολικό OH του καταλοίπου Tyr114 μπορούν να εμποδίσουν την ολική αποπρωτονίωση (“φαινόμενο θωράκισης”). Το φαινόμενο αυτό, μπορεί να επηρεάσει τη συχνότητα της κορυφής Y_{8a} , καθώς το pH αυξάνεται. Στα φάσματα του Σχήματος 4.2 η κορυφή Y_{8b} εμφανίζεται στους 1554 cm^{-1} , δηλώνοντας την παρουσία αποπρωτονιωμένης μορφής της Tyr. Αν κάθε κατάλοιπο Tyr βρίσκεται σε διαφορετικό τοπικό περιβάλλον, η αποπρωτονιωμένη μορφή θα οφειλόταν μόνο στο κατάλοιπο Tyr105 και η συχνότητα της κορυφής Y_{8a} που σε υψηλές τιμές του pH στο πεπτίδιο εμφανίζεται στους 1607 cm^{-1} , θα έπρεπε να αποτελεί το μέσο όρο των συχνοτήτων της κορυφής Y_{8a} για τα δύο κατάλοιπα.

(β) Είναι πιθανό κατά τη διαδικασία της τιτλοδότησης να μην επηρεάζεται η πλευρική αλυσίδα των καταλοίπων Tyr αλλά διαφορετικών καταλοίπων του πεπτιδίου (Ser, Thr). Στην περίπτωση αυτή, οι πλευρικές αλυσίδες των Tyr θα βιώνουν διαφορετικά περιβάλλοντα ανάλογα με τις αλλαγές του pH, οδηγώντας έτσι σε συνεχείς αλλαγές στη διαμόρφωση του πεπτιδίου. Οι αλλαγές αυτές θα αντικατοπτρίζονταν σε ερυθρή μετατόπιση της συχνότητας της κορυφής Y_{8a} . Και σε αυτή την περίπτωση, η παρουσία της κορυφής Y_{8b} θα οφείλεται στην αποπρωτονιωμένη μορφή του καταλοίπου Tyr105.

Ωστόσο, η τιμή του pK_a για τα κατάλοιπα Ser και Thr αν δεν επηρεάζεται από το περιβάλλον τους, είναι μεγαλύτερη από 13, γεγονός που καθιστά πολύ δύσκολη την αποπρωτονίωση στο εύρος pH που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Επιπλέον, η δόνηση Y_{9a} της Tyr στο πεπτίδιο, υφίσταται μικρότερη ερυθρή μετατόπιση ($\sim 2 \text{ cm}^{-1}$) σε σύγκριση με την ελεύθερη Tyr ($\sim 5 \text{ cm}^{-1}$). Οι Takeuchi *et al.* απόδωσαν τη μετατόπιση της κορυφής Y_{9a} στην αποπρωτονίωση του OH ή στην αλλαγή της διέδρης γωνίας του COH.²⁶ Στην περίπτωση που η ερυθρή μετατόπιση της κορυφής οφείλεται σε αποπρωτονίωση, οι Takeuchi *et al.* εισηγήθηκαν ότι αυτό οφείλεται στην απώλεια του υδροξυλικού H του δακτυλίου ή απεντοπισμού του αρνητικού φορτίου του φορτισμένου οξυγόνου (O^-) προς τον αρωματικό δακτύλιο.²⁶ Η μικρή μετατόπιση που παρατηρείται στο πεπτίδιο ενισχύει την παραδοχή ότι τα δύο κατάλοιπα Tyr βρίσκονται σε διαφορετικά τοπικά περιβάλλοντα, που δεν μπορούν να διαχωριστούν στα φάσματα που λήφθηκαν στην παρούσα μελέτη, με τις συχνότητές τους να αποτελούν το μέσο όρο των δύο.

4.5.3 Φαινολικό OH

Η παρατήρηση της κορυφής στους $\sim 3558 \text{ cm}^{-1}$ στα φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) σε χαμηλές τιμές του pH προκάλεσε το ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη της περιοχής των υψηλών συχνοτήτων. Η κορυφή αυτή ταυτοποιήθηκε με τη δόνηση τάσης του φαινολικού υδροξυλίου OH, όπου σύμφωνα με τη συμπεριφορά της κορυφής Y_{8a} θα ήταν αναμενόμενο να εξαφανίζεται με αύξηση του pH. Εντούτοις, η κορυφή αυτή εξακολουθεί να παρουσιάζεται σε όλο το εύρος pH που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, ενισχύοντας τους ισχυρισμούς που συζητήθηκαν προηγουμένως.

Προηγούμενες μελέτες Raman έδειξαν ότι η συχνότητα της δόνησης αυτής εξαρτάται από το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου του φαινολικού OH.^{15,17,32} Ο Thomas και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν μελέτες Raman για την π -κρεσόλη στην αέρια και υγρή φάση, όπου παρατήρησαν διαφορές στην περιοχή του φάσματος $3200\text{-}3700 \text{ cm}^{-1}$.¹⁷ Στην αέρια φάση, όπου δεν αναμένεται σχηματισμός δεσμών υδρογόνου, στο φάσμα Raman παρατηρείται μια οξεία κορυφή στους 3654 cm^{-1} , ενώ αντίθετα στην υγρή φάση εμφανίζονται τρεις κορυφές στους $3217, 3355, 3513 \text{ cm}^{-1}$ οι οποίες σχετίζονται με τρία φασματοσκοπικά ευδιάκριτα είδη των ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου του φαινολικού πρωτονίου. Αξίζει να σημειωθεί πως η π -κρεσόλη ήταν άνυδρη, έτσι δεν υπήρχε αλληλοεπικάλυψη με την κορυφή του H_2O σε αυτή την περιοχή. Επιπλέον, οι Takeuchi *et al.* έδειξαν ότι η συχνότητα της δόνησης τάσης του OH της π -κρεσόλης εξαρτάται από τη βασικότητα του

διαλύτη. Συγκεκριμένα, η συχνότητα της κορυφής κυμαίνεται από 3583 μέχρι 3050 cm^{-1} αυξανόμενης της βασικότητας του διαλύτη, ενώ στην περίπτωση των εντελώς άπολων διαλυτών, χωρίς ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, π.χ. CCl_4 , η κορυφή αυτή μετατοπίζεται στους 3614 cm^{-1} .²⁶

Η παρατήρηση της κορυφής στους $\sim 3558 \text{ cm}^{-1}$ σε όλη τη διάρκεια της τιτλοδότησης του πεπτιδίου TTR(105-115) ενισχύει όλες τους πιο πάνω ισχυρισμούς για το περιβάλλον στο οποίο υπόκεινται τα κατάλοιπα Tyr στο πεπτίδιο. Συγκεκριμένα, υποδεικνύει ότι η κορυφή στους $\sim 3558 \text{ cm}^{-1}$ οφείλεται στην προστασία του OH του καταλοίπου Tyr114 από αποπρωτονίωση, σχηματίζοντας ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου με τα γειτονικά κατάλοιπα Ser, τη Thr ή με την κύρια αλυσίδα. Ενώ, αντίθετα, η παρατήρηση της κορυφής στους 1554 cm^{-1} (Σχήμα 4.2) σε υψηλές τιμές του pH οφείλεται στην αποπρωτονιωμένη μορφή του καταλοίπου Tyr105 το οποίο παρουσιάζει μεγάλη προσβάσιμη επιφάνεια στο διαλύτη και επομένως η αρωματική πλευρική του αλυσίδα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στις αλλαγές του pH.

4.5.4 Προτεινόμενη Δομή του Πεπτιδίου

Οι Jarvis *et al.* μελετώντας το πεπτίδιο TTR(105-115) στην υγρή φάση, με χρήση της φασματοσκοπίας NMR, έδειξαν ότι το πεπτίδιο παρουσιάζει διαμόρφωση τυχαίου σπειρώματος με το σχηματισμό στροφής ή έλικας, αντίθετα με την αναμενόμενη εκτεταμένη διαμόρφωση που υιοθετεί το πεπτίδιο στη στερεά φάση.³¹ Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής που πραγματοποιήθηκαν για ένα “απομονωμένο” πεπτίδιο TTR(105-115) σε υψηλές συγκεντρώσεις στην υγρή φάση αποκάλυψαν ότι η περιοχή του πεπτιδίου T106 μέχρι L110 έχει μεγάλη τάση σχηματισμού α -έλικας (58% στους 330K και 48% στους 360K).³³ Οι υπολογισμοί αυτοί δείχνουν ότι το πεπτίδιο TTR(105-115) δεν υιοθετεί μια συγκεκριμένη δομή, αλλά αποτελείται από ένα σύνολο διαμορφώσεων.³³

Τα αποτελέσματα που απορρέουν από την παρούσα μελέτη επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα των δύο προηγούμενων μελετών, μέσω του σχηματισμού ενδομοριακού δικτύου δεσμών υδρογόνου που εμποδίζει τη δυνατότητα πρόσβασης του καταλοίπου Tyr114 στο διαλύτη. Περισσότερες πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή του πεπτιδίου δίνονται στο Κεφάλαιο 5 όπου πραγματοποιήθηκαν πειράματα μελέτης της αμιδικής περιοχής, μετά από διέγερση στα 200 nm. Εντούτοις, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι το πεπτίδιο TTR(105-115) υιοθετεί διαφορετική διαμόρφωση στην υγρή φάση σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της μελέτης ακτινών X για τη φυσική μορφή TTR στη στερεά κατάσταση.³⁰ Η μελέτη ακτινών X υποδεικνύει ότι η διαμόρφωση των καταλοίπων

της πρωτεΐνης 105 μέχρι 115 περιλαμβάνει μια εκτεταμένη δομή με τις φαινολικές πλευρικές αλυσίδες των Tyr να είναι πλήρως εκτεθειμένες στο διαλύτη,³⁰ ενώ τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι το πεπτίδιο υιοθετεί μια συγκεκριμένη διαμόρφωση.

Γαλάτεια Κ. Περίδου

Βιβλιογραφία

- (1) Niemeyer, M. I.; Gonzalez-Nilo, F. D.; Zuniga, L.; Gonzalez, W.; Cid, L. P. *Proceedings of the National Academy of Science* **2007**, 104, 666.
- (2) He, Y.; Xu, J.; Pan, X. M. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2007**, 69, 75.
- (3) Lavis, L. D.; Rutkoski, T. J.; Raines, R. T. *Analytical Chemistry* **2007**, 79, 6775.
- (4) Garel, J. R. *The FEBS Journal* **1976**, 70, 179.
- (5) Gong, B.; Chen, J. H.; Chase, E.; Chadalavada, D. M.; Yajima, R.; Golden, B. L.; Bevilacqua, P. C.; Carey, P. R. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, 13335.
- (6) Asher, S. A.; Larkin, P. J.; Teraokat, J. *Biochemistry* **1991**, 30, 5944.
- (7) Zscherp, C.; Schlesinger, R.; Tittor, J.; Oesterhelt, D.; Heberle, J. *Biophysics* **1999**, 96, 5498.
- (8) Li, H.; Robertson, A. D.; Jensen, J. H. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2005**, 61, 704.
- (9) Morikis, D.; Champion, P. M. *Biochemistry* **1989**, 28, 4791.
- (10) Sunndaramoorthy, E.; Maiti, S.; Brahmacheri, S. K.; Sengupta, S. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2007**, 71, 1475.
- (11) Warshel, A.; Sharma, P. K.; Kato, M.; Parson, W. W. *Biochimica et Biophysica Acta* **2006**, 1764, 1647.
- (12) Simonson, T.; Carlsson, J.; Case, D. A. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 4167.
- (13) Zhou, H-X.; Vijayakumar, M. *Journal of Molecular Biology* **1997**, 267, 1002.
- (14) Loewenthal, R.; Sancho, J.; Reinikainen, T.; Ferscht, A. R. *Journal of Molecular Biology* **1993**, 232, 574.
- (15) Fodor, S. P. A.; Copeland, R. A.; Grygon, C. A.; Spiro, T. G. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, 111, 5509.
- (16) Patrickios, C. S. *Journal of Colloid and Interface Science* **1995**, 175, 256.
- (17) Arp, Z.; Autrey, D.; Laane, J.; Overman, S. A.; Thomas, G. J. *Biochemistry* **2001**, 40, 2522.
- (18) Rodriguez-Mendieta, I. R.; Spence, G. R.; Gell, C.; Radford, S. E.; Smith, D. A. *Biochemistry* **2005**, 44, 3306.
- (19) Hu, X.; Spiro, T. G. *Biochemistry* **1997**, 36, 15701.
- (20) Cho, M.; Asher, A. *Biospectroscopy* **1996**, 2, 71.

- (21) Hildebrandt, P. G.; Copeland, R. A.; Spiro, T. G.; Otlewski, J.; Laskowski, M. J.; Prendergast, F. G. *Biochemistry* **1988**, *27*, 5426.
- (22) Reid, P. J.; Loftus, C.; Beeson, C. C. *Biochemistry* **2003**, *42*, 2441.
- (23) Welfle, H.; Misselwitz, R.; Fabian, H.; Damerau, W.; Hoelzer, W.; Gerlach, D.; Kalnin, N. N.; Venyaminov, S. Yu. *International Journal of Biological Macromolecules* **1992**, *14*, 9.
- (24) Pieridou, G. K.; Hayes, S. C. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2009**, *11*, 5302.
- (25) Johnson, C. R.; Ludwing, M.; Asher, S. A. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108*, 905.
- (26) Takeuchi, H.; Watanabe N., Satoh, Y.; Harada, I. *Journal of Raman Spectroscopy* **1989**, *20*, 233.
- (27) Takeuchi, H.; Ohtsuka, Y.; Harada, I. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 5321.
- (28) Chi, Z.; Asher, S. *Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102*, 9595.
- (29) Johnson, C. R.; Ludwing, M.; O'Donnell, S.; Asher, S. A. *Journal of the American Chemical Society* **1984**, *106*, 5008.
- (30) Jaroniec, C. P.; MacPhee, C. E.; Bajaj, V. S.; McMahon, M. T.; Dobson, C. M.; Griffin, R. G. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **2004**, *101*, 711.
- (31) Jarvis, J.; Kirkpatrick, A.; Craik, D. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1994**, *44*, 388.
- (32) Pimentel, G. C.; McClelland, A. L., *The Hydrogen Bond*; Freeman, W. H. San Fransisco, 1960.
- (33) Paci, E.; Gsponer, J.; Salvatella, X.; Vendruscolo, M. *Journal of Molecular Biology* **2004**, *340*, 555.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ TTR(105-115) ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ RAMAN

5.1 Εισαγωγή

Στο παρόν κεφάλαιο παρατίθενται και συζητούνται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στη δευτεροταγή δομή του πεπτιδίου TTR(105-115) στην υγρή φάση, με τη χρήση της φασματοσκοπίας συντονισμού Raman. Συγκεκριμένα, λήφθηκαν φάσματα UVRR του πεπτιδίου συναρτήσεως της θερμοκρασίας, μετά από διέγερση στα 200 nm. Η διέγερση στη βαθιά υπεριώδη περιοχή ενισχύει συντονιστικά το σκεδασμό Raman από το χρωμοφόρο αμίδιο (η κορυφή απορρόφησης $\pi \rightarrow \pi^*$ βρίσκεται στα 195 nm), ο οποίος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στις διέδρες γωνίες φ και ψ , δίνοντας άμεσες πληροφορίες σχετικά με τη δευτεροταγή δομή του πεπτιδίου. Παρατήρηση των συχνοτήτων των χαρακτηριστικών κορυφών αμιδίου I, II, III και της δόνησης τάσης C_{α} -H στο φάσμα Raman παρέχει ενδείξεις για το αν η δευτεροταγής δομή του πεπτιδίου περιέχει στοιχεία της α -έλικας, β -πτύχωσης, β -στροφής, ή τυχαίου σπειρώματος.¹⁻⁵ Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δομής του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε εκτενής στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων.

Η μελέτη της δομής του πεπτιδίου στην υγρή φάση πριν από την έναρξη της συσσωμάτωσής του είναι ιδιαίτερα σημαντική για τις μετέπειτα μελέτες που έχουν στόχο την κατανόηση του μηχανισμού ινδοποίησης, στον οποίο η διαδικασία της αυτο-συναρμολόγησης οδηγεί σε δομικές αλλαγές. Η *in vitro* διαδικασία συσσωμάτωσης του πεπτιδίου στο διάλυμα αρχίζει μετά από επώαση σε θερμοκρασία μεταξύ στους 25 και τους 37 °C, υπό όξινες συνθήκες. Επομένως, η μελέτη που παρουσιάζεται στο κεφάλαιο αυτό είναι μια συστηματική διερεύνηση των δομικών αλλαγών του πεπτιδίου TTR(105-115) που προκαλούνται από τη μεταβολή της θερμοκρασίας. Η συγκέντρωση του πεπτιδίου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα φασματοσκοπική μελέτη διατηρήθηκε σε χαμηλά επίπεδα, προκειμένου να παρατηρηθούν δομικές αλλαγές του “απομονωμένου” πεπτιδίου στο διάλυμα, συναρτήσεως της θερμοκρασίας. Οι δομικές αλλαγές που παρατηρούνται ενισχύονται από προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (MD) που πραγματοποιήθηκαν για ένα “απομονωμένο” πεπτίδιο στη θερμοκρασιακή περιοχή των 15 έως 37 °C.

5.2 Πειραματικές Συνθήκες

Στην παρούσα φασματοσκοπική μελέτη παρασκευάστηκαν διαλύματα του πεπτιδίου TTR(105-115) συγκέντρωσης ~ 1.5 mM σε μείγμα 40% v/v ακετονιτριλίου/νερού ώστε να επιταχύνεται η διαλυτότητά του και έπειτα χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη της θερμοκρασιακής εξάρτησης. Η ακριβής συγκέντρωση για κάθε διάλυμα υπολογίστηκε από το φάσμα απορρόφησης, χρησιμοποιώντας το μοριακό συντελεστή απορρόφησης της Tyr στα 274 nm ($1.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Κάθε φάσμα που παρουσιάζεται στο παρόν κεφάλαιο αποτελεί άθροισμα 9-12 φασμάτων με χρόνο συλλογής δεδομένων δέκα λεπτά ανά φάσμα.

5.3 Υπολογιστική Μέθοδος

Οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής που παρουσιάζονται στο κεφάλαιο αυτό πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια συνεργασίας με την ομάδα Βιοφυσικής του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Κύπρου.

Σύστημα: Το σύστημα προσομοίωσης αποτελείται από ένα πεπτίδιο και 4,054 μόρια νερού (12,335 άτομα). Η αλληλουχία του πεπτιδίου που χρησιμοποιήθηκε στις προσομοιώσεις είναι πανομοιότυπη με το τμήμα 105-115 της πρωτεΐνης transthyretin. Τα N- και C-τελικά άκρα του πεπτιδίου θεωρήθηκαν φορτισμένα (NH_3^+ και COO^- , αντίστοιχα), προσεγγίζοντας την πειραματική τιμή του pH (3.1-3.8). Όλες οι προσομοιώσεις διεξήχθησαν με τη χρήση του προγράμματος μοριακής μηχανικής CHARMM, έκδοση c35b3.⁶ Το ακετονιτρίλιο δεν έχει συμπεριληφθεί στον υπολογισμό επειδή τα πειραματικά αποτελέσματα των υδατικών διαλυμάτων του πεπτιδίου σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία έδειξαν παρόμοια συμπεριφορά με τα διαλύματα του CH_3CN .

Μέθοδος Προσομοίωσης: Η αρχική διαμόρφωση του πεπτιδίου ορίστηκε σύμφωνα με τις κρυσταλλογραφικές συντεταγμένες του τμήματος 105-115 της πρωτεΐνης transthyretin (*pdb entry 1BMZ*⁷). Αρχικά, το πεπτίδιο τοποθετήθηκε στο κέντρο ενός κυβικού κουτιού ακμής 49 Å με μόρια νερού, ήδη σε ισορροπία, με επαναλαμβανόμενες μονάδες που τοποθετήθηκαν γύρω από το προς μελέτη σύστημα στις τρεις διαστάσεις με τις συνθήκες περιοδικής οριοθέτησης. Όλα τα μόρια νερού με άτομα οξυγόνου σε απόσταση 2.5 Å μακριά από άτομα του πεπτιδίου εκτός του υδρογόνου, αφαιρέθηκαν. Αρχικά το σύστημα υποβλήθηκε σε 100 βήματα ελαχιστοποίησης της ενέργειας με χρήση του αλγόριθμου steepest-descent, μετά σε σταδιακή θέρμανση στους 285 K, εξισορρόπηση για 2 ns στους 285 K. Η τελική δομή χρησιμοποιήθηκε ως σημείο εκκίνησης για τις προσομοιώσεις

replica-exchange.⁸⁻¹³ Χρησιμοποιήθηκαν 12 *replicas* με θερμοκρασίες 288, 290, 292, 294, 296, 298, 300, 302, 304, 306, 308 και 310 K. Με τη χρήση αυτού του εύρους θερμοκρασιών η μέση πιθανότητα ανταλλαγής μεταξύ γειτονικών *replicas* ήταν $22 \pm 1\%$, ενώ τα διάφορα *replicas* ακολούθησαν πορεία (*random walk*) σε όλες τις θερμοκρασίες. Το θερμοκρασιακό εύρος που χρησιμοποιήθηκε στις προσομοιώσεις εκτείνεται στα πλαίσια των θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα συντονισμού Raman (283-301 K). Οι ανταλλαγές μεταξύ των *replicas* επιχειρούνταν σε διαστήματα του 1 ps. Ο συνολικός χρόνος προσομοίωσης σε κάθε θερμοκρασία ήταν 7.7 ns.

Δυναμική Πεδίου: Τα ατομικά φορτία, οι δυνάμεις van der Waals και οι στερεοχημικές παράμετροι για τα άτομα του πεπτιδίου λήφθηκαν από το δυναμικό πεδίο όλων των ατόμων CHARMM22,¹⁴ μαζί με τη διόρθωση στρέψης CMAP.¹⁵ Τα μόρια νερού που χρησιμοποιήθηκαν στο σύστημα περιγράφονται επακριβώς από ένα τροποποιημένο μοντέλο TIP3P, μοντέλο το οποίο αναπαριστά καλύτερα την ενέργεια και πυκνότητα του υγρού νερού.^{16,17} Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις υπολογίστηκαν χωρίς αποκοπή με τη μέθοδο σωματιδίου-δικτύου *Ewald* με παράμετρο $k=0.5$ για τον έλεγχο φορτίου και καμπύλη έκτου βαθμού για την παρεμβολή δικτύου. Οι αλληλεπιδράσεις Lennard-Jones εκμηδενίστηκαν σε απόσταση 11 Å. Η θερμοκρασία του συστήματος παρέμεινε σταθερή με τη χρήση του θερμοστάτη Nose-Hoover.^{18,19} Οι κλασικές εξισώσεις κίνησης ολοκληρώθηκαν με χρήση του ολοκληρώματος Leap-Frog, με βήματα 2-fs. Τα μήκη των δεσμών των ατόμων υδρογόνου και η εσωτερική γεωμετρία των μορίων νερού περιορίστηκαν με τη χρήση του αλγορίθμου SHAKE για πρότυπες τιμές.²⁰ Οι προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν σε σταθερό όγκο (NVT) με τη χρήση του προγράμματος CHARMM.⁶

Ανάλυση: Η ισορροπία του συστήματος επιτεύχθηκε μετά από χρόνο περίπου 2.7 ns. Η ανάλυση αποτελείται από 5.000 στιγμιότυπα, που εκτείνονται στα τελευταία 5 ns των τροχιών για κάθε μία από τις τρεις θερμοκρασίες 288, 300 και 310 K. Η δευτεροταγής δομή του πεπτιδίου καθορίστηκε από τον αλγόριθμο STRIDE²¹ στη μεθοδολογία VMD.²² Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων υπολογίστηκαν από τυποποιημένες ρουτίνες CHARMM.⁶ Επαφές μεταξύ πλευρικών αλυσίδων θεωρήθηκαν ότι υπήρχαν αν η απόσταση μεταξύ των γεωμετρικών κέντρων των δύο πλευρικών αλυσίδων ήταν μικρότερη από 5.5 Å.

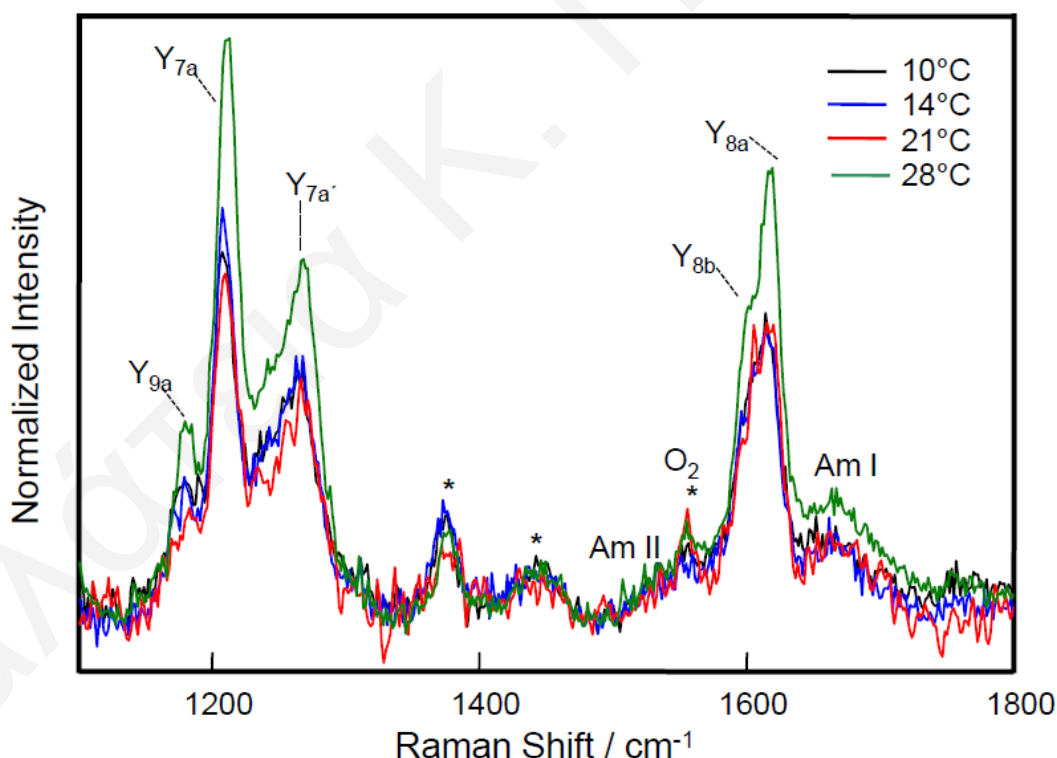
Ανάλυση Ομαδοποίησης: Οι διαμορφώσεις του πεπτιδίου ταξινομηθήκαν σε οικογένειες μετά από την ανάλυση ομαδοποίησης, βασισμένη στις καρτεσιανές συντεταγμένες των ατόμων του C_α για το τμήμα του πεπτιδίου 2-10. Δύο διαμορφώσεις ανήκαν στην ίδια

οικογένεια αν η *root-mean-square-difference* ήταν μικρότερη από 1.5 Å. Η μέθοδος ομαδοποίησης περιγράφεται αναλυτικά στη βιβλιογραφία.^{23,24}

5.4 Πειραματικά Αποτελέσματα

5.4.1 Φάσματα Συντονισμού Raman του Πεπτιδίου TTR(105-115) σε Διάλυμα CH₃CN/H₂O

Στο Σχήμα 5.1 παρουσιάζονται τα φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) σε διάλυμα 40% v/v CH₃CN/H₂O σε θερμοκρασιακό εύρος 10 και 28 °C, μετά από διέγερση στα 199.8 nm. Οι μεγάλες σε ένταση κορυφές που παρατηρούνται στα φάσματα οφείλονται στις δονήσεις του αρωματικού δακτυλίου των καταλοίπων Tyr. Η ένταση των κορυφών είναι ιδιαίτερα ισχυρή λόγω της αύξησης του συντονισμού με τη διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση B_{a,b} της Tyr. Οι αδύνατες κορυφές που παρουσιάζονται στα φάσματα αντιστοιχούν στις δονήσεις αμιδίου.



Σχήμα 5.1: Φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) σε διάλυμα 40% v/v CH₃CN/H₂O συναρτήσει της θερμοκρασίας, μετά από διέγερση στα 199.8 nm. Τα φάσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τη δόνηση τάσης CN του ακετονιτριλίου, στους 2258 cm⁻¹.

Στα φάσματα του Σχήματος 5.1 παρατηρούνται κορυφές στους 1179 (Y_{9a}), 1209 (Y_{7a}), 1614 cm⁻¹ (Y_{8a}) και 1600 cm⁻¹ (Y_{8b}) οι οποίες σχετίζονται με τη συνεισφορά της δόνησης κάμψης C-H του αρωματικού δακτυλίου, της δόνησης τάσης των ατόμων του άνθρακα,

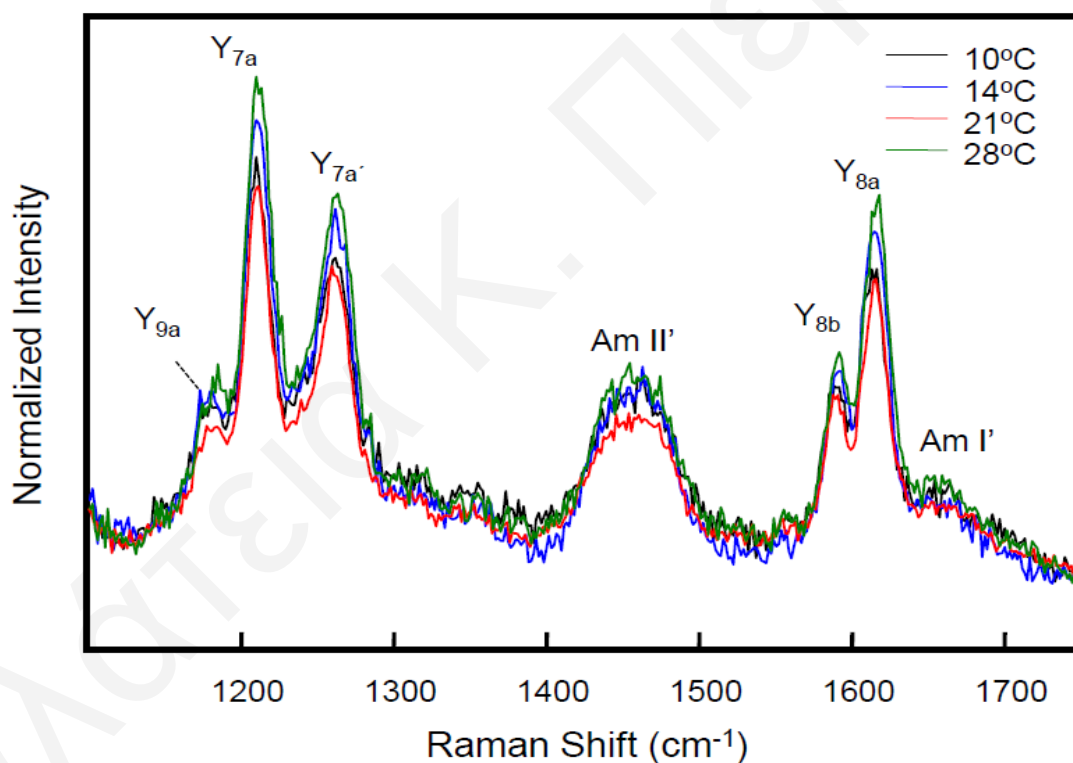
της συμμετρικής και αντισυμμετρικής δόνησης τάσης του αρωματικού δακτυλίου, αντίστοιχα. Η κορυφή του αμιδίου I, η οποία αντιστοιχεί κυρίως στη δόνηση τάσης του C=O, με μικρότερη συνεισφορά από τη δόνηση τάσης του C-N και τη δόνηση κάμψης του N-H, παρατηρείται στους 1666 cm^{-1} . Η κορυφή του αμιδίου II (εντός φάσης τάση N-H και κάμψη C-N), εμφανίζεται στους 1555 cm^{-1} , ενώ η κορυφή του αμιδίου III (εκτός φάσης τάση N-H και κάμψη C-N) αναμένεται στην περιοχή μεταξύ $1220\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$. Στην αναμενόμενη περιοχή του αμιδίου III, παρουσιάζεται μια ευρεία κορυφή στους $\sim 1265\text{ cm}^{-1}$. Ωστόσο η κορυφή αυτή είναι δυνατό να περιλαμβάνει συνεισφορά από τη δόνηση τάσης του C-O (γ_{7a}) των καταλοίπων Tyr. Οι κορυφές που εμφανίζονται στους $926, 1375, 2258\text{ cm}^{-1}$ οφείλονται στις δονήσεις τάσης C-C, κάμψης C-H, και τάσης C-N, του ακετονιτριλίου, αντίστοιχα.²⁵ Το ακετονιτρίλιο διαθέτει επίσης κορυφή στους 1440 cm^{-1} που οφείλεται στη δόνηση κάμψης του δεσμού C-H. Εντούτοις, η κορυφή που παρατηρείται στα φάσματα στους 1446 cm^{-1} αποδίδεται εδώ να είναι πιο οξεία και μεγαλύτερης έντασης σε σχέση με την αναμενόμενη κορυφή του ακετονιτριλίου. Επομένως, η κορυφή που παρατηρείται στα φάσματα γύρω στους 1446 cm^{-1} αποδίδεται εδώ στη δόνηση κάμψης του $C_{\alpha}H_2$ της αλυσίδας του πεπτιδίου η οποία επικαλύπτει την κορυφή του ακετονιτριλίου.³ Η ταυτότητα της συγκεκριμένης κορυφής επιβεβαιώθηκε από φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) σε υδατικό διάλυμα, στο ίδιο εύρος θερμοκρασιών, όπου παρατηρήθηκε ότι η κορυφή στους 1446 cm^{-1} εξακολουθεί να είναι εμφανής. Η ένταση όλων των κορυφών έχει κανονικοποιηθεί ως προς τη δόνηση τάσης C-N του ακετονιτριλίου στους 2258 cm^{-1} .

Η επίδραση της θερμοκρασίας είναι εμφανής στην υψηλότερη θερμοκρασία ($28\text{ }^{\circ}\text{C}$) όπου παρατηρείται αύξηση της έντασης των κορυφών της Tyr. Οι αδύνατες σε ένταση κορυφές του αμιδίου παραμένουν αμετάβλητες ως προς την έντασή τους συναρτήσει της θερμοκρασίας, εκτός από τους $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ όπου ο λόγος των εντάσεων των κορυφών AmI/AmII αυξάνεται. Η αλλαγή του λόγου των εντάσεων των κορυφών αυτών αποτελεί ένδειξη για τις δομικές αλλαγές που συμβαίνουν στο πεπτίδιο, συναρτήσει της θερμοκρασίας (Βλ. πιο κάτω).

Η ευρεία κορυφή που παρατηρείται στους $\sim 1666\text{ cm}^{-1}$ στα φάσματα του Σχήματος 5.1, πλησιάζει αρκετά στη συχνότητα δόνησης κάμψης του H_2O η οποία εμφανίζεται γύρω στους 1650 cm^{-1} και επομένως μπορεί να αποτελεί αποτέλεσμα επικάλυψης μεταξύ των κορυφών αμιδίου I και κάμψης του νερού. Μια τέτοια επικάλυψη μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με τη χρήση της ισοτοπικής ανταλλαγής υδρογόνου/δευτερίου.

5.4.2 Φάσματα Συντονισμού Raman του Πεπτιδίου TTR(105-115) σε Διάλυμα CD_3CN/D_2O

Η λήψη φασμάτων UVRR του πεπτιδίου μετά από ισοτοπική ανταλλαγή H/D κρίθηκε αναγκαία ώστε να επιβεβαιωθεί η ταυτότητα των κορυφών που παρουσιάζονται στα φάσματα του Σχήματος 5.1 στους ~ 1666 και ~ 1265 cm^{-1} . Στο Σχήμα 5.2 απεικονίζονται τα φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) σε μείγμα 40% v/v CD_3CN/D_2O σε θερμοκρασίες μεταξύ 10 και 28 °C, μετά από διέγερση στα 199.8 nm. Η ευρεία κορυφή στους 1666 cm^{-1} που παρατηρείται και μετά την ισοτοπική ανταλλαγή πρέπει να οφείλεται στη δόνηση του αμιδίου I'. Η δόνηση του Am I' προκύπτει κυρίως από τη δόνηση τάσης του C=O μια μικρότερη συνεισφορά από τη δόνηση κάμψης του δεσμού N-H και επομένως η συχνότητά της δεν αναμένεται να επηρεάζεται σημαντικά από τη δευτερίωση.

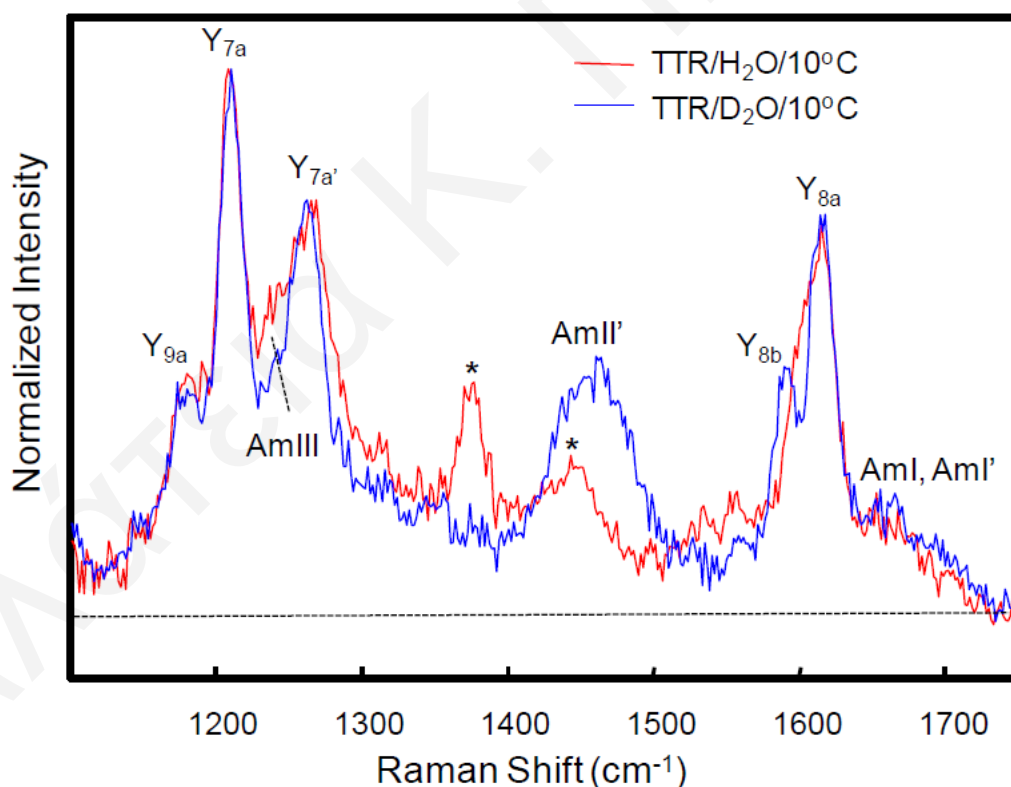


Σχήμα 5.2: Φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) σε διάλυμα 40% v/v CD_3CN/D_2O συναρτήσει της θερμοκρασίας, μετά από διέγερση στα 199.8 nm.

Γενικά, η ισοτοπική ανταλλαγή H σε D αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για το διαχωρισμό του αμιδίου II και III. Καθώς το πρωτόνιο του N-H ανταλλάσσεται με δευτέριο, οι δονήσεις των αμιδίων II και III (τόρα II' και III') μετατοπίζονται στους ~ 1465 και ~ 1005 cm^{-1} , αντίστοιχα, λόγω της αποσύζευξης της δόνησης τάσης του δεσμού C-N και της δόνησης κάμψης του δεσμού N-H, με το αμίδιο II' να χαρακτηρίζεται μόνο από τη δόνηση

τάσης του δεσμού C-N.^{26,27} Στην περίπτωση όπου το πεπτιδίο TTR(105-115) διαλύεται σε μείγμα 40% v/v CD₃CN/D₂O, στα φάσματα UVRR (Σχήμα 5.2) η ισχυρή κορυφή του αμιδίου II' μετατοπίζεται στους 1457 cm⁻¹, ενώ η δόνηση του Am III' που περιλαμβάνει συνεισφορά μόνο από τη δόνηση κάμψης του δεσμού N-H και συνήθως παρουσιάζει χαμηλή ένταση, δεν παρατηρείται στα φάσματα UVRR του πεπτιδίου.²⁶

Η παρουσία της κορυφής στους 1263 cm⁻¹ στα φάσματα, μετά την ισοτοπική ανταλλαγή H/D, επιβεβαιώνει ότι η ταυτότητά της αντιστοιχεί στη δόνηση Y_{7a}' της Tyr, η οποία εμφανίζεται ελαφρώς μετατοπισμένη σε μικρότερη συχνότητα.^{26,28} Εντούτοις, συγκρίνοντας τα φάσματα του πεπτιδίου πριν και μετά την ισοτοπική ανταλλαγή, η κορυφή αυτή εμφανίζεται πολύ πιο οξεία στο φάσμα των CD₃CN/D₂O. Η διαφορά στο εύρος της κορυφής οφείλεται στη συνεισφορά μιας δεύτερης κορυφής η οποία αντιστοιχεί στο Am III. Ενδεικτικά στο Σχήμα 5.3 παρουσιάζεται η σύγκριση των φασμάτων UVRR του πεπτιδίου πριν και μετά την ισοτοπική εναλλαγή στους 10 °C.



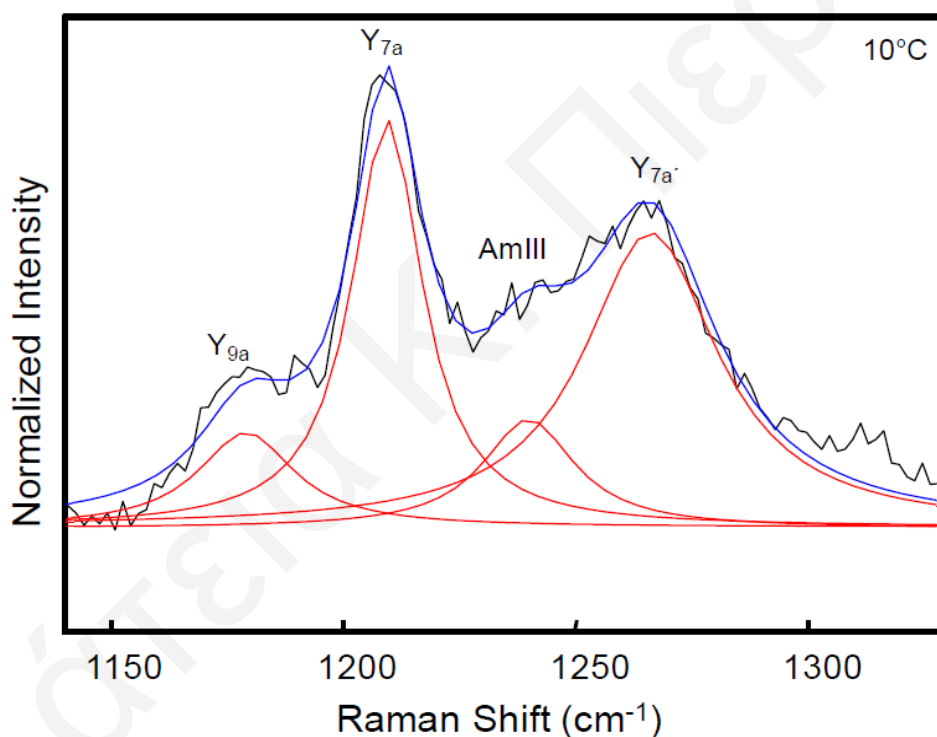
Σχήμα 5.3: Φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) σε διαλύματα: 40% v/v CD₃CN/D₂O (μπλε) και 40% v/v CH₃CN/H₂O (κόκκινο) στους 10 °C, μετά από διέγερση στα 199.8 nm.

Επιπλέον, με την ισοτοπική ανταλλαγή H/D, εκτός από τις μεταβολές που παρατηρήθηκαν στις συχνότητες των αμιδίων (Σχήμα 5.2), παρατηρείται επίσης μετατόπιση στη συχνότητα

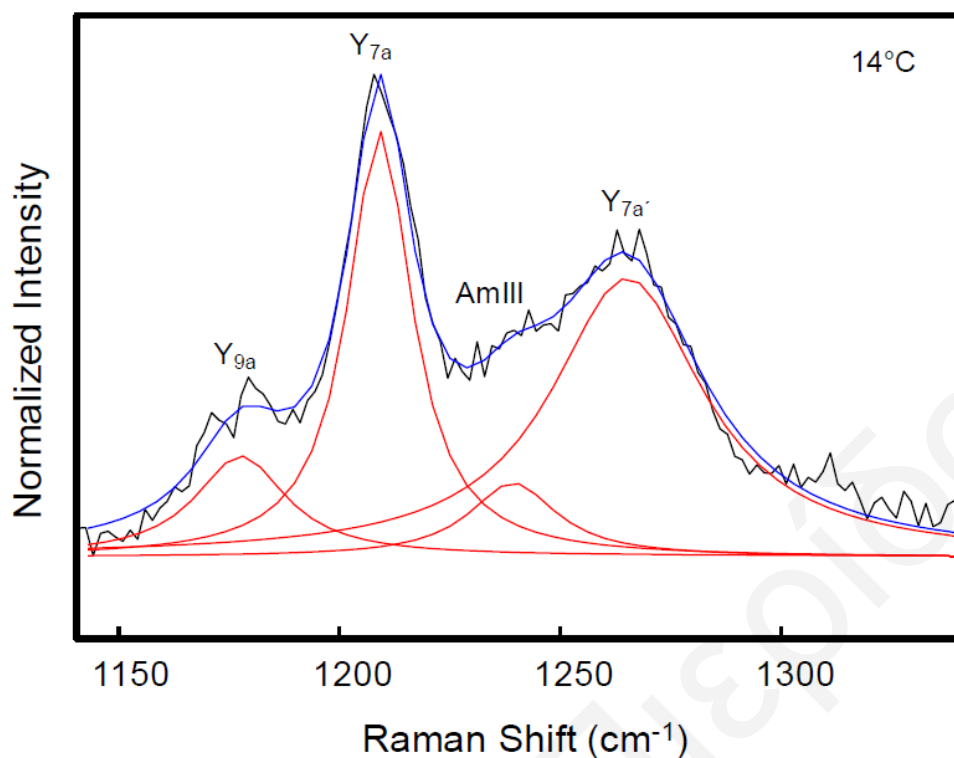
της δόνησης Y_{8b} από τους 1600 στους 1589 cm^{-1} . Η μεγάλη ερυθρή μετατόπιση που παρατηρείται οφείλεται στην αποσύζευξη της δόνησης κάμψης του νερού και της Y_{8b} , δεδομένου ότι η δόνηση κάμψης του δεσμού OD που σχηματίζεται μετά την ισοτοπική ανταλλαγή H/D εμφανίζεται πολύ πιο χαμηλά (1200 cm^{-1} vs 1650 cm^{-1}).²⁹

5.4.3 Δονήσεις Y_{7a} , Y_{9a} , $Y_{7a'}$

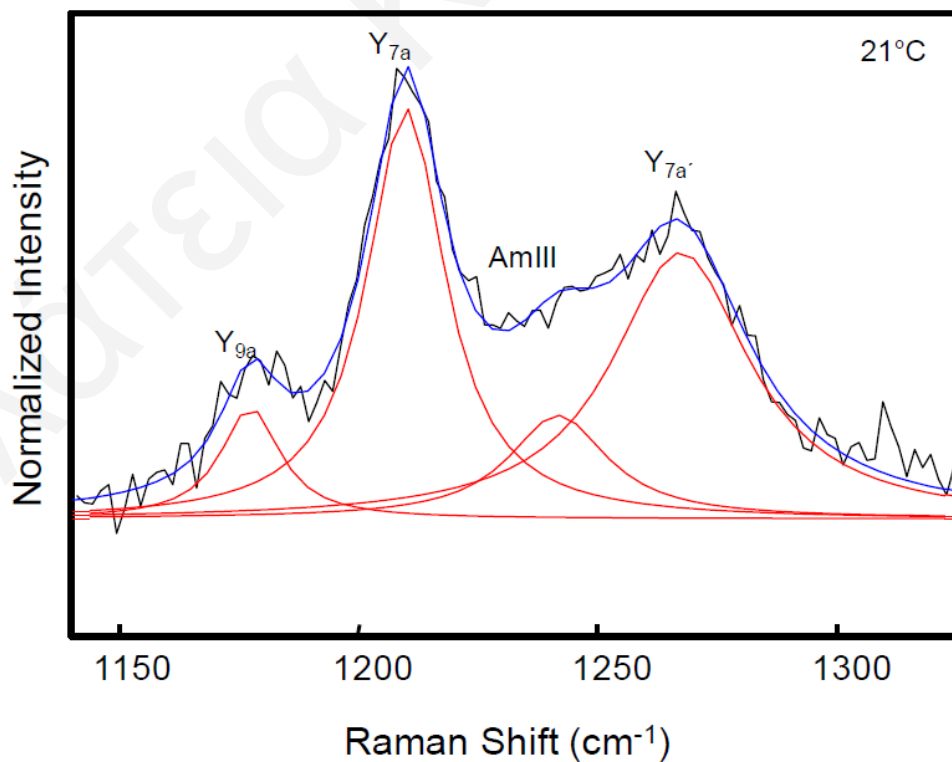
Η διαδικασία κατάλληλης αποσυνέλιξης της περιοχής των φασμάτων από τους 1150 μέχρι τους 1300 cm^{-1} στα διαλύματα των $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ στις διάφορες θερμοκρασίες επιβεβαίωσε τη συνεισφορά μιας κορυφής που παρουσιάζεται μεταξύ 1235 και 1245 cm^{-1} , η οποία αντιστοιχεί στη δόνηση του Am III (Σχήματα 5.4-5.8).



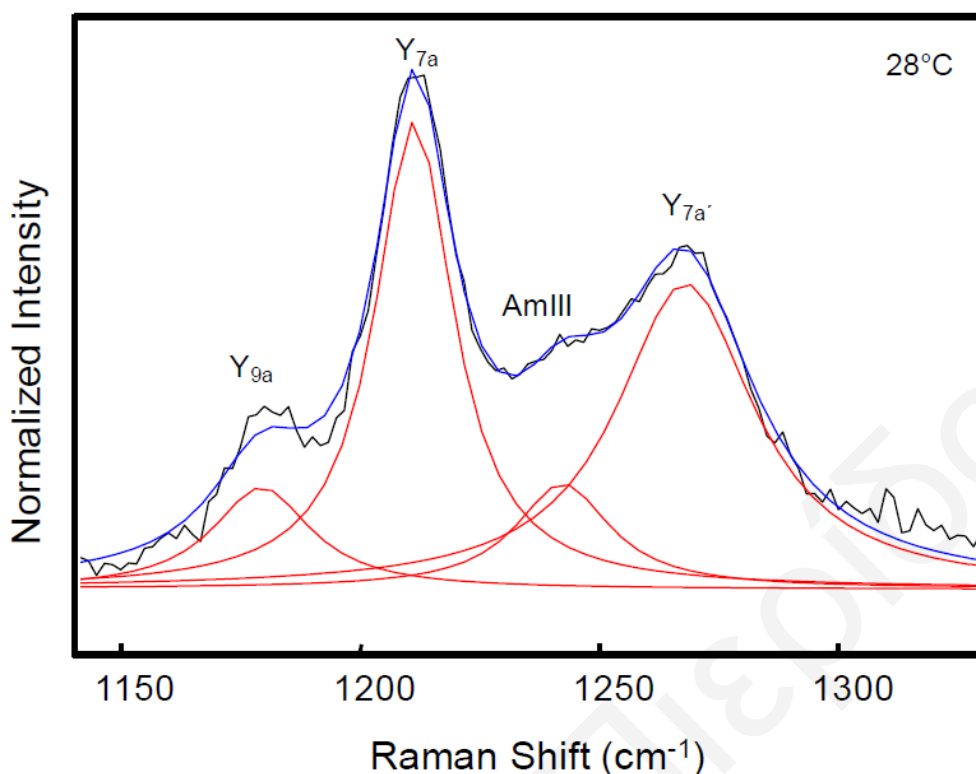
Σχήμα 5.4: Αποσυνέλιξη της περιοχής των 1200 cm^{-1} του φάσματος πεπτιδίου TTR(105-115) σε διάλυμα 40% v/v $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, στους $10\text{ }^\circ\text{C}$, μετά από διέγερση στα 200 nm . Με κόκκινο: Y_{9a} (1179 cm^{-1}), Y_{7a} (1209 cm^{-1}), Am III (1239 cm^{-1}) και $Y_{7a'}$ (1265 cm^{-1}), μπλε: το άθροισμα όλων των ειδών.



Σχήμα 5.5: Αποσυνέλιξη της περιοχής των 1200 cm⁻¹ του φάσματος πεπτιδίου TTR(105-115) σε διάλυμα 40% v/v CH₃CN/H₂O, στους 14 °C. Με κόκκινο: Y_{9a} (1179 cm⁻¹), Y_{7a} (1209 cm⁻¹), Am III (1239 cm⁻¹) και Y_{7a}' (1265 cm⁻¹), μπλε: το άθροισμα όλων των ειδών.

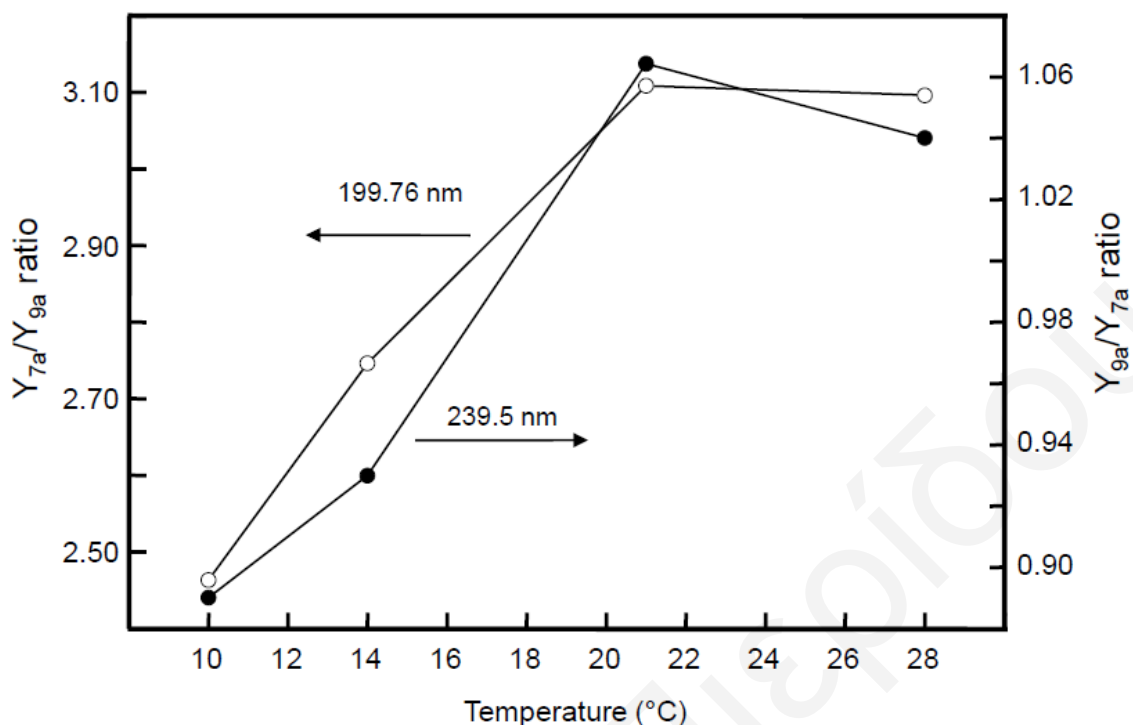


Σχήμα 5.6: Αποσυνέλιξη της περιοχής των 1200 cm⁻¹ του φάσματος πεπτιδίου TTR(105-115) σε διάλυμα 40% v/v CH₃CN/H₂O, στους 21 °C. Με κόκκινο: Y_{9a} (1179 cm⁻¹), Y_{7a} (1209 cm⁻¹), Am III (1241 cm⁻¹) και Y_{7a}' (1265 cm⁻¹), μπλε: το άθροισμα όλων των ειδών.



Σχήμα 5.7: Αποσυνέλιξη της περιοχής των 1200 cm^{-1} του φάσματος πεπτιδίου TTR(105-115) σε διάλυμα 40% v/v $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, στους $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Με κόκκινο: Y_{9a} (1179 cm^{-1}), Y_{7a} (1209 cm^{-1}), Am III (1242 cm^{-1}) και $Y_{7a'}$ (1265 cm^{-1}), μπλε: το άθροισμα όλων των ειδών.

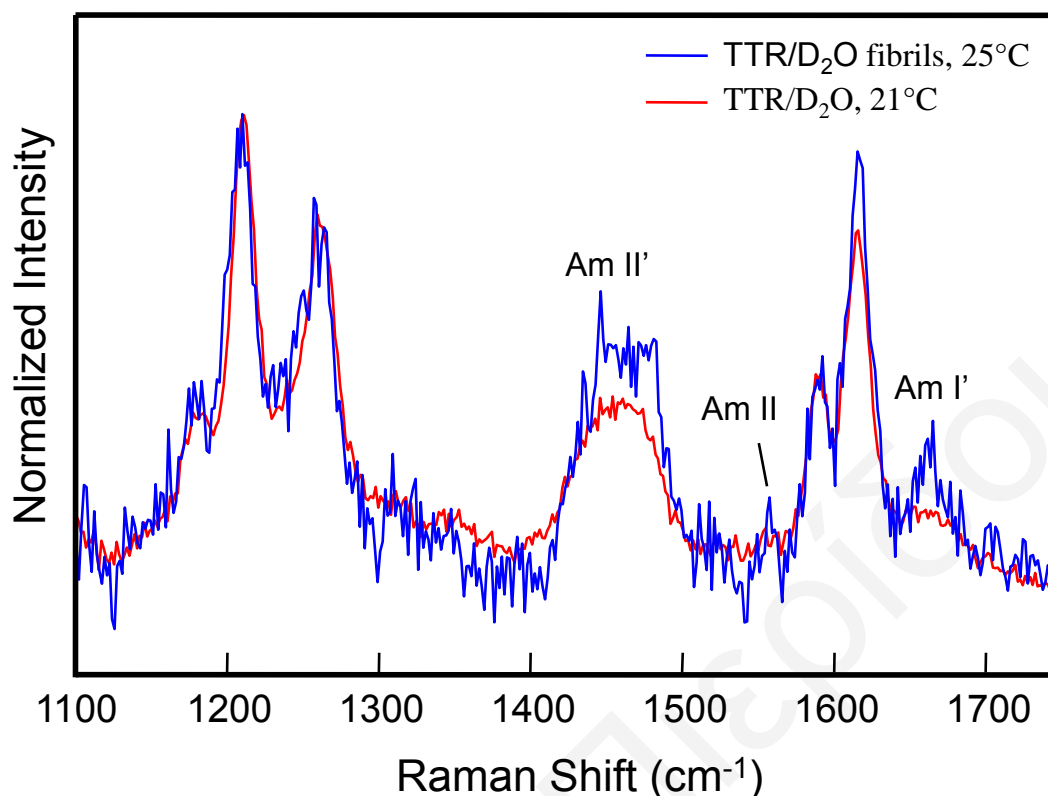
Γενικά οι σχετικές εντάσεις των κορυφών Y_{7a} και Y_{9a} (Σχήμα 5.1) χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στη βιβλιογραφία ως δείκτες για την αλλαγή των δεσμών υδρογόνου του φαινολικού υδροξυλίου.²⁸ Στο Σχήμα 5.8 παρουσιάζεται η καμπύλη του λόγου των εμβαδών των κορυφών Y_{7a}/Y_{9a} συναρτήσει της θερμοκρασίας, όπως προέκυψαν από την αποσυνέλιξη της περιοχής των φασμάτων $1150\text{-}1300 \text{ cm}^{-1}$ (Σχήματα 5.4-5.7). Όμοια τάση παρουσιάζουν και τα πειραματικά αποτελέσματα που λήφθηκαν σε προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριο Μοριακής Φασματοσκοπίας όπου το πεπτίδιο μελετήθηκε σε διάλυμα 40% v/v $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, μετά από διέγερση στα 239.5 nm .³⁰ Στο Σχήμα 5.8 παρουσιάζεται η μεταβολή του λόγου Y_{9a}/Y_{7a} συναρτήσει της θερμοκρασίας στα 239.5 nm , καθώς οι εντάσεις των κορυφών εξαρτώνται σημαντικά από το μήκος διέγερσης. Η μεταβολή που παρατηρείται στους λόγους των εμβαδών συναρτήσει της θερμοκρασίας σχετίζεται με την αλλαγή των δεσμών υδρογόνου του φαινολικού OH, η οποία οφείλεται στην αλλαγή της διαμόρφωσης του πεπτιδίου, ως επακόλουθο της αλλαγής του τοπικού περιβάλλοντος των καταλοίπων Tyr.



Σχήμα 5.8: Ο λόγος των εμβαδών Y_{7a} και Y_{9a} του πεπτιδίου TTR(105-115) σε διάλυμα 40% v/v $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ συναρτήσε της θερμοκρασίας, μετά από διέγερση στα 239.5 nm (κλειστοί κύκλοι) και 199.8 (ανοικτοί κύκλοι).³⁰

5.4.4 Σύγκριση Φασμάτων Συντονισμού Raman Αραιού Διαλύματος Πεπτιδίου και των Αμυλοειδών Ινιδίων του

Στο Σχήμα 5.9 παρουσιάζονται τα φάσματα UVRR του αραιού διαλύματος του πεπτιδίου TTR(105-115) (~1.5 mM) σε διάλυμα 40% v/v $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$ σε θερμοκρασία 21 °C και των σχηματιζόμενων ινιδίων του πεπτιδίου (~10 mM), μετά από διέγερση στα 199.8 nm. Το φάσμα UVRR των σχηματιζόμενων ινιδίων λήφθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Φασματοσκοπίας σε διάλυμα 10% v/v $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$, μετά από επώαση στους 25 °C. Η σύγκριση των δύο φασμάτων αποκαλύπτει ότι οι κορυφές που οφείλονται στις δονήσεις του Am I και Am II εμφανίζονται πολύ πιο οξείες στην περίπτωση των ινιδίων. Η διαφορά αυτή υποδεικνύει ότι οι δομικές αλλαγές που παρατηρούνται στην παρούσα φασματοσκοπική μελέτη συναρτήσε της θερμοκρασίας οφείλονται αποκλειστικά στην αλλαγή της διαμόρφωσης του πεπτιδίου και όχι στο σχηματισμό συσσωματωμάτων ή τελικών ινιδίων.

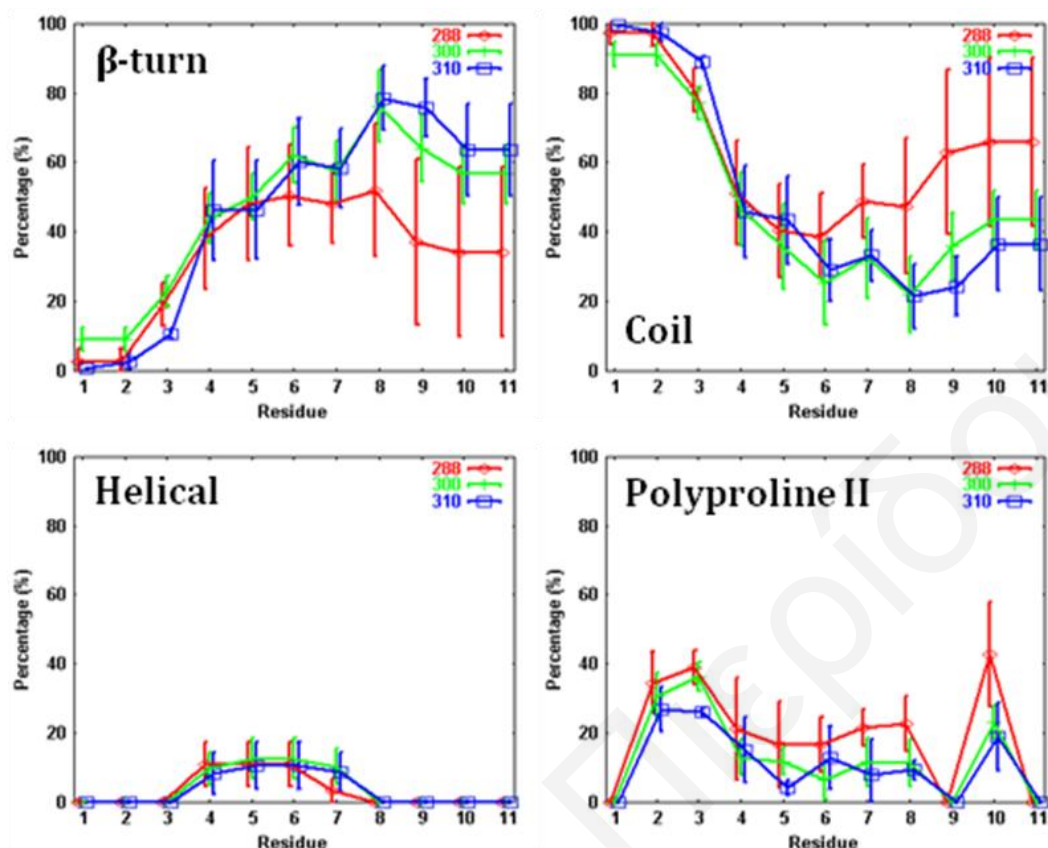


Σχήμα 5.9: Φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115). Με κόκκινο: χαμηλής συγκέντρωσης (~1.5 mM) σε διάλυμα 40% v/v CD₃CN/D₂O, στους 21°C. Με μπλε: ινίδια (~10 mM) σε D₂O, στους 25 °C, μετά από διέγερση στα 199.8 nm.

5.5 Υπολογιστικά Αποτελέσματα

5.5.1 Ανάλυση Διαμορφώσεων

Στο Σχήμα 5.10 παρουσιάζεται το ποσοστό της πιθανότητας σχηματισμού κάθε είδους δευτεροταγούς δομής του κάθε καταλοίπου της ακολουθίας του πεπτιδίου TTR(105-115), σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, το οποίο προκύπτει από την ανάλυση των διέδρων γωνιών ϕ και ψ . Παρατηρείται ότι στη χαμηλότερη θερμοκρασία (288 K), η κυρίαρχη διαμόρφωση είναι τυχαίου σπειρώματος, όπως έχει καθοριστεί από το STRIDE, με ~40-50% πιθανότητα σχηματισμού β -στροφής στην περιοχή του πεπτιδίου 4-11. Ανάλυση των διέδρων γωνιών έδειξε ότι τα κατάλοιπα που βρίσκονται σε τυχαία διαμόρφωση παρουσιάζουν 20-40% πιθανότητα να υιοθετούν δομή PPII και, σύμφωνα με το χάρτη Ramachandran, οι διέδρες γωνίες τους να είναι μεταξύ $-110^\circ < \phi < -40^\circ$ $130^\circ < \psi < 180^\circ$.³¹ Με την αύξηση της θερμοκρασίας στους 300 K, παρατηρείται σημαντική αύξηση της πιθανότητας σχηματισμού β -στροφών, κυρίως στην περιοχή 8-11 και ταυτόχρονη μείωση του ποσοστού σχηματισμού τυχαίου σπειρώματος. Σε θερμοκρασία 310 K, η πιθανότητα σχηματισμού δομής PPII είναι μικρότερη από 20% για όλα τα κατάλοιπα του πεπτιδίου.

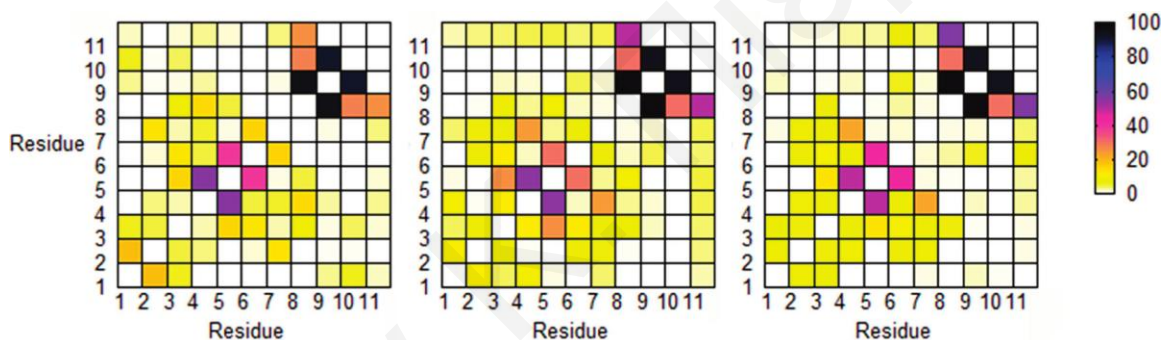


Σχήμα 5.10: Πιθανότητα σχηματισμού της δευτεροταγούς δομής των καταλοίπων του πεπτιδίου, όπως υπολογίστηκε μετά από προσομοιώσεις σε θερμοκρασίες 288, 300 και 310 K. Οι πιθανότητες σχηματισμού διαμόρφωσης polyproline II παρουσιάζονται στο κάτω δεξιά γράφημα, το οποίο περιλαμβάνει επίσης τις πιθανότητες σχηματισμού τυχαίου σπειρώματος που παρουσιάζονται στο πάνω δεξιά γράφημα. Η τυπική απόκλιση παρουσιάζεται στα γραφήματα με γραμμές σφάλματος. Τα κατάλοιπα 1-11 αντιπροσωπεύουν το τμήμα 105-115 της ακολουθίας της TTR.³⁰

5.5.2 Ανάλυση Αλληλεπιδράσεων Μεταξύ των Πλευρικών Αλυσίδων

Οι χάρτες πυκνότητας (*probability density maps*) των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.11. Σύμφωνα με την κλίμακα, το λευκό χρώμα αντιστοιχεί στη μηδενική πιθανότητα επαφής μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων, ενώ το μαύρο χρώμα αντιστοιχεί στη μέγιστη. Οι περισσότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων παρατηρούνται στο τμήμα του πεπτιδίου 8-11, όπου παρατηρείται και σχηματισμός της β-στροφής. Οι επαφές των πλευρικών αλυσίδων που σχηματίζονται στο κυρίως υδρόφοβο τμήμα των καταλοίπων 1-7 αντικατοπτρίζουν το σχηματισμό ενός υδρόφοβου πυρήνα ανάμεσα σε αυτά τα κατάλοιπα. Στην ενδιάμεση θερμοκρασία 300 K παρατηρείται αύξηση των αλληλεπιδράσεων των πλευρικών αλυσίδων στο τμήμα 1-7, ως επακόλουθο της μικρής αύξησης του ποσοστού

της β -στροφής. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καταλοίπων Ala4-Leu7, Ile3-Ala5 αποτελούν μερικά αντιπροσωπευτικά παραδείγματα. Στην υψηλότερη θερμοκρασία (310 K), παρατηρείται αύξηση των αλληλεπιδράσεων των πλευρικών αλυσίδων κυρίως στο τμήμα 8-11 σύμφωνα με την αύξηση του ποσοστού σχηματισμού β -στροφής. Η πιθανότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ των καταλοίπων Ser8-Ser11 αυξάνεται από 26% σε θερμοκρασία 288 K και σε 57% στην υψηλότερη θερμοκρασία 310 K. Επιπρόσθετα, στις υψηλές θερμοκρασίες το ποσοστό αλληλεπίδρασης μεταξύ της πλευρικής αλυσίδας της Tyr10 και γειτονικών πλευρικών αλυσίδων αυξάνεται κατά 5%. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων στα δύο τελικά άκρα είναι ελαφρώς πιο πιθανές στις δύο χαμηλότερες θερμοκρασίες. Σε θερμοκρασία 288 K παρατηρούνται σποραδικές αλληλεπιδράσεις που συμπεριλαμβάνουν τα ζεύγη καταλοίπων Tyr1-Tyr10 και Ile3-Tyr10.



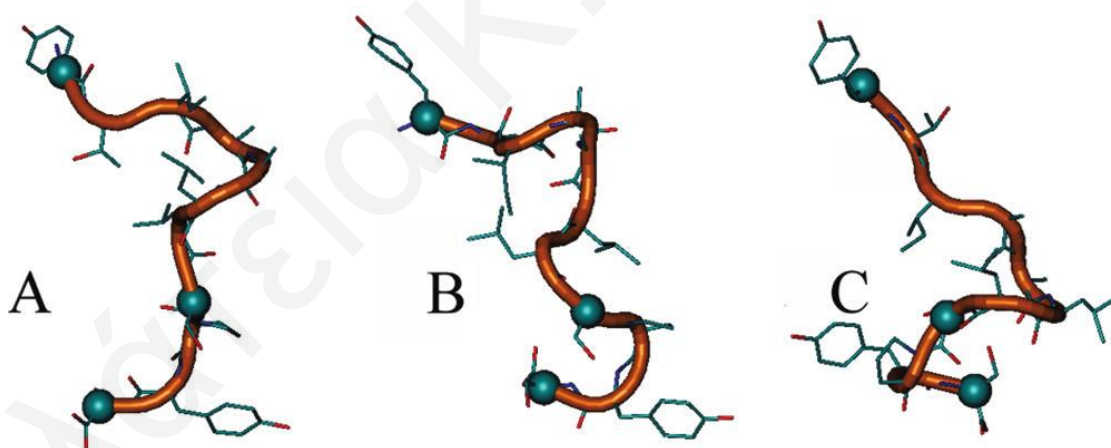
Σχήμα 5.11: Χάρτες πυκνότητας των αλληλεπιδράσεων των πλευρικών αλυσίδων. Τα γραφήματα από τα αριστερά προς τα δεξιά αντιστοιχούν σε προσομοιώσεις σε θερμοκρασίες 288, 300 και 310 K, αντίστοιχα. Τα κατάλοιπα 1-11 αντιπροσωπεύουν το τμήμα 105-115 της ακολουθίας της TTR.

5.5.3 Ανάλυση Ομαδοποίησης (*Cluster Analysis*)

Οι διαμορφώσεις του πεπτιδίου που προέκυψαν μετά από τις προσομοιώσεις στις θερμοκρασίες $T = 288$ K, 300 K και 312 K ταξινομηθήκαν σε οικογένειες μετά από ανάλυση ομαδοποίησης, βασισμένη στις καρτεσιανές συντεταγμένες των ατόμων του C_{α} για το τμήμα του πεπτιδίου 2-10. Τα C και N-τελικά άκρα δεν περιλαμβάνονται στην ανάλυση διότι απέδιδαν ένα πολύ μεγάλο αριθμό ομάδων, οι οποίες διέφεραν μόνο στο πρώτο και τελευταίο κατάλοιπο. Η αρχική κατάταξη έδωσε 26 ομάδες, με τις 11 ομάδες να αντιπροσωπεύουν το ~56% όλων των διαμορφώσεων. Χρησιμοποιώντας τις ιδιότητες των δευτεροταγών δομών των ομάδων αυτών, έγινε αναδιάταξή τους σε τρεις κύριες οικογένειες, με τις διαμορφώσεις τους να παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.12. Είναι

σημαντικό να αναφερθεί ότι κατά την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε δεν λήφθηκαν υπόψη οι πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων. Οι διαμορφώσεις των πλευρικών αλυσίδων που παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.12 αντιπροσωπεύουν μόνο τη θέση τους στην κύρια αλυσίδα.

Η οικογένεια A (πληθυσμός = 19%) εμφανίζεται να είναι περισσότερο σταθερή στις θερμοκρασίες 288 και 300 K. Η διαμόρφωση αυτή παρουσιάζει μια πιο συγκεκριμένη δομή στην κεντρική περιοχή της κύριας αλυσίδας. Η οικογένεια B (πληθυσμός = 16%) είναι σταθερή στις υψηλότερες θερμοκρασίες, 300 και 310 K, και εμφανίζεται περισσότερο δομημένη σε σχέση με τη οικογένεια A. Η διαμόρφωση αυτή περιλαμβάνει το σχηματισμό ενωμένων β -στροφών/κάμψεων στα τμήματα του πεπτιδίου 4-7, 5-8, 6-9 και 8-11. Η οικογένεια C (πληθυσμός = 20%) παρατηρείται σε όλο το θερμοκρασιακό εύρος που χρησιμοποιήθηκε στις προσομοιώσεις. Στη διαμόρφωση αυτή, το N-τελικό άκρο έχει τυχαία διαμόρφωση, ενώ τα τμήματα του πεπτιδίου 4-7, 5-8, 8-11 σχηματίζουν ενωμένες β -στροφές/κάμψεις. Το ποσοστό της β -στροφής που σχηματίζεται μεταξύ των καταλοίπων 8-11 στην οικογένεια C είναι μικρότερο σε σύγκριση με την οικογένεια A.



Σχήμα 5.12: Διαμορφώσεις των τριών κύριων οικογενειών όπως προέκυψαν από την ανάλυση ομαδοποίησης. Η διαμόρφωση της κύριας αλυσίδας παρουσιάζεται με πορτοκαλί σωλήνα. Τα άτομα C_{α} των καταλοίπων 1 (105), 8 (112) και 11 (115) εμφανίζονται με σφαιρίδια van der Waals. Τα κατάλοιπα 1 και 11 είναι τοποθετημένα από πάνω προς τα κάτω στο σχήμα, αντίστοιχα. Οι διαμορφώσεις της κύριας αλυσίδας και των πλευρικών αλυσίδων που παρατηρούνται σχετίζονται με τη χαρακτηριστική δομή για κάθε οικογένεια.

5.6 Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στις διαμορφωτικές αλλαγές που υπόκεινται τα αραιά διαλύματα του πεπτιδίου TTR(105-115), συναρτήσει της θερμοκρασίας. Οι δομικές

αλλαγές που συμβαίνουν στην κύρια αλυσίδα του πεπτιδίου επιφέρουν αλλαγές στο τοπικό περιβάλλον των αρωματικών καταλοίπων Tyr. Επομένως, η εκτενέστερη μελέτη των διαμορφωτικών αλλαγών μπορεί να παρέχει μια πιο λεπτομερή εικόνα για τη συμπεριφορά του πεπτιδίου στην υγρή φάση. Στην παρούσα μελέτη, η θερμοκρασία χρησιμοποιήθηκε ως κινητήρια δύναμη για την πρόκληση των διαμορφωτικών αλλαγών. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε βασισμένη στην ήδη γνωστή ιδιότητα των αμυλοειδογενών πρωτεϊνών και πεπτιδίων να σχηματίζουν ινίδια μετά από επώαση σε υψηλές θερμοκρασίες (π.χ. 36 °C). Η ινώδης δομή περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός εκτεταμένου δικτύου ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσεται μεταξύ ομάδων της κύριας αλυσίδας.^{32,33} Επομένως, έχει προταθεί ότι η δυνατότητα σχηματισμού ινιδίων αποτελεί γενική ιδιότητα όλων των πρωτεϊνών. Το πεπτίδιο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή σχηματίζει, μετά από επώαση, ινίδια *in vitro* και επομένως μπορεί να αποτελέσει πρότυπο για την κατανόηση του μηχανισμού σχηματισμού ινιδίων. Πριν από τη διαλεύκανση όμως του λεπτομερούς αυτού μηχανισμού, είναι αναγκαία η γνώση της δομής του πεπτιδίου στο διάλυμα, έτσι ώστε να μπορούν να παρακολουθηθούν οι δομικές αλλαγές που πρόκειται να συμβούν κατά τη διάρκεια της συσσωμάτωσης.

Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού ινιδίων, το πεπτίδιο αναμένεται να παρουσιάσει σημαντικές δομικές αλλαγές και κατ' επέκταση μεγάλη αλλαγή στο τοπικό περιβάλλον που περικλείει τα κατάλοιπά του. Προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριο Μοριακής Φασματοσκοπίας επιβεβαίωσε τις αλλαγές του τοπικού περιβάλλοντος των καταλοίπων Tyr στο πεπτίδιο, παρατηρώντας αύξηση της τιμής των απόλυτων διατομών σκεδασμού Raman της Tyr με την αύξηση της θερμοκρασίας.³⁰ Επομένως στο παρόν κεφάλαιο λήφθηκαν φάσματα UVRR μετά από διέγερση στα 200 nm ώστε να εξεταστούν απευθείας οι δομικές αλλαγές της κύριας αλυσίδας, συναρτήσει της θερμοκρασίας.

5.6.1 Προσδιορισμός της Δομής του Πεπτιδίου

Πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή του πεπτιδίου TTR(105-115) στην υγρή φάση λήφθηκαν από τα φάσματα UVRR μετά από διέγερση στα 199.8 nm. Οι δονήσεις αμιδίου του Σχήματος 5.1 εμφανίζονται στους 1666 (Am I), 1555 (Am II) και 1235-1245 cm^{-1} (Am III). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οι συχνότητες αυτές, αντιστοιχούν κυρίως σε τυχαία διαμόρφωση και ενδεχομένως στην παρουσία β -στροφής (από συχνότητα Am III).^{3,34} Ωστόσο, για μια πιο λεπτομερή εικόνα της δευτεροταγούς δομής του πεπτιδίου στην υγρή φάση, απαιτούνται περισσότερο ποσοτικές πληροφορίες. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό

της δομής του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε εκτενής στατιστική ανάλυση των φασμάτων UVRR του πεπτιδίου σε διάλυμα $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$.

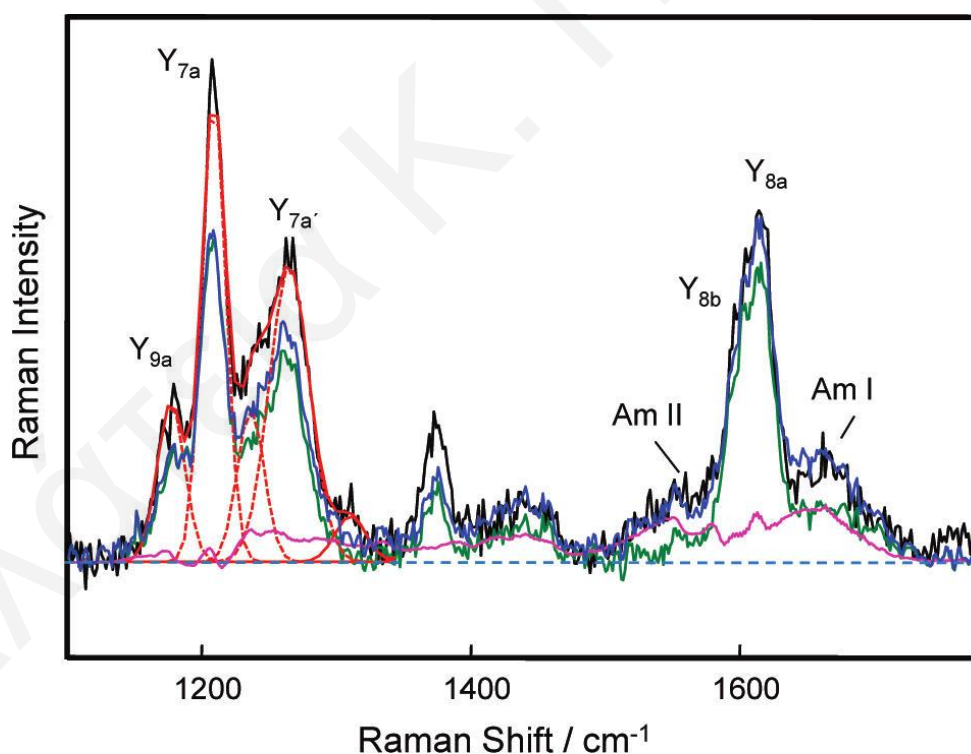
5.6.2 Ποσοτικός Προσδιορισμός της Δευτεροταγούς Δομής του Πεπτιδίου

Μια μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία συντονισμού Raman έχει αναπτυχθεί αρχικά από τους Chi *et al.*² και αργότερα από τους Huang *et al.*³ Συγκεκριμένα, η σύνθεση της δευτεροταγούς δομής μιας πρωτεΐνης μπορεί να καθοριστεί μετά από προσαρμογή ενός γραμμικού συνδυασμού πρότυπων φασμάτων που αντιστοιχούν στα “καθαρά” δευτεροταγή δομικά στοιχεία (PSSRS)^{2,3} στο φάσμα Raman της πρωτεΐνης με μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων. Επιπλέον, αναπτύχθηκαν πρόσφατα, διάφορες στατιστικές μέθοδοι, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ποσοτική ανάλυση των φασμάτων UVRR των πρωτεϊνών. Σκοπός των μεθόδων αυτών είναι η εξαγωγή των κυρίαρχων δομικών συστατικών που συνθέτουν ένα φάσμα Raman μιας πρωτεΐνης. Οι Lednev και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι με τη χρήση της μεθόδου *independent component analysis (ICA)*, μπορεί υπάρξει καλύτερη επίλυση των επιμέρους δευτεροταγών δομικών συστατικών, χωρίς να είναι απαραίτητη προϋπόθεση η εκ των προτέρων γνώση της δομικής σύστασης του πρωτεϊνικού συστήματος.^{1,35} Εκτενέστερη αναφορά για τις στατιστικές μεθόδους δίνονται στο Κεφάλαιο 2 (2.5.1.1).

Στην παρούσα μελέτη, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δευτεροταγούς δομής του πεπτιδίου TTR(105-115) συναρτήσει της θερμοκρασίας, χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο μέθοδοι. Ωστόσο, το κυριότερο πρόβλημα που παρατηρήθηκε κατά τη διαδικασία των αναλύσεων αυτών ήταν η πολύ ισχυρή συνεισφορά από τις δονήσεις των καταλοίπων Tyr στα φάσματα (Σχήμα 5.1). Για ένα μικρό πεπτίδιο, όπως το TTR(105-115) με μόνο δέκα πεπτιδικούς δεσμούς και με υψηλή συγκέντρωση σε αρωματικά κατάλοιπα Tyr, σε αντίθεση με τις μεγάλες σε μέγεθος πρωτεΐνες, είναι αναμενόμενη η ισχυρή συνεισφορά από τις αρωματικές πλευρικές αλυσίδες και αντίστοιχα, οι μικρές σε ένταση κορυφές των αμιδίων στα φάσματα Raman, μετά από διέγερση στα 200 nm. Η ελαχιστοποίηση της ισχυρής συνεισφοράς των αρωματικών καταλοίπων, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες,^{2,3} επιτυγχάνεται με την αφαίρεση των φασμάτων τους από τα φάσματα UVRR της πρωτεΐνης, ακόμη και αν η διαδικασία αφαίρεσης προκαλεί αλλοίωση στην περιοχή των φασμάτων με υψηλή ένταση. Στο Σχήμα 5.13 παρουσιάζονται τα φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) και της ελεύθερης Tyr σε διάλυμα 40% v/v $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ στους 14°C, μετά από διέγερση στα 199.8 nm. Από τα φάσματα είναι προφανές ότι ο λόγος των εντάσεων των κορυφών της Tyr στην περιοχή των 1200 cm^{-1} σε σχέση με την ένταση των

κορυφών στην περιοχή των 1600 cm^{-1} είναι διαφορετικός για το πεπτιδίο και την ελεύθερη Tyr. Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στους διαφορετικούς δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζει το φαινολικό OH στις δύο περιπτώσεις. Η αφαίρεση των δύο φασμάτων δεν ήταν αρκετά αποτελεσματική στην περιοχή των Y_{9a} , Y_{7a} και $Y_{7a'}$, παρεμποδίζοντας την περαιτέρω ανάλυση της κορυφής του Am III. Η προσαρμογή της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων στα φάσματα Raman του πεπτιδίου στην περίπτωση αυτή απέδωσε μεγάλο σφάλμα.

Επομένως, για τη λήψη χρήσιμων ποσοτικών πληροφοριών για τη δομή του πεπτιδίου από τα φάσματα του Σχήματος 5.1, εξετάστηκε ο λόγος των εντάσεων των κορυφών αμιδίου AmI/AmII και οι αντίστοιχες συχνότητές τους, μαζί με τη μελέτη της δόνησης κάμψης $C_{\alpha}H_2$ στους 1446 cm^{-1} και της δόνησης του Am III όπως προέκυψε από τη διαδικασία της αποσυνέλιξης (Σχήματα 5.4-5.7). Σύμφωνα με τα φάσματα PSSRS των Huang *et al.* μετά από διέγερση στα 197 nm , ο λόγος των εντάσεων των κορυφών AmI/AmII εξαρτάται από το είδος της δευτεροταγούς δομής.³



Σχήμα 5.13: Φάσμα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) στους $14\text{ }^{\circ}\text{C}$, μετά από διέγερση στα 199.8 nm (μαύρο), στο οποίο έγινε προσαρμογή γραμμικού συνδυασμού των φασμάτων PSSRS (ροζ) και του φάσματος υδατικού διαλύματος Tyr (πράσινο). Η προσαρμογή παρουσιάζεται με μπλε. Η αποσυνέλιξη της περιοχής του φάσματος στους 1200 cm^{-1} αποκαλύπτει τη συνεισφορά των δονήσεων Y_{9a} , Y_{7a} , Am III και $Y_{7a'}$ (διακεκομμένη κόκκινη γραμμή). Η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύει το άθροισμα όλων των κορυφών της αποσυνέλιξης.³⁰

Για τον προσδιορισμό του ποσοστού των δευτεροταγών στοιχείων που συνθέτουν τα φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115), χρησιμοποιήθηκε γραμμικός συνδυασμός των φασμάτων PSSRS³ και του φάσματος του υδατικού διαλύματος της ελεύθερης Tyr, προκειμένου να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή προσαρμογή στα δεδομένα (Σχήμα 5.13). Η καλύτερη προσαρμογή αντιστοιχεί σε συνεισφορά 70% β-στροφής και 30% τυχαίου σπειρώματος.³⁰ Κατά την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι συνδυασμοί, συμπεριλαμβανομένων συνεισφορών από α-έλικα και β-πτυχωτή επιφάνεια, καθώς και διάφορα ποσοστά β-στροφής και τυχαίου σπειρώματος. Εντούτοις, οι συχνότητες και οι εντάσεις των κορυφών του φάσματος δεν μπορούσαν να αναπαραχθούν σωστά. Ωστόσο, το χαμηλότερο ποσοστό για τα δύο δευτεροταγή στοιχεία (β-στροφής και τυχαίου σπειρώματος) μπορεί να καθοριστεί σε 50%. Μετά την προσαρμογή, οι εντάσεις των κορυφών στην περιοχή των 1200 cm⁻¹ δεν μπορούν να αναπαραχθούν επακριβώς για τους λόγους που προαναφέρθηκαν. Εντούτοις, η κλιμάκωση του φάσματος της προσαρμογής φαίνεται να προσεγγίζει αρκετά καλά τα πειραματικά δεδομένα σε αυτή την περιοχή. Επιπλέον, παρατηρείται ότι ο συνδυασμός των φασμάτων PSSRS και του φάσματος της ελεύθερης Tyr αναπαράγει και τις συνεισφορές από το διαλύτη, κυρίως τη δόνηση κάμψης του νερού στους 1650 cm⁻¹ και τη δόνηση κάμψης του C-H του ακετονιτριλίου στους ~1445 cm⁻¹. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε σε όλο το θερμοκρασιακό εύρος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Στο θερμοκρασιακό εύρος 10-21 °C όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.1 τα φάσματα παραμένουν αμετάβλητα σε σχέση με τη θερμοκρασία, και επομένως η καλύτερη προσαρμογή και στις τρεις περιπτώσεις αντιστοιχεί με το ίδιο ποσοστό β-στροφής και τυχαίου σπειρώματος. Ωστόσο, η αύξηση που παρατηρείται στο λόγο των εντάσεων των κορυφών AmI/AmII στους 28 °C αντικατοπτρίζεται στην αύξηση της συνεισφοράς της β-στροφής στην προσαρμογή, η οποία πλησιάζει το 100% του γραμμικού συνδυασμού.

Η ανάλυση *independent component* (ICA), σύμφωνα με τον κώδικα Jade,^{1,35,36} έδωσε μόνο ένα ανεξάρτητο στοιχείο, το οποίο ήταν πανομοιότυπο με το φάσμα της ελεύθερης Tyr, αγνοώντας έτσι τη συνεισφορά από τις χαμηλές σε ένταση ευρείες κορυφές των αμιδίων. Επομένως, στις περιπτώσεις των μικρών πεπτιδίων που περιέχουν αρωματικά κατάλοιπα σε υψηλές συγκεντρώσεις, η μέθοδος ICA δεν μπορεί να αναλύσει τα φάσματα των πεπτιδίων στα επιμέρους δευτεροταγή στοιχεία που συνθέτουν τη δομή τους.

Οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (Σχήμα 5.10) που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας Διατριβής, υπέδειξαν ότι η κυρίαρχη διαμόρφωση του πεπτιδίου

είναι τυχαίο σπείρωμα (κυρίως στην περιοχή 1-3) με το σχηματισμό β -στροφών στο κεντρικό τμήμα της ακολουθίας του πεπτιδίου (κατάλοιπα 4-7), των οποίων ο πληθυσμός τους αυξάνεται συναρτήσει της θερμοκρασίας. Η προτεινόμενη αυτή δομή επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από το γραμμικό συνδυασμό των φασμάτων PSSRS. Η ανάλυση των διεδρων γωνιών έδειξε ότι τα κατάλοιπα με τυχαία διαμόρφωση παρουσιάζουν πιθανότητα 20-40% να υιοθετούν PPII δομή πιθανότητα η οποία μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας.³⁰ Οι Asher και οι συνεργάτες του,^{37,38} μελετώντας τα φάσματα UVRR πολυπεπτιδίων πλούσιων σε αλανίνες, τα οποία εμφανίζουν PPII διαμόρφωση, έδειξαν ότι η συχνότητα του Am III (1245 cm^{-1}) βρίσκεται πολύ κοντά σε αυτή της β -στροφής όπως αναφέρθηκε από τους Huang *et al.*,³ ενώ οι συχνότητες των Am I και Am II πλησιάζουν τις συχνότητες της τυχαίας διαμόρφωσης. Επιπλέον, ο λόγος των εντάσεων των κορυφών Am I και Am II στο φάσμα της PPII δομής είναι διαφορετικός από το λόγο που παρατηρήθηκε στα φάσματα του πεπτιδίου. Η χαμηλή διακριτική ικανότητα των κορυφών αμιδίου στα συγκεκριμένα φάσματα σε συνδυασμό με την έντονη συνεισφορά από τις δονήσεις της Tyr δεν μπορούν να επιτρέψουν τη διαφοροποίηση της PPII διαμόρφωσης. Οι πειραματικές παρατηρήσεις σε συνδυασμό με την ανάλυση των διεδρων γωνιών από τις προσομοιώσεις, η οποία προτείνει ότι η διαμόρφωση PPII δεν είναι ο κυρίαρχος πληθυσμός στην κατάσταση της τυχαίας διαμόρφωσης, επικυρώνουν την παράλειψη της συνεισφοράς της PPII διαμόρφωσης κατά τη διαδικασία της ανάλυσης των φασμάτων UVRR στα 199.8 nm.

Επιπρόσθετα, η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων κατά μήκος της αλυσίδας του πεπτιδίου έδειξε ότι οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις παρουσιάζονται στο τμήμα 8-11, συμπεριλαμβανομένων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ Tyr10 (κατάλοιπο 114) με Ser8 (112) και Pro9(113). Η παρατήρηση των αλληλεπιδράσεων αυτών επιβεβαιώνει τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη προσδιορισμού της τιμής του pK_a που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 4, όπου προτάθηκε ο σχηματισμός ενδομοριακών δεσμών μεταξύ της υδροξυλικής ομάδας του καταλοίπου Tyr114 και των γειτονικών του πλευρικών αλυσίδων.³⁹

Βιβλιογραφία

- (1) Shashilov, V.; Xu, M.; Ermolenkov, V. V.; Fredriksen, L.; Lednev, I. K. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 6972.
- (2) Chi, Z. H.; Chen, X. G.; Holtz, J. S. W.; Asher, S. A. *Biochemistry* **1998**, *37*, 2854.
- (3) Huang, C. Y.; Balakrishnan, G.; Spiro, T. G. *Journal of Raman Spectroscopy* **2006**, *37*, 277.
- (4) Asher, S. A.; Ianoul, A.; Mix, G.; Boyden, M. N.; Karnoup, A.; Diem, M.; Schweitzer-Stenner, R. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 11775.
- (5) Asher, A. A.; Mikhonin, A. V.; Bykov, S. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 8433.
- (6) Brooks, B. R.; Brooks, C. L.; Mackerell, A. D.; Nilsson, L.; Petrella, R. J.; Roux, B.; Won, Y.; Archontis, G.; Bartels, C.; Boresch, S.; Caflisch, A.; Caves, L.; Cui, Q.; Dinner, A. R.; Feig, M.; Fischer, S.; Gao, J.; Hodoscek, M.; Im, W.; Kuczera, K.; Lazaridis, T.; Ma, J.; Ovchinnikov, V.; Paci, E.; Pastor, R. W.; Post, C. B.; Pu, J. Z.; Schaefer, M.; Tidor, B.; Venable, R. M.; Woodcock, H. L.; Wu, X.; Yang, W.; York, D. M.; Karplus, M. *Journal of Computational Chemistry* **2009**, *30*, 1545.
- (7) Peterson, S. A.; Klabunde, T.; Lashuel, H. A.; Purkey, H.; Sacchettini, J. C.; Kelly, J. W. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 12956.
- (8) Hansmann, U. H. E. *Chemical Physics Letters* **1997**, *281*, 140.
- (9) Sugita, Y.; Okamoto, Y. *Chemical Physics Letters* **1999**, *314*, 141.
- (10) Nymeyer, H.; Gnanakaran, S.; Garcia, A. E. Atomic simulations of protein folding, using the replica exchange algorithm. In *Numerical Computer Methods, Pt D*, 2004; Vol. 383; pp 119.
- (11) Tamamis, P.; Adler-Abramovich, L.; Reches, M.; Marshall, K.; Sikorski, P.; Serpell, L.; Gazit, E.; Archontis, G. *Biophysical Journal* **2009**, *96*, 5020.
- (12) Tamamis, P.; Kasotakis, E.; Mitraki, A.; Archontis, G. *Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 15639.

- (13) Tamamis, P.; Archontis, G. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2011**, *357*, 717.
- (14) MacKerell, A. D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. *Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102*, 3586.
- (15) MacKerell, A. D.; Feig, M.; Brooks, C. L. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25*, 1400.
- (16) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. *Journal of Chemical Physics* **1983**, *79*, 926.
- (17) Neria, E.; Fischer, S.; Karplus, M. *Journal of Chemical Physics* **1996**, *105*, 1902.
- (18) Nose, S. *Journal of Chemical Physics* **1984**, *81*, 511.
- (19) Hoover, W. G. *Physical Review A* **1985**, *31*, 1695.
- (20) Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. *Journal of Computational Physics* **1977**, *23*, 327.
- (21) Frishman, D.; Argos, P. *Proteins-Structure Function and Genetics* **1995**, *23*, 566.
- (22) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *J. Mol. Graph. Mod.* **1996**, *14*, 33–38.
- (23) Karpen, M. E.; Tobias, D. J.; Brooks, C. L. *Biochemistry* **1993**, *32*, 412.
- (24) Tamamis, P.; Skourtis, S. S.; Morikis, D.; Lambris, J. D.; Archontis, G. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* **2007**, *26*, 571.
- (25) Dek, J.C.; Iwaki, L. K.; Dlott, D. D. *Journal of Physical Chemistry A* **1998**, *102*, 8193.
- (26) Copeland, R. A.; Spiro, T. G. *Biochemistry* **1985**, *24*, 4960.
- (27) Sugawara, Y.; Harada, I.; Matsuura, H.; Shimanouchi, T. *Biopolymers* **1978**, *17*, 1405.
- (28) Hashimoto, S.; Miura, K.; Yamagishi, T.; Takeuchi, H.; Harada, I. *Photochemistry and Photobiology* **1992**, *56*, 1097.

- (29) Hildebrandt, P. G.; Copeland, R. A.; Spiro, T. G.; Otlewski, J.; Laskowski, M. J.; Prendergast, F. G. *Biochemistry* **1988**, *27*, 5426.
- (30) Pieridou, G.; Avgousti-Menelaou, C.; Tamamis, P.; Archontis, G.; Hayes, S. C. *Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115*, 4088.
- (31) Vila, J. A.; Baldoni, H. A.; Ripoll, D. R.; Ghosh, A.; Scheraga, H. A. *Biophysical Journal* **2004**, *86*, 731.
- (32) Jaroniec, C. P.; MacPhee, C. E.; Bajaj, V. S.; McMahon, M. T.; Dobson, C. M.; Griffin, R. G. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **2004**, *101*, 711.
- (33) Jaroniec, C. P.; MacPhee, C. E.; Astrof, N. S.; Dobson, C. M.; Griffin, R. G. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **2002**, *99*, 16748.
- (34) Chi, Z. H.; Asher, S. A. *Biochemistry* **1998**, *37*, 2865.
- (35) Shashilov, V. A.; Xu, M.; Ermolenkov, V.V.; Lednev, I. K. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radioactive Transfer* **2006**, *102*, 46.
- (36) Downloaded from <http://www.tsi.enst.fr/~cardoso/guidesepsou.html>
- (37) Mikhonin, A.V.; Asher, S.A. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 3047.
- (38) Asher, S.A.; Mikhonin, A.V.; Bykov, S. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 8433.
- (39) Pieridou, G.; Hayes, S. C. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2009**, *11*, 5302.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ TTR(105-115) ΣΕ ΜΕΙΓΜΑΤΑ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ/ΝΕΡΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ RAMAN

6.1 Εισαγωγή

Κατά τη διαδικασία ινιδοποίησης, ως αποτέλεσμα της επώασης σε υψηλές θερμοκρασίες, το πεπτιδίο TTR(105-115) αναμένεται να βιώσει σημαντικές δομικές αλλαγές και κατ' επέκταση μεγάλες αλλαγές στο τοπικό του περιβάλλον καθώς οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες ενσωματώνονται στην ινώδη δομή. Σε προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Φασματοσκοπίας μελετήθηκαν αραιά διαλύματα του πεπτιδίου TTR(105-115) συναρτήσει της θερμοκρασίας και προτάθηκε η αύξηση της υδροφοβικότητας του τοπικού περιβάλλοντος των καταλοίπων Tyr με αύξηση της θερμοκρασίας, μέσω υπολογισμού των απόλυτων διατομών RR και των αλλαγών στη συχνότητα των δονήσεων της Tyr.¹ Σε συνέχεια της ερευνητικής αυτής εργασίας, μείγματα γλυκερόλης/νερού διαφόρων συγκεντρώσεων χρησιμοποιήθηκαν ως ένα μεταβαλλόμενο διαλυτικό περιβάλλον με σκοπό να προσομοιώσουμε συστηματικά την αλλαγή στο περιβάλλον του πεπτιδίου κατά την ινιδοποίηση. Τυχόν αλλαγές στη δομή του πεπτιδίου λόγω του διαλυτικού περιβάλλοντος διερευνήθηκαν μέσω αλλαγών των δεσμών υδρογόνου των καταλοίπων Tyr.

Υδατικά διαλύματα της γλυκερόλης έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στο πεδίο της έρευνας ως βιολογικό κρυοπροστατευτικό, σταθεροποιώντας τη δραστηριότητα των ενζύμων και τη φυσική δομή των πρωτεϊνών.²⁻⁵ Ως αποτέλεσμα του ενδιαφέροντος αυτού, τα μείγματα αυτά έχουν μελετηθεί με διάφορες μεθόδους, συμπεριλαμβανομένης της φασματοσκοπίας IR,^{2,4,6} φθορισμού^{7,8}, Raman^{3,9,10} και θερμοδομετρίας,^{11,12} όπως και θεωρητικά με υπολογιστικές μεθόδους Μοριακής Δυναμικής.² Στην παρούσα μελέτη, το διαλυτικό περιβάλλον λαμβάνει επίσης το ρόλο του εσωτερικού προτύπου, επομένως ήταν αναγκαία η μελέτη της συμπεριφοράς μειγμάτων γλυκερόλης/νερού συναρτήσει της συγκέντρωσης, όπου το δίκτυο δεσμών υδρογόνου μεταβάλλεται, και πως οι αλλαγές αυτές αντικατοπτρίζονται στην τιμή της απόλυτης διατομής σκεδασμού Raman. Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει η συμπεριφορά ενός κυρίως υδρόφοβου πεπτιδίου σε ένα διαλυτικό σύστημα που κατά κύριο λόγο έχει μελετηθεί στις περιπτώσεις σφαιρικών πρωτεϊνών.

6.2 Πειραματικές Συνθήκες

Στην παρούσα φασματοσκοπική μελέτη παρασκευάστηκαν μείγματα γλυκερόλης/νερού, με συγκεντρώσεις γλυκερόλης (1.37 M, 3.4 M, 5.1 M, 6.9 M, και 9.6 M). Τα μείγματα αυτά αντιστοιχούν σε μοριακό κλάσμα της γλυκερόλης στο μείγμα 0.01 έως ~0.4. Ίδια συγκέντρωση έχει χρησιμοποιηθεί και σε προηγούμενες μελέτες αυτών των μειγμάτων, όπου εξετάστηκε η συμπεριφορά των δεσμών υδρογόνου.² Κάθε φάσμα που παρουσιάζεται στο παρόν κεφάλαιο αποτελεί άθροισμα 9-12 φασμάτων με χρόνο συλλογής δεδομένων δέκα λεπτά ανά φάσμα.

6.3 Μεθοδολογία Ανάλυσης Φασμάτων Συντονισμού Raman

Απόλυτες Διατομές συντονισμού Raman. Οι Απόλυτες Διατομές Σκεδασμού Raman έχουν προσδιοριστεί με βάση την πιο κάτω Εξίσωση:

$$\sigma_R(v(x)) = \frac{I_{v(x)} \cdot C_i \cdot \left(\frac{1+2\rho}{1+\rho}\right)_{v(x)}}{I_i \cdot C_{v(x)} \cdot \left(\frac{1+2\rho}{1+\rho}\right)_i} \cdot \sigma_i \quad (6.1)$$

Όπου σ_R η διατομή σκεδασμού Raman της δόνησης $v(x)$, ρ ο λόγος αποπόλωσης για τη συγκεκριμένη μετάπτωση, C είναι η συγκέντρωση του δείγματος και του εσωτερικού προτύπου, και $I_{v(x)}$ και I_i είναι οι πειραματικές εντάσεις της εξεταζόμενης κορυφής και του εσωτερικού προτύπου, αντίστοιχα. Ο υπολογισμός των απόλυτων διατομών συντονισμού Raman των καταλοίπων Tyr του πεπτιδίου TTR(105-115) σε διάφορα μείγματα γλυκερόλης/νερού, απαιτεί τη χρήση ενός εσωτερικού προτύπου, το οποίο πρέπει να μην επιταχύνει το μηχανισμό συσσωμάτωσης του πεπτιδίου, όπως έχει παρατηρηθεί με τη χρήση του θεικού νατρίου σε προηγούμενα πειράματα. Επομένως, ως εσωτερικό πρότυπο κρίθηκε αναγκαία η χρήση του ίδιου του διαλύτη και συγκεκριμένα η δόνηση παραμόρφωσης CH_2 (CH_2 deformation) της γλυκερόλης στους 1469 cm^{-1} . Αξίζει να σημειωθεί ότι η τιμή της απόλυτης διατομής Raman της κορυφής αυτής δεν έχει αναφερθεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία. Στην παρούσα μελέτη έγινε υπολογισμός της τιμής της απόλυτης διατομής σκεδασμού της παραμόρφωσης CH_2 της γλυκερόλης στα διάφορα μείγματα γλυκερόλης/νερού, χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό πρότυπο τη δόνηση κάμψης του νερού που παρατηρείται στους $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$. Διαλύματα των αλάτων που χρησιμοποιούνται ως εσωτερικά πρότυπα σε βιολογικές μελέτες, όπως το θεικό νάτριο δεν μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν γιατί οι κορυφές τους επικαλύπτονται από κορυφές

της γλυκερόλης, η οποία παρουσιάζει ένα αρκετά πλούσιο σε κορυφές φάσμα Raman. Η τιμή της απόλυτης διατομής Raman της δόνησης κάμψης του νερού για μήκος διεγερσης στα 239.5 nm, μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία, ούτε μπορεί να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας προσομοίωση του όρου A σε ήδη γνωστές τιμές για το λόγο ότι δεν υπάρχουν αρκετές διαθέσιμες τιμές της απόλυτης διατομής σκεδασμού Raman σε άλλα μήκη κύματος διεγερσης. Επομένως η απόλυτη διατομή της κάμψης του νερού έχει επίσης υπολογιστεί στην παρούσα μελέτη, σε σχέση με τη γνωστή διατομή σκεδασμού του SO_4^{2-} ($\sigma_{\delta(\text{H}_2\text{O})} = 3.05 \times 10^{-29} \text{ cm}^{-2}$). Εντούτοις, στα μείγματα γλυκερόλης/νερού οι αλληλεπιδράσεις λόγω δεσμών υδρογόνου ποικίλουν, προκαλώντας αλλαγή στο εύρος της κορυφής της κάμψης του νερού, και συνεπώς μεταβολή στη τιμή της απόλυτης διατομής RR.

Προκειμένου να διερευνηθεί η εξάρτηση της τιμής της απόλυτης διατομής Raman της κάμψης του νερού συναρτήσει της συγκέντρωσης της γλυκερόλης, έγινε υπολογισμός της διατομής σκεδασμού μέσω σύγκρισης της έντασης της κορυφής στα μείγματα γλυκερόλης/νερού με την αντίστοιχη ένταση στα μείγματα γλυκερόλης/νερού που περιείχαν θειικό νάτριο, συγκέντρωσης 0.5 M. Η διόρθωση των φασμάτων για αυτο-απορρόφηση κρίθηκε αναγκαία στην περίπτωση των διαλυμάτων που περιείχαν θειικά. Για τον υπολογισμό της διατομής σκεδασμού της κάμψης του νερού, έγινε αφαίρεση του εμβαδού της κορυφής της γλυκερόλης στους 976 cm^{-1} ($\text{CH}_2 \text{ rock}$) από το εμβαδόν της συμμετρικής δόνησης τάσης του θειικού στα 981 cm^{-1} .

Η διαφορική διατομή σκεδασμού Raman για τη συμμετρική δόνηση του θειικού έχει υπολογιστεί προηγουμένως σε αυτό το μήκος κύματος.¹³ Η Εξίσωση 6.2 που συνδέει την ολική διατομή σκεδασμού Raman και τη διαφορική διατομή, σε συνδυασμό με την Εξίσωση 6.1 μπορεί να αποδώσουν την τιμή της απόλυτης διατομής RR του θειικού.^{14,15}

$$\sigma_R = \frac{8\pi}{3} \cdot \frac{(1+2\rho)}{(1+\rho)} \cdot \left(\frac{d_{\sigma_R}}{d\Omega} \right) \quad (6.2)$$

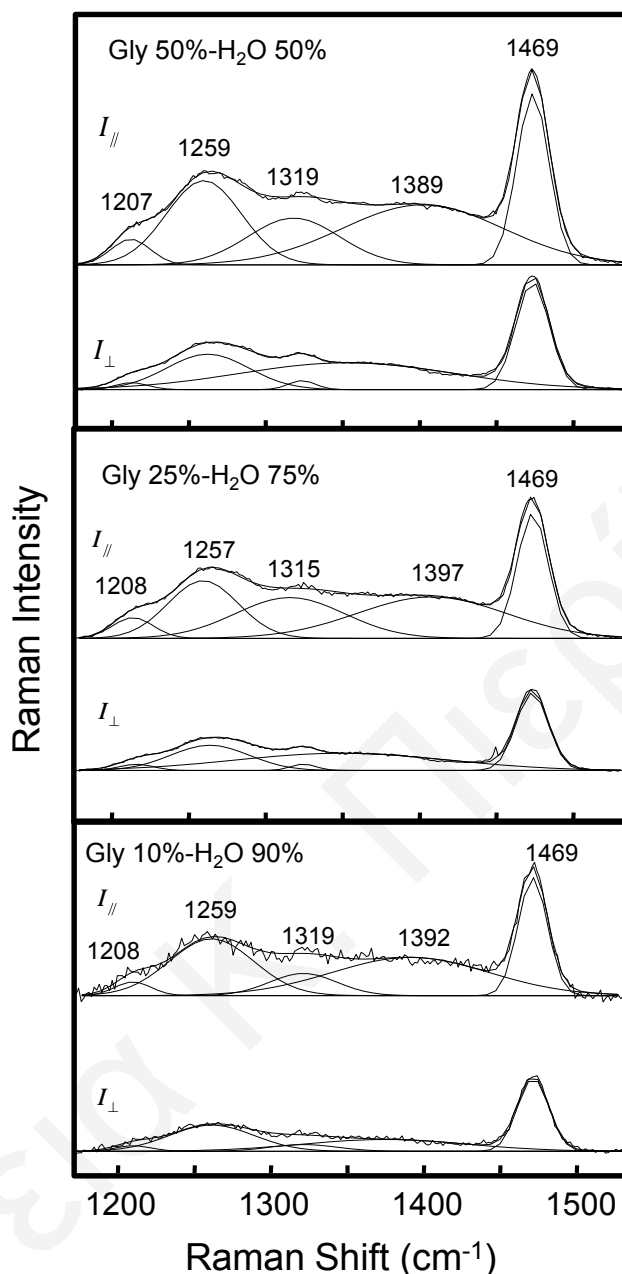
Οι εντάσεις των κορυφών έχουν διορθωθεί ως προς τη φασματική απόκριση του φασματογράφου, χρησιμοποιώντας βαθμονομημένη λάμπα δευτερίου D_2 (Heraeus Noblelight, Cathodeon Ltd), πριν από τη διαδικασία διόρθωσης της αυτοαπορρόφησης. Η απόλυτη διατομή σκεδασμού Raman της δόνησης παραμόρφωσης της γλυκερόλης στους 1469 cm^{-1} έχει χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό των απόλυτων διατομών σκεδασμού Raman των δονήσεων της Tyr (Y_{8a} , Y_{8b} , Y_{9a} , Y_{7a}). Οι τιμές των απόλυτων διατομών

σκεδασμού για τις δονήσεις των διαλυτών καθώς και για τις δονήσεις της Τγρ, παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.1.

Λόγος Αποπόλωσης. Ο λόγος αποπόλωσης ($\rho=I_{\perp}/I_{\parallel}$) ορίζεται ως ο λόγος της σκεδαζόμενης έντασης με πόλωση κάθετη ως προς τη σκεδαζόμενη ένταση που μετράται παράλληλα σε σχέση με την πόλωση του προσπίπτοντος φωτός στο δείγμα. Η πόλωση της ακτινοβολίας διέγερσης, καθορίστηκε περνώντας διαμέσου πέντε πλακιδίων μικροσκοπίου από χαλαζία *air-spaced*, τα οποία βρίσκονται σε ίση απόσταση μεταξύ τους και είναι προσανατολισμένα σύμφωνα με τη γωνιά Brewster. Πριν από τον αποπολωτή (*polarization scrambler*), τοποθετείται ένας πολωτής *Glan-Laser* (10 mm άνοιγμα) (Thorlabs) για τον καθορισμό της πολώσης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας που περνά στο φασματογράφο. Οι λόγοι αποπόλωσης έχουν διορθωθεί για τη μη-ιδανική απόσβεση του πολωτή σύμφωνα με την εξίσωση 6.3:¹⁶

$$\frac{I_{per}^{measured}}{I_{par}^{measured}} = \frac{I_{per}^{ideal} + c \cdot I_{par}^{ideal}}{I_{par}^{ideal} + c \cdot I_{per}^{ideal}} \quad (6.3)$$

όπου c είναι μια σταθερά που αντιπροσωπεύει την τιμή της ορθογωνικότητας του πολωμένου φωτός που περνά διαμέσου του πολωτή. Η υπολογισμένη τιμή του λόγου αποπόλωσης της δόνησης του κυκλοεξανίου στους 802 cm^{-1} στα 239.5 nm είναι ήδη γνωστή από τη βιβλιογραφία (0.08 ± 0.01), έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της σταθεράς c (-0.01) για τη συγκεκριμένη πειραματική διάταξη.^{16,17} Οι εντάσεις των κορυφών Raman έχουν προσδιοριστεί μετά από αριθμητική ολοκλήρωση των κορυφών. Στις περιπτώσεις που παρατηρήθηκε αλληλοεπικάλυψη των κορυφών πραγματοποιήθηκε κατάλληλη αποσυνέλιξη σε Γκαουσιανές συνιστώσες και στη συνέχεια έγινε ολοκλήρωση των καμπυλών που προέκυψαν. Ο λόγος αποπόλωσης για την κορυφή της γλυκερόλης στους 1469 cm^{-1} έχει υπολογιστεί μετά από διέγερση στα 239.5 nm (Σχήμα 6.1) και βρέθηκε σε όλες τις συγκεντρώσεις γλυκερόλης ίσος με 0.59 , γεγονός που υποδεικνύει ότι ο λόγος αποπόλωσης δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωση της γλυκερόλης. Η τιμή αυτή συμφωνεί με βιβλιογραφικά δεδομένα στα οποία μετά από διέγερση στα 532 nm η τιμή βρέθηκε να είναι ίση με 0.60 .¹²



Σχήμα 6.1: Φάσματα UVRR μειγμάτων γλυκερόλης/νερού για συγκεντρώσεις 10% (1.37 M), 25% (3.4 M) και 50% (6.9 M), μετά από διέγερση στα 239.5 nm. Τα φάσματα λήφθηκαν για (||) και (⊥) πόλωση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε σχέση με την πόλωση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Η τιμή του $\rho_{\delta(\text{H}_2\text{O})}$ έχει υπολογιστεί σε προηγούμενη μελέτη στα 260 nm και έχει βρεθεί ότι δεν εξαρτάται από το μήκος διέγερσης (0.54).¹⁸ Ο λόγος αποπόλωσης των δονήσεων της τυροσίνης λήφθηκε από προηγούμενη βιβλιογραφική μελέτη (0.33).¹⁹ Συνολικά οι λόγοι αποπόλωσης της γλυκερόλης στις διάφορες συγκεντρώσεις, παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.1.

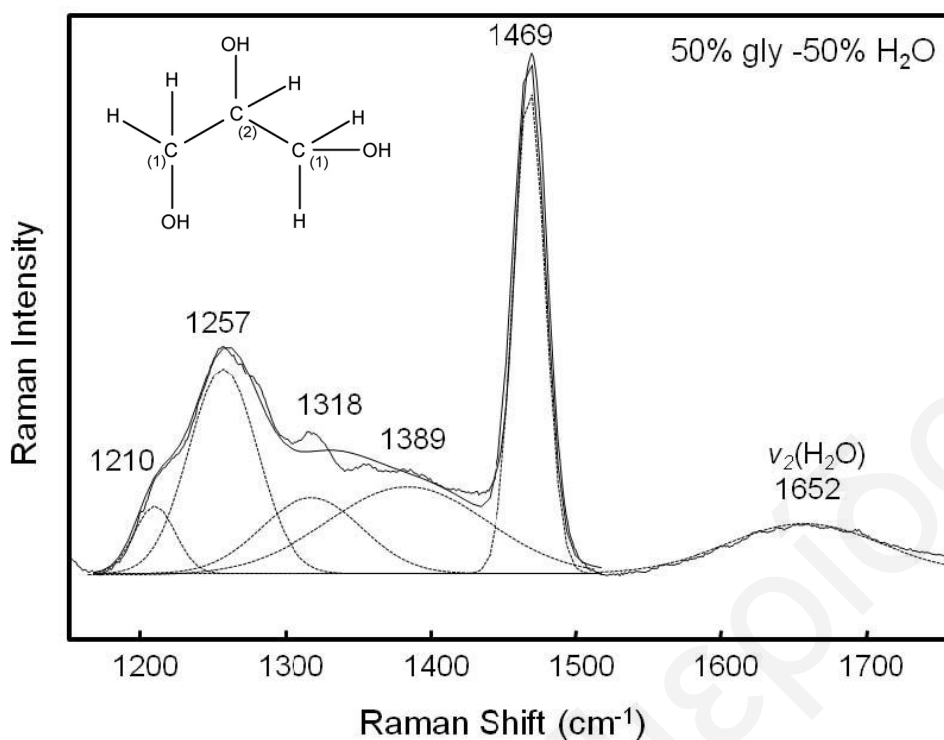
Πίνακας 6.1. Απόλυτες διατομές σκεδασμού Raman (σ_R) και λόγοι αποπόλωσης (ρ) για τη δόνηση της γλυκερόλης στους 1469 cm^{-1} και απόλυτες RR διατομές για τη δόνηση κάμψης του νερού και τις δονήσεις της Tyr σε διαλύματα γλυκερόλης/νερού, σε μήκος διέγερσης 239.5 nm .

χ_{glycerol}	$\rho(\text{solvent})$	$\sigma_R(\text{H}_2\text{O})$ (10^{-29} cm^2)	$\sigma_R(\text{gly})$ (10^{-27} cm^2)	$\sigma_R(\text{Y}_{8a+b})$ (10^{-25} cm^2)	$\sigma_R(\text{Y}_{9a})$ (10^{-25} cm^2)	$\sigma_R(\text{Y}_{7a})$ (10^{-25} cm^2)
0.027	0.59 ± 0.03	1.46 ± 0.29	0.24 ± 0.02	2.14 ± 0.59	0.93 ± 0.31	0.70 ± 0.14
0.075	0.60 ± 0.03	1.72 ± 0.37	0.29 ± 0.05	2.86 ± 0.72	1.50 ± 0.47	1.22 ± 0.52
0.127	0.59	1.39 ± 0.44	0.20 ± 0.02	3.41 ± 0.46	1.44 ± 0.17	1.12 ± 0.11
0.196	0.58 ± 0.06	3.41 ± 0.12	0.44 ± 0.07	5.84 ± 0.78	2.68 ± 0.31	1.90 ± 0.27
0.365	0.59	17.30 ± 3.61	1.97 ± 0.26	28.0 ± 2.42	13.20 ± 0.89	10.60 ± 1.04

6.4 Αποτελέσματα και Συζήτηση

6.4.1 Μείγματα Γλυκερόλης/Νερού

Για τον υπολογισμό της απόλυτης διατομής σκεδασμού της δόνησης παραμόρφωσης της γλυκερόλης στους 1469 cm^{-1} συναρτήσει της συγκέντρωσης, λήφθηκαν φάσματα UVRR μιας σειράς μειγμάτων v/v γλυκερόλης/νερού, μετά από διέγερση στα 239.5 nm . Ενδεικτικά, στο Σχήμα 6.2 παρουσιάζεται το φάσμα UVRR μείγματος 50% v/v γλυκερόλης/νερού (3.4 M , $\chi_g=0.196$). Το φάσμα επικεντρώνεται στην περιοχή μεταξύ 1200 και 1500 cm^{-1} , η οποία μπορεί να αναλυθεί σε πέντε κορυφές, μετά από κατάλληλη διαδικασία αποσυνέλιξης του ολικού φάσματος. Μετά την αποσυνέλιξη παρατηρούνται κορυφές στους 1210 , 1257 , 1318 , 1389 και 1469 cm^{-1} , οι οποίες σχετίζονται με τη συνεισφορά της δόνησης στρέψης CH_2 , της δόνησης τάσης του CO του ατόμου του δευτεροταγούς άνθρακα (C_2), της δόνησης στρέψης CH_2 , της παραμόρφωσης του COH (COH deformation) και της παραμόρφωσης του CH_2 , αντίστοιχα.²⁰



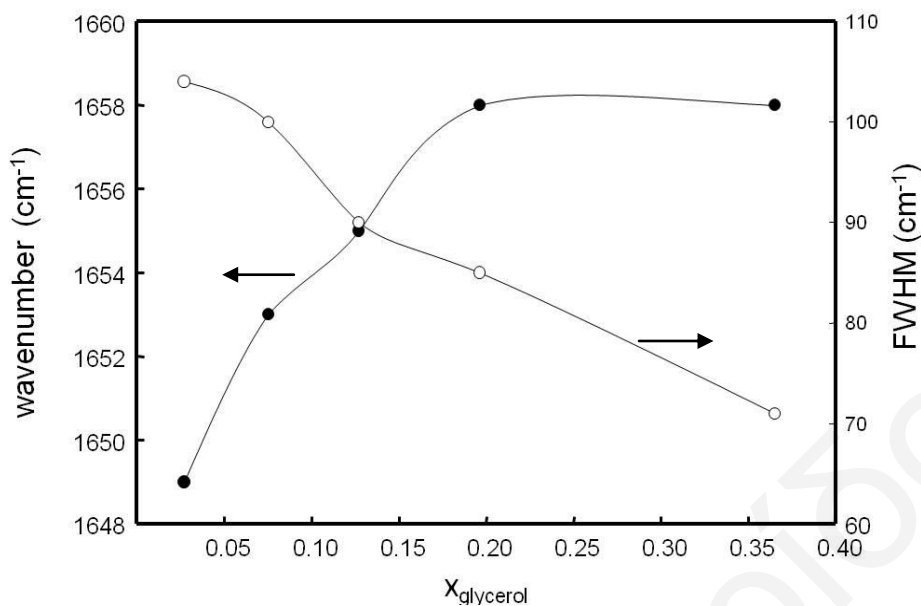
Σχήμα 6.2: Φάσμα UVRR μείγματος 50% v/v γλυκερόλης/νερού (3.4 M, χ_g 0.196), μετά από διέγερση στα 239.5 nm. Η κορυφή στους ~ 1650 cm⁻¹ αντιστοιχεί στη δόνηση κάμψης του νερού και έχει χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό πρότυπο. Στο πάνω αριστερό μέρος της γραφικής παρουσιάζεται η δομή της γλυκερόλης με την αριθμηση των ανθράκων όπως αυτοί αναφέρονται στο κείμενο.

Οι κορυφές αυτές, όπως παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.1, είναι αρκετά πεπλατυσμένες και επομένως, μετά από τη διαδικασία αποσυνέλιξης μέσω προσαρμογής τους (*curve fitting*) σε πέντε κορυφές (*Gaussian type*), συναρτήσε της συγκέντρωσης της γλυκερόλης, η συχνότητα στην οποία εμφανίζονται παρουσιάζει μικρή διακύμανση. Ειδικότερα, η κορυφή της παραμόρφωσης του COH στους ~ 1389 cm⁻¹ είναι αρκετά ευρεία δεδομένου ότι περιέχει συνεισφορές από τα υδροξύλια των πρωτοταγών (C₁-OH) και του δευτεροταγούς ατόμου του άνθρακα (C₂-OH) των μορίων της γλυκερόλης. Σύμφωνα με τους Mudalige *et al.* οι οποίοι μελέτησαν μείγματα γλυκερόλης/D₂O με τη φασματοσκοπία Raman, έδειξαν ότι η δόνηση αυτή εξαρτάται από το δίκτυο δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων της γλυκερόλης και του περιβάλλοντος.³ Συγκεκριμένα, παρατήρησαν ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης η κορυφή εμφανίζεται στους 1369 cm⁻¹, ενώ με την αύξηση της συγκέντρωσης, η κορυφή υπόκειται ερυθρή μετατόπιση που οφείλεται στο σχηματισμό ολιγομερών της γλυκερόλης. Αντίθετα η συχνότητα και το εύρος της κορυφής 1469 cm⁻¹ παραμένουν αμετάβλητα από τις αλλαγές του τοπικού περιβάλλοντος των OH, καθιστώντας την ιδανική για χρήση ως εσωτερικό πρότυπο (Σχήμα 6.1). Οι Zelent *et al.*⁴

και Vanderkooi *et al.*,⁶ οι οποίοι μελέτησαν μείγματα γλυκερόλης/νερού συναρτήσεως της θερμοκρασίας με τη φασματοσκοπία IR, έδειξαν ότι η συχνότητα παραμόρφωσης του CH₂ δεν επηρεάζεται από τη θερμοκρασία στα πλαίσια του θερμοκρασιακού εύρους που χρησιμοποίησαν (10-300 K), υποδεικνύοντας ότι ο μέσος όρος των δεσμών παραμένει αμετάβλητος με τη θερμοκρασία.

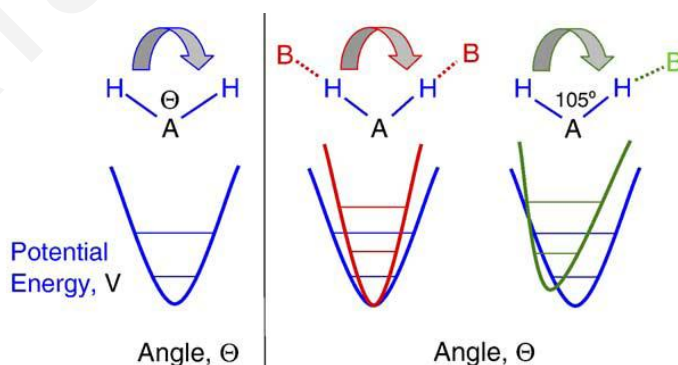
6.4.2 Δόνηση Κάμψης του Νερού

Η ευρεία κορυφή που παρατηρείται στους ~1650 cm⁻¹ (Σχήμα 6.2), οφείλεται στη δόνηση κάμψης του νερού, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό πρότυπο για τον υπολογισμό των απόλυτων διατομών σκεδασμού Raman της δόνησης παραμόρφωσης CH₂ της γλυκερόλης, στις διάφορες συγκεντρώσεις. Εντούτοις, στα μείγματα γλυκερόλης/νερού οι αλληλεπιδράσεις λόγω δεσμών υδρογόνου ποικίλουν, προκαλώντας αλλαγή στη συχνότητα και το εύρος της κορυφής της κάμψης του νερού.² Επομένως, η μελέτη της κορυφής κάμψης του νερού μπορεί να οδηγήσει στην άντληση σημαντικών πληροφοριών για το δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει το μείγμα γλυκερόλης/νερού, δεδομένου ότι η κορυφή αυτή δεν παρουσιάζει αλληλοεπικάλυψη με καμία κορυφή της γλυκερόλης. Μετατόπιση της κάμψης προς υψηλότερες συχνότητες είναι γενικά αποδεκτό ότι σχετίζεται με την αύξηση της ισχύος των δεσμών υδρογόνου.^{2,6} Η σχέση μεταξύ της συχνότητας και των δεσμών υδρογόνου έχει αποδειχτεί από τους Shimanouchi *et al.*, συγκρίνοντας τη συχνότητα κάμψης του νερού στην αέρια και υγρή φάση.²¹ Στην αέρια φάση, όπου δεν αναμένεται σχηματισμός δεσμών υδρογόνου η κάμψη του νερού παρατηρείται στους 1595 cm⁻¹, ενώ στην υγρή φάση η κορυφή μετατοπίζεται στους 1648 cm⁻¹. Στο Σχήμα 6.3 παρουσιάζεται η μεταβολή στη συχνότητα της κάμψης HOH, συναρτήσεως του χ_{glycerol} . Αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στο διάλυμα προκαλεί μετατόπιση της κορυφής προς υψηλότερες συχνότητες, υποδεικνύοντας ότι τα μόρια νερού συμμετέχουν σε περισσότερο ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου.^{2,8}



Σχήμα 6.3: Συχνότητα (κλειστοί κύκλοι) και εύρος (ανοικτοί κύκλοι) της δόνησης κάμψης HOH, συναρτήσει του μοριακού κλάσματος της γλυκερόλης.

Στο Σχήμα 6.4 περιγράφεται το δυναμικό πηγάδι για τη δόνηση κάμψης του νερού. Για τη δόνηση κάμψης χωρίς το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου (αριστερά), ο άξονας x αντιστοιχεί στη γωνία θ μεταξύ H-O-H.⁶ Η παρουσία δεσμών υδρογόνου καθιστά δύσκολη την κάμψη του δεσμού και η δυναμική επιφάνεια στενεύει (ενδιάμεσο διάγραμμα). Συνέπεια αυτού είναι η δόνηση κάμψης να μετατοπίζεται σε υψηλότερη συχνότητα με το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου. Το δεξί διάγραμμα του Σχήματος 6.4 αντιπροσωπεύει την περίπτωση στην οποία τα δύο άτομα H σχηματίζουν διαφορετικό είδος δεσμών υδρογόνου και το δυναμικό πηγάδι εμφανίζει αναρμονικότητα.⁶



Σχήμα 6.4: Σχηματική απεικόνιση του δυναμικού της ενέργειας της δόνησης κάμψης, τριατομικού μορίου, απουσία (αριστερά) και παρουσία (δεξιά) αλληλεπιδράσεων δεσμών υδρογόνου.⁶

Παράλληλα, με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στο διάλυμα παρατηρείται μείωση του εύρους της κορυφής στους $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ (Σχήμα 6.3). Η μείωση του εύρους της

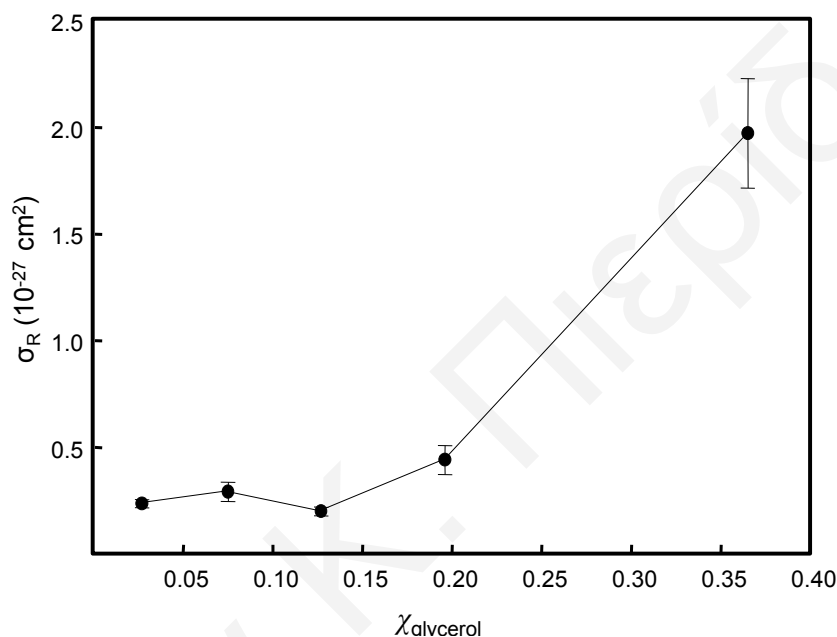
κορυφής σχετίζεται με τη μείωση της ανομοιογενούς διαπλάτυνσης, η οποία υφίσταται από τη μεγάλη κατανομή γωνιών και αποστάσεων μεταξύ των δεσμών υδρογόνου των μορίων νερού λόγω επίδρασης του τοπικού τους περιβάλλοντος. Το περιβάλλον γύρω από τα μόρια νερού, με την αύξηση της συγκέντρωσης γλυκερόλης προκαλεί ομοιόμορφο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου.² Εντούτοις, η μείωση του εύρους της κορυφής είναι πιο πιθανό να οφείλεται στην ομοιογενή διαπλάτυνση ($e^{-\Gamma^2 t^2 / \hbar^2}$, όπου Γ είναι το ομοιογενές πλάτος), η οποία σχετίζεται με το χρόνο ημιζωής της δονητικής διεγερμένης κατάστασης των μορίων.^{2,22} Η ομοιογενής διαπλάτυνση αυξάνει το εύρος της κορυφής, όταν ο χρόνος χαλάρωσης μειώνεται. Οι Puzenko *et al.*¹² και οι Hayashi *et al.*¹¹ έχουν δείξει ότι οι δονητικοί χρόνοι χαλάρωσης των μειγμάτων γλυκερόλης/νερού επηρεάζονται σημαντικά από τη συγκέντρωση, όπου αύξηση της περιεκτικότητας σε νερό οδηγεί σε μικρότερους δονητικούς χρόνους χαλάρωσης. Επομένως, η μείωση του εύρους της κορυφής κάμψης του νερού που παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.3 μπορεί να είναι αποτέλεσμα αύξησης του δονητικού χρόνου χαλάρωσης των μορίων του νερού στις υψηλότερες τιμές του χ_{glycerol} . Η απόλυτη διατομή σκεδασμού Raman της δόνησης κάμψης HOH εξαρτάται από την ομοιογενή και ανομοιογενή διαπλάτυνση,²² η οποία αυξάνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης (Πίνακας 6.1).

Οι υπολογισμοί Μοριακής Δυναμικής που πραγματοποιήθηκαν από τους Dashnau *et al.*² για τον προσδιορισμό της κατανομής πιθανότητας για τη γωνία O-H...O ενισχύουν τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Συγκεκριμένα, παρατήρησαν ότι η γωνία αυτή εμφανίζει μεγαλύτερη κατανομή πιθανότητας στις 12° (A1) και 52° (A2). Ο λόγος των πιθανοτήτων A1/A2 χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται σε μείγματα γλυκερόλης/νερού με μοριακό κλάσμα της γλυκερόλης στο μείγμα από 0.03 έως 0.27. Ίδιες συγκεντρώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρούσα μελέτη. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι αυξανόμενη της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στο διάλυμα, ο λόγος A1/A2 ενώ παραμένει σταθερός για τις υπόλοιπες αλληλεπιδράσεις (νερό-νερό, γλυκερόλη-γλυκερόλη), για τους δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ της γλυκερόλης-νερού, αυξάνεται. Η αύξηση αυτή οφείλεται στην αύξηση της κατανομής A1 σε σχέση με την κατανομή A2, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι οι δεσμοί υδρογόνου εμφανίζουν μεγαλύτερη γραμμικότητα. Επομένως, η αλλαγή στη συχνότητα και στο εύρος που παρατηρείται στην κάμψη του νερού με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στο διάλυμα, εισηγείται ότι οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται είναι περισσότερο γραμμικοί και μιμούνται τους δεσμούς υδρογόνου που παρατηρούνται στη

δομή του πάγου, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν αρκετά μόρια νερού ώστε να διατηρούν τις φυσικές τους ιδιότητες.²

6.4.3 Απόλυτες Διατομές Σκεδασμού Raman της Γλυκερόλης

Στο Σχήμα 6.5 παρουσιάζεται η μέση τιμή της απόλυτης διατομής σκεδασμού Raman που υπολογίστηκε για τη δόνηση παραμόρφωσης του CH₂ της γλυκερόλης στους 1469 cm⁻¹, συναρτήσει του μοριακού κλάσματος της γλυκερόλης.



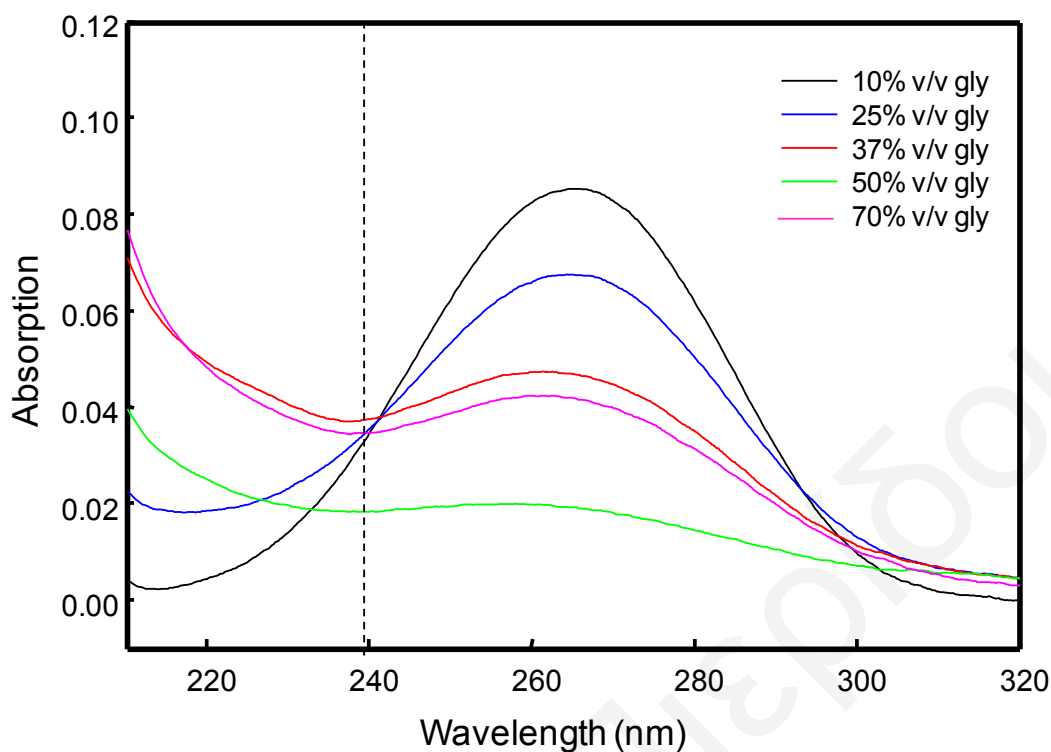
Σχήμα 6.5: Απόλυτη διατομή σκεδασμού Raman της δόνησης παραμόρφωσης του CH₂ της γλυκερόλης σε μείγμα γλυκερόλης/νερού, συναρτήσει της συγκέντρωσής της, με διέγερση στα 239.5 nm. Η τυπική απόκλιση παρουσιάζεται στα γραφήματα με γραμμές σφάλματος.

Η τιμή της απόλυτης διατομής RR (σ_R) εμφανίζει μια ανομοιόμορφη συμπεριφορά όπου στα πλαίσια του πειραματικού σφάλματος παραμένει σταθερή σε τιμές $\chi_{\text{gly}}=0.027$ και $\chi_{\text{gly}}=0.075$, σε $\chi_{\text{gly}}=0.127$ παρουσιάζει μικρή μείωση, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γλυκερόλης ($\chi_{\text{gly}}=0.196$ και $\chi_{\text{gly}}=0.365$) η σ_R αυξάνεται απότομα. Οι αλλαγές που παρατηρούνται στην τιμή της απόλυτης διατομής RR πιθανόν να οφείλονται στην αλλαγή του δικτύου δεσμών H αυξανόμενης της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στα μείγματα γλυκερόλης/νερού και συγκεκριμένα σε συγκεντρώσεις γλυκερόλης >0.127.

Η πρόβλεψη και η θεωρητική ερμηνεία του τρόπου με τον οποίο σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου στο σύστημα γλυκερόλης/νερού έχει δοθεί πρόσφατα από προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής που πραγματοποιήθηκαν στο ίδιο εύρος συγκέντρωσης.² Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης ($\chi_g < 0.15$) οι

κυρίαρχες αλληλεπιδράσεις οφείλονται στους δεσμούς H μεταξύ των μορίων νερού. Η κρίσιμη συγκέντρωση της γλυκερόλης φαίνεται να είναι η $\chi_g=0.15$, όπου παρατηρείται απότομη μείωση των δεσμών H μεταξύ των μορίων νερού, ενώ ταυτόχρονα οι αλληλεπιδράσεις στην πρώτη στιβάδα επιδιалύτωσης των μορίων γλυκερόλης αυξάνονται. Σε αυτές περιλαμβάνονται αλληλεπιδράσεις γλυκερόλης-νερού και γλυκερόλης-γλυκερόλης. Με συνεχή αύξηση της περιεκτικότητας σε γλυκερόλη επικρατούν οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις γλυκερόλης, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν επαρκή μόρια νερού για τα ενυδατώσουν ($\chi_g > 0.15$). Στην περίπτωση αυτή είναι πιθανό να σχηματίζονται δεσμοί H μεταξύ των OH και των ομάδων CH της γλυκερόλης. Η περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης ($\chi_g=0.27$) προκαλεί ακόμη μεγαλύτερη αναδιοργάνωση των δεσμών H στο ενιαίο δίκτυο δεσμών με τα μόρια νερού στην πρώτη στιβάδα επιδιалύτωσης να προτιμούν να συνδέονται με τα OH αντί με τις αλκυλο-ομάδες των μορίων γλυκερόλης. Επομένως σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης, οι αλκυλο-ομάδες αναπτύσσουν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τις ομάδες CH άλλων νορίων, σχηματίζοντας υδρόφοβες πλειάδες (clusters) μορίων γλυκερόλης.²

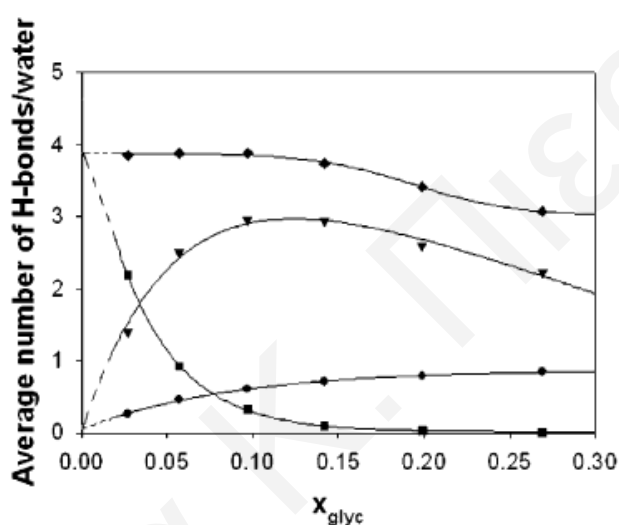
Για περισσότερη εις βάθος εξέταση του παράγοντα από τον οποίο εξαρτάται η αύξηση της διατομής σκεδασμού της γλυκερόλης, έχουν μελετηθεί τα φάσματα απορρόφησης της στα διάφορα μείγματα γλυκερόλης/νερού που έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρούσα μελέτη. Είναι γενικά αποδεκτό ότι στα φάσματα απορρόφησης η θέση, το σχήμα και η ένταση των κορυφών ενός διαλύτη εξαρτώνται άμεσα από τα χαρακτηριστικά και τη σύνθεση του ίδιου του διαλύτη.²³ Στο Σχήμα 6.6 παρουσιάζονται τα φάσματα ηλεκτρονιακής απορρόφησης της γλυκερόλης, συναρτήσει της συγκέντρωσης της. Στα φάσματα εμφανίζεται μία κορυφή στα 263 nm η οποία σχετίζεται με τη μετάπτωση $\pi \rightarrow \pi^*$ στη γλυκερόλη. Εντούτοις, με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης, στα 239.5 nm, μήκος κύματος στο οποίο έγινε ο υπολογισμός των απόλυτων διατομών RR, παρατηρείται ανομοιόμορφη αλλαγή στην ένταση των φασμάτων, πιθανό λόγω του ισοσβηστικού σημείου στην περιοχή. Μέγιστη τιμή παρατηρείται σε συγκέντρωση γλυκερόλης 37% v/v, ενώ τη μικρότερη απορρόφηση παρουσιάζει το μείγμα γλυκερόλης/νερού 10% v/v, συμπεριφορά που δεν συμπίπτει με τις υπολογισμένες τιμές σ_R . Επομένως, σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, η αύξηση που παρατηρείται στην απόλυτη διατομή σκεδασμού Raman της δόνησης παραμόρφωσης CH_2 φαίνεται πως δεν οφείλεται σε ενίσχυση λόγω συντονισμού (*resonance enhancement*).



Σχήμα 6.6: Φάσματα ηλεκτρονικής απορρόφησης μειγμάτων γλυκερόλης με συγκεντρώσεις γλυκερόλης 10%, 25%, 37%, 50% και 70% v/v. Η κάθετη γραμμή δηλώνει το μήκος διέγερσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

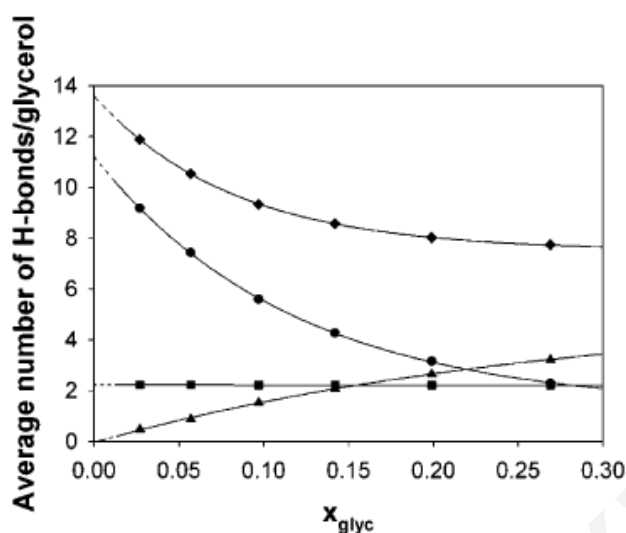
Ένας άλλος παράγοντας από τον οποίο εξαρτάται άμεσα η διατομή σκεδασμού είναι η πολωσιμότητα των μορίων. Πολλές πειραματικές και θεωρητικές μελέτες πλειάδες (*cluster*) νερού ασχολήθηκαν με την αξιολόγηση του μεγέθους της πολωσιμότητας, το οποίο είναι απαραίτητο για την κατανόηση των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων νερού, αλλά και μεταξύ μορίων νερού με άλλες διαλυμένες ουσίες, ειδικότερα με βιομόρια.^{24,25,26} Η τιμή της πολωσιμότητας των μορίων σε ένα σύστημα σχετίζεται με τον αριθμό και το είδος δεσμών H που αναπτύσσουν με τα γειτονικά μόρια.^{25,27} Πρόσφατα, οι Yang *et al.*²⁶ μελέτησαν την εξάρτηση της πολωσιμότητας από το σχηματισμό δεσμών H σε διάφορες σε μέγεθος πλειάδες νερού, χρησιμοποιώντας την υπολογιστική μέθοδο *Density Functional Theory*. Οι τελευταίοι, έδειξαν ότι η πολωσιμότητα των μορίων νερού επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από το τοπικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται μέσα στα *cluster* νερού. Συγκεκριμένα, τα μόρια νερού που βρίσκονται στο εσωτερικό των *cluster*, σχηματίζουν μεγαλύτερο αριθμό δεσμών H και παρουσιάζουν μικρότερη τιμή της πολωσιμότητας, ενώ αντίθετα για τα μόρια που βρίσκονται στην επιφάνεια, η τιμή της πολωσιμότητας αυξάνεται λόγω του μειωμένου αριθμού δεσμών H που αναπτύσσουν.^{25,27} Στην περίπτωση των μειγμάτων

γλυκερόλης/νερού, σε συγκέντρωση $\chi_g > 0.15$ όπου παρατηρείται μείωση των δεσμών H που σχηματίζονται στο μείγμα γλυκερόλης/νερού και ταυτόχρονη αύξηση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων της γλυκερόλης,² η πολωσιμότητα του συστήματος μεταβάλλεται. Συγκεκριμένα, τα μόρια του νερού σε $\chi_g = 0.15$ βρίσκονται στην πρώτη στιβάδα επιδιалύτωσης και σχηματίζουν δεσμούς H με το πολικό τμήμα της γλυκερόλης, δεδομένου ότι ο μέσος αριθμός δεσμών H μεταξύ των μορίων νερού τείνει στο μηδέν (Σχήμα 6.7), αυξάνοντας την τιμή της πολωσιμότητας τους, και αντίστοιχα την τιμή της απόλυτης διατομής σκεδασμού της δόνηση κάμψης του νερού, αποτελώντας έτσι ακόμη ένα μηχανισμό που προσφέρει στην αύξηση της απόλυτης διατομής σκεδασμού της $\delta_{\text{H}_2\text{O}}$.



Σχήμα 6.7: Μέσος αριθμός δεσμών H ανά μόριο νερού συναρτήσεως του μοριακού κλάσματος της γλυκερόλης χ_{gly} . Τα σύμβολα αντιπροσωπεύουν το συνολικό μέσο αριθμό δεσμών H ανά μόριο νερού (διαμάντι) καθώς και συνεισφορές από δεσμούς H: αλληλεπιδράσεις νερού-νερού (τετράγωνα), αλληλεπιδράσεις της στιβάδας επιδιалύτωσης (τρίγωνα) και αλληλεπιδράσεις γλυκερόλης-νερού (κύκλοι).²

Σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης, η πολωσιμότητα των αλκυλοαμάδων των μορίων γλυκερόλης αυξάνεται αφού επικρατούν εδώ οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους (Σχήμα 6.8) αντί δεσμών H με το νερό. Η μεταβολή αυτή της πολωσιμότητας των μορίων γλυκερόλης επηρεάζει την τιμή της απόλυτης διατομής RR των δονήσεων που περιέχουν συνεισφορές μόνο από τα CH και CH₂. Επομένως, η αύξηση της σ_R που παρατηρείται για την παραμόρφωση του CH₂ στα 1469 cm⁻¹ (Σχήμα 6.5), επιβεβαιώνει τους πιο πάνω ισχυρισμούς. Περισσότερες πληροφορίες για τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλκυλοαμάδων της γλυκερόλης που αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα μείγματα γλυκερόλης/νερού και για την αλλαγή της δομής των μορίων, μπορούν να δοθούν από υπολογισμούς Μοριακής Δυναμικής.



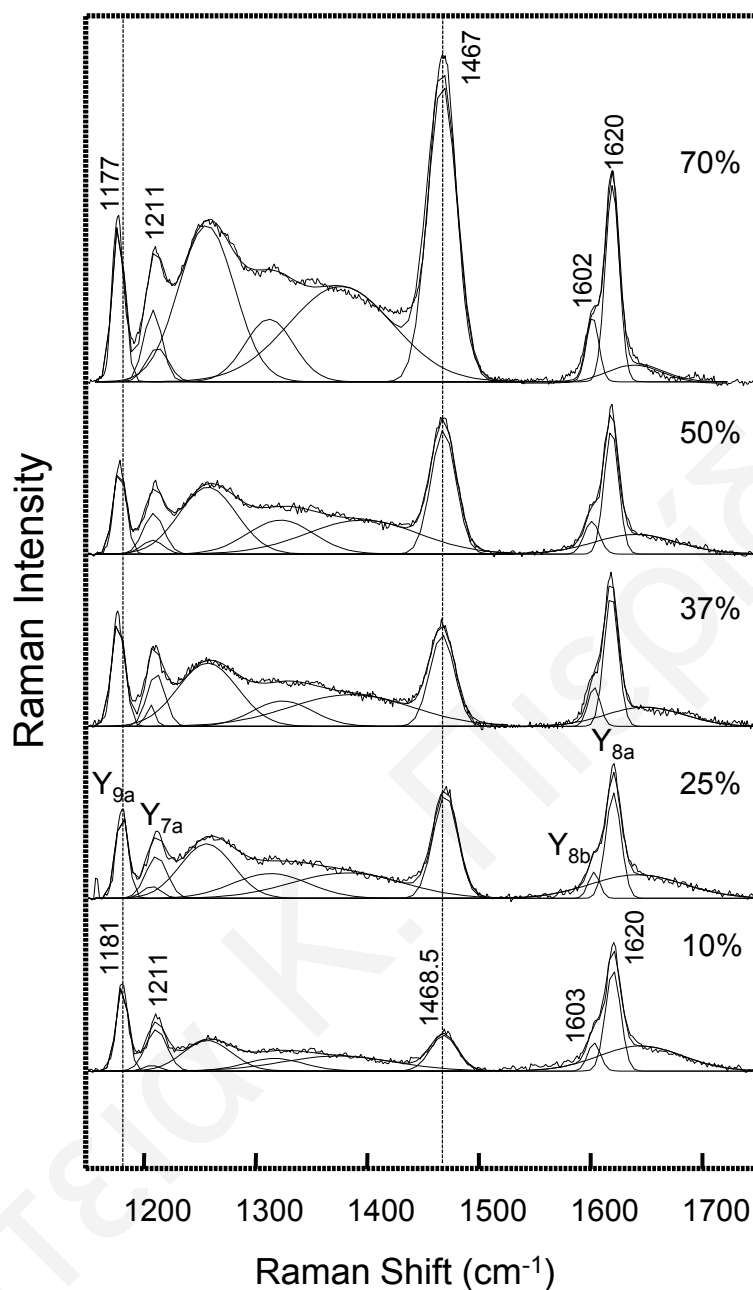
Σχήμα 6.8: Μέσος αριθμός δεσμών H ανά μόριο γλυκερόλης συναρτήσει του μοριακού κλάσματος της γλυκερόλης x_{gly} . Τα σύμβολα αντιπροσωπεύουν το συνολικό μέσο αριθμό δεσμών H ανά μόριο γλυκερόλης (διαμάντι) καθώς και συνεισφορές από δεσμούς H: γλυκερόλης-νερού (κύκλοι), ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις γλυκερόλης-γλυκερόλης (τετράγωνα), αλληλεπιδράσεις γλυκερόλης-γλυκερόλης (τρίγωνα).¹¹

6.4.4 TTR(105-115) σε Διάλυμα Γλυκερόλης/Νερού

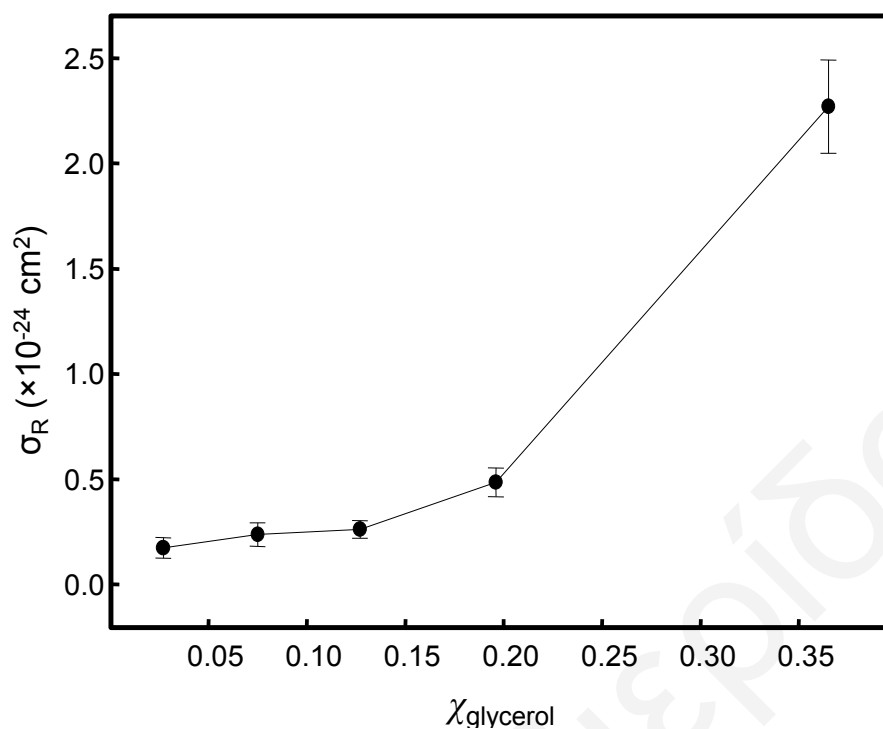
Στο Σχήμα 6.9 παρουσιάζονται τα φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) σε μείγματα v/v γλυκερόλης/νερού με συγκέντρωση γλυκερόλης 10% (1.37 M), 25% (3.4 M), 37% (5.1 M), 50% (6.9 M), και 70% (9.6 M), μετά από διέγερση στα 239.5 nm. Σε αυτό το μήκος κύματος διέγερσης, ενισχύεται ο σκεδασμός Raman από τις δονήσεις που συνδέονται με τις αρωματικές πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων Tyr στο πεπτίδιο. Συγκεκριμένα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης, παρατηρούνται κορυφές στους 1181 (Y_{9a}), 1211 (Y_{7a}), 1603 (Y_{8b}) και 1620 (Y_{8a}), οι οποίες σχετίζονται με τη συνεισφορά της δόνησης κάμψης C-H στο επίπεδο του αρωματικού δακτυλίου, της δόνησης τάσης C-C μεταξύ δακτυλίου και μεθυλομάδας, της αντισυμμετρικής και συμμετρικής δόνησης τάσης του αρωματικού δακτυλίου, αντίστοιχα. Οι κορυφές που παρατηρούνται στην περιοχή μεταξύ 1200 και 1500 cm^{-1} αντιστοιχούν στις δονήσεις της γλυκερόλης.^{3,9} Η κορυφή που εμφανίζεται γύρω στους ~1650 cm^{-1} αντιστοιχεί στη δόνηση κάμψης του νερού. Η αποσυνέλιξη όλων των κορυφών της Tyr και της γλυκερόλης επιτρέπει τον υπολογισμό των διατομών RR όλων των δονήσεων της Tyr, χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό πρότυπο τη κορυφή της γλυκερόλης στους 1469 cm^{-1} . Η κορυφή Y_{7a} που παρατηρείται στην περιοχή μεταξύ 1205-1212 cm^{-1} εμφανίζει αλληλοεπικάλυψη με τη δόνηση στρέψης CH_2 της γλυκερόλης στους 1207 cm^{-1} , επομένως ο υπολογισμός της τιμής s_R για τη δόνηση

αυτή παρουσιάζει μεγάλη αβεβαιότητα. Είναι προφανές ότι στις συγκεντρώσεις της γλυκερόλης μεταξύ 10% και 50% v/v οι εντάσεις των κορυφών της Tyr είναι αρκετά παρόμοιες, ενώ σε συγκέντρωση 70% v/v παρατηρείται σημαντική αύξηση των εντάσεων αυτών. Η αλλαγή της έντασης των κορυφών συναρτίζεται της συγκέντρωσης της γλυκερόλης αντικατοπτρίζεται στο Σχήμα 6.10 όπου ενδεικτικά περιγράφεται η εξάρτηση της μέσης τιμής της σ_R για την συμμετρική δόνηση τάσης Y_{8a} των καταλοίπων Tyr στο πεπτίδιο σε μείγματα γλυκερόλης/νερού, συναρτίζεται της περιεκτικότητας σε γλυκερόλη, σε μήκος διέγερσης 239.5 nm. Στον Πίνακα 6.1 δίνονται οι μέσες τιμές των σ_R για όλες τις δονήσεις της Tyr (Y_{7a} , Y_{9a} , Y_{8a+8b}). Οι απόλυτες διατομές RR παρουσιάζουν αυξανόμενη τάση στην περιοχή στις συγκεντρώσεις γλυκερόλης 10% με 50% v/v, ενώ σε συγκέντρωση 70% v/v παρατηρείται απότομη αύξηση της τιμής (της τάξης του 92.4%).

Οι αλλαγές στην ένταση των αρωματικών αμινοξέων στα φάσματα RR έχουν μελετηθεί εκτεταμένα και σχετίζονται με το βαθμό έκθεσης των πλευρικών τους αλυσίδων στο τοπικό τους περιβάλλον.^{23,27,29,30,31,32,33} Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι διατομές σκεδασμού της Tyr στα 240 nm είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στο τοπικό περιβάλλον σε ένα πεπτίδιο ή μια πρωτεΐνη, όταν τα αμινοξέα εκτείνουν τις αρωματικές πλευρικές τους αλυσίδες σε υδρόφοβο περιβάλλον.^{23,30,31}



Σχήμα 6.9: Φάσματα UVRR του πεπτιδίου TTR(105-115) σε μείγματα γλυκερόλης/νερού, με συγκεντρώσεις γλυκερόλης v/v 10% (1.37 M), 25% (3.4 M), 37% (5.1 M), 50% (6.9 M), και 70% (9.6 M), μετά από διέγερση στα 239.5 nm. Οι κορυφές που οφείλονται στις δονήσεις της Tyr και της γλυκερόλης προέκυψαν μετά από αποσυνέλιξη του ολικού φάσματος.



Σχήμα 6.10: Εξάρτηση της απόλυτης διατομής συντονισμού Raman της συμμετρικής δόνησης τάσης Y_{8a} των καταλοίπων Tyr στο πεπτίδιο TTR(105-115) σε μείγματα γλυκερόλης/νερού, συναρτήσει της συγκέντρωσης της γλυκερόλης, στα 239.5 nm.

Οι Takeuchi *et al.* μελέτησαν την επίδραση του διαλύτη στο σκεδασμό Raman της AcTyrEE και AcPheEE, προκειμένου να εξηγήσουν την σημαντική αύξηση των κορυφών Raman όταν τα πεπτίδια Met-encephalin και Leu-encephalin συνδέονται σε επιφάνειες φωσφολιπιδίων.²⁹ Οι μεγαλύτερες αλλαγές στην ένταση των κορυφών παρατηρήθηκαν μετά από διέγερση των πρότυπων ενώσεων στα 240 nm, όπου οι αρωματικές πλευρικές αλυσίδες της Tyr εμφανίζουν ασθενή απορρόφηση. Η μεταβολή της έντασης των κορυφών αποδόθηκε στην αύξηση της υδροφοβικότητας του περιβάλλοντος τους. Επομένως, κάθε διαλύτης που προκαλεί ερυθρή μετατόπιση της κορυφής απορρόφησης των αρωματικών αμινοξέων L_a (~220 nm) λόγω αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου ή διπόλου-πολικών αλληλεπιδράσεων αυξάνει την ένταση των κορυφών που αντιστοιχούν στις δονήσεις των αρωματικών πλευρικών αλυσίδων. Ο βαθμός αύξησης της έντασης των κορυφών εξαρτάται από την ισορροπία των αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου, οι οποίες σχετίζονται με τις ηλεκτρονιακές ιδιότητες του διαλύτη και της διαλυμένης ουσίας, ειδικά όταν είναι πολική όπως και η πλευρική αλυσίδα της Tyr που είναι πολική λόγω της παρουσίας του φαινολικού OH.²⁹ Σύμφωνα με τη μελέτη τους, η αύξηση της υδροφοβικότητας του τοπικού περιβάλλοντος των πλευρικών αλυσίδων της Tyr προκαλεί αύξηση στην ένταση των κορυφών που συνδέονται με τις δονήσεις του αρωματικού δακτυλίου.

Η εξάρτηση των τιμών των διατομών σκεδασμού Raman των κορυφών της Tyr από το τοπικό περιβάλλον και ως επακόλουθο της προσβάσιμης επιφάνειας των αρωματικών καταλοίπων στο διαλύτη έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές.^{23,34} Οι Chi και Asher μελέτησαν την εξάρτηση των απόλυτων διατομών σκεδασμού Raman της Tyr συναρτήσει της διαλυτικής της έκθεσης, υπολογίζοντας τις διατομές σκεδασμού σε διάφορα μείγματα νερού/προπανόλης σε διάφορες αναλογίες,⁶ όπου επιβεβαιώθηκε ότι η αύξηση της υδροφοβικότητας του διαλύτη προκαλεί αύξηση στη τιμή της διατομής σκεδασμού Raman. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από υπολογισμούς διατομών σκεδασμού της Tyr που πραγματοποιήθηκαν για συγκεκριμένα κατάλοιπα τα οποία βρίσκονται “θαμμένα” ή πλήρως εκτεθειμένα στο διαλύτη στην πρωτεϊνική δομή του κυτοχρώματος c στον τόνο, καθώς και στο σπέρμα της φάλαινας και της μυογλοβίνης του αλόγου, πρωτεΐνες των οποίων οι δομές τους είναι ήδη γνωστές και ο υπολογισμός της προσβάσιμης επιφάνειας των αρωματικών καταλοίπων στο διαλύτη είναι εφικτός.

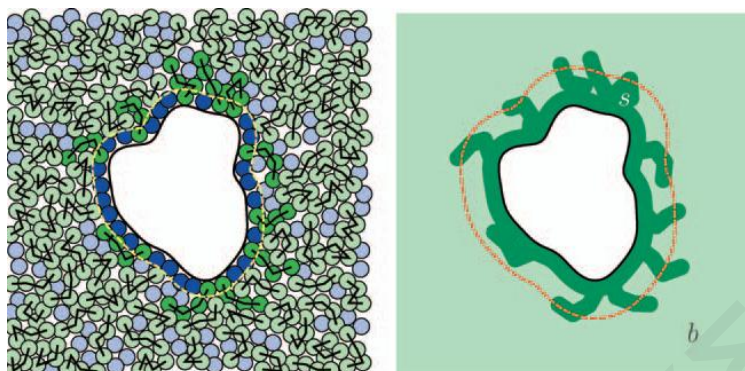
Στα φάσματα του Σχήματος 6.9, εκτός από τις αλλαγές στην ένταση των κορυφών, παρατηρείται μετατόπιση της κορυφής Y_{9a} , συναρτήσει της συγκέντρωσης της γλυκερόλης. Συγκεκριμένα, η κορυφή Y_{9a} μετατοπίζεται από τους 1181 στις χαμηλές συγκεντρώσεις, στους 1177 cm^{-1} σε συγκεντρώσεις $>37\%$. Η ερυθρή μετατόπιση της κορυφής αυτής μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζει το φαινολικό υδροξύλιο.³⁵ Η αλλαγή στη συχνότητα της συχνότητας της κορυφής Y_{9a} επιβεβαιώνει την παρουσία αλληλεπιδράσεων με το διαλυτικό περιβάλλον. Η ερυθρή μετατόπιση της κορυφής Y_{9a} εξαρτάται από τη διεδρη γωνία τ_{co} . Η διεδρη γωνία τ_{co} σχηματίζεται μεταξύ του COH της πλευρικής αλυσίδας και του φαινολικού δακτυλίου και σχετίζεται με την απωστική δύναμη μεταξύ του υδρογόνου του φαινολικού δακτυλίου και του υδρογόνου του OH. Οι Takeuchi *et al.*³⁵ έδειξαν ότι αν η τιμή της γωνίας τ_{co} μεγαλώνει, τότε οι δυνάμεις van der Waals μεταξύ των υδρογόνων εξασθενούν, παρατηρείται χαλάρωση της απόθησης μεταξύ των υδρογόνων και η κορυφή Y_{9a} μετατοπίζεται σε μικρότερους κυματαριθμούς. Επομένως, είναι πιθανό η φαινολική πλευρική αλυσίδα των καταλοίπων Tyr να σχηματίζει δεσμούς H, απομακρύνοντας το φαινολικό OH από το C-H του βενζοϊκού δακτυλίου.

Η αλλαγή στην ένταση των κορυφών της Tyr στο πεπτίδιο TTR(105-115) σε συνδυασμό με τη μετατόπιση της συχνότητας της Y_{9a} , αποδεικνύουν την εξάρτηση της τιμής των απόλυτων διατομών συντονισμού Raman από την αύξηση του υδρόφοβου χαρακτήρα του τοπικού περιβάλλοντος των αρωματικών καταλοίπων Tyr. Η τιμή της διηλεκτρικής

σταθεράς του μείγματος γλυκερόλης/νερού μειώνεται από 77.17 (10%) στα 55.96 (70%) με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης.³⁶ Επομένως, το πεπτίδιο βρίσκεται σε ένα κάπως πιο υδρόφοβο περιβάλλον με το οποίο μπορεί να αντιδρά, δεδομένου ότι το πεπτίδιο κατά κύριο λόγο είναι υδρόφοβο. Η αύξηση του υδρόφοβου χαρακτήρα του περιβάλλοντος των καταλοίπων Tyr πιθανό να οφείλεται στην αύξηση των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων των γειτονικών καταλοίπων με την ανθρακική αλυσίδα της γλυκερόλης. Σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης τα μόρια νερού προτιμούν να σχηματίζουν δεσμούς H με τις υδροξυλικές ομάδες των μορίων γλυκερόλης, αφήνοντας της ανθρακικές αλυσίδες της γλυκερόλης να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Οι ανθρακικές αλυσίδες των μορίων γλυκερόλης είναι πιθανόν να προσεγγίζουν το κεντρικό τμήμα του πεπτιδίου, δημιουργώντας ένα ευρύτερο υδρόφοβο πυρήνα. Επιπλέον, η αυξημένη πολωσιμότητα των CH₂ όπως προέκυψε από τον υπολογισμό της σ_R , προκαλεί μεγάλη στιγμιαία διπολική ροπή, η οποία μπορεί να προάγει ισχυρή έλξη μεταξύ τους, αναπτύσσοντας δυνάμεις van der Waals, ή δυνάμεις London/διασποράς. Από την άλλη πλευρά τα κατάλοιπα Tyr έχοντας μόρια γλυκερόλης στο ευρύτερό τους περιβάλλον και δεδομένου ότι παρατηρείται ερυθρή μετατόπιση της Y_{9a}, είναι πιθανόν να σχηματίζει ενδομοριακούς δεσμούς H με γειτονικές πλευρικές αλυσίδες ή με την κύρια αλυσίδα. Επιπρόσθετα, η μεγάλη αλλαγή που παρατηρείται στο τοπικό περιβάλλον του πεπτιδίου με την αύξηση της γλυκερόλης μπορεί να προάγει το σχηματισμό δεσμών H μεταξύ των δύο καταλοίπων Tyr, υιοθετώντας μια πιο κλειστή δομή. Οι Behrends *et al.* μελέτησαν τη μακροσκοπική ιδιότητα της διηλεκτρικής σταθεράς διάφορων μειγμάτων γλυκερόλης/νερού και υπολόγισαν τους διηλεκτρικούς χρόνους χαλάρωσης.³⁷ Οι τελευταίοι παρατήρησαν δύο χαρακτηριστικούς χρόνους αποδιέγερσης, οι οποίοι δηλώνουν την παρουσία δύο τοπικών μικροπεριβάλλοντων μέσα στο διάλυμα της γλυκερόλης/νερού. Επομένως, το υδρόφοβο τοπικό περιβάλλον του διαλύματος, το οποίο σχηματίζεται από τις ανθρακικές αλυσίδες των μορίων γλυκερόλης, προσεγγίζει το υδρόφοβο πεπτίδιο, αφήνοντας τα μόρια του νερού μακριά.

Από μελέτες που αφορούσαν τη μελέτη της διαλυτοποίησης των πρωτεϊνικών συστημάτων σε μείγματα γλυκερόλης/νερού, βρέθηκε ότι μόνο τα μόρια νερού συμμετέχουν στην επιδιαλύτωση των πρωτεϊνών (πρώτη στιβάδα επιδιαλύτωσης), σχηματίζοντας ένα κέλυφος γύρω από τις σφαιρικές πρωτεΐνες με τα μόρια της γλυκερόλης να εξαιρούνται από την επιφάνεια της πρωτεΐνης (Σχήμα 6.11).³⁸⁻⁴⁰ Εντούτοις, στην περίπτωση του υδρόφοβου πεπτιδίου TTR(105-115), το οποίο σύμφωνα με τα προηγούμενα πειραματικά μας αποτελέσματα διαθέτει εκτεταμένη διαμόρφωση στην υγρή φάση, τα μείγματα

γλυκερόλης/νερού δεν αναμένονται να εμφανίσουν την ίδια δράση, δηλαδή ένα ανάλογο φαινόμενο με την περίπτωση των σφαιρικών πρωτεϊνών.



Σχήμα 6.11: Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου της επιλεκτικής επιδιάλυσης της λυσοζύμης σε μείγμα γλυκερόλης/νερού. Αριστερά: οι κύκλοι με σκούρο και ανοικτό μπλε αντιστοιχούν στα μόρια νερού που βρίσκονται στην πρώτη στιβάδα επιδιάλυσης και στο διάλυμα, αντίστοιχα. Οι κύκλοι με σκούρο και ανοικτό χρώμα αντιστοιχούν στα μόρια της γλυκερόλης. Δεξιά: η κίτρινη γραμμή αντιστοιχεί στην πρώτη στιβάδα επιδιάλυσης.³⁸

Στην περίπτωση αυτή, το πεπτίδιο και ειδικότερα τα κατάλοιπα Tyr βιώνουν ένα υδρόφοβο περιβάλλον, αυξάνοντας την τιμή της απόλυτης διατομής συντονισμού Raman. Επομένως, για μικρά πεπτίδια και για πρωτεΐνες που δεν εμφανίζουν σφαιρική γεωμετρία, τα μείγματα γλυκερόλης/νερού δεν κάνουν κατά ανάγκη πιο συμπαγή τη δομή τους ούτως ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικό κρυοπροστατευτικό, σταθεροποιώντας τη φυσική τους δομή. Εντούτοις, εις βάθος ανάλυση της δομής που υιοθετεί το πεπτίδιο στα μείγματα γλυκερόλης/νερού σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση υπολογιστικών μεθόδων. Περεταίρω πειραματική μελέτη της διαμόρφωσης του πεπτιδίου με χρήση της φασματοσκοπίας συντονισμού Raman δεν έχει καταστεί δυνατή εφόσον οι κορυφές αμιδίου αλληλοεπικαλύπτονται από κορυφές της γλυκερόλης που εμφανίζονται στην ίδια περιοχή. Επιπλέον, χρήση της ισοτοπικής ανταλλαγής H/D δεν μπορεί να προσφέρει περισσότερες πληροφορίες αφού και πάλι παρατηρείται αλληλοεπικάλυψη των κορυφών.

Βιβλιογραφία

- (1) Pieridou, G.; Avgousti-Menelaou, C.; Tamamis, P.; Archontis, G.; Hayes, S. C. *Journal of Physical Chemistry B* **2011**, 115, 4088.
- (2) Dashnau, J. D.; Nucci, N. V.; Sharp, K. A.; Vanderkooi, J. M. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, 13670.
- (3) Mudalige, A.; Pemberton, J. E. *Vibartional Spectroscopy* **2007**, 45, 27.
- (4) Zelent, B.; Nucci, N. V.; Vanderkooi, J. M. *Journal of Physical Chemistry A* **2004**, 108, 11141.
- (5) Arakawa, T.; Timasheff, S. N. *Journal of Biophysical Society* **1985**, 47, 411.
- (6) Vanderkooi, J. M.; Dashnau, J. L.; Zelent, B. *Biochimica et Biophysica Acta* **2005**, 1749, 214.
- (7) Wright, W. W.; Guffanti, G. T.; Vanderkooi, J. M. *Biophysical Journal* **2003**, 85, 1980.
- (8) Dashnau, J. L.; Zelent, B.; Vanderkooi, J. *Biophysical Chemistry* **2005**, 114, 71.
- (9) Mendelovici, E.; Frost, R. L.; Klooproge, T. *Journal of Raman Spectroscopy* **2000**, 31, 1121.
- (10) Kojima, S. *Journal of Molecular Structure* **1993**, 294, 193.
- (11) Hayashi, Y.; Puzenko, A.; Balin, I.; Ryabov, Y. E.; Feldman, Y. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, 109, 9174.
- (12) Puzenko, A.; Hayashi, Y.; Ryabov, Y. E.; Balin, I.; Feldman, Y. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, 109, 6031.
- (13) Fodor, S. P. A.; Copeland, R. A.; Grygon, C. A.; Spiro, T. G. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, 111, 5509
- (14) Song, S.; Asher, S. A. *Biochemistry* **1991**, 30, 1199.
- (15) Willis, K., J.; Szabo, A. G. *J. Physical Chemistry* **1990**, 95, 1585.
- (16) Reid, P. J., Esposito, A. P.; Foster, C. E.; Beckman, R. A. *The Journal Chemical Physics* **1997**, 107, 8262.

- (17) Abe, N.; Wakayama, M.; Ito, M. *Journal of Raman Spectroscopy* **1977**, *6*, 38.
- (18) Hayes, S. C.; Thomsen, C. L.; Reid, P. J. *The Journal Chemical Physics* **2001**, *115*, 11228.
- (19) Matsuno, M.; Takeuchi, H.; Overman, S. A.; Thomas, G. J. *Biophysical Journal* **1998**, *74*, 3217.
- (20) Mendelovici, E.; Frost, R. L.; Kloprogge, T. *Journal of Raman Spectroscopy* **2000**, *31*, 1121.
- (21) Shimanouchi, T.; Linstrom, P. J.; Mallard, W. G. NIST Chemistry WebBook, **2001**, NIST Gaithersburg, MD.
- (22) Nyholm, B. P.; Reid, P. J. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108*, 8716.
- (23) Chi, Z.; Asher, S. *Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102*, 9595.
- (24) Yang, M.; Senet, P.; van Alsenoy, C. *International Journal of Quantum Chemistry* **2005**, *101*, 535.
- (25) Krishtal, A.; Senet, P.; Yang, M.; van Alsenoy, C. *Journal of Chemical Physics* **2006**, *125*, 34312.
- (26) Yang, F.; Wang, X.; Yang, M.; Krishtal, A.; van Alsenoy, C.; Delarue, P.; Senet, P. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *12*, 9239.
- (27) Maroulis, G.; *Atoms, Molecules and Clusters in Electric Fields Theoretical Approaches to the Calculation of Electric Polarizability*, Imperial College Press, London.
- (28) Rodriguez-Mendieta, I. R.; Spence, G. R.; Gell, C.; Radford, S. E.; Smith, D. A. *Biochemistry* **2005**, *44*, 3306.
- (29) Takeuchi, H.; Ohtsuka, Y.; Harada, I. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 5321.
- (30) Cho, N.; Asher, S. A. *Biospectroscopy* **1996**, *2*, 71.
- (31) Hashimoto, S.; Miura, K.; Yamagishi, T.; Takeuchi, H.; Harada, I. *Photochemistry and Photobiology* **1992**, *56*, 1097.
- (32) Overman, S. A.; Maiti, N. C.; Thomas, G. J. *Biochemistry* **2005**, *44*, 3091

- (33) Sinibaldi, R.; Ortore, M. G.; Spinozzi, F. *The Journal of Chemical Physics* **2007**, *126*, 235101.
- (34) Chi, Z.; Asher, S. A. *Biochemistry* **1998**, *37*, 2865.
- (35) Takeuchi, H.; Watanabe N., Satoh, Y.; Harada, I. *Journal of Raman Spectroscopy* **1989**, *20*, 233.
- (36) <http://www.dow.com/glycerine/resources/dielectric.htm>
- (37) Behrends, R.; Fuchs, K.; Kaatze, U.; Hayashi, Y.; Feldman, Y. *The Journal of Chemical Physics* **2006** *124*, 144512
- (38) Spinozzi, F.; Ortore, M. G.; Sinibaldi, R. S.; Mariani, P.; Esposito, A.; Cinelli, S.; Onori, G. *The Journal of Chemical Physics* **2008**, *129*, 35101.
- (39) Gekko, K.; Timasheff, S. N. *Biochemistry* **1981**, *20*, 4667.
- (40) Schellman, J. A. *Biophysical Journal* **2003**, *85*, 108.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, έχει χαρακτηριστεί για πρώτη φορά εκτενώς η δομή του πεπτιδίου TTR(105-115) στην υγρή φάση και η συμπεριφορά του με τη χρήση της φασματοσκοπίας συντονισμού Raman. Τα κυριότερα συμπεράσματα που εξάγονται από τη συστηματική αυτή μελέτη συνοψίζονται στο παρόν κεφάλαιο.

Ο συνδυασμός της αυξημένης τιμής του pK_a για τα κατάλοιπα Tyr στο πεπτίδιο σε σχέση με την τιμή της ελεύθερης Tyr, μαζί με τις μεταβολές στη συχνότητα των δονήσεων Tyr, καθώς και η μελέτη της κορυφής του φαινολικού OH στα φάσματα UVRR, οδηγεί στην άντληση σημαντικών πληροφοριών σχετικά με τη δομή του πεπτιδίου στο διάλυμα. Συγκεκριμένα, συνεπάγεται ότι τα δύο κατάλοιπα Tyr υπόκεινται σε δύο διαφορετικά τοπικά περιβάλλοντα στην υγρή φάση, σε αντίθεση με την ελεύθερη πρόσβαση στο διαλύτη που τους επιτρέπει η εκτεταμένη διαμόρφωση στη στερεά φάση. Το κατάλοιπο Tyr105 που βρίσκεται στο N-τελικό άκρο του πεπτιδίου διαθέτει μεγάλη προσβάσιμη επιφάνεια στο διαλύτη, με τη φαινολική πλευρική του αλυσίδα να είναι πλήρως εκτεθειμένη και να επηρεάζεται από το τοπικό περιβάλλον της (αλλαγή pH). Αντίθετα, το κατάλοιπο Tyr114 σχηματίζει ενδομοριακούς δεσμούς, εμποδίζοντας την αποπρωτονίωσή του σε βασικό περιβάλλον. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές πιθανότητα να οφείλονται στο σχηματισμό ενδομοριακών δεσμών μεταξύ της OH ομάδας του καταλοίπου Tyr114 και των γειτονικών του πλευρικών αλυσίδων. Η ύπαρξη των αλληλεπιδράσεων αυτών επιβεβαιώνεται από τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής οι οποίες έδειξαν ότι οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις παρουσιάζονται στο τμήμα 8-11, συμπεριλαμβανομένων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ Tyr114 με Ser112 και Pro113.

Διέγερση στα ~200 nm, όπου ενισχύεται ο σκεδασμός Raman από το χρωμοφόρο αμίδιο, επιτρέπει την ανάλυση της δευτεροταγούς δομής του πεπτιδίου. Προσομοίωση των φασμάτων χρησιμοποιώντας ένα γραμμικό συνδυασμό των φασμάτων *pure secondary structure Raman spectra (PSSRS)* και του φάσματος του υδατικού διαλύματος της ελεύθερης Tyr, έδωσε ποσοτικές πληροφορίες για τη διαμόρφωση του πεπτιδίου στην υγρή φάση, συναρτήσει της θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα, η δομή του πεπτιδίου TTR

(105-115) σε θερμοκρασιακό εύρος 10-21 °C περιέχει 70% συνεισφορά β -στροφής και 30% από τυχαίο σπείρωμα. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες (28 °C) το πεπτιδίο υιοθετεί δομή η οποία αντιστοιχεί κατά κύριο λόγο σε διαμόρφωση β -στροφής. Η χρήση στην στατιστικής μεθόδου ICA, ως ανεξάρτητης μεθόδου προσδιορισμού της δευτεροταγούς δομής, έδωσε μόνο ένα ανεξάρτητο στοιχείο, το οποίο ήταν πανομοιότυπο με το φάσμα της ελεύθερης Tyr, αγνοώντας έτσι τη συνεισφορά από τις χαμηλές σε ένταση ευρείες κορυφές των αμιδίων. Επομένως, στις περιπτώσεις των μικρών πεπτιδίων που περιέχουν αρωματικά κατάλοιπα σε υψηλές συγκεντρώσεις, η μέθοδος ICA δεν μπορεί να αναλύσει τα φάσματα των πεπτιδίων στα επιμέρους δευτεροταγή στοιχεία που συνθέτουν τη δομή τους. Τέλος, οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής που πραγματοποιήθηκαν, έδωσαν μια ξεκάθαρη εικόνα για τη δευτεροταγή δομή του πεπτιδίου. Οι προσομοιώσεις υπέδειξαν ότι η κυρίαρχη διαμόρφωση του πεπτιδίου είναι το τυχαίο σπείρωμα (κυρίως στην περιοχή 1-3) με το σχηματισμό β -στροφών στο κεντρικό τμήμα της ακολουθίας του πεπτιδίου (κατάλοιπα 4-7), των οποίων ο πληθυσμός αυξάνεται με τη θερμοκρασία, αποτελέσματα που επιβεβαιώνουν και ενισχύουν τα πειραματικά αποτελέσματα. Επιπλέον, η ανάλυση των δίδρωνων γωνιών η οποία υποδεικνύει ότι η διαμόρφωση PPII δεν είναι ο κυρίαρχος πληθυσμός στην κατάσταση της τυχαίας διαμόρφωσης, δικαιολογεί την παράλειψη της συνεισφοράς της PPII διαμόρφωσης κατά τη διαδικασία της ανάλυσης των φασμάτων UVRR στα ~200 nm.

Η μελέτη της επίδρασης υδατικών διαλυμάτων πολυδρικών αλκοολών, (γλυκερόλη/νερό) στο υδρόφοβο πεπτιδίο TTR(105-115) με εκτεταμένη διαμόρφωση στην υγρή φάση, παρείχε πληροφορίες για το τοπικό περιβάλλον των καταλοίπων Tyr. Συγκεκριμένα, η αύξηση της τιμής της απόλυτης διατομής σκεδασμού Raman όλων των δονήσεων της Tyr με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στο διάλυμα, επιδεικνύει τη μεταβολή του τοπικού περιβάλλοντος των καταλοίπων αυτών σε πιο υδρόφοβο, όπως θα αναμενόταν κατά τη διαδικασία ινιδοποίησης. Η αύξηση του υδρόφοβου χαρακτήρα του περιβάλλοντος των καταλοίπων Tyr πιθανό να οφείλεται στην αύξηση των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων των γειτονικών καταλοίπων με την ανθρακική αλυσίδα της γλυκερόλης. Σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης, τα μόρια νερού προτιμούν να σχηματίζουν δεσμούς H με τις υδροξυλικές ομάδες των μορίων γλυκερόλης, αφήνοντας της ανθρακικές αλυσίδες της γλυκερόλης να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Οι ανθρακικές αλυσίδες των μορίων γλυκερόλης είναι πιθανόν να προσεγγίζουν τα κεντρικά τμήματα του πεπτιδίου, δημιουργώντας ένα ευρύτερο υδρόφοβο

πυρήνα. Από την άλλη πλευρά, τα κατάλοιπα Tyr έχοντας μόρια γλυκερόλης στο ευρύτερο τους περιβάλλον και δεδομένου ότι παρατηρείται ερυθρή μετατόπιση της Y_{9a} , είναι πιθανόν να σχηματίζει ενδομοριακούς δεσμούς H με γειτονικές πλευρικές αλυσίδες ή με την κύρια αλυσίδα. Επιπρόσθετα, η μεγάλη αλλαγή που παρατηρείται στο τοπικό περιβάλλον του πεπτιδίου με την αύξηση της γλυκερόλης μπορεί να προάγει το σχηματισμό δεσμών H μεταξύ των δύο καταλοίπων Tyr, υιοθετώντας μια πιο κλειστή δομή. Επομένως, για τα μικρά πεπτίδια και για τις πρωτεΐνες που δεν εμφανίζουν σφαιρική γεωμετρία, τα μείγματα γλυκερόλης/νερού δεν εμφανίζουν την ίδια δράση, ανάλογο φαινόμενο με την περίπτωση των σφαιρικών πρωτεϊνών. Εντούτοις, εις βάθος ανάλυση της δομής που υιοθετεί το πεπτίδιο στα μείγματα γλυκερόλης/νερού σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση υπολογιστικών μεθόδων.

Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να αναφερθεί ότι όλα τα πειραματικά αποτελέσματα που προκύπτουν από τη παρούσα Διδακτορική Διατριβή οφείλονται στις δομικές αλλαγές του πεπτιδίου TTR(105-115) στην υγρή φάση και όχι στο σχηματισμό συσσωματωμάτων και τελικών ινιδίων, δεδομένου ότι σε όλες τις πειραματικές μελέτες η συγκέντρωση του πεπτιδίου παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα (~1.4 mM). Εντούτοις, αποτελούν το πρώτο βήμα για την κατανόηση των δομικών αλλαγών που ενδέχεται να συμβούν κατά το σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων του πεπτιδίου.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή προετοίμασε το έδαφος και έδωσε το έναυσμα για τη μελέτη της διαδικασίας σχηματισμού αμυλοειδών ινιδίων από το πρότυπο πεπτιδίο TTR(105-115). Μελλοντική εργασία σε αυτό το θέμα συμπεριλαμβάνει τις πιο κάτω μελέτες.

— Μελέτη των πολύ αρχικών σταδίων της διαδικασίας συσσωμάτωσης του πεπτιδίου TTR(105-115) με τη φασματοσκοπία χρονικής ανάλυσης συντονισμού Raman (TRRR), χρησιμοποιώντας τη βέλτιστη οπτική διάταξη που κατασκευάστηκε στα πλαίσια της Παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. Η δυναμική της συσσωμάτωσης θα εξεταστεί κατόπιν άλματος θερμοκρασίας (T-jump) στο δείγμα χρησιμοποιώντας ένα υπέρυθρο παλμό laser ns και παρακολουθώντας έπειτα τη διαδικασία χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία TRRR. Ο θερμικός παλμός που προκαλεί το T-jump παίρνει το ρόλο του παλμού διέγερσης. Ο παλμός διερεύνησης με τον οποίο θα μελετηθεί το δείγμα του πεπτιδίου είναι ένας υπεριώδης παλμός στα ~ 200 nm. Ο παλμός διερεύνησης σε αυτά τα πειράματα στη χρονοκλίμακα ns θα καθυστερήσει χρονικά σε σχέση με το θερμικό παλμό χρησιμοποιώντας μια ψηφιακή γεννήτρια καθυστέρησης. Τα φάσματα που θα ληφθούν στις διάφορες χρονικές στιγμές θα μελετηθούν ως προς την αλλαγή της δομής του πεπτιδίου στο χρόνο. Στην πρώτη περίπτωση, πιθανές μετατοπίσεις των συχνοτήτων των διαφόρων γνωστών κορυφών στις περιοχές αμιδίου I, II, III και C_{α} -H θα δώσουν ενδείξεις ως προς την αλλαγή της δομής του πεπτιδίου στο χρόνο. Έπειτα, η ένταση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών δονητικών κορυφών θα χαρακτηρίσει συναρτήσει του χρόνου, ούτως ώστε να γίνει κατανοητή η δυναμική της διαδικασίας συσσωμάτωσης.

— Δεδομένου ότι τα προϊνίδια είναι περισσότερο τοξικά στα κύτταρα παρά τα τελικά ινίδια, θα γίνει προσπάθεια ταυτοποίησης των πιθανών ενδιάμεσων ειδών καθώς και της δευτεροταγούς δομής τους. Χαρακτηρισμός τέτοιων ενδιάμεσων θα ήταν σημαντικός για την ανάπτυξη κατάλληλων αναστολέων για την αποτροπή του σχηματισμού ινιδίων σε ασθενείς με προδιάθεση σε αμυλοειδείς ασθένειες όπως και τρόπων στόχευσης τέτοιων συσσωματωμάτων σε θεραπευόμενους ασθενείς.

— Τα διάφορα στάδια του μηχανισμού συσσωμάτωσης του πεπτιδίου TTR(105-115) σε πραγματικό χρόνο μπορούν να χαρακτηριστούν ποσοτικά, με χρήση της φασματοσκοπίας συντονισμού Raman *2D correlation* (2DCoS). Αυτή η τεχνική παρέχει τη δυνατότητα

προσδιορισμού των διαδοχικών σταδίων δομικής εξέλιξης και τις χρονικές στιγμές που λαμβάνουν χώρα. Η ανάλυση *2D correlation* επιτρέπει το διαχωρισμό κορυφών οι οποίες αλληλοεπικαλύπτονται στα φάσματα Raman πρωτεϊνών και τις αναλύει στα επιμέρους συστατικά τα οποία αντιστοιχούν στα διάφορα δευτεροταγή στοιχεία της δομής.

Γαλάτεια Κ. Περίδου