ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΩΝ & ΑΕΡΟΝΑΥΠΗΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΘΕΟΔΩΡΑ Σ. ΤΣΑΠΙΚΟΥΝΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΙΝΩΔΟΓΟΝΟΥ-ΕΠΙΦΑΝΕΙΩΝ ΜΕ ΤΗ
ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΤΡΑ
ΙΟΥΝΙΟΣ 2008

Πρακτικό εξέτασης της διδακτορικής διατριβής
κ^ας Θεοδώρας Τσαπικούνη

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή αποτελούμενη από τα μέλη ΔΕΠ:

- Αντιμησιάρη Σοφία, Αναπλ. Καθηγήτρια Τμήματος Φαρμακευτικής Παν/μίου Πατρών
- Δέσποινα Δεληγιάννη, Επίκ. Καθηγήτρια Τμήματος Μηχανολόγων & Αεροναυπηγών Μηχανικών Παν/μίου Πατρών
- Λογοθετίδη Στέργιο, Καθηγητή Τμήματος Φυσικής Α.Π.Θ.
- Μαυρίλα Δημοσθένη, Επίκ. Καθηγητή Τμήματος Μηχανολόγων & Αεροναυπηγών Μηχανικών Παν/μίου Πατρών
- Μισιρλή Ιωάννη, Καθηγητή Τμήματος Μηχανολόγων & Αεροναυπηγών Μηχανικών Παν/μίου Πατρών
- Παπανικολάου Γεώργιο, Καθηγητή Τμήματος Μηχανολόγων & Αεροναυπηγών Μηχανικών Παν/μίου Πατρών
- Τοπρακτσιόγλου Χρήστο, Καθηγητή Τμήματος Φυσικής Παν/μίου Πατρών.

που συγκροτήθηκε με την υπαρ. Αροθμ. 6/1-4-2008 Γενική Συνέλευση με Ειδική Σύνθεση του Τμήματος Μηχαν. & Αεροναυπηγών Μηχανικών, αφού συνήλθε την Παρασκευή 9-5-2008 και ώρα 18.00 στην αίθουσα Συνεδριάσεων του Τμήματος, εξέτασε τη διδακτορική διατριβή που ανέπτυξε η υποψηφία διδάκτωρ κα Τσαπικούνη Θεοδώρα με τίτλο: «Μελέτη αλληλεπίδρασης ινωδογόνου – επιφανειών με τη χρήση του Μικροσκοπίου Ατομικής Δύναμης».

Η Επιτροπή ενέκρινε την διατριβή και τη βαθμολόγησε με βαθμό ΑΡΙΣΤΑ.

Η Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αντιμησιάρη Σοφία

Δεληγιάννη Δέσποινα

Λογοθετίδης Στέργιος

Μαυρίλας Δημοσθένης

Μισιρλής Ιωάννης

Παπανικολάου Γεώργιος

Τοπρακτσιόγλου Χρήστος

Ἐοικεν Ἐμπεδοκλῆς ἂν εἰπεῖν ὡς τὸ κρατεῖν καὶ κινεῖν ἐν μέρει τὴν Φιλίαν καὶ τὸ Νεῖκος
ὑπάρχει τοῖς πράγμασιν ἐξ ἀνάγκης, ἡρεμεῖν δὲ τὸν μεταξὺ χρόνον.

(Φυσικά, Ἀριστοτέλης, 384-322 π.Χ.)

Γράφει ἐδῶ: “Ἐν ἀρχῇ ἦν ὁ λόγος!”
Διστάζω ἤδη! Με περιμένει ψόγος!
Ἀδυνατῶ τόσο τὸ λόγο νὰ ἐκτιμήσω.
Κάπως ἀλλιῶς πρέπει ν’ ἀρχίσω,
Ἀφοῦ με τὸ πνεῦμα ἐξηγῶ τοὺς οἰωνοὺς.
Πρέπει νὰ πω: “Ἐν ἀρχῇ ἦν ὁ νοῦς”.
Μέτρα καλὰ τὴν πρώτη λέξη,
ἡ πένα σου ας μὴν προτρέξει!
Εἶναι ὁ νοῦς τῶν πάντων ποιητής;
Σωστότερο θὰ ἔταν: “Ἐν ἀρχῇ ἦν ἡ δύναμις!”

(Faust I, Johann Wolfgang von Goethe, 1749-1832)

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ

ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης

Η συγκεκριμένη Διδακτορική Διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ το οποίο συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση και Εθνικούς Πόρους.

Ευχαριστίες

Η διατριβή αυτή εκπονήθηκε από το Σεπτέμβριο του 2002 ως τον Απρίλιο του 2008 στο Εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Βιοϊατρικής Τεχνολογίας υπό την επίβλεψη του καθ.Ι.Μισιρλή. Η δική του επιστημονική διορατικότητα ήταν αυτή, η οποία μου προσέφερε τη δυνατότητα να ασχοληθώ με ένα θέμα υψηλού ερευνητικού ενδιαφέροντος, έχοντας στη διάθεσή μου ένα σύγχρονο τεχνικό εργαλείο, το Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (AFM). Τον ευχαριστώ όμως ιδιαίτερα για όσα έμαθα κοντά του όλο αυτό το διάστημα και ίσως να μην διαφαίνονται στο κείμενο της διατριβής, κύρια να αναζητώ πάντα την αλήθεια και να μη φοβάμαι να επιλέγω το δύσκολο δρόμο.

Στη διαδρομή αυτή, κατεξοχήν μοναχική, η βοήθεια συγκεκριμένων ανθρώπων υπήρξε πολύτιμη. Ευχαριστώ τον καθ. A.Curtis για τις τεχνικές, που έθεσε στη διάθεσή μου, όσες φορές με φιλοξένησε στο Centre for Cell Engineering στο Πανεπιστήμιο της Γλασκώβης, και την επιμονή του να με μάθει να αντιμετωπίζω την έρευνα με θετική σκέψη. Το Δρ.N.Gadegaard, από το ίδιο εργαστήριο, ευχαριστώ για τις υποδείξεις και τις συμβουλές του στα πρώτα μου βήματα με το AFM. Καταλυτική για την πρόοδο των πειραμάτων της διατριβής και την αποσαφήνιση πρακτικών ζητημάτων σχετικά με τη λειτουργία του AFM υπήρξε η φιλοξενία μου στο υπερδραστήριο Laboratory of Biophysics and Surface Analysis του Πανεπιστημίου του Νότινγχαμ, για την οποία ευχαριστώ τον καθ.Μ.Davies καθώς και τη Δρ.S.Allen, η οποία επέβλεψε τα πειράματά μου εκεί.

Για τις χρήσιμες συζητήσεις σχετικά με την τροποποίηση επιφανειών με μονομοριακά στρώματα και τη μέτρηση δυνάμεων σε αυτές ευχαριστώ τον καθ.Χ.Τοπρακτσιόγλου από το τμήμα Φυσικής του Πανεπιστημίου Πατρών. Τον ίδιο, όπως και το Δρ.Ν.Σπηλιόπουλο, ευχαριστώ για τις οδηγίες τους για την προμήθεια αναγκαίων υλικών για τα τελικά πειράματα της διατριβής.

Τον κ.Δ.Σταμέλο από τις Αναλυτικές Συσκευές Α.Ε ευχαριστώ για τη μέριμνά του κατά τη διαδικασία αναβάθμισης του Μικροσκοπίου και τη συνεργασία του για την αντιμετώπιση των προβλημάτων, τα οποία είχαν παρουσιαστεί. Για την άμεση επιβεβαίωση αυτών των προβλημάτων καίρια υπήρξε η βοήθεια του Δρ.Ε.Καρούτσου από το τμήμα της Επιστήμης των Υλικών και τον ευχαριστώ για αυτή.

Ευχαριστώ ακόμα τον καθ.Π.Κουτσούκο και τις ερευνήτριες του Εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών, την κα.Δ. Κανελλοπούλου, τη Δρ.Κ.Κοφινά,

την κα.Κ.Βαβουράκη και την κα. Μ.Ροκίδη για την αδιάλειπτη διάθεση νερού από τη στήλη απόσταξης τους και την υλικοτεχνική υποστήριξη, την οποία μου προσέφεραν, σε κρίσιμες στιγμές των πειραμάτων.

Ευχαριστώ επίσης, τα υπόλοιπα μέλη της εφταμελούς εξεταστικής επιτροπής, την αναπ.καθ. Σ.Αντιμησιάρη, την επικ.καθ.Δ.Δεληγιάννη, τον καθ.Σ.Λογοθετίδη, τον επικ.καθ.Δ.Μαυρίλα και τον καθ.Γ.Παπανικολάου για τις ενδιαφέρουσες υποδείξεις και σχόλια τους πάνω στο κείμενο της διατριβής.

Τέλος ευχαριστώ τους συναδέλφους, τις φίλες και τους φίλους, οι οποίοι μοιράστηκαν μαζί μου χαρές και αγωνίες όλα αυτά τα χρόνια στην Πάτρα ή όπου αλλού συναντηθήκαμε. Ευγνωμοσύνη οφείλω στο Βασίλη γιατί στα πιο δύσκολα χρόνια πίστεψε στην αξία αυτής της προσπάθειας και την υποστήριξε. Ακριβή ευγνωμοσύνη οφείλω και στην οικογένειά μου, τους γονείς και τον αδελφό μου, για τη στήριξή τους. Με το δικό τους τρόπο με δίδαξαν ότι για την κατανόηση απαραίτητη δεν είναι μόνο η γνώση αλλά και η αγάπη.

Περιεχόμενα

Συντμήσεις	xii
Σύμβολα.....	xiv
Περιεχόμενοι Πίνακες	xv
Περίληψη.....	xvii
Abstract	xix
Κεφάλαιο 1-Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με τις επιφάνειες των βιοϋλικών: Η περίπτωση του ινωδογόνου	1
1.1 Εισαγωγή.....	1
1.2 Πρωτεΐνες και διεπιφάνειες	2
1.3 Η προσρόφηση των πρωτεϊνών	5
1.3.1 Παράγοντες ελέγχου της προσρόφησης	5
1.3.2 Η προσρόφηση σε βήματα	7
1.4 Η πρωτεΐνη ινωδογόνο	9
1.4.1 Μοριακή δομή.....	10
1.4.2 Η φυσιολογία του ινωδογόνου και ο σχηματισμός του ινώδους	11
1.4.3 Μη ειδικές αλληλεπιδράσεις του ινωδογόνου με επιφάνειες	12
1.5 Τεχνικές μελέτης αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-επιφάνειας	14
1.5.1 Τεχνικές μελέτης των πρωτεϊνών στις επιφάνειες	14
1.5.2 Τεχνικές μέτρησης δυνάμεων αλληλεπίδρασης	20
Κεφάλαιο 2-Μελέτη προσρόφησης ινωδογόνου στην επιφάνεια μίκας.....	23
2.1 Εισαγωγή.....	23
2.2 Θεωρητικό υπόβαθρο.....	24
2.2.1 Η προσρόφηση πρωτεϊνών σύμφωνα με τη θερμοδυναμική θεωρία	24
2.2.2 Η αντιστρεπτότητα της προσρόφησης.....	25
2.2.3 Υπολογισμός της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας κατά την προσρόφηση.....	26
2.3 Οργανολογία –Το Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (AFM)	33
2.3.1 Η αρχή λειτουργίας του AFM.....	33
2.3.2 Τεχνικές AFM.....	40

2.4 Πειραματική μεθοδολογία	48
2.4.1 Προετοιμασία δειγμάτων.....	48
2.4.2 Το Nanoscope III Multimode AFM.....	49
2.4.3 Τεχνικές λεπτομέρειες λήψης εικόνων με AFM.....	50
2.4.4 Επεξεργασία εικόνων και μετρήσεων.....	52
2.5 Αποτελέσματα.....	53
2.5.1 Εικόνες μεμονωμένων μορίων ινωδογόνου	53
2.5.2 Επίδραση του pH και της ιοντικής ισχύος στην προσρόφηση	59
2.6 Συζήτηση αποτελεσμάτων	62
Κεφάλαιο 3-Μέτρηση δυνάμεων μεταξύ τροποποιημένης ακίδας και επιφάνειας	73
3.1 Εισαγωγή.....	73
3.2 Διεπιφανειακές δυνάμεις	74
3.3 Μέτρηση δυνάμεων με το AFM.....	78
3.3.1 Η τεχνική.....	78
3.3.2 Διακριτική ικανότητα μετρήσεων	82
3.3.2 Βαθμονόμηση της σταθεράς ελατηρίου του προβόλου της ακίδας.....	85
3.3.3 Μέθοδοι ακινητοποίησης πρωτεϊνών στην ακίδα.....	89
3.4 Πειραματική μεθοδολογία	96
3.4.1. Τροποποίηση ακίδων	96
3.4.2 Μέτρηση δυνάμεων και επεξεργασία καμπύλων	99
3.5 Μετρήσεις-Αποτελέσματα.....	101
3.5.1 Έλεγχος τροποποίησης ακίδων	101
3.5.2 Καμπύλες δύναμης-απόστασης σε διάφορες συνθήκες ιοντικής ισχύος.....	104
3.5.3 Καμπύλες δύναμης-απόστασης σε διάφορες συνθήκες pH.....	106
3.6 Συζήτηση αποτελεσμάτων	107
3.6.1 Τροποποίηση κολλοειδών αισθητήρων.....	107
3.6.2 Ο ρόλος της ιοντικής ισχύος στην αλληλεπίδραση του ινωδογόνου με τη μίκα	109
3.6.3 Ο ρόλος του pH στην αλληλεπίδραση του ινωδογόνου με τη μίκα	113
Κεφάλαιο 4-Μέτρηση δύναμης αποκόλλησης μεμονωμένων μορίων ινωδογόνου από επιφάνεια .	117
4.1 Εισαγωγή.....	117
4.2 Πρόσδεση των μορίων ινωδογόνου στην ακίδα	119
4.2.1 Επισκόπηση μεθόδων πρόσδεσης	119

4.2.2 Έλεγχος μεθόδων τροποποίησης ακίδας με αμινομάδες	123
4.2.3 Έλεγχος συνδετών για την πρόσδεση του ινωδογόνου στις τροποποιημένες ακίδες	138
4.3 Πειραματική διαδικασία.....	150
4.4 Επεξεργασία πειραματικών μετρήσεων	152
4.4.1 Αξιολόγηση πειραματικών καμπύλων.....	152
4.4.2 Αλγόριθμος επεξεργασίας πειραματικών καμπύλων και μετρήσεων	155
4.4.3 Προσαρμογή της τάνυσης των μορίων ινωδογόνου από θεωρητικές εξισώσεις.....	159
4.5 Αποτελέσματα.....	163
4.5.1 Ανάλυση μετρήσεων δύναμης και θέσης αποκόλλησης	163
4.5.2 Έλεγχος της δυναμικής των δεσμών ινωδογόνου-επιφάνειας με τη θεωρία των Bell-Evans	169
4.6 Φυσική ερμηνεία συμβάντων αποκόλλησης	176
4.6.1 Αποδιάταξη δομών ανώτερης τάξης στην πρωτεϊνική αλυσίδα.....	177
4.6.2 Θεώρηση διαδοχικής διάσπασης δεσμών της ίδιας πρωτεϊνικής αλυσίδας με την επιφάνεια.....	179
4.6.3 Θεώρηση παράλληλων πρωτεϊνικών μορίων.....	183
Κεφάλαιο 5-Συμπεράσματα	189
Παραρτήματα	193
A. Υπολογισμός πλάτους ταλάντωσης στην τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας	193
B. Ποιοτική και ποσοτική χημική ανάλυση επιφανειών γυαλιού τροποποιημένων με αιθανολαμίνη/PEG με φασματοσκοπία ακτίνων Χ (XPS).	195
Γ. Αλγόριθμοι Matlab αυτόματης επεξεργασίας πειραματικών καμπύλων και μετρήσεων	199
Βιβλιογραφία.....	213
Δημοσιεύσεις	235
Παρουσιάσεις σε συνέδρια	235

Συντμήσεις

AFM:	μικροσκοπία ατομικής δύναμης, Atomic Force Microscopy
ANB-NOS :	N-5-2-νιτροβενζοϋλοξυ-ηλεκτριμιδικού αζίδιο, N-5-azido-2-nitrobenzoyloxy-succinimide
ANOVA:	ανάλυση διακυμάνσεων, Analysis of Variance
APDES:	αμινοπροπυλοδιμεθυλαιθοξυσιλάνιο, (3-aminopropyl)dimethyl-ethoxysilane
APTES:	αμινοπροπυλοτριαιθοξυσιλάνιο, (3-aminopropyl)-triethoxysilane
BS ³ :	δι-θειο-υδροξυ-ηλεκτριμιδικός εστέρας
CN:	νιτρική κυτταρίνη, nitrocellulose
DDS:	διμεθυλοδιχλωροσιλάνιο, dimethyl-dichlorosilane
DETA:	τριμεθοξυσυλοπροπυλοδιαθιθεννοτριαμίνη , trimethoxy-silylpropyl-diethylene-triamine
DLVO:	θεωρία Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek
DMF:	διμεθυλοφορμαμίδιο, dimethylformamide
DMSO:	διμεθυλοσουλφοξείδιο, dimethylsulfoxide
EDC:	N-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)-N'-αιθυλοκαρβοδιιμίδιο, (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride
FITC:	ισοθειοκυανική φθορισεΐνη, fluorescein isothiocyanate
Fmoc:	9-φθορο-μεθοξυ-καρβονυλική ομάδα, 9-fluorenylmethoxycarbonyl
FTIR :	φασματοσκοπία υπεράθρων ακτίνων με μετασχηματισμό Fourier, Fourier Transform Infra-red Spectroscopy
HOPG:	προσανατολισμένος πυρολυτικός γραφίτης, Highly Oriented Pyrolytic Graphite
MALDI:	φασματοσκοπία εκρόφησης/ιονισμού λέιζερ με τη βοήθεια μήτρας, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
MBS:	μαλεϊμιδο-βενζολ-N-υδροξυ-ηλεκτριμιδικός εστέρας, maleimido-benzoyl-N-hydroxy-succinimide ester
MTES:	μεθυλοτριαιθοξυσιλάνιο, methyltriethoxysilane
NHS:	υδροξυ-ηλεκτριμίδιο, N-hydroxysuccinimide
Θειο-NHS:	υδροξυθειο-ηλεκτριμίδιο, N-Hydroxysulfosuccinimide
NT:	νιτριλοτριοξικό οξύ, nitrilotriacetic acid
OTS:	δεκαοκτυλοτριχλωροσιλάνιο, octadecyltrichlorosilane
OWLS :	φασματοσκοπία οπτικού κυματοδηγού, Optical Waveguide Light Spectroscopy

PBS:	ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα, phosphate buffered saline
PDITC:	1,4-φαινυλο-δισοθειο-κυάνιο, 1,4-phenylenediisothiocyanate
PDMS:	πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο, polydimethylsiloxane
PDP :	2-πυριδυλοδιθειοπροπιονικός εστέρας, pyridyl-dithio-propionate
PEG:	πολυαιθυλενική γλυκόλη, poly(ethylene glycol)
pI:	ισοηλεκτρικό σημείο
PMMA:	πολυμεθακρυλικό οξύ, poly(methyl methacrylate)
PS:	πολυστυρένιο, polystyrene
PTFE:	πολυτετραφθοροαιθυλένιο, polytetrafluoroethylene
RGD:	αλληλουχία αμινοξέων αργινίνη-γλυκίνη-ασπαρτικό οξύ
QCM:	μικροζυγός κρυστάλλου χαλαζία, Quartz Crystal Microbalance
RMS:	τετραγωνική τιμή του μέσου τετραγώνου, Root Mean Square
SAM:	αυτο-οργανούμενο μονομοριακό στρώμα, self - assembled monolayer
SATP:	N-3-(S-ακετυλοθειοπροπιονικό) ηλεκτριμίδιο, N-succinimidyl-3-(S-acethylthio) propionate
SEM :	ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, Scanning Electron Microscope
SERS :	φασματοσκοπία Ραμάν με ενίσχυση επιφάνειας, Surface Enhanced Raman Spectroscopy
SFA :	συσκευή μέτρησης επιφανειακών δυνάμεων, Surface Force Apparatus
SPDP:	3-2-πυριδυλοδιθειοπροπιονικό-N-ηλεκτριμίδιο, N-succinimidyl-3-(2-pyridyl-dithio) propionate
SPR:	συντονισμός επιφανειακών πλάσμονων, Surface Plasmon Resonance
STM:	μικροσκόπιο σήραγγος, Scanning Tunnel Microscope
TIRF:	φθορισμός ολικής ανάκλασης, Total Internal Reflection Fluorescence
ToF-SIMS :	φασματοσκοπία μάζας δευτερογενών ιόντων ως προς το χρόνο πτήσης, Time of Flight-Secondary Ions Mass Spectroscopy
WLC:	Worm-Like Chain model
XPS/ ESCA:	φασματοσκοπία ακτίνων X, X-ray Photoelectron Spectroscopy

Σύμβολα

Å:	angstrom, 10^{-10}m
A:	σταθερά Hamaker
ΔG :	μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος, ενέργεια του Gibbs
ϵ :	διηλεκτρική σταθερά του μέσου
ϵ_0 :	ηλεκτρική διαπερατότητα του κενού, $8.854 \cdot 10^{-12} \text{C}^2/\text{J}\cdot\text{m}$
e :	φορτίο ηλεκτρονίου, $1,602 \cdot 10^{-19} \text{C}$
k_B :	σταθερά του Boltzmann, $1.3805 \cdot 10^{-23} \text{J/K}$
$k_{\text{διασπ(ο)}}$:	φυσικός ρυθμός διάσπασης αντιστρεπτού δεσμού
λ :	μήκος Debye
L_p :	μήκος δυσκαμψίας, persistence length
Q :	παράγοντας Q ταλάντωσης προβόλου
x_B :	μήκος μετάβασης μοριακού δεσμού (transition distance)
k :	σταθερά ελατηρίου, δυσκαμψία ακίδας/μορίου

Περιεχόμενοι Πίνακες

Πίνακας 1.1. Τυπικές τιμές για τη διακριτική ικανότητα, το βάθος ανίχνευσης και την ευαισθησία των τεχνικών μελέτης της προσρόφησης πρωτεϊνών.....	20
Πίνακας 2.1. Αλληλεπιδράσεις κατά την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις διεπιφάνειες και η συνεισφορά τους στη μεταβολή της ενέργειας του Gibbs.....	32
Πίνακας 2.2. Μηχανικά και γεωμετρικά χαρακτηριστικά δύο τύπων ακίδων-προβόλων AFM.....	35
Πίνακας 2.3. Χαρακτηριστικά των τριών τυπικών σαρωτών, οι οποίοι χρησιμοποιούνται με το Multimode AFM της Digital Instruments.....	37
Πίνακας 2.4. Τυπικές τιμές για τις παραμέτρους ελέγχου της σάρωσης των δειγμάτων προσροφημένου ινωδογόνου πάνω σε μίκα με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας σε PBS.....	52
Πίνακας 2.5. Επισκόπηση εργασιών απεικόνισης προσροφημένου ινωδογόνου με το AFM.....	64
Πίνακας 3.1. Μέθοδοι ακινητοποίησης και αποτελέσματα πειραμάτων μέτρησης δυνάμεων με τροποποιημένες ακίδες AFM.....	93
Πίνακας 3.2. Τιμές επιφανειακού φορτίου, οι οποίες προέκυψαν για τη μίκα (σ_E) και το στρώμα της πρωτεΐνης (σ_H) ύστερα από διαδικασία βελτιστοποίησης της προσαρμογής των καμπύλων DLVO στα πειραματικά δεδομένα στις τρεις τιμές pH.....	113
Πίνακας 4.1. Στοιχειομετρική ανάλυση επιφάνειας δειγμάτων γυαλιού πριν και μετά την τροποποίησή τους με αιθανολαμίνη.....	133
Πίνακας 4.2. Στοιχειομετρική ανάλυση δειγμάτων γυαλιού πριν και μετά την τροποποίησή τους με διπλό-NHS-PEG.....	146
Πίνακας 4.3. Συχνότητα κύκλου, χρόνος επαφής ακίδας-επιφάνειας και πρόσθετη καθυστέρηση της ακίδας σε επαφή με την επιφάνεια για πέντε διαφορετικές ταχύτητες προσέγγισης-απομάκρυνσης και τα αντίστοιχα εύρη μετακίνησης.....	152
Πίνακας 4.4. Αποτελέσματα μετρήσεων αντοχής δεσμών ινωδογόνου-επιφάνειας γυαλιού ομαδοποιημένα ανάλογα με το ρυθμό φόρτισής τους.....	173
Πίνακας 4.5. Μήκος μετάβασης και φυσική συχνότητα διάσπασής δεσμού για διάφορα βιομόρια, τα οποία αλληλεπιδρούν με ειδικό τρόπο.....	174
Πίνακας B.1. Στοιχειομετρική ανάλυση δειγμάτων γυαλιού πριν και μετά την τροποποίησή τους με αιθανολαμίνη και διπλό-NHS-PEG.....	197

Περίληψη

Αντικείμενο της διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση των μηχανισμών προσρόφησης των πρωτεϊνών και η μέτρηση των δυνάμεων αποκόλλησής τους από την επιφάνεια τεχνητών υλικών. Ως βασικό εργαλείο για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (AFM), με το οποίο ελήφθησαν εικόνες από δείγματα μέσα σε υδατικό διάλυμα καθώς και καταγράφηκαν οι δυνάμεις αλληλεπίδρασης μορίων με επιφάνειες. Η πρωτεΐνη ινωδογόνο επιλέχθηκε για τη μελέτη εξαιτίας της σημασίας της για τη βιοσυμβατότητα των βιοϋλικών, καθώς ο πολυμερισμός της σε ινώδες είναι δυνατό να καταλήξει στο σχηματισμό θρόμβων. Ως υποστρώματα προσρόφησης χρησιμοποιήθηκαν η μίκα και το γυαλί λόγω της απαίτησης λείων επιφανειών για το AFM.

Το πρώτο στάδιο της έρευνας περιελάμβανε την ποσοτικοποίηση της προσρόφησης μεμονωμένων μορίων ινωδογόνου πάνω σε επιφάνεια μίκας υπό μεταβλητές συνθήκες ιοντικής ισχύος και pH. Στόχος ήταν η κατανόηση του τρόπου, μέσω του οποίου η κατανομή των ηλεκτροστατικών φορτίων, τόσο στα πρωτεϊνικά μόρια όσο και στην επιφάνεια, επηρεάζει την αλληλεπίδρασή τους. Η μελέτη της προσρόφησης με μεμονωμένα πρωτεϊνικά μόρια, αντί του συνήθους συμπαγούς στρώματος, προτιμήθηκε για να αποφευχθεί η παρεμβολή των πλευρικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων στο τελικό αποτέλεσμα. Έτσι, οι εικόνες, οι οποίες ελήφθησαν με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα και η στατιστική ανάλυση της επιφανειακής κάλυψης στις διάφορες συνθήκες διαλύματος έδειξαν ότι η ισορροπία των απωστικών ηλεκτροστατικών δυνάμεων και των δυνάμεων ενυδάτωσης με τις ελκτικές van der Waals καθορίζει την έκβαση της προσρόφησης από τα πρώτα στάδιά της, όταν δηλαδή την επιφάνεια προσεγγίζουν ανεξάρτητα πρωτεϊνικά μόρια.

Περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της ιοντικής ισχύος και του pH στην αλληλεπίδραση ινωδογόνου-επιφανειών επιχειρήθηκε με μέτρηση της δύναμης έλξης και αποκόλλησης ακίδων του AFM από δείγματα μίκας. Οι ακίδες είχαν προηγουμένως τροποποιηθεί με μικροσφαιρίδια, στην επιφάνεια των οποίων είχε προσδεθεί ομοιοπολικά, με κατάλληλη χημική διαδικασία, ένα στρώμα μορίων ινωδογόνου. Οι καμπύλες προσέγγισης-απομάκρυνσης, οι οποίες περιγράφηκαν θεωρητικά με βάση το μοντέλο DLVO, απέδειξαν την ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στις μετρούμενες δυνάμεις και το βαθμό προσρόφησης στις διάφορες συνθήκες. Ειδικότερα οι μετρήσεις σε pH 3.5 έδωσαν

ισχυρές ενδείξεις για αλλαγές της μοριακής διάταξης του ινωδογόνου, οι οποίες μπορούν να συσχετιστούν με τις ενζυμικά καταλυόμενες αναδιατάξεις της δομής του κατά το σχηματισμό του ινώδους.

Η τελευταία ομάδα των πειραμάτων επικεντρώθηκε στη μέτρηση της δύναμης αποκόλλησης μεμονωμένων μορίων ινωδογόνου από την επιφάνεια γυαλιού. Για το σκοπό αυτό η πρωτεΐνη προσδέθηκε ομοιοπολικά στις ακίδες του AFM μέσω αλυσίδων πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG), αφού πρώτα εξετάστηκαν τρεις διαφορετικές τεχνικές επιφανειακής χημικής τροποποίησης (3-αμινοπροπυλο-τριαιθοξυσιλάνιο, αιθανολαμίνη και 3-αμινοπροπυλο-διμεθυλ-αιθοξυσιλάνιο). Ο εντοπισμός στο σύνολο των καμπύλων, που συλλέχθηκαν, εκείνων, οι οποίες αντιπροσωπεύουν αποκόλληση ενός μόνο πρωτεϊνικού μορίου, στηρίχθηκε στα χαρακτηριστικά των καμπύλων τάνυσης των ανεξάρτητων μορίων ινωδογόνου, οι οποίες και προσαρμόστηκαν από το μοντέλο “Worm-Like Chain”. Η επεξεργασία των πειραματικών καμπύλων και ο προσδιορισμός της δύναμης αποκόλλησης σε κάθε μία έγινε με τη βοήθεια πρωτότυπου κώδικα στη Matlab. Οι μετρηθείσες δυνάμεις ομαδοποιήθηκαν με κριτήριο την ταχύτητα αποκόλλησης και εξετάστηκε κατά πόσο η θεωρία των Bell και Evans μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την περιγραφή της δυναμικής των δεσμών, οι οποίοι σχηματίζονται μεταξύ του ινωδογόνου και του υποστρώματος του γυαλιού. Τέλος, προτάθηκαν δύο θεωρήσεις για τη φυσική ερμηνεία των πειραματικών καμπύλων, οι οποίες παρουσίαζαν πολλαπλά συμβάντα αποκόλλησης, η θεώρηση της διαδοχικής διάσπασης δεσμών μιας μοναδικής πρωτεϊνικής αλυσίδας με το υπόστρωμα και η θεώρηση των παράλληλων μορίων.

Συμπερασματικά η διατριβή αυτή παρουσιάζει ολοκληρωμένα τη χρήση του AFM για τη μελέτη, στο νανοεπίπεδο, της συμπεριφοράς ανεξάρτητων πρωτεϊνικών μορίων σε διεπιφάνειες. Η πρωτοτυπία της έγκειται στη μέτρηση της δύναμης αποκόλλησης μεμονωμένων μορίων ινωδογόνου από την επιφάνεια. Η επέκταση της τεχνικής αυτής σε χημικά τροποποιημένες και σαφώς χαρακτηρισμένες επιφάνειες καθώς και χρήση άλλων πρωτεϊνών μπορεί να φέρει την τεχνική αυτή κοντά σε ακριβέστερες εφαρμογές ελέγχου της βιοσυμβατότητας χρησιμοποιούμενων από την ιατρική υλικών.

Abstract

The aim of this doctoral thesis was the study of the mechanisms of protein adsorption and the measurement of the detachment forces of proteins from surfaces. The experiments were conducted with the Atomic Force Microscope (AFM), with which images of adsorbed proteins were obtained in liquid and protein-surface interaction forces were recorded. The study was focused on fibrinogen, a protein the behavior of which on biomaterial surfaces is critical for their biocompatibility assessment, since its polymerization into fibrin leads to the formation clots. Mica and glass were used as substrates for adsorption due to the restrictions imposed by AFM techniques for smooth surfaces.

In the first set of experiments we tried to quantify the adsorption of single protein molecules on mica at different conditions of pH and ionic strength. The objective was to clarify the role of electrostatic charge distribution both on the surface and the molecules upon their interaction. Single protein molecules were studied instead of confluent monolayers in order to exclude the effect of lateral intermolecular interactions in the measurements. The images acquired with tapping mode in phosphate buffered saline and the statistical analysis of the surface coverage at the various conditions indicated that the balance between the repulsive electrostatic or hydration forces and the attractive van der Waals forces determines adsorption from its very early steps, when individual molecules approach the surface.

To further investigate the pH and ionic strength effect in fibrinogen-surface interaction, the force of attraction and detachment of colloid probes from mica surface was measured. The probes were constructed from silica microspheres attached to AFM cantilevers and were modified with a fibrinogen layer covalently bound to their surface. The approach-retract curves, which were fitted by the DLVO model, proved that the measured interaction forces, can be correlated with the degree of adsorption at the various conditions. Particularly measurements at pH 3.5 offered evidence of fibrinogen conformational changes, which may be related to enzymically catalyzed restructurings during the formation of fibrin.

The last set of experiments was focused on the measurement of the detachment force of single fibrinogen molecules from glass surfaces. For this purpose the protein was covalently bound to AFM tips, through polyethylene glycol linkers, after three different methods of surface chemical

modification had been tested (3-aminopropyl(triethoxysilane), ethanolamine, 3-aminopropyl(dimethylethoxysilane)). The experimental curves representing single molecule detachment were identified from the characteristic stretching curves of the protein chains which were fitted by the Worm-Like Chain model. For the automatic processing of force data an algorithm was written in Matlab. Then the measured rupture forces were grouped according to the loading rate and an attempt was made to describe the dynamics of fibrinogen-substrate bindings with the Bell-Evans theory. Finally, two models were suggested for the physical interpretation of curves with multiple rupture events. The first refers to successive ruptures of multiple connections of a single fibrinogen molecule with the substrate, while the second to parallel molecules stretched between the tip and the substrate.

In conclusion this thesis demonstrated in detail the use of AFM for the study, at the nanoscale, of protein molecules at interfaces. An important novelty was the measurement of the rupture force of single protein molecules from surfaces. Extension of the tested techniques to chemically modified and well-characterized surfaces as well as to different proteins can be applied for the accurate prediction of realistic biomaterial biocompatibility.

Κεφάλαιο 1

Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με τις επιφάνειες των βιοϋλικών: Η περίπτωση του ινωδογόνου

1.1 Εισαγωγή

Αντικείμενο αυτή της διατριβής είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης ινωδογόνο με τεχνητές επιφάνειες. Η σκοπιμότητα μιας τέτοιας μελέτης πηγάζει από την ανάγκη διεύρυνσης της γνώσης, την οποία διαθέτουμε γύρω από τη συμπεριφορά των πρωτεϊνών στις διεπιφάνειες και ειδικότερα το κρίσιμο φαινόμενο της προσρόφησής τους στις επιφάνειες υλικών. Παρόλο που η γνώση αυτή είναι απαραίτητη για μια πληθώρα εφαρμογών, οι οποίες άπτονται της βιοϊατρικής τεχνολογίας και όχι μόνο, η πολυπλοκότητα των παραμέτρων, οι οποίες ελέγχουν τη συμπεριφορά των πρωτεϊνών στις διεπιφάνειες καθιστούν το σχετικό εγχείρημα δύσκολο. Η αποκωδικοποίηση των σχετικών διαδικασιών, μη άμεσα αντιληπτών λόγω της κλίμακας του χώρου αλλά και του χρόνου στον οποίο συμβαίνουν, παραμένει μια πρόκληση για τους ερευνητές, οι οποίοι συγκεντρώνονται από διαφορετικές κατευθύνσεις προκειμένου να συνεισφέρουν ο καθένας με το δικό του επιστημονικό υπόβαθρο στη συγκεκριμένη προσπάθεια. Ως εφόδια έχουν τις σύγχρονες τεχνικές, οι οποίες διατίθενται για τη μελέτη των πρωτεϊνών στις διεπιφάνειες. Με μία τέτοια, τη Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης, προσπαθήσαμε στη συγκεκριμένη διατριβή να διερευνήσουμε τη συμπεριφορά του ινωδογόνου στις επιφάνειες.

Το πρώτο αυτό κεφάλαιο ξεκινά με την παρουσίαση της σπουδαιότητας της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών με τις τεχνητές επιφάνειες και συνεχίζει με μια σύντομη αναφορά των παραμέτρων, από τις οποίες εξαρτάται αυτή. Αφού περιγραφούν οι επιμέρους διαδικασίες, οι οποίες συνθέτουν την προσρόφηση των πρωτεϊνών, παρουσιάζεται η πρωτεΐνη ινωδογόνο και αιτιολογείται η επιλογή της για τα πειράματα. Στο τέλος του κεφαλαίου παρατίθενται συνοπτικά πληροφορίες σχετικά με τις τεχνικές, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των πρωτεϊνών στις επιφάνειες.

Καθένα από τα τρία κεφάλαια, τα οποία ακολουθούν, είναι αφιερωμένα σε μία από τις ομάδες πειραμάτων, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της διατριβής. Το δεύτερο

κεφάλαιο αναφέρεται στην προσρόφηση μεμονωμένων μορίων ινωδογόνου πάνω σε μίκα και την επίδραση της ιοντικής ισχύος και του pH του διαλύματος σε αυτή, το τρίτο στη μέτρηση της δύναμης αλληλεπίδρασης και αποκόλλησης τροποποιημένου με ινωδογόνο αισθητήρα από επιφάνεια μίκας σε αντίστοιχες συνθήκες διαλύματος και το τέταρτο στη μέτρηση της δύναμης αποκόλλησης ανεξάρτητων μορίων ινωδογόνου από την επιφάνεια γυαλιού. Η σχετική θεωρία, οι χρησιμοποιούμενες τεχνικές και η πειραματική διαδικασία περιγράφονται για κάθε ομάδα πειραμάτων στο αντίστοιχο κεφάλαιο. Το πέμπτο κεφάλαιο έχει χαρακτήρα σύνοψης καθώς συγκεντρώνει τα συμπεράσματα και από τις τρεις ομάδες πειραμάτων.

1.2 Πρωτεΐνες και διεπιφάνειες

Η επιλογή ενός υλικού για μια συγκεκριμένη ιατρική εφαρμογή – καθετήρα, αγγειακό νάρθηκα (stent), ολική αρθροπλαστική μηριαίου ή ιστογένεση- εξαρτάται κυρίως από τις φυσικές και μηχανικές του ιδιότητες, όπως για παράδειγμα το μέτρο ελαστικότητας ή τη δυνατότητα διαμόρφωσης στο επιθυμητό σχήμα. Ωστόσο, υλικά ακόμα και με τις ιδανικότερες φυσικο-μηχανικές ιδιότητες συγκεντρώνουν ελάχιστο πρακτικό ενδιαφέρον, αν δεν είναι και βιοσυμβατά. Αυτό, που καθορίζει, τη βιοσυμβατότητα ενός υλικού είναι η αλληλεπίδραση της επιφάνειας του με το βιολογικό περιβάλλον.

Η αλληλεπίδραση αυτή ξεκινά αμέσως μετά την πρώτη επαφή και εξελίσσεται δυναμικά για όσο χρόνο το υλικό βρίσκεται στο βιολογικό περιβάλλον (Missirlis & Lemm 1991, Ratner et al. 1990). Λίγα νανοδευτερόλεπτα μετά τη στιγμή, όπου το υλικό βρεθεί στο βιολογικό περιβάλλον, μόρια νερού προερχόμενα από το βιολογικό υγρό, για παράδειγμα το αίμα ή το διάμεσο/μεσοκυττάριο υγρό, προσεγγίζουν την επιφάνεια και σχηματίζουν ένα υδάτινο κέλυφος (Roach et al. 2007). Η δομή και η έκταση αυτού του κελύφους ρυθμίζεται από τις ιδιότητες της επιφάνειας, η οποία επίσης καθορίζει το είδος των πρωτεϊνών και των άλλων μορίων, που θα προσροφηθούν στη συνέχεια. Έτσι, στο δεύτερο στάδιο της αλληλεπίδρασης της επιφάνειας με το βιολογικό περιβάλλον, το οποίο διαρκεί από μερικά δευτερόλεπτα έως λίγα λεπτά, η επιφάνεια καλύπτεται από ένα στρώμα προσροφημένων πρωτεϊνών, όμοιων με αυτές που δομούν την εξωκυττάρια ύλη (Midwood et al. 2004). Στο τρίτο στάδιο, κύτταρα αρχίζουν να φτάνουν στην “επιφάνεια”, την οποία όμως, δεν μπορούν να διακρίνουν, καθώς είναι ήδη καλυμμένη από τις πρωτεΐνες (Vitte et al. 2004). Τα κύτταρα δηλαδή, δεν έρχονται σε επαφή με την ίδια την επιφάνεια, αλλά αλληλεπιδρούν με τη μοριακή δομή του προσροφημένου πρωτεϊνικού στρώματος.

Στο στάδιο αυτό, το οποίο κάποιες φορές ξεκινά ακόμα και μερικά λεπτά μετά την εμφύτευση του υλικού στον οργανισμό και διαρκεί για μέρες, τα κύτταρα εξετάζουν το υπόστρωμα μέσω των υποδοχέων, τους οποίους φέρουν στη μεμβράνη τους, και ανιχνεύουν πιθανές συνδέσεις με τις προσροφημένες πρωτεΐνες (Woo et al. 2007). Ο ειδικός δεσμός, ο οποίος σχηματίζεται ανάμεσα σε τέτοιους κυτταρικούς υποδοχείς και τα πρωτεϊνικά επίτοπα, όπως είναι αντίστοιχα οι ιντεγκρίνες και η αλληλουχία των αμινοξέων αργινίνη-γλυκίνη-ασπαρτικό οξύ (RGD) (Lehenkari & Horton 1999), που συναντάται στις πρωτεΐνες ινονεκτίνη (fibronectin) (Erickson et al. 1981, Hyonchol et al. 2002), υαλονεκτίνη (vitronectin) (Morris et al. 1994, Thomas et al. 1997) και σε άλλες, δημιουργεί ένα βιοχημικό σήμα, το οποίο μεταφέρεται μέσω της μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου και ενεργοποιεί συγκεκριμένες διαδικασίες. Οι διαδικασίες αυτές συνθέτουν την τελική απόκριση του κυττάρου, το οποίο είτε θα αναπτύξει ειδικές προεξοχές στη μεμβράνη του, τα λεγόμενα ελασματοπόδια και νηματοπόδια (Curtis et al. 2006), προκειμένου να προσκολληθεί στην επιφάνεια μέσω των εστιακών επαφών και στη συνέχεια να μετακινηθεί, να διαφοροποιηθεί και να παράγει εξωκυττάρια ύλη και ιστό, είτε θα συρρικνωθεί και θα αποκολληθεί από την επιφάνεια συνεχίζοντας τη βιολογική του πορεία (Curtis 2004).

Η λειτουργική ενσωμάτωση του βιοϋλικού στο βιολογικό περιβάλλον κρίνεται σε μεγάλο βαθμό από την προσκόλληση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων στην επιφάνεια του, γεγονός το οποίο επηρεάζεται από παράγοντες, όπως η προσρόφηση των πρωτεϊνών (Sagvolden et al. 1999), οι βιοφυσικές ιδιότητες του περιβάλλοντος, οι μεταβαλλόμενες φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας του υλικού, η έκλυση διαλυτών παραγώγων από το υλικό (Vermette et al. 2002) και η μικρο-δομή του (Karpen et al. 2002, Pianigiani et al. 1999), π.χ. το πορώδες του. Από τους παραπάνω παράγοντες το μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η προσρόφηση των πρωτεϊνών, λόγω του αναπόφευκτου χαρακτήρα της για την πλειονότητα των υλικών ανεξάρτητα από το σημείο της εμφύτευσης και της παρεμβολής, την οποία προκαλεί στην αλληλεπίδραση υλικών-κυττάρων μέσω της συγκάλυψης των ιδιοτήτων της επιφάνειας.

Η προσρόφηση των πρωτεϊνών ανάγεται, συνεπώς, σε καθοριστικό παράγοντα ελέγχου της βιοσυμβατότητας ενός υλικού. Η τελευταία θα μπορούσε να προδιαγραφεί με ασφάλεια, αν γνωρίζαμε την ποσότητα, την πυκνότητα, τη διάταξη και τον προσανατολισμό καθενός από τα διαφορετικά είδη πρωτεϊνών, τα οποία προσροφούνται στην επιφάνεια, αφού θα ήμασταν σε θέση να ελέγξουμε την παρουσία στο προσροφημένο πρωτεϊνικό στρώμα των αναγκαίων κέντρων σύνδεσης με τα κύτταρα. Όσο απλή και αν φαίνεται η ιδέα αυτή, η ποικιλία των πρωτεϊνών, οι οποίες περιέχονται στα βιολογικά υγρά, σε συνδυασμό με τη δομική τους πολυπλοκότητα, καθιστά

την ακριβή πρόβλεψη των αποτελεσμάτων της ρόφησης, τουλάχιστον μέχρι σήμερα, αδύνατη με συνέπεια η αλληλεπίδραση πρωτεϊνών-επιφανειών να παραμένει ένα από τα πιο σημαντικά αντικείμενα μελέτης στον τομέα των βιοϋλικών.

Πέρα όμως από παράγοντας ελέγχου της βιοσυμβατότητας ή της ικανότητας υποστήριξης ιστογένεσης από ένα υλικό, η συμπεριφορά των πρωτεϊνών στη διεπιφάνεια μεταξύ υλικού και βιολογικού περιβάλλοντος είναι κρίσιμη και για το σχεδιασμό συστημάτων ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμάκων. Σε τέτοιες περιπτώσεις συνηθίζεται η αγκίστρωση στην επιφάνεια των νανοσφαιριδίων ή των λιποσωμάτων, τα οποία φέρουν τη φαρμακευτική ουσία, ειδικών πρωτεϊνών, οι οποίες μέσω της επιλεκτικής τους πρόσδεσης σε συγκεκριμένους στόχους, π.χ. αντισώματα ή υποδοχείς εκφραζόμενους αποκλειστικά από καρκινικά κύτταρα, εξασφαλίζουν την απελευθέρωση του φαρμάκου στα επιθυμητά σημεία (Backer et al. 2004). Οι πρωτεΐνες εξάλλου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σχηματισμό ενός οργανικού ικριώματος, το οποίο μεταφέρει και -μέσω της βιολογικής του αποδόμησης- απελευθερώνει ελεγχόμενα το εγκλωβισμένο φάρμακο (Ren et al. 2007). Και στις δύο περιπτώσεις η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών είτε με την ίδια την επιφάνεια των συνθετικών νανομεταφορέων είτε με τις άλλες επιφάνειες, οι οποίες θα εμφανιστούν στη διαδρομή προς το στόχο τους, απαιτεί μελέτη, προκειμένου να διασφαλιστεί η δομική σταθερότητα και η διατήρηση της βιολογικής δραστηριότητας των πρωτεϊνών, έτσι ώστε η βιοκατανομή του φαρμάκου να μπορέσει γίνει τελικά σύμφωνα με τις προδιαγραφές.

Μία άλλη βιοϊατρική εφαρμογή, για την οποία η αλληλεπίδραση πρωτεϊνών-επιφανειών αποτελεί κρίσιμη σχεδιαστική παράμετρο, είναι οι βιο-αισθητήρες. Πρωτεΐνες με τη μορφή ενζύμων, υποδοχέων ή αντισωμάτων ακινητοποιούνται στην επιφάνεια των αισθητήρων (Shafer-Peltier et al. 2003) και το βιοχημικό σήμα από τη σύνδεσή τους με βιολογικούς προσδέτες, οι οποίοι περιέχονται στο μετρούμενο διάλυμα, μετατρέπεται σε ηλεκτρικό ή οπτικό σήμα, το οποίο καταγράφεται για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της σύστασης του εξεταζόμενου διαλύματος. Και ενώ η πρόοδος στην ηλεκτρονική τεχνολογία έχει απλοποιήσει τη μετατροπή και καταγραφή των σημάτων, η μέθοδος πρόσδεσης των πρωτεϊνών στην επιφάνεια των αισθητήρων απαιτεί ιδιαίτερη προσπάθεια καθώς η ικανότητα δέσμευσης των μορίων-στόχων εξαρτάται άμεσα από το προσανατολισμό και τη μοριακή τους διάταξη.

Από την άλλη μεριά, η προσρόφηση των πρωτεϊνών στις επιφάνειες σχετίζεται άμεσα με μία σειρά αρνητικών φαινομένων, από τη μόλυνση των φακών επαφής από τις πρωτεΐνες των δακρύων, τη φθορά της οδοντικής πλάκας ή το σχηματισμό ενός βιοστρώματος στις μονάδες επεξεργασίας τροφίμων μέχρι την αστοχία βιολογικών εμφυτευμάτων. Στην τελευταία περίπτωση, η δυσμενής

απόκριση του οργανισμού εκφράζεται με το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας και θρόμβων, για παράδειγμα σε καθετήρες και stents, ή με το σχηματισμό ενός ινώδους περιβλήματος γύρω από το εμφύτευμα, το οποίο το εμποδίζει να αφομοιωθεί από τον οργανισμό. Λόγοι αστοχίας μπορεί να είναι ο υποβιβασμός των ιδιοτήτων του υλικού ή ακόμα και η αποσύνθεσή του με το χρόνο, αλλά η ουσιαστική αιτία δεν είναι άλλη από τη μη συμβατότητα του υλικού με το βιολογικό περιβάλλον, για το οποίο ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό, όπως αναφέρθηκε ήδη, η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με τις διεπιφάνειες (Bajrai 2005, Quirk et al. 2001).

Ένας έμμεσος τρόπος να αντιληφθούμε τη σημαντικότητα της συμπεριφοράς των πρωτεϊνών στις διεπιφάνειες είναι μέσω της εφαρμογής της υγρής χρωματογραφίας για το διαχωρισμό πρωτεϊνών από ένα διάλυμα. Ιοντικές, υδροφοβικές ή άλλες ειδικές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών με τη σταθερή φάση της στήλης οδηγούν στη συγκράτηση των διαφόρων πολυπεπτιδίων κατά τη ροή τους μέσα από την τελευταία και την απόδοσή τους σε διαφορετικούς χρόνους (Stahlberg et al. 1992). Ο βαθμός απόδοσης της τεχνικής είναι δυνατό να μεγιστοποιηθεί, αν οι φυσικοχημικές ιδιότητες της σταθερής φάσης και του διαλύτη ρυθμιστούν κατάλληλα (Zhang & Sun 2002). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την εξάρτηση της κρίσιμης διαδικασίας της πρωτεϊνικής προσρόφησης από παραμέτρους, οι οποίες σχετίζονται όχι μόνο με την ίδια την πρωτεΐνη αλλά και με το περιβάλλον, στο οποίο βρίσκεται, ή την επιφάνεια, στην οποία προσροφάται.

1.3 Η προσρόφηση των πρωτεϊνών

1.3.1 Παράγοντες ελέγχου της προσρόφησης

Ο έλεγχος της προσρόφησης των πρωτεϊνών στην επιφάνεια των βιοϋλικών, προϋποθέτει την κατανόηση των παραγόντων, οι οποίοι επηρεάζουν την αλληλεπίδραση των βιομορίων αυτών με τις επιφάνειες. Οι κυριότεροι παράγοντες, οι οποίοι ελέγχουν την πολύπλοκη διαδικασία της ρόφησης είναι:

- Οι ιδιότητες των πρωτεϊνικών μορίων, δηλαδή η μοριακή τους διάταξη, η κατανομή του ηλεκτροστατικού φορτίου και ενδομοριακοί δεσμοί.
- Οι χημικές ιδιότητες της επιφάνειας και η τοπογραφία της.
- Τα χαρακτηριστικά του βιολογικού διαλύματος, για παράδειγμα η συγκέντρωση αλάτων και το pH.

Οι πρωτεΐνες σχηματίζονται, ως γνωστόν, από τη σύνδεση μιας σειράς αμινοξέων σε μια αλυσίδα μέσω πεπτιδικών δεσμών. Κάθε ένα από τα 20 γνωστά αμινοξέα έχει σαφώς χαρακτηρισμένες ιδιότητες, ηλεκτροστατικό φορτίο και υδροφοβικότητα, τις οποίες κληροδοτεί στο πρωτεϊνικό μόριο (Ratner et al. 1996). Η αλληλουχία των αμινοξέων στην πολυπεπτιδική αλυσίδα αφορά την πρωτοταγή δομή, ενώ η δευτεροταγής είναι αποτέλεσμα σχηματισμού α-ελίκων, β-πτυχώσεων και βρόχων. Η οργάνωση και συγκράτηση των δευτεροταγών αυτών δομών στον τρισδιάστατο χώρο μέσω δεσμών υδρογόνου ή δισουλφιδικών δεσμών (τριτοταγής δομή) καθορίζει ποια ακριβώς κατάλοιπα θα εκτεθούν στην επιφάνεια της πρωτεΐνης.

Αν και η μοριακή διάταξη διαφέρει από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη, η τάση να κρύβονται τα μη πολικά αμινοξέα στο εσωτερικό του μορίου, μακριά από το υδατικό διάλυμα είναι κυρίαρχη (Ratner et al. 1996). Ακόμα και τότε όμως, η επιφάνεια των πρωτεϊνών παρουσιάζεται αμφίφιλη, με υδρόφιλες και υδρόφοβες ομάδες αμινοξέων, θετικά ή αρνητικά φορτισμένων. Το τι είδους επιφανειακές ομάδες παρουσιάζει μια πρωτεΐνη απέναντι σε μια τεχνητή επιφάνεια (Asthagiri & Lenhoff 1997) και η ισχύς των δεσμών (Weiner et al. 1984), οι οποίοι συγκρατούν τις δευτεροταγείς δομές, θα προσδιορίσουν τελικά τη συμπεριφορά του βιομορίου στη διεπιφάνεια (Lee & Park 1994), αν δηλαδή θα προσεγγίσει ή θα απωθηθεί λόγω ηλεκτροστατικού φορτίου, αν θα ξεδιπλωθεί ή όχι εκθέτοντας τις υδρόφοβες ομάδες του. Δεδομένου όμως, ότι τα στοιχεία από τις κρυσταλλογραφικές αναλύσεις προσφέρουν μόνο μια εκτίμηση της πρωτεϊνικής δομής, και ότι ο προσανατολισμός των πρωτεϊνικών μορίων, καθώς προσεγγίζουν μια επιφάνεια, είναι τυχαίος, η συμπεριφορά αυτή δεν μπορεί να προβλεφθεί παρά μόνο μέσω πολύπλοκων μοριακών προσομοιώσεων (Noinville et al. 1995, Ravichandran et al. 2001).

Η χημεία της επιφανείας παίζει και αυτή κρίσιμο ρόλο στον τρόπο, με τον οποίο οι πρωτεΐνες αντιδρούν με αυτή. Το ηλεκτροστατικό της φορτίο (Pasche et al. 2005), η επιφανειακή της ενέργεια - ειδικότερα η υδροφοβικότητά της (Michael et al. 2003, Siedlecki et al. 1994, Xu & Siedlecki 2007)- και η σύναψη δεσμών μεταξύ των χημικών ομάδων της με τις ομάδες της πρωτεΐνης (Patel et al. 1997, Ta & McDermott 2000) καθορίζουν τη διάταξη των προσροφημένων μορίων, το ρυθμό προσρόφησης καθώς και την τελική επιφανειακή συγκέντρωση. Τροποποίηση των επιφανειακών χημικών ιδιοτήτων συνηθίζεται να γίνεται μέσω αυτό-οργανωνόμενων μονομοριακών στρωμάτων (Capadona et al. 2003, Faucheux et al. 2004, Prime & Whitesides 1991) ή επεξεργασιών πλάσματος (Favia et al. 2001, Ko & Cooper 1993), χωρίς να αποκλείονται και άλλες χημικές επεξεργασίες, οι οποίες στοχεύουν στη ρύθμιση των ηλεκτροστατικών ή των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, οι οποίες ελέγχουν τη ρόφηση των πρωτεϊνών.

Από την άλλη μεριά η τοπογραφία και η τραχύτητα της επιφάνειας επιδρούν στην προσρόφηση των πρωτεϊνών και μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της διάταξής τους, αν οι διαστάσεις τους είναι της κλίμακας των πρωτεϊνών (Cacciafesta et al. 2001, Holland & Marchant 2000). Έχει δειχτεί για παράδειγμα, ότι η ενσωμάτωση σε υπόστρωμα πυριτίου νανοσφαιριδίων πολυστυρενίου διαμέτρου 23nm, τα οποία δημιουργούν νανο-προεξοχές, εμποδίζει το σχηματισμό στην επιφάνεια επιμηκών συστοιχιών μορίων κολλαγόνου (Denis et al. 2002). Σχετικός με το ρόλο της τοπογραφίας στην αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με τις επιφάνειες είναι και ο προβληματισμός, για το αν οι επιφανειακές χημικές τροποποιήσεις επιδρούν στη ρόφηση των πρωτεϊνών καθαρά λόγω των χημικών ιδιοτήτων, τις οποίες εισάγουν, ή μέσω της δημιουργίας τοπογραφικών ανωμαλιών, καθώς συνήθως συνοδεύονται από μεταβολές της επιφανειακής τραχύτητας ή της προϋπάρχουσας τοπογραφίας. Κατ' επέκταση διερευνάται κατά πόσο η απόκριση των κυττάρων σε ένα χημικό μοτίβο (chemical pattern) υπαγορεύεται και από τις επαγόμενες τοπογραφικές ιδιομορφίες, όπως τις διαφορές πάχους μεταξύ των προσροφημένων πρωτεϊνικών στρωμάτων και εξετάζεται ποια από τις δύο παραμέτρους, οι χημικές ιδιότητες ή η τοπογραφία, έχει την ισχυρότερη επίδραση (Britland et al. 1996).

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες εντούτοις, τόσο των πρωτεϊνικών μορίων όσο και των επιφανειών δεν είναι μονοσήμαντα ορισμένες, αλλά υπόκεινται στις επιδράσεις του περιβάλλοντος, στο οποίο βρίσκονται. Το φορτίο τους για παράδειγμα, ρυθμίζεται από το βαθμό πρωτονίωσης των χημικών τους ομάδων, ο οποίος εξαρτάται από τη σταθερά διάστασης των ομάδων αυτών αλλά και το pH του διαλύματος, που τις περιβάλλει. Μεταβάλλοντας το pH μεταβάλλεται το συνολικό τους φορτίο και η τιμή μάλιστα, για την οποία αυτό μηδενίζεται, ορίζει το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI) (Ratner et al. 1996). Επιπλέον, η συγκέντρωση των διαφόρων αλάτων στο διάλυμα μεταβάλλει το εύρος των ηλεκτροστατικών δυνάμεων, οι οποίες ασκούνται μεταξύ των φορτισμένων ομάδων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, ρυθμίζοντας τις ενδομοριακές και διαμοριακές αποστάσεις (Frank & Belfort 2003), από τις οποίες εξαρτάται η συρρίκνωση των μορίων και η συσσωμάτωσή τους αντίστοιχα.

1.3.2 Η προσρόφηση σε βήματα

Η πολυπλοκότητα της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών με τις επιφάνειες πηγάζει όχι μόνο από το πλήθος των παραμέτρων, από τις οποίες εξαρτάται, αλλά και από το γεγονός ότι είναι ένα δυναμικό φαινόμενο αποτελούμενο από μία σειρά βημάτων πολύ συχνά μη διακριτών μεταξύ τους.

Αρχικά, τα πρωτεϊνικά μόρια προσεγγίζουν την επιφάνεια με ένα ρυθμό διάχυσης, ο οποίος εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους μέσα στο διάλυμα, το μοριακό τους βάρος (Fang & Szleifer 2001) και την ταχύτητα ροής του βιολογικού υγρού. Όσο περισσότερο πλησιάζουν την επιφάνεια τόσο μεγαλύτερη γίνεται η επίδραση των δυναμικών πεδίων, λόγω των οποίων τα μόρια έρχονται σε επαφή με την επιφάνεια ή απωθούνται από αυτή (Roth & Lenhoff 1993).

Στη δεύτερη φάση οι πρωτεΐνες προσροφούνται στην επιφάνεια με μία αντιστρεπτή διαδικασία σύμφωνα με την αντίδραση (Wnek & Bowlin 2005):

όπου P είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα, S η συγκέντρωση των διαθέσιμων θέσεων για ρόφηση στην επιφάνεια, P·S η συγκέντρωση της αντιστρεπτά ροφημένης πρωτεΐνης στην επιφάνεια και k_f και k_r οι ταχύτητες αντίδρασης για την προσρόφηση και την αποδέσμευση αντίστοιχα. Στην παραπάνω αντίδραση m και n μόρια νερού εμφανίζονται αρχικά ως σύμπλοκα της πρωτεΐνης ενώ r και v ως σύμπλοκα της επιφάνειας, από τα οποία τα n και v δεσμεύονται ανάμεσα στην πρωτεΐνη και την επιφάνεια κατά την προσρόφηση, ενώ τα m και r απελευθερώνονται στο διάλυμα.

Η κατεύθυνση της αντίδρασης, η οποία θα υπερισχύσει, δηλαδή το αν η πρωτεΐνη θα παραμείνει ή όχι στην επιφάνεια, καθορίζεται από τη σταθερά ισορροπίας της αντίδρασης $K=k_f/k_r$ με $k_f=d[P \cdot S]/dt$ και $k_r=d([P] \cdot [S])/dt$. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας κατά την προσρόφηση, η οποία εξαρτάται από τη σταθερά ισορροπίας K και στην κατάσταση ισορροπίας δίνεται από τη σχέση:

$$\Delta G_{ροφ} = -RT \ln \left(\frac{[P \cdot S]}{[P] \cdot [S]} \right)_{ισορ} = -RT \ln(K) \quad (1.2)$$

όπου R είναι η σταθερά των ιδανικών αερίων και T η απόλυτη θερμοκρασία. Όπως θα αναφερθεί και σε επόμενο κεφάλαιο, η έκβαση της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-επιφάνειας είναι συνάρτηση αυτής της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας.

Ανάλογα με την ισχύ της αρχικής προσκόλλησης η πρωτεΐνη μπορεί να παραμείνει προσροφημένη στην επιφάνεια ή να επιστρέψει στο διάλυμα δίνοντας τη θέση της σε πρωτεΐνες άλλου είδους. Η δεύτερη αυτή περίπτωση αφορά το φαινόμενο Vroman (Vroman & Adams 1969), κατά το οποίο πρωτεΐνες υψηλής συγκέντρωσης στο αίμα προσροφούνται πρώτες στις επιφάνειες, αλλά λόγω της ασθενούς προσκόλλησης τους αντικαθίστανται στη συνέχεια από άλλες, όπως

συμβαίνει για παράδειγμα με το ινωδογόνο, το οποίο αντικαθίσταται από το κινινογόνο και τον παράγοντα XII, αλλά και με άλλες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων της αλβουμίνης, της ανοσοσφαιρίνης και της ινονεκτίνης (Wnek & Bowlin 2005).

Στο επόμενο στάδιο εκείνες οι πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν παραμείνει στην επιφάνεια αναμορφώνουν τη μοριακή τους διάταξη προσπαθώντας να αυξήσουν το εμβαδό επαφής με το υπόστρωμα (Agnihotri & Siedlecki 2004) για να ελαχιστοποιήσουν την ενέργεια αλληλεπίδρασης με αυτό (Wertz & Santore 2002). Οι αναδιατάξεις αυτές συνήθως συνοδεύονται από ξεδίπλωμα των εσωτερικών δομών των πρωτεϊνών και έκθεση προς την επιφάνεια των υδρόφοβων αμινοξέων τους. Εξαιτίας αυτού δημιουργείται η εντύπωση ότι οι υδρόφοβες επιφάνειες προσροφούν μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεϊνών (Ortega-Vinuesa et al. 1998b). Στην πραγματικότητα όμως, η ποσότητα των προσροφημένων πρωτεϊνών εξαρτάται και από την αρχική συγκέντρωση στο διάλυμα, γιατί αν η πρωτεΐνη προσροφάται από ένα αραιό διάλυμα, η ταχύτητα προσρόφησης θα είναι μικρή και η μεταφορά μάζας στην επιφάνεια πιο αργή σε σχέση με τις μοριακές αναδιατάξεις και το ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών, με συνέπεια η επιφάνεια να καλύπτεται με μικρότερο αριθμό μορίων από ότι μια λιγότερο υδρόφοβη (Wnek & Bowlin 2005).

Έχει αποδειχθεί πειραματικά, ότι στην τελευταία φάση της προσρόφησης και ενώ η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στην επιφάνεια προσεγγίζει το όριο της πλήρους κάλυψης, τα μόρια αλλάζουν σταδιακά τη διεύθυνσή τους από πλευρική σε κατακόρυφη, προκειμένου να δημιουργηθεί χώρος για τη δέσμευση και άλλων πρωτεϊνών (Minton 1999).

Γίνεται φανερό έτσι, ότι η τελική διάταξη, ο προσανατολισμός και η στοίχιση των πρωτεϊνικών μορίων στο προσροφημένο στρώμα δεν εξαρτάται απλώς από τις ιδιότητες των βιομορίων, της επιφάνειας και του διαλύματος αλλά και από τους περιορισμούς, τους οποίους θέτουν η ανταγωνιστικότητα πρωτεϊνών ή επιφανειών, η συσχέτιση της κινητικής των φαινομένων μεταφοράς μάζας και μοριακής αναδιάταξης και οι πλευρικές αλληλεπιδράσεις των μορίων στη διεπιφάνεια (Fang & Szleifer 2001).

1.4 Η πρωτεΐνη ινωδογόνο

Από τις εκατοντάδες χιλιάδες πρωτεΐνες, οι οποίες συνθέτουν και περιέχονται σε ένα οργανισμό, κάποιες συγκεντρώνουν το ιδιαίτερο ενδιαφέρον των ερευνητών λόγω της κρισιμότητας της αλληλεπίδρασής τους με τεχνητές επιφάνειες. Αυτές είναι κυρίως οι πρωτεΐνες της εξωκυττάριας

ύλης και του πλάσματος του αίματος, με προεξέχουσα στην τελευταία ομάδα την πρωτεΐνη ινωδογόνο.

Το ινωδογόνο είναι μια σχετικά μεγάλη γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 340.000, η οποία συντίθεται από τα ηπατικά κύτταρα και κυκλοφορεί διαλυμένη στο πλάσμα του αίματος του ανθρώπου αλλά και όλων των υπόλοιπων σπονδυλωτών ζώων σε συγκέντρωση μεταξύ 2.6 – 3.0 g/l (Agnihotri & Siedlecki 2004). Κατέχει κεντρικό ρόλο στη διαδικασία σχηματισμού των θρόμβων και στην επούλωση πληγών μέσω της μετατροπής του σε ινώδες μετά την καταλύομενη από τη θρομβίνη απόσχιση συγκεκριμένων πεπτιδίων από την αλυσίδα του. Κλινικές μελέτες εξάλλου, δείχνουν μεγάλη θετική συσχέτιση μεταξύ εγκεφαλικών επεισοδίων και υψηλής συγκέντρωσης ινωδογόνου στο αίμα.

1.4.1 Μοριακή δομή

Το μοντέλο της μοριακής δομής του ινωδογόνου έχει βασιστεί σε κρυσταλλογραφικές αναλύσεις (Doolittle 1992, Yang et al. 2000) καθώς και σε εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (Verklich et al. 1993). Περιγράφεται ως ένα επίμηκες μόριο μήκους 47-50nm, το οποίο αποτελείται από τρία σφαιρίδια (Σχήμα 1.1). Τα δύο ομόλογα ακραία (τομείς D), με διάμετρο 6.5 nm, συνδέονται με το μικρότερο κεντρικό (τομέας E), διαμέτρου 5nm, μέσω δύο ζευγών τριών περιελισσόμενων αλυσίδων, οι οποίες ονομάζονται Αα, Ββ και γ (Sit & Marchant 1999).

Σχήμα 1.1. Μοντέλο μοριακής δομής ινωδογόνου και τα μήκη των επιμέρους τομέων του. (I) Κεντρικός τομέας E. (II) Ακραίοι τομείς D. (III) Καρβοξυτελικά άκρα Αα αλυσίδων (αC στελέχη). (IV) Περιελισσόμενες αλυσίδες ΑΑ, ΒΒ και γ. Προσαρμογή εικόνας από (Cacciafesta et al. 2000).

Το κεντρικό σφαιρίδιο είναι ένα διμερές. Κάθε ένα από τα διμερή περιλαμβάνει τα τρία αμινοτελικά άκρα των περιελισσόμενων αλυσίδων. Ειδικά τα αμινοτελικά άκρα των Αα και Ββ αλυσίδων αποτελούν τις πεπτιδικές αλληλουχίες, οι οποίες ονομάζονται ινωδοπεπτίδια Α και Β

αντίστοιχα. Τα δύο διμερή του κεντρικού τομέα E συγκρατούνται μέσω τριών δισουλφιδικών δεσμών, ενώ άλλοι οκτώ τέτοιοι δεσμοί εντοπίζονται μεταξύ των Αα και Ββ αλυσίδων καθώς και στις συνδέσεις του τομέα E με τις περιελισσόμενες αλυσίδες. Για την περιέλιξη των Αα, Ββ και γ αλυσίδων, οι οποίες έχουν δομή α-ελίκων, και τη συγκράτησή τους στους ακραίους τομείς D ευθύνονται άλλοι έξι δισουλφιδικοί δεσμοί, οι οποίοι σχηματίζουν δαχτυλίδια.

Καθένας από τους ακραίους τομείς D συντίθεται από τα καρβοξυτελικά άκρα των Ββ και γ αλυσίδων, τα οποία συνθέτουν δύο ομόλογους λοβούς (Doolittle 1992). Τα καρβοξυτελικά άκρα των Αα αλυσίδων (αC στελέχη), τα οποία έχουν ένα συνολικό φορτίο +2 και περιλαμβάνουν τόσο υδρόφοβα όσο και υδρόφιλα αμινοξέα (Ta et al. 1998), εκτείνονται πέρα από τα σφαιρίδια D και αναδιπλώνονται σχηματίζοντας δύο ακόμα σφαιρικούς τομείς εφαιπτόμενους στον κεντρικό τομέα E (Verklich et al. 1993).

1.4.2 Η φυσιολογία του ινωδογόνου και ο σχηματισμός του ινώδους

Η κύρια λειτουργία του ινωδογόνου σχετίζεται με την αιμόσταση των αιμοφόρων αγγείων καθώς δρα ως πρόδρομο μόριο του ινώδους. Ο σχηματισμός του αδιάλυτου ινώδους είναι το τελικό αποτέλεσμα του μηχανισμού πήξης του αίματος, στο τελευταίο στάδιο του οποίου η ενεργοποιημένη θρομβίνη αποσχίζει τα ινωδοπεπτίδια Α και Β από τα αμινοτελικά άκρα των Αα και Ββ αλυσίδων του ινωδογόνου. Η αποκόλληση του ινωδοπεπτιδίου Α αποκαλύπτει στο αμινοτελικό άκρο της Αα αλυσίδας μία θέση πολυμερισμού, αποτελούμενη από την αλληλουχία των αμινοξέων γλυκίνη-προλίνη-αργινίνη, η οποία αντιδρά με μια αντίστοιχη υποδοχή στο λοβό της γ αλυσίδας στον τομέα D, ενώ η απομάκρυνση του ινωδοπεπτιδίου Β εκθέτει το αμινοτελικό άκρο της Ββ αλυσίδας (αλληλουχία γλυκίνη-ιστιδίνη-αργινίνη), το οποίο αντιδρά με μία συμπληρωματική θέση στο λοβό της Ββ αλυσίδας στον τομέα D (Fuss et al. 2001).

Οι αρχικές αυτές αντιδράσεις οδηγούν στο σχηματισμό των πρώτων ολιγομερών ινώδους, το οποίο συνεχίζει να μεγαλώνει καθώς προστίθενται μονομερή ινώδους. Το δίκτυο των ινών του ινώδους σταθεροποιείται με τη βοήθεια του παράγοντα XIIIa, ή αλλιώς τρανσγλουταμινάση, ο οποίος προκύπτει από την ενεργοποίηση του παράγοντα XIII από τη θρομβίνη και σχηματίζει διασταυρούμενους δεσμούς μεταξύ δύο γ αλυσίδων ή μίας γ και μίας Αα αλυσίδας (Laurens et al. 2006). Το σταθεροποιημένο πλέον δίκτυο του ινώδους μπορεί να δεσμεύσει αιμοπετάλια μέσω σχηματισμού δεσμών ανάμεσα σε ειδικά επίτοπα των Αα και γ αλυσίδων και τον $\alpha_{IIb}\beta_3$ υποδοχέα των αιμοπεταλίων (Lee & Marchant 2001, Litvinov et al. 2004). Αυτά στη συνέχεια θα εκκρίνουν

αυξητικούς παράγοντες προκαλώντας την παραγωγή κολαγόνου, γλυκοζαμινογλυκάνων και πρωτεογλυκάνων από τους ινοβλάστες.

Παράλληλα στο ινώδες ενσωματώνονται και άλλες συνδετικές πρωτεΐνες του πλάσματος, όπως η ινονεκτίνη και η υαλονεκτίνη, χάρη στις οποίες αυξάνεται η ελαστικότητά του. Η ινονεκτίνη συνδέεται στο ινώδες μέσω των αC στελεχών, τα οποία αν και υπάρχουν και στο ινωδογόνο, αποκτούν ευκινησία μόνο στο ινώδες. Η ινονεκτίνη και η υαλονεκτίνη δρουν ως μόρια-γέφυρες ανάμεσα στο ινώδες και κύτταρα, όπως είναι οι ινοβλάστες ή τα μαλακά μυϊκά κύτταρα, καθώς έχουν την ικανότητα να συνδέονται μέσω της αλληλουχίας RGD στους κυτταρικούς υποδοχείς $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$. Η Αα αλυσίδα του ινωδογόνου περιέχει και αυτή δύο αλληλουχίες αμινοξέων RGD, αλλά μόνο η μία, αυτή που βρίσκεται στο αC στέλεχος φαίνεται να μπορεί να συνδεθεί στην $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνη των ενδοθηλίων (Laurens et al. 2006).

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν η λειτουργία του ινώδους δεν περιορίζεται στη μείωση της απώλειας αίματος, αλλά δημιουργεί και την αναγκαία εξωκυττάρια ύλη για να ξεκινήσει η αποκατάσταση του ιστού και η αγγειογένεση στο σημείο της πληγής. Η δομή του ινώδους περιγράφεται από χαρακτηριστικά, όπως το πάχος των ινών, το πλήθος των σημείων σύνδεσής τους, το πορώδες και η διαπερατότητα, και εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους. Οι πιο σημαντικές από αυτές είναι ο ρυθμός μετασχηματισμού του ινωδογόνου, ο οποίος καθορίζεται από τη συγκέντρωση των αλάτων και της θρομβίνης, και ο ρυθμός πολυμερισμού του ινώδους, ο οποίος εξαρτάται από τη συγκέντρωση του παράγοντα XII και το ρυθμό ενεργοποίησής του. Τα ιόντα Cl^- έχουν την ικανότητα να επιδρούν στον πολυμερισμό του ινώδους εμποδίζοντας την ανάπτυξη δύσκαμπτων ινών με μεγάλο πάχος. Η ηπαρίνη ακόμα, επηρεάζει την ευαισθησία του ινώδους στην πλασμίνη, η οποία λειτουργεί αποδομητικά κατά τη διαδικασία της ινόλυσης.

Η ινόλυση έχει σκοπό να περιορίσει το σχηματισμό των θρόμβων διασφαλίζοντας την ομοιόσταση. Η πλασμίνη, η ενεργοποιημένη μορφή του πλασμινογόνου, αποδομεί τόσο το ινωδογόνο όσο και το ινώδες υδρολύοντας αργυνιλικούς και λυσινικούς δεσμούς στις περιελισσόμενες αλυσίδες (Fuss et al. 2001). Το ινώδες βέβαια, λόγω του πολυμερισμού του διαλύεται πιο αργά και δίνει διαφορετικά παράγωγα σε σχέση με το ινωδογόνο.

1.4.3 Μη ειδικές αλληλεπιδράσεις του ινωδογόνου με επιφάνειες

Ο σχηματισμός του ινώδους, η δέσμευση των αιμοπεταλίων και η σύνδεση με άλλα κύτταρα αφορούν τις ειδικές αλληλεπιδράσεις του ινωδογόνου με οργανικούς παράγοντες. Πέρα όμως, από

αυτές το ινωδογόνο μπορεί να αλληλεπιδρά και μη ειδικά με βιολογικές ή τεχνητές επιφάνειες και να δημιουργεί τις προϋποθέσεις για τον επακόλουθο σχηματισμό του ινώδους, προσροφόμενο πάνω τους βιοφυσικά και αλλάζοντας τη μοριακή του διάταξη.

Μη ειδικές αλληλεπιδράσεις του ινωδογόνου με βιολογικές επιφάνειες εμφανίζονται σε παθολογικές καταστάσεις του αγγειακού συστήματος, όπως στις περιπτώσεις διάρρηξης του ενδοθηλίου, οπότε εκτίθενται στο πλάσμα θετικά φορτισμένα και υδρόφοβα, θρομβογεννητικά, βιολογικά στοιχεία, ή σχηματισμού αθηροσκληρωτικής πλάκας, η οποία αποτελείται κυρίως από υδρόφοβα λιπίδια και χοληστερίνη (Sit & Marchant 1999). Αντίθετα, οι έντονα υδρόφιλοι και αρνητικά φορτισμένοι γλυκοκάλυκες της κυτταρικής μεμβράνης απωθούν το ινωδογόνο μετά από μια τυχαία σύγκρουση. Αυτού του είδους οι αλληλεπιδράσεις προϊδεάζουν και για τη συμπεριφορά του ινωδογόνου στην επιφάνεια προσθετικών υλικών, τα οποία έρχονται σε επαφή με το πλάσμα του αίματος.

Έτσι, υδρόφιλες και αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες αναμένονται να προκαλούν μικρότερο ξεδίπλωμα της μοριακής δομής του ινωδογόνου σε σχέση με τις υδρόφοβες και θετικά φορτισμένες (Agnihotri & Siedlecki 2004, Sit & Marchant 1999, Ta et al. 1998), αλλά αυτό δεν συνεπάγεται άμεσα τη θρομβογεννητική ικανότητα των τελευταίων. Ενώ για παράδειγμα, έχει δειχθεί η θετική συσχέτιση μεταξύ του βαθμού προσρόφησης/συγκράτησης του ινωδογόνου σε μία επιφάνεια και του συντελεστή επιφανειακής ενέργειας αυτής (ειδικά του παράγοντα διάχυσης γ^d) (Perez-Luna et al. 1994), άλλα πειράματα αποδεικνύουν τη θρομβογεννητική ικανότητα του καολίνη και του γυαλιού, παρά το αρνητικό τους φορτίο (Sit & Marchant 2001).

Η τροποποίηση υλικών με φθόριο (Massa et al. 2005), μεθακρυλικό οξύ (PMMA) (Bajrai & Mishra 2008) ή φαινυλικούς δακτυλίου (πολυστυρένιο) έχει αποδειχτεί ότι βελτιώνει τη συμβατότητά τους ως προς το ινωδογόνο. Εντούτοις, μακροχρόνια και συνήθως ατελέσφορα πειράματα πάνω σε νέα υλικά θα μπορούσαν να αποφευχθούν, αν γνωρίζαμε με ακρίβεια τους μηχανισμούς, μέσω των οποίων η μη ειδική αλληλεπίδραση ινωδογόνου-επιφάνειας συμβάλλει στο σχηματισμό θρόμβων. Η απόκτηση βέβαια της σχετικής γνώσης απαιτεί περαιτέρω έρευνα, στη διάθεση της οποίας υπάρχουν πλέον αρκετές τεχνικές, που θα παρουσιαστούν στη συνέχεια.

1.5 Τεχνικές μελέτης αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-επιφάνειας

1.5.1 Τεχνικές μελέτης των πρωτεϊνών στις επιφάνειες

Σε αρχικό επίπεδο η πειραματική διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών με τις επιφάνειες των βιοϋλικών εστιάζεται στην ποσότητα και το είδος των μορίων, τα οποία προσροφούνται στην επιφάνεια. Μία από τις πιο άμεσες μεθόδους ποσοτικοποίησης της προσρόφησης των πρωτεϊνών και παρακολούθησης της κινητικής του αντίστοιχου φαινομένου είναι η καταγραφή της ισόθερμης καμπύλης μεταβολής της μάζας στην επιφάνεια.

Αυτό μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους λιγότερο ή περισσότερο τεχνικά προηγμένους, όπως είναι η ελλειψομετρία ή ο μικροζυγός κρυστάλλου χαλαζία (QCM), για τα οποία θα γίνει αναφορά στη συνέχεια, αλλά ο απλούστερος είναι με **σήμανση των πρωτεϊνών με ραδιοϊσότοπα** (Balcells et al. 1999, Lee et al. 2004) ή **φθορίζοντες δείκτες** (Model & Healy 2000). Και οι δύο αυτές τεχνικές στηρίζονται στην ποσοτικοποίηση ενός σήματος, ραδιενέργειας ή φθορισμού, το οποίο εκπέμπεται από τις προσροφημένες πρωτεΐνες, που έχουν σημειωθεί. Είναι μάλιστα δυνατό, να προσδιοριστεί ο προσανατολισμός των πρωτεϊνών στην επιφάνεια μέσω της προσάρτησης των δεικτών σε συγκεκριμένες ομάδες της πρωτεΐνης και της παρακολούθησης της ενδεχόμενης μεταβολής του φθορισμού λόγω των αλλαγών στην τοπική πολικότητα κατά το ξεδίπλωμα πάνω στην επιφάνεια. Επιπλέον, ο χρόνος φθορισμού και οι συγκρίσεις ανισότροπων φασμάτων μπορούν να συμβάλλουν στον προσδιορισμό της δυναμικής των μορίων, όπως για παράδειγμα τον εγκλωβισμό των φθορίζοντων δεικτών ανάμεσα στην επιφάνεια και την πρωτεΐνη (Hammarstrom et al. 2001, Karlsson et al. 2003).

Μια άλλη τεχνική για τον υπολογισμό της μάζας των προσροφημένων πρωτεϊνών σε μία επιφάνεια είναι η σύγκριση της αρχικής με την τελική συγκέντρωση του υπερκείμενου διαλύματος. Αυτό μπορεί να γίνει με **χρωματομετρικές αναλύσεις**, για παράδειγμα την ανάλυση Bradford ή την ανάλυση Lowry (Lowry et al. 1951), ή απλά μετρώντας την απορρόφηση φωτός από αρωματικά αμινοξέα, όπως είναι η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη, στα 280nm (Stoscheck 1990). Οι προαναφερθείσες τεχνικές όμως, παρουσιάζουν το μειονέκτημα ότι παρακολουθούν την προσρόφηση στη μικροκλίμακα και πιθανότατα αποκρύπτουν παραμέτρους της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-επιφάνειας στο μοριακό επίπεδο. Το ίδιο μειονέκτημα παρουσιάζει και η μέτρηση των αλλαγών της θερμοδυναμικής κατάστασης των πρωτεϊνών στις διεπιφάνειες με τη **Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης** (Differential Scanning Calorimetry) ή η ποσοτικοποίηση της προσρόφησης

με τη **Φασματοσκοπία Ηλεκτροχημικής Αντίστασης** (Electrochemical Impedance Spectroscopy). Η πρώτη συγκρίνει την απορροφούμενη ή εκλυόμενη θερμότητα κατά τη θέρμανση ενός δείγματος πρωτεΐνης προσροφημένης σε μία επιφάνεια, με τη θερμότητα αποδιάταξης της ίδιας πρωτεΐνης σε διάλυμα και αν αυτές οι δύο διαφέρουν, τότε συμπεραίνεται το ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης ως αποτέλεσμα της προσρόφησης (Welzel 2002), ενώ η δεύτερη μετρά τις ηλεκτροχημικές ιδιότητες επιφανειακά τροποποιημένων με πρωτεΐνη ηλεκτροδίων (Chen et al. 2005).

Στις περιπτώσεις όμως, όπου επιθυμείται ο σχεδιασμός επιφανειών με αυστηρά προδιαγεγραμμένη συμπεριφορά ως προς τη ρόφηση των πρωτεϊνών, χρειάζεται να διερευνηθούν εν εξελίξει και με περισσότερες λεπτομέρειες οι μοριακοί μηχανισμοί της προσρόφησης και το πώς αυτοί επηρεάζουν τον προσανατολισμό, τη διάταξη και τη βιολογική δράση των προσροφημένων πρωτεϊνών. Η χρήση του φθορισμού εξελίχθηκε προς αυτή την κατεύθυνση με την εφαρμογή του **Φθορισμού Ολικής Ανάκλασης** (Total Internal Reflection Fluorescence, TIRF). Ο Φθορισμός Ολικής Ανάκλασης εκμεταλλεύεται τα αποσβενόμενα κύματα, τα οποία δημιουργούνται κατά την ολική ανάκλαση προσπιπτόντων κυμάτων στη διεπιφάνεια υγρού-υποστρώματος, για τη διέγερση φθοροφόρων αποκλειστικά μέχρι μια απόσταση 100nm από την επιφάνεια. Έτσι είναι εφικτό, να παρακολουθηθεί in-situ η προσρόφηση των πρωτεϊνών σε μία επιφάνεια (Sanders & Jennissen 1996) ή ακόμα και να παρατηρηθούν αναδιατάξεις των μορίων στη διεπιφάνεια με το χρόνο (Daly et al. 2003).

Περισσότερες πληροφορίες για τη μοριακή οργάνωση των πρωτεϊνών στις διεπιφάνειες μπορούν να εξαχθούν με τη βοήθεια της **Φασματοσκοπίας Υπερύθρων Ακτίνων με Μετασχηματισμό Fourier** (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR). Τα φάσματα, που λαμβάνονται με αυτή την τεχνική από δείγματα στα οποία έχουν προσροφηθεί πρωτεΐνες, παρουσιάζουν ένα χαρακτηριστικό σήμα στη ζώνη μεταξύ $1600-1700\text{cm}^{-1}$ (ζώνη αμιδίου I), το οποίο αν αποσυνελιχθεί αποκαλύπτει την αναλογία α -ελίκων, β -πτυχώσεων, βρόχων και τυχαίων σπειρών στα πρωτεϊνικά μόρια (Tunc et al. 2005). Αν μάλιστα συγκριθούν φάσματα, τα οποία έχουν ληφθεί πριν και μετά την προσρόφηση, είναι δυνατό να εξαχθούν συμπεράσματα για τις αναδιατάξεις, που υφίστανται οι πρωτεΐνες στη δομή τους ως συνέπεια της αλληλεπίδρασης με την επιφάνεια. Επιπλέον, αν η επιφάνεια του δείγματος διαιρεθεί σε στοιχειώδεις ψηφίδες, καταγράφουν φάσματα για κάθε μία από αυτές και οριστεί μια τιμή κατωφλίου για τη ζώνη του αμιδίου I, υποδηλωτική της παρουσίας προσροφημένων πρωτεϊνών, μπορεί να προκύψει μια ψηφιακή απεικόνιση της επιφάνειας με τις περιοχές της ρόφησης (Steiner et al. 2007). Φάσματα εξάλλου, τα οποία έχουν ληφθεί με Γραμμικό ή Κυκλικό Διχροϊσμό (Linear/Circular Dichroism), δηλαδή με

παράλληλα και κάθετα πολωμένο φως, μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τον προσανατολισμό των πρωτεϊνικών δομών στη διεπιφάνεια (Chittur 1998).

Η **Φασματοσκοπία Ακτίνων Χ** (X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS ή αλλιώς ESCA) από την άλλη μεριά, βασίζεται στην ανίχνευση των στοιχείων και της σχετικής τους θέσης/σύνδεσης σε χημικές ενώσεις μέσω καταγραφής της ενέργειας αποδέσμευσης των ηλεκτρονίων, τα οποία εκπέμπονται από το δείγμα ύστερα από ακτινοβολία του με ακτίνες Χ. Το γεγονός ότι οι διακριτικές της δυνατότητες περιορίζονται σε βάθος μόλις λίγων νανομέτρων από την επιφάνεια, την καθιστούν μια ιδανική τεχνική για τη μελέτη βιομορίων στις διεπιφάνειες αλλά και για το χαρακτηρισμό των επιφανειών των βιοϋλικών ύστερα από χημικές τροποποιήσεις. Το στοιχείο, το οποίο υποδηλώνει την παρουσία πρωτεϊνών στην επιφάνεια, είναι συνήθως το άζωτο, αλλά δεν αποκλείεται και η χρήση κάποιων ιχνοστοιχείων, όπως είναι ο σίδηρος, ο φώσφορος ή το θείο, όταν η συγκέντρωσή τους στην επιφάνεια ξεπερνά το όριο ανίχνευσης της τεχνικής (McArthur 2006). Η ευαισθησία της φασματοσκοπίας XPS φτάνει στο επίπεδο των νανογραμμαρίων, όπως αποδεικνύεται από την ανίχνευση -βάσει αζώτου και αναλογίας ατόμων N/Al- προσροφημένου ινωδογόνου στην επιφάνεια μίκας σε συγκέντρωση 10 ng/cm^2 (Wagner et al. 2002). Παρόλα αυτά, η Φασματοσκοπία ακτίνων Χ αδυνατεί να διακρίνει άμεσα το είδος των πρωτεϊνών, οι οποίες προσροφούνται σε μία επιφάνεια από ένα μίγμα, ενώ οι συνθήκες υψηλού κενού, στις οποίες λειτουργεί, αλλοιώνουν τη μοριακή διαμόρφωση των πρωτεϊνών. Συνεπώς, αν απαιτείται η διατήρηση της φυσικής διαμόρφωσης, τα δείγματα πρέπει να υποβληθούν σε μια διαδικασία λυοφιλοποίησης (freeze-drying) πριν την εισαγωγή τους στο θάλαμο μετρήσεων.

Ανάγκη λυοφιλοποίησης των βιολογικών δειγμάτων υφίσταται και για τη **Φασματοσκοπία Μάζας Δευτερογενών Ιόντων ως προς το Χρόνο Πτήσης** (Time of Flight- Secondary Ions Mass Spectroscopy,ToF-SIMS), μιας και τα ιόντα, τα οποία απελευθερώνονται από το δείγμα ύστερα από το βομβαρδισμό του με πρωτογενή ιόντα, πρέπει να επιταχυνθούν ηλεκτροστατικά σε κενό. Τα στοιχεία στην επιφάνεια του δείγματος ταυτοποιούνται με αναγωγή του χρόνου πτήσης σε μάζα μετά από μέτρηση του χρόνου άφιξης των ιόντων στον ανιχνευτή, καθώς η ταχύτητα πτήσης είναι ανάλογη του λόγου μάζας/φορτίο. Τα φάσματα, που καταγράφονται με αυτή την τεχνική, παρουσιάζουν ένα πλήθος κορυφών, οι οποίες με κατάλληλη επεξεργασία μπορούν να ομαδοποιηθούν και να χαρακτηριστούν ως ίχνη συγκεκριμένων αμινοξέων (Canavan et al. 2007). Στη συνέχεια, με τη βοήθεια της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA) (Vanden Eynde & Bertrand 1997), τα προσροφημένα μόρια μπορούν να αναγνωριστούν και σε ένα επόμενο στάδιο να συγκριθεί η σύνθεση του επιφανειακού στρώματος για διαφορετικά

δείγματα. Καθώς το βάθος ανίχνευσης της περιορίζεται στα 10-20 Å, δηλαδή είναι αρκετά μικρότερο από τις διαστάσεις των περισσότερων πρωτεϊνών, η Φασματοσκοπία ToF-SIMS προσφέρεται για τη διερεύνηση της διαμόρφωσης και του προσανατολισμού των πρωτεϊνικών μορίων στην επιφάνεια (Wagner & Castner 2004). Αξίζει να σημειωθεί ότι στις περιπτώσεις, στις οποίες επιθυμείται αποφυγή εκτεταμένου κατακερματισμού των πρωτεϊνών, εναλλακτικά της ToF-SIMS χρησιμοποιείται η **Φασματοσκοπία Εκρόφησης/Ιονισμού Λέιζερ με τη βοήθεια Μήτρας** (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) (Siuzdak 1994). Η τεχνική αυτή προστατεύει τα βιολογικά δείγματα από την αποδόμηση, την οποία προκαλεί η υψηλή ενέργεια της δέσμης των πρωτογενών ιόντων, με ενσωμάτωση τους σε ένα υλικό. Το υλικό/μήτρα απορροφά την ενέργεια από τη δέσμη λέιζερ και μεταδίδει μόνο ένα μέρος του φορτίου της στα βιομόρια, τα οποία ιονίζονται.

Άλλη μία τεχνική φασματοσκοπίας, η οποία εφαρμόζεται για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και επιφανειών, είναι η **Φασματοσκοπία Ραμάν με Ενίσχυση Επιφάνειας** (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS). Ονομάζεται έτσι, εξαιτίας της ενίσχυσης, την οποία υφίσταται το σήμα σκέδασης Ραμάν του δείγματος, όταν αυτό βρίσκεται πάνω σε υπόστρωμα ευγενούς μετάλλου, λόγω μεταβολών της κατάστασης των ηλεκτρονίων των χημικά ροφημένων μορίων (Doering & Nie 2002) ή διέγερσης των ταλαντώσεων τους από τα ισχυρά ηλεκτρομαγνητικά πεδία στη διεπιφάνεια (Haynes et al. 2005). Η φασματοσκοπία SERS έχει εφαρμοστεί για παράδειγμα, στην προτυποποίηση ενός βιοαισθητήρα γλυκόζης, ο οποίος μετρά απευθείας τη συγκέντρωση του μονοσακχαρίτη, που προσροφάται από το διάλυμα στην επιφάνεια χημικά τροποποιημένων νανοσφαιριδίων καλυμμένων με άργυρο (Shafer-Peltier et al. 2003). Με την ίδια τεχνική έχουν αναλυθεί οι μοριακές ταλαντώσεις μεμονωμένων μορίων αιμοσφαιρίνης μέσω πρόσδεσής τους σε νανοσφαιρίδια αργύρου (Xu et al. 1999).

Η **Φασματοσκοπία Οπτικού Κυματοδηγού** (Optical Waveguide Light Spectroscopy, OWLS) είναι μια σχετικά νέα τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της προσρόφησης των πρωτεϊνών in-situ (Ramsden 1993). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της καταγραφής των μεταβολών, οι οποίες προκαλούνται, στη διάδοση μίας δέσμης λέιζερ μέσα στον κυματοδηγό λόγω της δέσμευσης των μορίων στην επιφάνεια του. Η επιφάνεια του κυματοδηγού είναι δυνατό να τροποποιηθεί, για παράδειγμα με εναπόθεση οξειδίου του τιτανίου (TiO₂) (Kurrat et al. 1997), και συνεπώς η τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί για την εκτίμηση της συμπεριφοράς βιοϋλικών σε βιολογικό περιβάλλον (Ball & Ramsden 2000).

Πέρα από τις τεχνικές φασματοσκοπίας υπάρχουν και άλλες τεχνικές, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των βιολογικών διεπιφανειών με πιο γνωστή την **Ελλειψομετρία**. Η σχετική βιβλιογραφία είναι εκτενής, καθώς η Ελλειψομετρία έχει καθιερωθεί ως τεχνική τόσο για τον έλεγχο επιφανειακών χημικών τροποποιήσεων σε επίπεδο νανομέτρων (Ducharme et al. 2001) όσο και για την ποσοτικοποίηση της προσρόφησης βιομορίων (Elwing 1998). Η λειτουργία της βασίζεται στη μέτρηση της μεταβολής της πόλωσης μιας δέσμης φωτός κατά την ανάκλασή της από την επιφάνεια και τη συσχέτιση της μεταβολής αυτής με το πάχος και το δείκτη διάθλασης του δείγματος. Με αφετηρία αυτή τη βασική αρχή έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές Ελλειψομετρίας, όπως η Ελλειψομετρία Ρύθμισης Φάσης και η Φασματοσκοπική Ελλειψομετρία (Arwin 1998). Η τελευταία προτιμάται για τη μέτρηση πολύστρωτων δειγμάτων εξαιτίας της αυξημένης διακριτικής της ικανότητας και για αυτό το λόγο έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα στη μελέτη της προσρόφησης πρωτεϊνών πάνω σε τροποποιημένες επιφάνειες (Lousinian & Logothetidis 2007).

Ευρύτατα χρησιμοποιούμενη τεχνική για τη μελέτη της προσρόφησης των πρωτεϊνών είναι και ο **Μικροζυγός Κρυστάλλου Χαλαζία** (Quartz Crystal Microbalance, QCM), ο οποίος καταγράφει τη μείωση της συχνότητας συντονισμού ενός κρυστάλλου χαλαζία κατά τη δέσμευση των πρωτεϊνών στην επιφάνειά του και μέσω μιας απλής μαθηματικής σχέσης (εξίσωση Sauerbrey) υπολογίζει τη προσροφημένη μάζα. Αν το προσροφημένο στρώμα είναι μαλακό ή περιέχει νερό, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των προσροφημένων πρωτεϊνών, καταγράφεται παράλληλα και ένας συντελεστής απόσβεσης, ο οποίος συσχετίζεται με τις ιξωδοελαστικές ιδιότητες του στρώματος (Nguyen & Elimelech 2007, Patel & Frank 2006). Ο Hook και οι συνεργάτες του, για παράδειγμα (Hook et al. 1998), μέτρησαν τη μεταβολή του συντελεστή απόσβεσης παράλληλα με την αύξηση της προσροφούμενης μάζας από διάλυμα αιμοσφαιρίνης σε μία τροποποιημένη με μεθυλομάδες επιφάνεια και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο σχηματισμός ενός συμπαγούς στρώματος πρωτεΐνης ακολουθείται από τη ρόφηση πιο χαλαρά δεσμευόμενων πρωτεϊνικών μορίων.

Μία άλλη τεχνική είναι ο **Συντονισμός Επιφανειακών Πλασμονίων** (Surface Plasmon Resonance, SPR). Βασίζεται στην επίδραση της προσρόφησης των πρωτεϊνών στη διάδοση των επιφανειακών πλασμονίων, δηλαδή των ταλαντώσεων ηλεκτρονικών νεφών, τα οποία δημιουργούνται παράλληλα με τη διεπιφάνεια μετάλλου/διηλεκτρικού. Το φαινόμενο αυτό μεταφράζεται σε μεταβολή της γωνίας, η οποία σχηματίζεται μεταξύ της προσπίπτουσας και της ανακλώμενης δέσμης λέιζερ, όταν ελαχιστοποιείται η εσωτερική ανάκλαση, έτσι ώστε η διαδικασία της προσρόφησης να μπορεί να παρακολουθείται κατά την εξέλιξή της. Ο Green και οι συνεργάτες του (Green et al. 1999), χρησιμοποίησαν την SPR για να μελετήσουν τη συναγωνιστική προσρόφηση

αλβουμίνης, ανοσοσφαιρίνης και ινωδογόνου στην επιφάνεια πολυστυρενίου κατά τη ροή πλάσματος αίματος μέσω σήμανσης των τριών πρωτεϊνών με αντισώματα. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν μείωση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης και της ανοσοσφαιρίνης και παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσης του ινωδογόνου με το χρόνο, επιβεβαιώνοντας το φαινόμενο Vroman.

Οι τεχνικές, οι οποίες αναφέρθηκαν ήδη, παρουσιάζουν το μειονέκτημα ότι δεν μπορούν να συλλέξουν πληροφορίες για την αλληλεπίδραση μεμονωμένων μορίων με τις επιφάνειες, αφού η διακριτική τους ικανότητα δεν ξεπερνά τα 500nm (Πίνακας 1.1), ενώ οι διαστάσεις των περισσότερων πρωτεϊνών είναι αρκετά μικρότερες. Την ανάγκη αυτή καλύπτει το **Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης** (Scanning Electron Microscope, SEM), το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί για τη λήψη εικόνων από προσροφημένα πρωτεϊνικά μόρια (Erickson et al. 1981) και τη μελέτη των δομικών αναδιατάξεων, που υφίστανται ως αποτέλεσμα της επαφής τους με την επιφάνεια (Erickson & Carrell 1983, Verklich et al. 1993). Η λειτουργία του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου βασίζεται στη σάρωση της επιφάνειας του δείγματος από μία δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας και τη σύνθεση της εικόνας της επιφανείας μέσω της ανίχνευσης των ηλεκτρονίων, τα οποία εκπέμπονται από κάθε σημείο του δείγματος. Οι συνθήκες εξέτασης των δειγμάτων με την Ηλεκτρονική Μικροσκοπία ωστόσο, επιβάλλουν περιορισμούς στην εφαρμογή της για τη μελέτη βιομορίων στις διεπιφάνειες, καθώς δεν είναι εφικτή η παρακολούθηση της διαδικασίας της προσρόφησης εν εξελίξει. Στην περίπτωση μάλιστα, όπου δεν χρησιμοποιείται κάποιο Environmental SEM, είναι αναγκαία η επιχρύσωση των δειγμάτων και η εξέτασή τους υπό κενό με πιθανές επιπτώσεις στη φυσική διαμόρφωση των βιομορίων.

Το μειονέκτημα αυτό το ξεπερνά η Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM), με την οποία είναι δυνατό να ληφθεί εικόνα μεμονωμένων πρωτεϊνικών μορίων πάνω σε μία επιφάνεια χωρίς να απαιτείται ιδιαίτερη προετοιμασία του δείγματος, ακόμα και σε συνθήκες οι οποίες προσομοιάζουν τις φυσικές, δηλαδή μέσα σε υγρό. Το γεγονός αυτό την καθιστά ιδανική τεχνική για τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-επιφανειών και δικαιολογεί την ταχεία και ευρεία διάδοσή της. Εκτενής περιγραφή της μικροσκοπίας AFM, των δυνατοτήτων και των τεχνικών λειτουργίας της θα γίνει σε επόμενο κεφάλαιο.

Πίνακας 1.1. Τυπικές τιμές για τη διακριτική ικανότητα, το βάθος ανίχνευσης και την ευαισθησία των τεχνικών μελέτης της προσρόφησης πρωτεϊνών.ⁱ

Τεχνική	Διακριτική ικανότητα	Βάθος ανάλυσης	Ευαισθησία
TIRF		100nm (Daly et al. 2003)	
FTIR	4μm (Steiner et al. 2007)	1-3μm	
XPS	10μm	2-10nm	10ng/cm ² (Wagner et al. 2002)
ToF-SIMS	500nm	1-2 nm (Wagner & Castner 2004)	
SERS	1μm	5μm	
OWLS		50-100nm	1ng/cm ²
Ελλειψομετρία		0.1nm	1-2ng/cm ² (Speijer et al. 2004)
QCM			10ng/cm ²
SPR	200nm	50nm	
SEM	5nm		
AFM	0.1nm	0.1nm	

1.5.2 Τεχνικές μέτρησης δυνάμεων αλληλεπίδρασης

Η Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης εκτός από την εξαιρετική της διακριτική ικανότητα στη λήψη εικόνων από βιολογικά δείγματα έχει αναχθεί σε βασικό εργαλείο μελέτης των βιολογικών φαινομένων στην διεπιφάνεια υλικού-υγρού και για ένα ακόμα λόγο, τη δυνατότητα να μετράει δυνάμεις με ευαισθησία pN. Το χαρακτηριστικό της αυτό αξιοποιείται σε μία πληθώρα εφαρμογών, από τη μέτρηση της δύναμης του δεσμού μεταξύ προσδέματος (ligand) και του αντίστοιχου υποδοχέα (receptor) (Bonanni et al. 2005, Fritz et al. 1998, Li et al. 2003) και την εξακρίβωση των μηχανικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνικών μορίων στην αναδιπλωμένη τους δομή (Dietz et al. 2006) ως τη μέτρηση της δύναμης προσκόλλησης κυττάρων σε επιφάνειες (Sagvolden et al. 1999) και της ελαστικότητας της μεμβράνης τους (Miyazaki & Hayashi 1999).

ⁱ Όπου δεν παρατίθεται βιβλιογραφική αναφορά, πηγή θεωρείται το υποστηρικτικό υλικό του μαθήματος Biomaterial Surfaces: Properties and Characterization, ETH Zürich
http://www.textorgroup.ch/pdf/teachingcourses/onlinescripts/2/bms_2002_small.pdf

Εναλλακτικά της Μικροσκοπίας Ατομικής Δύναμης αλλά με αυξημένο βαθμό πολυπλοκότητας, για τη μέτρηση δυνάμεων μεταξύ μεμονωμένων πρωτεϊνικών μορίων και επιφανειών μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι **Οπτικές Λαβίδες** (Optical Tweezers)(Kellermayer et al. 1998). Οι Οπτικές Λαβίδες ονομάστηκαν έτσι, εξαιτίας της ιδιότητας τους να παγιδεύουν μέσα σε μία ισχυρά εστιασμένη δέσμη λέιζερ νανοσωματίδια, η θέση των οποίων μπορεί να ελέγχεται μέσω ενός ακουστο-οπτικού εκτροπέα (acousto-optic deflector, AOD)(Neuman & Block 2004). Η δύναμη, η οποία εφαρμόζεται στο παγιδευμένο σωματίδιο, αυξάνει γραμμικά με την απόσταση από το κέντρο της δέσμης και επομένως, οι Οπτικές Λαβίδες μπορούν να παραλληλιστούν με γραμμικά ελατήρια. Με την τεχνική αυτή είναι δυνατό να μετρηθεί η δύναμη ξεδιπλώματος μεγάλων βιομορίων, όπως για παράδειγμα της τιτίνης, αν προηγουμένως έχουν προσκολληθεί στην επιφάνεια του νανοσωματιδίου (Tskhovrebova et al. 1997).

Λόγω της ιδιαίτερης σημασίας, που έχει για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-επιφανειών η μέτρηση της δύναμης προσκόλλησης/απόκολλησης, από νωρίς (αρχές δεκαετίας '80) αξιοποιήθηκαν μέθοδοι δανεισμένες από άλλους επιστημονικούς τομείς, όπως η **Συσκευή Μέτρησης Επιφανειακών Δυνάμεων** (Surface Force Apparatus, SFA), η οποία χρησιμοποιήθηκε αρχικά στη φυσική των κolloειδών (Israelachvili 1992). Η Συσκευή Μέτρησης Επιφανειακών Δυνάμεων μετρά τη δύναμη ανάμεσα σε δύο επιφάνειες, οι οποίες συγκρατούνται με τη βοήθεια ελατηρίων και των οποίων η σχετική θέση ελέγχεται από ένα πιεζοηλεκτρικό κρύσταλλο. Η απόσταση ανάμεσα στις δύο επιφάνειες μετράται με μια τεχνική βασισμένη στους κροσσούς συμβολής δέσμης φωτός, ενώ η δύναμη αλληλεπίδρασης υπολογίζεται ύστερα από πολλαπλασιασμό της σταθεράς των ελατηρίων με τη διαφορά της πραγματικής απόστασης από την επιμήκυνση του πιεζοκρυστάλλου. Μία εκτενής ανασκόπηση εφαρμογών της Διάταξης Μέτρησης Επιφανειακών Δυνάμεων για τη μέτρηση δυνάμεων ανάμεσα σε στρώματα προσροφημένων πρωτεϊνών περιέχεται στην αναφορά Claesson et al. 1995.

Στη θέση των συνδεδεμένων με ελατήρια επιφανειών, ο Evans και οι συνεργάτες του (Evans et al. 1995) πρότειναν τη χρήση ενός πεπιεσμένου σωματιδίου, λιποσώματος ή ερυθροκυττάρου, στη μεμβράνη του οποίου προσκολλάται ένα μικροσφαιρίδιο με ακινητοποιημένους βιολογικούς προσδέτες. Το σωματίδιο τίθεται υπό πίεση μέσω αναρρόφησης από μία μικροπιπέττα και η δυσκαμψία της μεμβράνης του, που εξαρτάται από την τάση στην οποία βρίσκεται το σωματίδιο, χρησιμοποιείται για την μετατροπή των ακτινικών παραμορφώσεων σε ασκούμενες δυνάμεις κατά την αποκόλληση του σφαιριδίου από την εξεταζόμενη επιφάνεια. Με αυτή τη μέθοδο μετρήθηκε η

δύναμη προσκόλλησης της κονκαναβαλίνης A (con A) από την επιφάνεια κυττάρων BHK (Baby Hamster Kidney cells).

Οι τεχνικές, οι οποίες αναφέρθηκαν παραπάνω, αφορούν πειράματα δοκιμής-ελέγχου, τα οποία έπονται του σχεδιασμού των βιοϋλικών και πολύ συχνά της εμφάνισης προβλημάτων στις διεπιφάνειες τους. Κλείνοντας όμως, αυτό κεφάλαιο αξίζει να γίνει αναφορά και σε μία άλλη μέθοδο μελέτης της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-επιφανειών, η οποία βασίζεται στην πρόβλεψη, τις **μοριακές προσομοιώσεις**. Η εντυπωσιακή εξέλιξη των δυνατοτήτων των υπολογιστικών μεθόδων σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό της δομής χιλιάδων πρωτεϊνών, οι οποίες συγκεντρώνονται στη βάση δεδομένων της Protein Data Bankⁱⁱ, έχουν δώσει ώθηση στη χρήση των μοριακών προσομοιώσεων για τη πρόβλεψη της συμπεριφοράς των πρωτεϊνών μέσα σε διάλυμα και κοντά σε διεπιφάνειες. Στις προσομοιώσεις αυτές συνυπολογίζονται οι ξεχωριστές αλληλεπιδράσεις καθεμιάς από τις χημικές ομάδες της πρωτεΐνης με την επιφάνεια και η τελική συμπεριφορά του βιομορίου καθορίζεται από τη σύνθεση διαφόρων παραμέτρων, όπως είναι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις, ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου κ.α.

Δεδομένης της σημαντικότητας των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και επιφανειών και του γεγονότος ότι η βιοϊατρική τεχνολογία εξακολουθεί να αναζητά υλικά με όσο το δυνατό πιο ευρεία βιοσυμβατότητα, οι τεχνικές οι οποίες αναφέρθηκαν, θα χρησιμοποιούνται και θα εξελίσσονται στα πλαίσια νέων εφαρμογών, ενώ πιθανόν να εμφανιστούν και νέες μέθοδοι.

Ειδικά για τα πειράματα αυτής της διατριβής, χρησιμοποιήθηκε η Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης με επικουρική συμβολή άλλων τεχνικών, όπως της Φασματοσκοπίας Ακτίνων Χ και της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας.

ⁱⁱ βλ. ιστοσελίδα: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

Κεφάλαιο 2

Μελέτη προσρόφησης ινωδογόνου στην επιφάνεια μίκας

2.1 Εισαγωγή

Αν και η συμπεριφορά των πρωτεϊνών στις διεπιφάνειες φαίνεται εκ πρώτης όψεως να ελέγχεται από ένα πλήθος διαφορετικών και ασυσχέτιστων παραμέτρων, οι οποίες αφορούν την πρωτεΐνη, την επιφάνεια ή το διάλυμα, στο οποίο βρίσκονται οι δύο προηγούμενες (βλ. Κεφ. 1.2.1.), ο ρόλος κάθε παραμέτρου αποκτά νόημα, όταν διερευνηθεί η επίδραση της στις κινητήριες δυνάμεις της προσρόφησης.

Στο πρώτο πειραματικό μέρος αυτής της διατριβής επιλέχθηκε η μελέτη της επίδρασης του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος στην προσρόφηση του ινωδογόνου πάνω σε επιφάνεια μίκας ως μια έμμεση μέθοδος έρευνας των μηχανισμών της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-επιφανειών. Αν και οι δύο αυτές ιδιότητες είναι αυστηρά καθορισμένες για τα βιολογικά συστήματα (π.χ. για το πλάσμα του αίματος το pH είναι 7.4 και συγκέντρωση αλάτων 150mM (Verma et al. 2004)), πειράματα με διευρυμένες τιμές μπορούν να συμβάλλουν στην κατανόηση του ανταγωνιστικού ρόλου των διεπιφανειακών δυνάμεων, ειδικότερα των ηλεκτροστατικών και των van der Waals, καθώς και της σημαντικότητας της μοριακής δομής των πρωτεϊνών για την προσρόφηση.

Η πρωτοτυπία της συγκεκριμένης έρευνας σε σχέση με άλλες, οι οποίες αναφέρονται στη βιβλιογραφία, είναι ότι επικεντρώθηκε στη μελέτη μεμονωμένων μορίων ινωδογόνου πάνω στην επιφάνεια αποφεύγοντας τα διαμοριακά φαινόμενα και την ενδεχόμενη παρεμβολή των τελευταίων στις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης με το υπόστρωμα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (AFM), το οποίο έχει τη δυνατότητα να λαμβάνει εικόνες από βιολογικά δείγματα με ανάλυση μερικών nm ακόμα και σε ψευδο-φυσικό περιβάλλον, δηλαδή μέσα σε υγρό. Για να αποφευχθεί αποκόλληση των προσροφημένων μορίων κατά τη σάρωση των δειγμάτων από την ακίδα εφαρμόστηκε η μέθοδος της ταλαντούμενης ακίδας.

Την τελειοποίηση της τεχνικής για τη λήψη εικόνων υψηλής ευκρίνειας από ανεξάρτητα μόρια ινωδογόνου, ακολούθησε η σύγκριση της επιφανειακής κάλυψης σε μεταβαλλόμενες τιμές

pH και ιοντικής ισχύος. Τα συμπεράσματα προήλθαν από σύγκριση των μέσων τιμών κάλυψης από ένα πλήθος δειγμάτων, τα οποία εξετάστηκαν στις διάφορες συνθήκες pH και ιοντικής ισχύος. Για την αποτροπή του σχηματισμού συμπαγούς στρώματος προσροφημένων μορίων, η προσρόφηση πραγματοποιούνταν από διάλυμα πολύ μικρής συγκέντρωσης σε πρωτεΐνη.

2.2 Θεωρητικό υπόβαθρο

2.2.1 Η προσρόφηση πρωτεϊνών σύμφωνα με τη θερμοδυναμική θεωρία

Όπως αναφέρθηκε ήδη στην εισαγωγή, η προσρόφηση των πρωτεϊνών στις επιφάνειες είναι εφικτή, μόνο όταν η αλληλεπίδραση τους συνοδεύεται από ελαχιστοποίηση της ολικής ενέργειας του συστήματος πρωτεΐνη-επιφάνεια-διαλύτης ή με άλλα λόγια από μείωση της ελεύθερης ενέργειας του Gibbs:

$$\Delta G_{\text{ροφ}} = \Delta H_{\text{ροφ}} - T\Delta S_{\text{ροφ}} < 0 \quad (2.1)$$

όπου H, S και T είναι η ενθαλπία, η εντροπία και απόλυτη θερμοκρασία αντίστοιχα, ενώ ο τελεστής $\Delta_{\text{ροφ}}$ υποδεικνύει μεταβολές των αντίστοιχων θερμοδυναμικών μεγεθών ως αποτέλεσμα της διαδικασίας προσρόφησης.

Η προσρόφηση των πρωτεϊνών είναι το τελικό αποτέλεσμα μιας σειράς αλληλεπιδράσεων ανάμεσα ή στο εσωτερικό των συστατικών στοιχείων του συστήματος πρωτεΐνη-επιφάνεια-διαλύτης. Οι κυριότερες δυνάμεις, οι οποίες υποκρύπτονται στις αλληλεπιδράσεις αυτές είναι οι ηλεκτροστατικές, οι van der Waals, οι Lewis acid-base (οι οποίες περιλαμβάνουν τους δεσμούς υδρογόνου) καθώς και φαινόμενα, τα οποία βασίζονται στην εντροπία, όπως οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ή οι περιορισμοί λόγω μοριακής διάταξης. Είναι αναμενόμενο, ότι οι διεπιφανειακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων και της επιφάνειας ή μεταξύ της επιφάνειας και του διαλύτη, έχουν εξίσου σημαντική συνεισφορά στη μεταβολή της ενέργειας $\Delta G_{\text{ροφ}}$ με τα ενδομοριακά ή διαμοριακά φαινόμενα.

Η παρούσα έρευνα επικεντρώνεται στην αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-επιφάνειας αποκλείοντας την επίδραση δυνάμεων μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων, καθώς οι πειραματικές μετρήσεις στην επιφάνεια αφορούν ανεξάρτητα μόρια ινωδογόνου και όχι συμπαγές στρώμα πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά, για χάρη πληρότητας στη συνέχεια θα γίνει αναφορά στα κύρια φαινόμενα, τα οποία συνεισφέρουν στη μεταβολή $\Delta G_{\text{ροφ}}$, χωρίς διάκριση.

2.2.2 Η αντιστρεπτότητα της προσρόφησης

Προτού αναφερθούμε αναλυτικά στις δυνάμεις και εν γένει στα φαινόμενα, τα οποία καθορίζουν τη συμπεριφορά των πρωτεϊνών στις διεπιφάνειες, κρίνεται σκόπιμη μια συζήτηση σχετικά με την αντιστρεπτότητα της προσρόφησης των πρωτεϊνών (Haynes & Norde 1994). Το πιο απλό κριτήριο για την κατάταξη της προσρόφησης ως αντιστρεπτής διαδικασίας είναι η απελευθέρωση και επιστροφή πρωτεϊνικών μορίων από την επιφάνεια στο διάλυμα, όταν η συγκέντρωση του τελευταίου μειωθεί σε σχέση με την τιμή, στην οποία πραγματοποιήθηκε αρχικά η προσρόφηση. Αυτή η ανταλλαγή μορίων μεταξύ της διεπιφάνειας και του διαλύματος προσρόφησης φανερώνει την επίτευξη θερμοδυναμικής ισορροπίας στο σύστημα.

Η αντιστρεπτότητα του φαινομένου της προσρόφησης είναι δυνατό να διερευνηθεί με τη βοήθεια της ισόθερμης καμπύλης προσρόφησης, η οποία παρουσιάζει σε σταθερή θερμοκρασία το ποσό της προσροφημένης στην επιφάνεια μάζας, Γ , συναρτήσει της συγκέντρωσης ισορροπίας στο διάλυμα, c_s . Στο βαθμό, που η προσρόφηση των πρωτεϊνών είναι αντιστρεπτή διαδικασία και η αναδιάταξη της δομής τους στη διεπιφάνεια δεν εισάγει αναντίστρεπτα φαινόμενα, ο κλάδος της ισόθερμης, ο οποίος αντιστοιχεί στην αύξηση της προσροφημένης μάζας με αυξανόμενη της συγκέντρωση στο διάλυμα, συμπίπτει με τον κλάδο μείωσης της προσροφημένης μάζας με μειούμενη συγκέντρωση. Σε αυτή την περίπτωση θα μπορούσε να γίνει προσαρμογή της πειραματικά μετρούμενης ισόθερμης καμπύλης από το μοντέλο του Langmuir. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατός ο υπολογισμός της σταθεράς ισορροπίας K και της ενέργειας προσρόφησης ΔG (βλ. Κεφ. 1.2.2.).

Στην πράξη όμως, η προσρόφηση των πρωτεϊνών συνοδεύεται από την αναδιάταξη της δομής των μορίων και το σχηματισμό ενός πλήθους δεσμών με την επιφάνεια. Τόσο οι αναδιατάξεις, οι οποίες συνοδεύονται από αύξηση της περιστροφικής ελευθερίας των ενδομοριακών αλυσίδων, όσο και η αύξηση της εντροπίας του συστήματος όταν κάποιοι από τους δεσμούς με την επιφάνεια σπάνε, τη στιγμή που άλλοι εξακολουθούν να συγκρατούν το μόριο στην επιφάνεια (Bell 1978), λειτουργούν ανασταλτικά για την άμεση αποδέσμευση των μορίων από την επιφάνεια, όταν μειωθεί η συγκέντρωση του διαλύματος, και καθιστούν τη προσρόφηση μια μη αντιστρεπτή διαδικασία.

Απόρροια αυτού του συμπεράσματος είναι η περιγραφή των διαδικασιών της προσρόφησης των πρωτεϊνών με βάση τις αρχές των μη αντιστρεπτών θερμοδυναμικών φαινομένων. Από αυτή τη σκοπιά, ο υπολογισμός της μη αντιστρεπτής συνεισφοράς της εντροπίας $(\Delta S_{\text{ροφ}})_{\text{μη-αντ}}$ στη μεταβολή

της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος αποκτά ιδιαίτερη βαρύτητα. Επιπλέον, αν και οι κλάδοι της ισόθερμης της αναντίστρεπτης προσρόφησης έχουν τα χαρακτηριστικά των ισόθερμων Langmuir, η εφαρμογή του θεωρητικού μοντέλου του Langmuir για τον υπολογισμό της ενέργειας προσρόφησης δεν ενδείκνυται. Το εμβαδό ωστόσο, του βρόγχου υστέρησης, που σχηματίζουν (Σχήμα 2.1), μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της μεταβολής $\Delta_{\text{ροφ}} S_{\text{μη-αντ}}$:

$$(\Delta S_{\text{ροφ}})_{\text{μη-αντ}} = R \int \frac{\Gamma_p(c_s)}{\Gamma^*} d \ln c_s \quad (2.2)$$

όπου Γ^* είναι η προσροφημένη μάζα στο ανώτερο σημείο του βρόγχου υστέρησης και R η σταθερά του Avogadro (Haynes & Norde 1994).

Σχήμα 2.1 Ισόθερμη προσρόφησης (x) και αποδέσμευσης (διακεκομμένες γραμμές) αλβουμίνης βόειου ορού σε νανοσφαιρίδια γυαλιού μέσα σε διάλυμα 50mM PBS pH 7 (T=25°C). Ο βρόγχος υστέρησης, ο οποίος σχηματίζεται από τους δύο κλάδους, αντιπροσωπεύει την μη αντιστρεπτή συνεισφορά της εντροπίας στην προσρόφηση. Προσαρμογή από (Norde 1992).

Ο υπολογισμός των μη αντιστρεπτών συνεισφορών των όρων της Εξίσωσης 2.1 δεν αποτέλεσε αντικείμενο αυτής της έρευνας. Το γεγονός όμως, ότι η προσρόφηση των πρωτεϊνών είναι ένα μη αντιστρεπτό φαινόμενο αποτέλεσε τη βάση της ερμηνείας των πειραματικών αποτελεσμάτων της.

2.2.3 Υπολογισμός της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας κατά την προσρόφηση.

Στο κεφάλαιο αυτό θα αναλυθούν οι κινητήριες δυνάμεις για την προσρόφηση των πρωτεϊνών καθώς και η συνεισφορά κάθε μίας από αυτές στη μείωση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος πρωτεΐνη-επιφάνεια-διάλυμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η θεωρητική προσέγγιση των περισσότερων από αυτών των δυνάμεων-φαινομένων προέρχεται από τη φυσική των κολλοειδών και των πολυμερών.

Ηλεκτροστατικό δυναμικό

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες, οι οποίοι προσδιορίζουν τη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας ΔG και ειδικότερα το ενθαλπικό της μέρος είναι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Αυτές μπορεί να είναι ελκτικές ή απωστικές ανάλογα με τα ηλεκτροστατικά φορτία της πρωτεΐνης και της επιφάνειας, τα οποία ρυθμίζονται από τη διαφορά του pH του διαλύματος από το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης και της επιφάνειας αντίστοιχα (Matsumoto et al. 2003). Η ισχύς και το εύρος του προκύπτοντος ηλεκτροστατικού δυναμικού από την άλλη μεριά, εξαρτάται από την ιοντική ισχύ του διαλύματος.

Για να γίνει κατανοητή η επίδραση της ιοντικής ισχύος στο ηλεκτροστατικό δυναμικό απαιτείται η εισαγωγή της έννοιας του διπλού στρώματος διάχυσης. Όταν μια φορτισμένη επιφάνεια βρίσκεται μέσα σε ένα ηλεκτρολυτικό διάλυμα, το επιφανειακό της φορτίο εξουδετερώνεται από αντίθετα φορτισμένα ιόντα του διαλύματος, μερικά από τα οποία είναι δεσμευμένα στην επιφάνεια της μέσα στο επονομαζόμενο στρώμα Stern ή αλλιώς Helmholtz, ενώ κάποια άλλα σχηματίζουν ένα νέφος ταχύτατα κινούμενων ιόντων, το διπλό στρώμα διάχυσης (Muller et al. 1997a) (Σχήμα 2.2). Μέτρο του πάχους του διπλού στρώματος διάχυσης αποτελεί το μήκος Debye, λ :

$$\lambda = \sqrt{\frac{\epsilon \epsilon_0 k_B T}{e^2 \sum_i c_i q_i^2}} \quad (2.3)$$

όπου ϵ_0 είναι η διαπερατότητα του κενού, ϵ η διηλεκτρική σταθερά του μέσου, k_B η σταθερά του Boltzmann, T η απόλυτη θερμοκρασία, e το φορτίο του ηλεκτρονίου, q_i το ιοντικό σθένος και c_i η συγκέντρωση του ι-οστού ηλεκτρολύτη στο διάλυμα.

Σχήμα 2.2. Άπωση μεταξύ μορίου πρωτεΐνης και επιφάνειας λόγω της επικάλυψης των διπλών στρωμάτων διάχυσης, που τείνουν να εξουδετερώσουν το ηλεκτροστατικό τους φορτίο. Τα κατιόντα εμφανίζονται ενυδατωμένα ενώ τα ανιόντα όχι.

Κατά την προσρόφηση τα διπλά στρώματα διάχυσης της πρωτεΐνης και της επιφάνειας επικαλύπτονται και όσο η πρωτεΐνη πλησιάζει την επιφάνεια τα διαχεόμενα ιόντα πιέζονται να ενσωματωθούν στα αλληλοεπιδρώντα σώματα. Λόγω του φαινομένου αυτού αναπτύσσεται οσμωτική πίεση, η οποία προκαλεί μια άπωση εντροπικής φύσης, που μπορεί τελικά να αποτρέψει την προσρόφηση (Janshoff et al. 2000). Με άλλα λόγια η ηλεκτροστατική άπωση δεν είναι παρά η απώθηση επικαλυπτόμενων ιοντικών στρωμάτων. Αφού το πάχος του διπλού στρώματος διάχυσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση των αλάτων, σύμφωνα με την Εξίσωση 2.3, η τελευταία ρυθμίζει και το εύρος του ηλεκτροστατικού δυναμικού.

Η ακριβής έκφραση της ενέργειας αλληλεπίδρασης λόγω των ηλεκτροστατικών δυνάμεων προκύπτει από τη λύση της μη γραμμικής εξίσωσης Poisson-Boltzmann (Israelachvili 1992) και ανάλογα με τις συνοριακές συνθήκες, οι οποίες λαμβάνονται υπόψη -σταθερού επιφανειακού δυναμικού ή σταθερού επιφανειακού φορτίου- προκύπτουν δύο διαφορετικές λύσεις (Gregory 1975, Valle-Delgado et al. 2004a):

$$U_{\eta\lambda\epsilon\kappa\tau} = \epsilon\pi R \left[(\Psi_E + \Psi_\Pi)^2 \ln \left(1 + e^{-\frac{x}{\lambda}} \right) + (\Psi_E - \Psi_\Pi)^2 \ln \left(1 - e^{-\frac{x}{\lambda}} \right) \right] \quad (2.4)$$

υπό συνοριακές συνθήκες σταθερού επιφανειακού δυναμικού και

$$U_{\eta\lambda\epsilon\kappa\tau} = \epsilon\pi R \left[(\Psi_E + \Psi_\Pi)^2 \ln \left(1 - e^{-\frac{x}{\lambda}} \right) + (\Psi_E - \Psi_\Pi)^2 \ln \left(1 + e^{-\frac{x}{\lambda}} \right) \right] \quad (2.5)$$

υπό συνοριακές συνθήκες σταθερού φορτίου, όπου Ψ_E είναι το επιφανειακό δυναμικό της επιφάνειας, Ψ_Π το επιφανειακό δυναμικό της πρωτεΐνης, R είναι η θεωρητική ακτίνα καμπυλότητας του πρωτεϊνικού μορίου και x είναι η απόσταση της πρωτεΐνης από την επιφάνεια.

Η πραγματική ενέργεια αλληλεπίδρασης βρίσκεται μεταξύ των δύο θεωρητικών λύσεων και σύμφωνα με πειραματικά αποτελέσματα πιο κοντά στη λύση του σταθερού επιφανειακού δυναμικού (Kokkoli & Zukoski 2000, Meagher & Griesser 2002). Αξίζει να σημειωθεί ότι η λύση υπό συνοριακές συνθήκες σταθερού επιφανειακού δυναμικού προβλέπει ενδεχόμενη αντιστροφή του επιφανειακού φορτίου εκείνης της επιφάνειας, που είναι λιγότερο φορτισμένη, σε πολύ μικρές αποστάσεις. Καθώς δηλαδή η πρωτεΐνη έρχεται πολύ κοντά στην επιφάνεια, τα ιόντα του διαλύματος πιέζονται μεταξύ των δύο τους και τείνουν να εξουδετερώσουν το ηλεκτροστατικό τους φορτίο διατηρώντας τη συνθήκη του σταθερού επιφανειακού δυναμικού. Έτσι, είναι πιθανό να εμφανιστούν ελκτικές δυνάμεις σε μικρές αποστάσεις μεταξύ αρνητικά φορτισμένων επιφανειών με άνισο φορτίο (Hunter 1987, McCormack et al. 1995).

Δυνάμεις van der Waals

Μία άλλη, καθοριστική για την προσρόφηση των πρωτεϊνών, ομάδα δυνάμεων είναι οι van der Waals. Στην αλληλεπίδραση, η οποία είναι γνωστή με το όνομα αυτών των δυνάμεων συμβάλλουν τριών ειδών δυνάμεις:

- i. η δύναμη προσανατολισμού, ή αλλιώς δύναμη Keesom
- ii. η δύναμη επαγωγής, ή αλλιώς δύναμη Debye
- iii. η δύναμη διάχυσης, ή αλλιώς δύναμη London

Για τις πρώτες δύο επιβάλλεται η ύπαρξη τουλάχιστον ενός διπόλου, ενώ η τρίτη εμφανίζεται ακόμα και ανάμεσα σε μη πολικά σωματίδια. Η ιδιαιτερότητα των δυνάμεων van der Waals πηγάζει από το εύρος δράσης τους, το οποίο κυμαίνεται από τα 10nm έως τα 0.2nm καθώς και από το γεγονός ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ δύο σωματιδίων επηρεάζεται από την παρουσία άλλων γειτονικών σωματιδίων, με συνέπεια να θεωρούνται μη αθροιστικές δυνάμεις (Israelachvili 1992).

Το πρόβλημα της μη-αθροιστικότητας των δυνάμεων van der Waals ξεπερνιέται με τη βοήθεια της θεωρίας Lifshitz, η οποία αγνοεί τη ατομική δομή των σωμάτων και υπολογίζει τις δυνάμεις ανάμεσα τους χρησιμοποιώντας ιδιότητες συνεχών μέσων, όπως τη διηλεκτρική σταθερά και το δείκτη διάθλασης. Ουσιαστικά αυτό που υπολογίζεται για κάθε σύστημα είναι η τιμή της σταθεράς Hamaker, A , η οποία στη συνέχεια εισάγεται στον κατάλληλο μαθηματικό τύπο ανάλογα με τη γεωμετρία των αλληλεπιδρώντων σωμάτων (σφαίρα, επίπεδο ή κύλινδρος) (Garcia et al. 2007, Meagher & Griesser 2002, Willemsen et al. 1999). Για την περίπτωση μιας σφαίρας πάνω από μια επίπεδη επιφάνεια, η ενέργεια αλληλεπίδρασης λόγω των δυνάμεων van der Waals εκφράζεται από τον τύπο (Janshoff et al. 2000):

$$U_{vdWaals} = -\frac{A \cdot R}{6x} \quad (2.6)$$

Τυπικές τιμές της σταθεράς Hamaker για σωματίδια, τα οποία αλληλεπιδρούν σε νερό, είναι της τάξης των 10^{-20} J. Αν και για μη ομοειδή σώματα η δύναμη van der Waals μπορεί να είναι απωστική ή ελκτική, για τα συστήματα που θα μας απασχολήσουν (βιομόρια-νερό-γυαλί/μίκας) η σταθερά Hamaker είναι πάντα θετική και συνεπώς, η ενέργεια αλληλεπίδρασης αρνητική, δηλαδή φανερώνει έλξη.

Όταν οι δυνάμεις van der Waals εξετάζονται σε συνδυασμό με τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις, η συνολική αλληλεπίδραση περιγράφεται από το μοντέλο των Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), στο οποίο θα γίνει εκτενής αναφορά σε επόμενο κεφάλαιο.

Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις - Ενέργεια ενυδάτωσης

Καθώς η αλληλεπίδραση πρωτεϊνών-βιοϋλικών συμβαίνει σε περιβάλλον οργανικών υγρών, τα οποία αποτελούνται κατά κύριο λόγο από νερό, είναι αναμενόμενο τα μόρια του νερού να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην προσρόφηση των πρωτεϊνών. Όπως συμβαίνει και με άλλους, μη υδατικούς διαλύτες, τα μόρια του νερού, τα οποία βρίσκονται κοντά σε επιφάνειες, αναγκάζονται να αυτο-οργανώνονται σε δομές, που μοιάζουν με στρώματα. Όταν επιπλέον, δυο επιφάνειες προσεγγίζουν η μία τη άλλη μέσα σε νερό, γεωμετρικοί περιορισμοί επιβάλλουν τη μεταβολή της οργάνωσης των μορίων του νερού, ώστε να προσαρμόζονται στο συνεχώς μειούμενο διάκενο. Θεωρητικά το φαινόμενο αυτό προκαλεί την εμφάνιση μιας μειούμενης δύναμης άπωσης με κυματοειδή μορφή (Israelachvili 1992, Janshoff et al. 2000), η σημασία της οποίας όμως, δεν έχει ακόμα επιβεβαιωθεί πειραματικά στην περίπτωση βιομορίων, που προσεγγίζουν επιφάνειες προσρόφησης (Muller et al. 1999).

Μια πιο σημαντική επίδραση των μορίων του νερού στην προσρόφηση των πρωτεϊνών πηγάζει από τη χαρακτηριστική ιδιότητά τους να είναι πολωμένα. Έτσι, τα μόρια του νερού, τα οποία βρίσκονται σε επαφή με υδρόφοβες, μη-πολικές επιφάνειες αναγκάζονται να λαμβάνουν συγκεκριμένο προσανατολισμό ως προς αυτές, ώστε να σχηματίζουν όσο το δυνατό περισσότερους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους, αφού είναι αδύνατο να σχηματίσουν δεσμούς με την επιφάνεια. Κατά την προσρόφηση της πρωτεΐνης τα οργανωμένα μόρια του νερού “απελευθερώνονται” από την επιφάνεια στο διάλυμα δίνοντας τη θέση τους στα μόρια της πρωτεΐνης (Koutsoukos et al. 1982). Αυτή η αποδέσμευση των υδατικών μορίων οδηγεί σε αύξηση της εντροπίας του συστήματος, η οποία συνεπάγεται μείωση της ελεύθερης ενέργειας ΔG (βλ. Εξίσωση 2.1). Λόγω του φαινομένου αυτού, θεωρείται ότι οι υδρόφοβες επιφάνειες ευνοούν την προσρόφηση των πρωτεϊνών, τουλάχιστον σε όρους ξεδιπλώματος της δομής των τελευταίων επάνω τους (Frank & Belfort 2003, Sit & Marchant 1999).

Μια εντελώς διαφορετική συνεισφορά των υδατικών μορίων στη θερμοδυναμική της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών με τις επιφάνειες είναι οι απωστικές δυνάμεις ενυδάτωσης. Αυτές εμφανίζονται, όταν στην επιφάνεια ή κοντά σε αυτή βρίσκονται χημικές ομάδες, οι οποίες σχηματίζουν εύκολα δεσμούς υδρογόνου, όπως είναι τα υδροξύλια, ή ενυδατωμένα ιόντα, σαν τα Na^+ , K^+ ή Ca^{2+} (Pashley 1981). Τα τελευταία περιέχονται σε όλα τα οργανικά υγρά με τη μορφή αλάτων, η διάσταση των οποίων δίνει ιόντα, τα οποία περιβάλλονται από πολικά υδατικά μόρια. Η παρουσία αυτών των ενυδατωμένων ιόντων, επί το πλείστον κατιόντων μιας και τα ανιόντα ενυδατώνονται πιο δύσκολα, κοντά σε αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες προκαλεί μια άπωση

καθώς οι πρωτεΐνες τις προσεγγίζουν για να προσροφηθούν (Valle-Delgado et al. 2004b) (Σχήμα 2.2). Στη βιβλιογραφία (Petsev & Vekilov 2000) έχει επικρατήσει αυτή η ενέργεια ενυδάτωσης να περιγράφεται από την εμπειρική εξίσωση:

$$U_{\text{ενυδ}} = U_o e^{-\frac{x}{\kappa}} \quad (2.7)$$

όπου η σταθερά U_o εξαρτάται από την ενυδάτωση της επιφάνειας και κ είναι το μήκος απόσβεσης, της τάξης 0.6-1.1nm.

Σταθερότητα πρωτεϊνικής δομής

Κρίσιμη για τη συμπεριφορά των πρωτεϊνικών μορίων στις διεπιφάνειες είναι επίσης, η σταθερότητα της δομής τους και οι ενδομοριακές δυνάμεις. Όπως αναφέρθηκε ήδη στην Εισαγωγή (Κεφ.1.2.1.), δεσμοί υδρογόνου και δισουλφιδικοί δεσμοί συμβάλλουν στη διαμόρφωση των δευτεροταγών δομών στο εσωτερικό των πρωτεϊνικών μορίων, ενώ ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καταλοίπων συνεργάζονται για την τριτοταγή δομή (Ratner et al. 1996). Στη διεπιφάνεια οι ενδομοριακοί δεσμοί είναι δυνατό να διαταραχθούν λόγω του ηλεκτροστατικού δυναμικού ή της επιφανειακής τάσης/ενέργειας, ενεργοποιώντας διαδικασίες αποδιάταξης της μοριακής δομής και σχηματισμού δεσμών με το υπόστρωμα.

Οι διάφορες αλληλεπιδράσεις και τα φαινόμενα, τα οποία συμβάλλουν στην αποδιάταξη της πρωτεϊνικής δομής στις διεπιφάνειες καθώς και η συνεισφορά τους στη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας του Gibbs παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1 (Haynes & Norde 1994). Ανάλογα με το φορτίο της επιφάνειας ως προς το φορτίο των πρωτεϊνικών καταλοίπων, τα οποία τείνουν να αποδιαταχθούν και να συνδεθούν με το υπόστρωμα, η ενθαλπική συνεισφορά στη μεταβολή ΔG μπορεί να είναι είτε αρνητική είτε θετική. Το ύψος της μεταβολής αυτής εξαρτάται τόσο από τη πυκνότητα του φορτίου στο πρωτεϊνικό μόριο, η οποία ρυθμίζεται από τη σχετική τιμή του pH του διαλύματος ως προς το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης, όσο και από το εύρος των ηλεκτροστατικών δυνάμεων, το οποίο εξαρτάται από τη συγκέντρωση των αλάτων.

Σχετικά με τους δεσμούς υδρογόνου, η συνεισφορά τους προσδιορίζεται με μεγαλύτερη σαφήνεια. Η αποδιάταξη της πρωτεΐνης στην επιφάνεια επιβάλλει κατά κανόνα τη ρήξη τέτοιων δεσμών με αποτέλεσμα η συνεισφορά στη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος να είναι θετική. Η συνεισφορά των υδρόφοβων ενυδατώσεων, από την άλλη μεριά, είναι μηδαμινή καθώς τα υδρόφοβα αμινοξέα, τα οποία ενδεχομένως θα εκτίθονταν στο διάλυμα μετά το ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης, έρχονται σε επαφή με την επιφάνεια και απομονώνονται και πάλι από τα υδατικά μόρια.

Δημιουργείται εύλογα η απορία, ποια είναι τελικά τα φαινόμενα εκείνα, τα οποία έχουν αρνητική συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια και υποκινούν την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις επιφάνειες. Ένα από αυτά είναι η χαλάρωση των ενδομοριακών δεσμών, οι οποίοι βρίσκονται υπό τάση λόγω γεωμετρίας, δηλαδή γωνίας ή μήκους δεσμού. Ο κυριότερος όμως, παράγοντας μείωσης της ελεύθερης ενέργειας είναι η αύξηση της εντροπίας του πρωτεϊνικού μορίου μετά την αποδιάταξη του στη διεπιφάνεια, καθώς οι πολυπεπτιδικές του αλυσίδες αποκτούν περιστροφική ελευθερία, την οποία δεν είχαν, όταν συγκρατούνταν στη φυσική μοριακή διάταξη.

Πίνακας 2.1. Αλληλεπιδράσεις κατά την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις διεπιφάνειες και η συνεισφορά τους στη μεταβολή της ενέργειας του Gibbs.

Φαινόμενο	$\Delta G_{\text{ροφ. διάλυμα}}$	Παρατηρήσεις
Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις	$> < 0$	Εξαρτώνται από το pH σε σχέση με το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης και την ιοντική ισχύ
Δεσμοί υδρογόνου	> 0	Ρήξη ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου
Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις	≈ 0	Υδρόφοβοι πυρήνες έρχονται σε επαφή με την επιφάνεια αποφεύγοντας την έκθεση στο υδατικό διάλυμα
Μεταβολή της γεωμετρίας των ενδομοριακών δεσμών	< 0	Ορισμένοι δεσμοί βρίσκονται υπό τάση στη φυσική/αναδιπλωμένη διάταξη της πρωτεΐνης
Εντροπία διάταξης	$<< 0$	Η αποδιάταξη αυξάνει την περιστροφική ελευθερία των πολυπεπτιδικών αλυσίδων

Πέρα των όσων προαναφέρθηκαν, υπάρχουν και αρκετά άλλα φαινόμενα, τα οποία συνεισφέρουν στη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας κατά την προσρόφηση, όπως είναι η παράλληλη προσρόφηση ιόντων χαμηλού μοριακού βάρους, η αποδέσμευση πρωτονίων από φορτισμένα κατάλοιπα στην επιφάνεια της πρωτεΐνης ή οι πλευρικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων (Sethuraman et al. 2004). Εντούτοις, όσο δύσκολη είναι η πρόβλεψη της συμβολής καθενός από αυτά τα φαινόμενα στο τελικό αποτέλεσμα, τόσο δευτερεύουσα θεωρείται η συνεισφορά τους, με συνέπεια σπάνια να λαμβάνονται υπόψη στην ερμηνεία πειραματικών αποτελεσμάτων, με εξαίρεση ίσως τις πλευρικές αλληλεπιδράσεις (Ortega-Vinuesa et al. 1998a).

2.3 Οργανολογία –Το Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (AFM)

2.3.1 Η αρχή λειτουργίας του AFM

Το Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (AFM) παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1986 σε ένα άρθρο του Binnig και των συνεργατών του (Binnig et al. 1986), το οποίο έχει χαρακτηριστεί βάσει αριθμού αναφορών ως το τέταρτο πιο σημαντικό άρθρο Φυσικής της περιόδου 1958-2002. Η κατασκευή του AFM βασίστηκε στο Μικροσκόπιο Σήραγγος (Scanning Tunnel Microscope, STM), του οποίου αποτέλεσε βελτίωση καθώς το τελευταίο μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μόνο σε αγωγίμα δείγματα. Αν και έχουν περάσει μόλις δύο δεκαετίες από τότε, το AFM εξελίχθηκε σε ένα εύχρηστο μικροσκόπιο –ειδικά μετά τις τροποποιήσεις, που εισήγαγαν στο οπτικό του σύστημα οι Meyer και Amer (Meyer & Amer 1988)- το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για τη λήψη εικόνων υψηλής ανάλυσης από την επιφάνεια δειγμάτων και τη μέτρηση δυνάμεων με ευαισθησία μερικών pN.

Η αρχή λειτουργίας του μοιάζει με αυτή ενός φωνογράφου. Μια αιχμηρή ακίδα στερεωμένη στην άκρη ενός μικρού προβόλου, τόσο λεπτού και εύκαμπτου ώστε να προσομοιάζει ελατήριο, σαρώνει το δείγμα, το οποίο βρίσκεται από κάτω της. Η σχετική κίνηση του δείγματος ως προς την ακίδα, στο επίπεδο xy αλλά και στον κατακόρυφο άξονα, ελέγχεται μέσω ενός σαρωτή-πιεζοκρυστάλλου (Σχήμα 2.3). Η συγκράτηση της ακίδας στην επιφάνεια κατά τη σάρωση εξασφαλίζεται μέσω των δυνάμεων, οι οποίες αναπτύσσονται ανάμεσα τους –ηλεκτροστατικών, μαγνητικών, van der Waals ή άλλων, ανάλογα με τις ιδιότητες του υλικού και τον τρόπο σάρωσης, ο οποίος έχει επιλεγεί. Για τον έλεγχο της σάρωσης, μια δέσμη λέιζερ (μέγιστης ισχύος 5mW, μήκος κύματος 670nm), η οποία προσπίπτει κατακόρυφα και ανακλάται από την πίσω πλευρά του προβόλου, οδηγείται μέσω ενός κατόπτρου σε ένα διαιρεμένο σε τεταρτημόρια φωτοαισθητήρα. Στη θέση ηρεμίας ο πρόβολος είναι άκαμπτος και η ανακλώμενη δέσμη προσπίπτει στο κέντρο του φωτοαισθητήρα. Καθώς όμως, η ακίδα σαρώνει την επιφάνεια ακολουθώντας την τοπογραφία της, αναγκάζεται να κάμπτεται. Η κάμψη αυτή παρακολουθείται από ένα ηλεκτρονικό σύστημα, το οποίο υπολογίζει τη διαφορά του σήματος στα αντίθετα τεταρτημόρια του φωτοαισθητήρα και ενεργοποιεί μια διαδικασία ανάδρασης, ώστε να επαναφέρει το σήμα στην αρχική θέση και κατά συνέπεια τον πρόβολο στην κατάσταση ισορροπίας του. Κατάληξη της ανάδρασης είναι μια ηλεκτρική διέγερση προς τον πιεζοκρυστάλλο, η οποία ρυθμίζει το ύψος του και ανάλογα απομακρύνει ή προσεγγίζει το δείγμα από την ακίδα.

Σχήμα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση διάταξης AFM. Η δέσμη λέιζερ ανακλάται από την πίσω πλευρά του προβόλου της ακίδας πάνω στο φωτοαισθητήρα, ο οποίος τροφοδοτεί το κύκλωμα ανάδρασης με ένα σήμα τάσης. Από το σύστημα ελέγχου το διορθωτικό σήμα καταλήγει στο σαρωτή για τη ρύθμιση του ύψους του και τη διατήρηση σταθερής δύναμης, δηλαδή σταθερής απόστασης ακίδας-επιφάνειας, κατά τη σάρωση.

Για να γίνει περισσότερο κατανοητή η λειτουργία του AFM, θα δοθεί στη συνέχεια μια σύντομη περιγραφή των δομικών του στοιχείων και του ρόλου του καθενός.

Ακίδα

Οι ακίδες του AFM έχουν μορφή τετράεδρης ή πεντάεδρης πυραμίδας (Σχήμα 2.4). Οι ακίδες όπως και οι πρόβολοι, στους οποίους στηρίζονται, κατασκευάζονται από πυρίτιο (Si) ή νιτρίδιο του πυριτίου (Si_3N_4) ανάλογα με τη χρήση για την οποία προορίζονται (για τις διάφορες τεχνικές AFM βλ. στη συνέχεια Κεφ. 2.3.2). Αυτές, οι οποίες χρησιμοποιούνται με την τεχνική της επαφής στον αέρα ή με οποιαδήποτε τεχνική σε υγρό, στηρίζονται σε τριγωνικό πρόβολο και κατασκευάζονται από Si_3N_4 . Όσες προορίζονται για χρήση με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας στον αέρα στηρίζονται σε ένα μικρό ορθογώνιο πρόβολο και κατασκευάζονται από Si. Οι γεωμετρικές και μηχανικές ιδιότητες δύο χαρακτηριστικών τύπων ακίδας, των NP-S της VeecoProbes και των OMCL AC240TS της Olympus παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2. Σημειώνεται ότι κάθε τεμάχιο ακίδων NP-S φέρει τέσσερις προβόλους, καθένας από τους οποίους έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά αλλά όμοιες ακίδες.

Σχήμα 2.4. Εικόνες Si_3N_4 ακίδων AFM από Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο (SEM). (α) Διακρίνονται οι τριγωνικοί πρόβολοι δυο από τις τέσσερις ακίδες, οι οποίες υπάρχουν σε κάθε φορέα/τεμάχιο. (β) Εστίαση σε μία από τις ακίδες. Διακρίνεται η πυραμοειδής μορφή της.

Πίνακας 2.2. Μηχανικά και γεωμετρικά χαρακτηριστικά δύο τύπων ακίδων-προβόλων AFM.

Τύπος	Υλικό ακίδας	Χρήση	Μήκος προβόλου (μm)	Πλάτος προβόλου (μm)	Σταθερά ελατηρίου (N/m)	Συχνότητα συντονισμού (kHz)
OMCL AC 240 TS (Olympus)	Si	Τεχνική ταλαντούμενης ακίδας στον αέρα	240	30	2	70
NP-S (VeecoProbes)	Si_3N_4	Τεχνική επαφής στον αέρα ή σε υγρό, ταλαντούμενης ακίδας σε υγρό, μέτρηση δυνάμεων	115	25	0.58	57
			196	41	0.12	20
			115	17	0.32	56
			196	23	0.06	18

Οι ακίδες, αν και αποτελούν το μικρότερον διαστάσεων στοιχείο ενός AFM, είναι το σημαντικότερο, αφού καθορίζουν την ανάλυση των εικόνων, οι οποίες λαμβάνονται. Σε αντίθεση με την κλασική οπτική μικροσκοπία, στην οποία η μέγιστη δυνατή ανάλυση περιορίζεται από τα φαινόμενα διάθλασης του φωτός, η ανάλυση στο AFM καθορίζεται από τις δυνατότητες των ηλεκτρονικών κυκλωμάτων και της ακίδας. Η εντυπωσιακή εξέλιξη των πρώτων έχει συντελέσει στο να μην θεωρούνται πλέον περιοριστικός παράγοντας, κάτι το οποίο όμως, εξακολουθεί να ισχύει για τις διαστάσεις και τη γεωμετρία των ακίδων. Η μέγιστη ανάλυση στο xy επίπεδο, η οποία έχει καταγραφεί με ακίδες ονομαστικής ακτίνας καμπυλότητας 10nm, είναι 0.1nm και αφορά απεικόνιση της ατομικής δομής μίκας και προσανατολισμένου πυρολυτικού γραφίτη (HOPG) ((Drake et al. 1989, Sokolov et al. 1997). Εντούτοις, σχετικές επιστημονικές αντιπαραθέσεις οδήγησαν στο

συμπέρασμα, ότι αυτή η πειραματικά μετρούμενη μέγιστη ανάλυση δεν αντανακλά τις πραγματικές δυνατότητες του AFM, αλλά είναι αποτέλεσμα της επικάλυψης των ατομικών αλληλεπιδράσεων ακίδας-επιφάνειας, οι οποίες καταλήγουν σε μια εικόνα περιοδικότητας.

Συνεπώς, το ενδιαφέρον για την αύξηση της ανάλυσης του AFM εστιάζεται στην κατασκευή όσο το δυνατό πιο αιχμηρών ακίδων. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί δύο τεχνικές, οι οποίες σχετίζονται με τον άνθρακα. Στην πρώτη από αυτές, προσκολλούνται στην κορυφή της ακίδας νανοσωλήνες άνθρακα, οι οποίοι εξασφαλίζουν ατομική ανάλυση χάρη στην τάξης 1nm διάμετρό τους. Με τη δεύτερη τεχνική αναπτύσσεται μια προεξοχή από άνθρακα στην κορυφή ακίδων Si_3N_4 μέσω εστίασης της δέσμης ηλεκτρονίων ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Karrasch et al. 1993, Taatjes et al. 1997). Και οι δύο τεχνικές ωστόσο, παρουσιάζουν προβλήματα, τα οποία εμποδίζουν την εκμετάλλευσή τους για βιομηχανική παραγωγή.

Σαρωτής-scanner

Ο σαρωτής αποτελεί το κεντρικό στοιχείο του AFM καθώς είναι αυτός, ο οποίος δημιουργεί την ελεγχόμενη επίπεδη κίνηση για τη σάρωση του δείγματος από την ακίδα. Η επίπεδη αυτή κίνηση είναι η σύνθεση μιας παλινδρομικής κίνησης στον άξονα x , ο οποίος χαρακτηρίζεται ως “γρήγορος άξονας” με μια ευθύγραμμη μετατόπιση στον άξονα y , ο οποίος χαρακτηρίζεται ως “αργός άξονας”. Ο σαρωτής παράλληλα διορθώνει τη σχετική απόσταση ακίδας-επιφάνειας στον κατακόρυφο άξονα ανάλογα με το σήμα, το οποίο λαμβάνει από το σύστημα ανάδρασης. Για να είναι εφικτός ο έλεγχος της μετατόπισης και στις τρεις διαστάσεις, ο σαρωτής κατασκευάζεται από τρεις ομάδες πιεζοκρυστάλλων, κάθε μία από τις οποίες ελέγχει τη μετατόπιση σε έναν από τους άξονες x, y, z . Όταν στις άκρες ενός πιεζοκρυστάλλου εφαρμοστεί μια διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού, η κρυσταλλική του δομή επιμηκύνεται στη μία διεύθυνση και συστέλλεται στις άλλες.

Το σύμπλεγμα των πιεζοκρυστάλλων είναι συναρμολογημένο στον κύλινδρο του σαρωτή, ο οποίος συνήθως αποτελεί τη βάση πάνω στην οποία τοποθετείται το δείγμα. Σε αυτή την περίπτωση είναι το δείγμα, το οποίο μετατοπίζεται, και η ακίδα παραμένει ακίνητη, ενώ αν ο σαρωτής καθοδηγεί την ακίδα, το δείγμα μένει ακίνητο (όπως συμβαίνει στο μοντέλο Dimension 3100 της Veeco). Από τους δύο αυτούς τρόπους διάρθρωσης του AFM, ο πρώτος προτιμάται όταν το ζητούμενο είναι η άριστη ποιότητα των εικόνων, καθώς η σχετική απόσταση ακίδας-δείγματος μετράται μέσω του προβόλου και η μετακίνησή του θα εισήγαγε θόρυβο λόγω ταλαντώσεων.

Οι σαρωτές AFM διακρίνονται σε κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθός τους, το οποίο ορίζει και τη μέγιστη παραμόρφωσή τους. Οι δυνατότητες των τριών πιο κοινών σαρωτών, για τα

Multimode AFM της Digital Instruments, Veeco φαίνονται στον Πίνακα 2.3. Οι μικρότεροι σαρωτές (A ή E), ως πιο σταθεροί, προτιμούνται για δείγματα, στα οποία απαιτείται ατομική ανάλυση (Chen et al. 1997), ενώ ο J χρησιμοποιείται για δείγματα μεγαλύτερων διαστάσεων.

Πίνακας 2.3. Χαρακτηριστικά των τριών τυπικών σαρωτών, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στο Multimode AFM της Digital Instruments.

Σαρωτής	Μέγιστο μέγεθος σάρωσης	Κατακόρυφο εύρος
A	0.4μm x 0.4μm	0.4μm
E	10μm x 10μm	2.5μm
J	125μm x 125μm	5μm

Από τη φύση τους τα πιεζοκρυσταλλικά υλικά εμφανίζουν μια υστέρηση στις μεταβολές των διαστάσεων τους, γεγονός το οποίο επιδρά στην ακρίβεια οδήγησής τους και τελικά σε μια απόκλιση των πραγματικών από τις επιθυμητές μετατοπίσεις. Το πρόβλημα αυτό είναι δυνατό να ξεπεραστεί, αν χρησιμοποιηθεί σαρωτής κλειστού βρόγχου (closed loop scanner). Οι σαρωτές τέτοιου τύπου περιέχουν στο εσωτερικό τους αισθητήρες μετατόπισης με πηνίο, οι οποίοι μετρούν κάθε στιγμή την πραγματική μετατόπιση στις τρεις διατάσεις. Οι μετρήσεις αυτές συγκρίνονται με την επιθυμητή μετατόπιση και σε περίπτωση απόκλισης στέλνεται προς τον πιεζοκρύσταλλο ένα διορθωτικό σήμα.

Επιπλέον, οι πιεζοκρύσταλλοι αναμένεται να χάνουν σταδιακά με το χρόνο τη δυνατότητά τους να μεταβάλλουν τις διαστάσεις τους. Για το λόγο αυτό, οι κατασκευαστές συστήνουν την τακτική μέτρηση των μετατοπίσεων, τις οποίες δίνουν οι σαρωτές για τη μέγιστη εφαρμοζόμενη τάση, και την περιοδική βαθμονόμηση του συστήματος ελέγχου, έτσι ώστε η κλίμακά του να αντιστοιχεί στις πραγματικές μετατοπίσεις.

Κύκλωμα ανάδρασης

Το κύκλωμα ανάδρασης είναι αυτό, το οποίο διατηρεί την ακίδα κατά τη σάρωση σε τέτοια απόσταση από το δείγμα, ώστε να εξασφαλίζεται η επαφή τους χωρίς όμως να κινδυνεύει να καταστραφεί η ακίδα, ενώ παράλληλα παράγει το σήμα, το οποίο χρησιμοποιείται για την ψηφιακή αναπαραγωγή της τοπογραφίας της εξεταζόμενης επιφάνειας. Αποτελείται από το φωτοαισθητήρα, στον οποίο προσπίπτει η ανακλώμενη από τον καμπτόμενο πρόβολο της ακίδας δέσμη λέιζερ και ένα σύστημα ελέγχου (controller), του οποίου τις παραμέτρους λειτουργίας ρυθμίζει ο χειριστής του μικροσκοπίου μέσω ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή.

Ο φωτοαισθητήρας καταγράφει κατά τη σάρωση την κάμψη της ακίδας και στέλνει το πρωτογενές αυτό σήμα (σε Volts) στο σύστημα ελέγχου. Εκεί το πρωτογενές σήμα συγκρίνεται με μία τιμή αναφοράς, η οποία έχει προκαθοριστεί ως το σήμα του φωτοαισθητήρα για την ελάχιστη επαφή της ακίδας με την επιφάνεια (setpoint). Από τη σύγκριση αυτή προκύπτει ένα σήμα απόκλισης (error signal), το οποίο μετασχηματίζεται από το σύστημα ελέγχου σε σήμα διόρθωσης, που προσαρμόζει ανάλογα τη σχετική απόσταση δείγματος-ακίδας. Το σήμα διόρθωσης σε σχέση με το σήμα απόκλισης ρυθμίζεται από το χειριστή μέσω δύο παραμέτρων, της αναλογικής ενίσχυσης (proportional gain) και της ενίσχυσης ολοκλήρωσης (integral gain). Οι τιμές των παραμέτρων αυτών ορίζουν το μέγεθος της ενίσχυσης του σήματος απόκλισης και την ταχύτητα, με την οποία αυτό θα μετασχηματιστεί σε σήμα διόρθωσης. Έχουν ιδιαίτερη σημασία, αν αναλογιστεί κανείς ότι το σήμα διόρθωσης είναι αυτό, που ορίζει την κατακόρυφη παραμόρφωση του σαρωτή, προκειμένου να διατηρηθεί η ακίδα σε επαφή με την επιφάνεια, όταν η τελευταία παρουσιάζει βυθίσματα ή να μην προσκρούσει σε αυτή, αν έχει προεξοχές.

Επιπλέον το σήμα διόρθωσης, εκφρασμένο ως υψομετρική διαφορά, αποτελεί το μέγεθος εκείνο το οποίο χρησιμοποιείται για την απεικόνιση της τοπογραφίας της επιφάνειας. Συμπληρωματικά του συνήθως αναπαράγονται και απεικονίσεις βασισμένες σε άλλα σήματα, όπως είναι τα πρωτογενή σήματα της κάμψης, του εύρους ταλάντωσης ή της διαφοράς φάσης ανάλογα με την χρησιμοποιούμενη τεχνική. Συνεπώς, η βελτιστοποίηση των τιμών των δύο ενισχύσεων, και πιθανώς η χρησιμοποίηση μιας τρίτης, της ενίσχυσης πρόβλεψης (look ahead gain) σε περίπτωση, όπου το δείγμα έχει επαναλαμβανόμενη τοπογραφία κατά τη διεύθυνση σάρωσης, παίζει κρίσιμο ρόλο για τη λήψη εικόνων καλής ποιότητας και υψηλής πιστότητας.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ταχύτητα ανάδρασης παύει σιγά-σιγά να αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την ταχύτητα λειτουργίας του AFM χάρη στην εξέλιξη των ηλεκτρονικών συστημάτων δειγματοληψίας και επεξεργασίας αναλογικών και ψηφιακών σημάτων. Με την κατασκευή μάλιστα κατάλληλων ακίδων, μικρή μάζας και υψηλής συχνότητας συντονισμού, οι οποίες παρουσιάζουν μεγαλύτερη σταθερότητα ταλάντωσης, το AFM υψηλών ταχυτήτων αποκτά ολοένα και περισσότερες εφαρμογές (Ando et al. 2007, Hansma et al. 2006).

Χειρισμός- έλεγχος από το χρήστη

Ο χειρισμός του AFM γίνεται μέσω ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή, στον οποίο λειτουργεί ένα λογισμικό επικοινωνίας με το σύστημα έλεγχου του μικροσκοπίου. Το λογισμικό αυτό

παρέχεται από την εκάστοτε κατασκευάστρια εταιρεία, καθώς είναι σε μεγάλο βαθμό εξειδικευμένο για κάθε τύπο AFM και επιτρέπει τον ορισμό των παραμέτρων λειτουργίας του μικροσκοπίου.

Καταρχάς, ο χειριστής πρέπει να προσδιορίσει στο πρόγραμμα το είδος του σαρωτή, τον οποίο χρησιμοποιεί αφού οι διαστάσεις και η ευαισθησία του τελευταίου καθορίζουν το πραγματικό μέγεθος της σάρωσης και τις διαστάσεις των τοπογραφικών χαρακτηριστικών, τα οποία εμφανίζονται στις εικόνες. Αφού επιλέξει μια από τις τεχνικές λειτουργίας, οι οποίες θα παρουσιαστούν στο επόμενο κεφάλαιο, ορίζει:

1. τις παραμέτρους της σάρωσης, π.χ. μέγεθος σάρωσης (scan size), ευαισθησία κατακόρυφης κλίμακας (z limit), περιοχή σάρωσης ως προς την αρχική θέση της ακίδας (x,y offset), διεύθυνση σάρωσης (scan angle) κ.α.
2. τις παραμέτρους ανάδρασης, π.χ. τιμή αναφοράς (setpoint), αναλογική ενίσχυση σήματος, ενίσχυση ολοκλήρωσης κ.α.
3. το είδος των σημάτων (πρωτογενή ή και διόρθωσης), τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την αναπαραγωγή της εικόνας της τοπογραφίας καθώς και την κατακόρυφη κλίμακα κάθε εικόνας (z range).

Για να αρχίσει η σάρωση του δείγματος και η λήψη της εικόνας, πρέπει η ακίδα να έρθει σε επαφή με την επιφάνεια. Αν και κάτι τέτοιο ακούγεται απλό για το μακρόκοσμο, στο νανοεπίπεδο η “επαφή” ορίζεται ως κάποια οριακή τιμή αλληλεπίδρασης του δυναμικού της ακίδας με αυτό της επιφάνειας. Συνεπώς, η διαδικασία “εμπλοκής” ακίδας-επιφάνειας στο AFM προϋποθέτει τον ορισμό από το χειριστή μιας τιμής κατωφλίου για την ασκούμενη από την επιφάνεια στην ακίδα δύναμη (set point). Καθώς το σύστημα ελέγχου διεγείρει τον πιεζοκρύσταλλο του σαρωτή, ώστε να αρχίσει να διαστέλλεται στον z άξονα, και ακίδα προσεγγίζει την επιφάνεια, η αλληλεπίδρασή τους ελέγχεται μέσω του φωτοαισθητήρα και όταν αυτή φτάσει την προκαθορισμένη τιμή, λέγεται ότι επιτεύχθηκε εμπλοκή (engagement), οπότε αρχίζει η σάρωση. Πρέπει να τονιστεί ότι η τιμή κατωφλίου για την εμπλοκή εκφράζεται σε Volts σήματος του φωτοαισθητήρα και ταυτίζεται με την τιμή αναφοράς για το κύκλωμα ανάδρασης.

Το λογισμικό του AFM εκτός από το περιβάλλον διαχείρισης της λειτουργίας του, παρέχει τη δυνατότητα επεξεργασίας των εικόνων, οι οποίες έχουν ληφθεί. Οι σχετικές εντολές του προγράμματος αφορούν αφ’ ενός τη βελτίωση των εικόνων, π.χ. με απαλοιφή κλίσης/κύρτωσης ή διαγραφή συγκεκριμένων γραμμών σάρωσης, και αφ’ ετέρου την ανάλυσή τους, για παράδειγμα τον υπολογισμό της τραχύτητας, της κατανομής υψών ή του πλήθους συγκεκριμένων τοπογραφικών χαρακτηριστικών.

2.3.2 Τεχνικές AFM

Η εξάπλωση της χρήσης του AFM σε εφαρμογές, οι οποίες εκτείνονται από τη μικροηλεκτρονική ως τη νανο-βιοτεχνολογία, θα ήταν αδύνατη χωρίς την ευελιξία, την οποία του έχουν προσδώσει οι διάφορες τεχνικές λειτουργίας του. Με αφετηρία την τεχνική της επαφής ή αλλιώς σταθερής δύναμης (contact mode), η οποία αξιοποιεί τις βασικές αρχές λειτουργίας του AFM, η ανάγκη για μείωση της ασκούμενης δύναμης σε ευαίσθητα δείγματα οδήγησε στη γέννηση των τεχνικών μη-επαφής (non-contact modes), με πιο χαρακτηριστική αυτή της ταλαντούμενης ακίδας (tapping mode). Πέρα όμως, από αυτές τις βασικές τεχνικές, υπάρχουν και μια πληθώρα άλλων, πιο εξειδικευμένων, όπως είναι αυτή της μαγνητικής δύναμης ή της τριβής (lateral ή friction mode).

Εξάλλου, η εκμετάλλευση της βασικής δυνατότητας του AFM, της μέτρησης δηλαδή, δυνάμεων μεταξύ τροποποιημένων ακίδων και επιφανειών, οδήγησε στην ανάπτυξη μιας σχεδόν αυτόνομης ομάδας εφαρμογών, οι οποίες χαρακτηρίζονται με την ονομασία Φασματοσκοπία Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Spectroscopy). Στην ίδια οικογένεια τεχνικών μπορεί να θεωρηθεί ότι ανήκουν και οι τεχνικές μέτρησης ελαστικότητας (nano-indentation methods) (Weisenhorn et al. 1993) ή η φασματοσκοπία δύναμης μοριακής αναγνώρισης (molecular recognition force spectroscopy), η οποία ανιχνεύει στην επιφάνεια του δείγματος θέσεις συγκεκριμένων μορίων μέσω της ειδικής αλληλεπίδρασής της ακίδας με αυτά (Hinterdorfer & Dufrene 2006, Willemsen et al. 1999).

Είναι βέβαιο, ότι όσο περισσότερο χρησιμοποιείται το AFM, θα εμφανίζονται νέες τεχνικές ή παραλλαγές των ήδη υπαρχόντων. Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης διατριβής όμως, η περιγραφή των τεχνικών του AFM θα περιοριστεί στις δύο βασικές, την τεχνική της επαφής και την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας, η οποία χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα. Ακόμα, θα περιγραφούν οι ιδιαιτερότητες της λειτουργίας του AFM σε υγρό. Η τεχνική μέτρησης δυνάμεων θα περιγραφεί αναλυτικά σε επόμενο κεφάλαιο.

Τεχνική επαφής (contact mode)

Ονομάζεται έτσι, γιατί το κύκλωμα ανάδρασης ελέγχει την κατακόρυφη κάμψη του προβόλου της ακίδας, όπως μετράται από την διαφορά της τάσης μεταξύ του επάνω και του κάτω τμήματος του φωτοαισθητήρα, και προσαρμόζει το ύψος του πιεζοκρυστάλλου του σαρωτή, έτσι ώστε κατά τη σάρωση να διατηρείται η επαφή ακίδας-επιφάνειας στην προκαθορισμένη τιμή

εφαρμοζόμενης δύναμης (set point). Ανάλογα με τις τιμές της αναλογικής ενίσχυσης και της ενίσχυσης ολοκλήρωσης του σήματος στο βρόγχο ανάδρασης, η τεχνική επαφής μπορεί να θεωρηθεί είτε ως τεχνική “σταθερού ύψους” είτε ως τεχνική “σταθερής δύναμης”. Αν η ενίσχυση του σήματος ανάδρασης είναι μικρή, ο σαρωτής διατηρείται σχεδόν σε σταθερό ύψος και η τοπογραφία της επιφάνειας απεικονίζεται μόνο μέσω του σήματος της κάμψης του προβόλου. Αντίθετα, αν η ενίσχυση είναι μεγάλη, το ύψος του σαρωτή μεταβάλλεται για να διατηρηθεί η κάμψη του προβόλου και συνεπώς, η ασκούμενη σε αυτόν δύναμη σταθερή. Σε αυτή την περίπτωση η σύνθεση της εικόνας στηρίζεται στο σήμα διόρθωσης, δηλαδή στο σήμα του ύψους.

Η σταθερή δύναμη σάρωσης καθορίζει τη δύναμη, την οποία δέχεται η ακίδα, καθώς και τη δύναμη, την οποία η ίδια ασκεί στο δείγμα. Επομένως, για ελαστικά και ευαίσθητα δείγματα, όπως είναι οι πρωτεΐνες, η δύναμη πρέπει να έχει την ελάχιστη δυνατή τιμή για να εξασφαλίζεται η μόνιμη επαφή ακίδας-επιφάνειας και ταυτόχρονα να αποφεύγεται η παραμόρφωση του δείγματος (Scheuring et al. 2001, You & Lowe 1996). Μια εκτίμηση της ασκούμενης δύναμης μπορεί να προκύψει από τη σύγκριση της προκαθορισμένης τάσης του φωτοαισθητήρα κατά τη σάρωση, ή αλλιώς της τάσης αναφοράς του βρόγχου ανάδρασης (setpoint), με την τάση όταν η ακίδα βρίσκεται σε ηρεμία μακριά από την επιφάνεια. Όσο μεγαλύτερη είναι η αλγεβρική διαφορά της δεύτερης τάσης από την πρώτη τόσο μεγαλύτερη είναι η δύναμη, την οποία δέχεται το δείγμα κατά τη σάρωση. Η ίδια δύναμη μπορεί να υπολογιστεί ακριβώς, αν καταγραφεί η καμπύλη της δύναμης, η οποία κάμπτεται τον πρόβολο, συναρτήσει της απομάκρυνσης της ακίδας από την επιφάνεια και μετρηθεί η διαφορά ανάμεσα στο σημείο, το οποίο αντιστοιχεί στη σταθερή κάμψη κατά τη σάρωση και το οριζόντιο τμήμα της καμπύλης (βλ. Τεχνική μέτρησης δυνάμεων Κεφ. 3.3.1).

Οι προτεινόμενες τιμές για τη σταθερή δύναμη σάρωσης στη βιβλιογραφία κυμαίνονται από 100pN έως μερικά nN (Karrasch et al. 1993, Lea et al. 1992, Rossell et al. 2003), αλλά πρέπει να τονιστεί ότι η τελική επιλογή εξαρτάται από τις συνθήκες σάρωσης. Στην περίπτωση της σάρωσης στον αέρα, η συμπύκνωση της υγρασίας πάνω στο δείγμα δημιουργεί τριχοειδείς δυνάμεις στη διεπιφάνεια ακίδας-επιφάνειας και αυξάνει την ασκούμενη δύναμη (Siedlecki et al. 1994). Αντίθετα, η σάρωση μέσα σε υγρό, επιτρέπει τον καλύτερο έλεγχο της ασκούμενης δύναμης, όπως θα σχολιαστεί και στη συνέχεια.

Η τεχνική της επαφής κρύβει και ένα άλλο μειονέκτημα για τα βιολογικά δείγματα. Καθώς αυτά συχνά συγκρατούνται με ασθενείς δυνάμεις στο υπόστρωμα, ειδικά μέσα σε υδατικά διαλύματα, η αλληλεπίδρασή τους με την ακίδα κατά τη σάρωση προκαλεί φαινόμενα δυναμικών παραμορφώσεων, τα οποία μπορούν να καταλήξουν ακόμα και σε αποκόλλησή τους (Lyubchenko et

al. 1993) (Σχήμα 2.5). Υπάρχουν διάφοροι τρόποι για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα και να ληφθούν εικόνες υψηλής ανάλυσης από βιολογικά δείγματα:

- Η φυσική τους προσκόλληση στο υπόστρωμα μέσω υδροφοβικών ή ιοντικών δυνάμεων (Fritz et al. 1995, Siedlecki et al. 1994, Wagner 1998)
- Η χημική τους πρόσδεση ύστερα από κάλυψη του υποστρώματος με κατάλληλους χημικούς προσδέτες (Facci et al. 2002, Vinckier et al. 1995, Wang et al. 2002)
- Η ενσωμάτωση τους σε ένα δυσδιάστατο πλέγμα (Fritz et al. 1997, Karrasch et al. 1994, Muller et al. 1997a).

Οι μέθοδοι αυτές είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στην περίπτωση, όπου η σάρωση γίνεται μέσα σε υγρό, έχουν όμως λιγότερη σημασία στην περίπτωση της σάρωσης στον αέρα, γιατί η ξήρανση του δείγματος συμβάλλει στην σταθεροποίηση των μορίων πάνω στο υπόστρωμα (Ortega-Vinuesa et al. 1998b).

Σχήμα 2.5. Αποκόλληση μορίων ινωδογόνου από την ακίδα, μετά τη σάρωσης ενός τμήματος $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$ της επιφάνειας με την τεχνική της επαφής με σταθερή δύναμη $>10\text{nN}$. Στη συνέχεια εικόνες ευρύτερου τμήματος της επιφάνειας, διαστάσεων $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$, ελήφθησαν με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας. (α) Πλήρες στρώμα ινωδογόνου πάνω σε επιχρυσωμένη επιφάνεια πυριτίου. (β) Μεμονωμένα μόρια ινωδογόνου πάνω σε μίκας. Και οι δύο εικόνες ελήφθησαν σε PBS.

Τεχνική ταλαντούμενης ακίδας (tapping mode)

Οι τεχνικές της μη-επαφής (non-contact mode) (Anselmetti et al. 1994) και της ταλαντούμενης ακίδας (tapping mode) (Fritz et al. 1995) γεννήθηκαν λόγω της ανάγκης απεικόνισης με υψηλή ανάλυση της τοπογραφίας δειγμάτων, τα οποία παραμορφώνονται ή αποκολλούνται εύκολα από την ακίδα κατά τη σάρωση σε επαφή. Και στις δύο τεχνικές η ακίδα κρατείται σε ελάχιστη απόσταση πάνω από το δείγμα και τίθεται μέσω του προβόλου της, με τη βοήθεια ένα

μικρού πιεζοκρυστάλλου, σε εξαναγκασμένη ταλάντωση στη συχνότητα ή πολύ κοντά στη συχνότητα συντονισμού της, η οποία τυπικά κυμαίνεται μεταξύ 50-500kHz. Λόγω της εξαναγκασμένης ταλάντωσης και ενώ η ακίδα δεν ακουμπά το δείγμα, ο πρόβολος ταλαντώνεται με ένα πλάτος, το οποίο ονομάζεται “ελεύθερο πλάτος”. Κατά τη διάρκεια της σάρωσης, η ταλαντούμενη ακίδα, η οποία έχει μετακινηθεί προς το δείγμα, πλησιάζει και απομακρύνεται περιοδικά από την επιφάνεια, ερχόμενη σε επαφή μαζί της, όταν βρίσκεται στο μέγιστο της ταλάντωσης της. Η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί μια μεταβολή της συχνότητας συντονισμού της ακίδας (Bhushan 2004) και μείωση του πλάτους ταλάντωσης της. Τότε το κύκλωμα ανάδρασης στέλνει μια διορθωτική τάση στο σαρωτή, ύστερα από σύγκριση του σήματος του φωτοαισθητήρα, ο οποίος μετρά την τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγώνου (RMS) του πλάτους ταλάντωσης σε Volts, με μία αντίστοιχη προκαθορισμένη τιμή αναφοράς. Ο σαρωτής τελικά μεταβάλλει το ύψος του, έτσι ώστε η περιοδική επαφή ακίδας-επιφάνειας να επανέλθει στο επιθυμητό επίπεδο και η ταλάντωση του προβόλου να συνεχιστεί με το αρχικό πλάτος.

Η διαφορά ανάμεσα στην τεχνική της μη-επαφής και της τεχνικής της ταλαντούμενης ακίδας, είναι ότι στην πρώτη η ακίδα ταλαντώνεται αποκλειστικά στο χώρο έλξης του δυναμικού αλληλεπίδρασης ακίδας-επιφάνειας και η “χαρτογράφηση” της επιφάνειας βασίζεται στη μείωση της έλξης χωρίς να χρειάζεται η ακίδα να χτυπήσει το δείγμα (Paolo & Garcia 2000). Αντίθετα, στη δεύτερη τεχνική η ακίδα περνά από το ελκτικό δυναμικό στο απωστικό, καθώς χτυπά περιοδικά το δείγμα (Moller et al. 1999). Η τεχνική της μη-επαφής συνεπώς, φαίνεται να πλεονεκτεί έναντι αυτής της ταλαντούμενης ακίδας. Στην πράξη όμως, η αστάθεια της λειτουργίας στο χώρο έλξης, η οποία μπορεί εύκολα να καταλήξει σε λειτουργία υπό την επίδραση απωστικών δυνάμεων (Pignataro et al. 2002), ακόμα και αν παράμετροι, όπως το ελεύθερο πλάτος ταλάντωσης, η συχνότητα διέγερσης και η τιμή RMS αναφοράς, επιλεγούν προσεκτικά (Dreier et al. 1994, Garcia & Paolo 1999), την καθιστά μια δύσκολη τεχνική, χαρίζοντας το προβάδισμα στην τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας. Εξάλλου, ακόμα και με αυτή την τεχνική, η ενέργεια παραμόρφωσης, η οποία μεταφέρεται στο δείγμα είναι ελάχιστη, δεδομένου ότι στις υψηλές συχνότητες ταλάντωσης της ακίδας τα ιξωδοελαστικά σώματα εκδηλώνουν χαρακτηριστικά δυσκαμψίας (Lantz et al. 1999, Putman, Constant A. J. et al. 1994).

Η περιοδικά ασκούμενη δύναμη στο δείγμα, μπορεί να μειωθεί, αν το σταθερό πλάτος ταλάντωσης κατά τη σάρωση ή αλλιώς, το RMS αναφοράς (set point) επιλεγεί ελάχιστα (85-95%) μικρότερο από το ελεύθερο πλάτος (Roiter et al. 2006, Wang et al. 2002). Αν και μεγαλύτερες τιμές του RMS αναφοράς είναι προτιμότερες, γιατί συνεπάγονται μικρότερη μεταφορά ενέργειας στο δείγμα και μικρότερο απαιτούμενο χρόνο, για να επανέλθει ο πρόβολος στην αδιατάρακτη

ταλάντωση του ύστερα από μια επίδραση του δείγματος, τιμές πέρα μιας μέγιστης είναι δυνατό να οδηγήσουν σε ασταθή σάρωση και απώλεια της “επαφής” ακίδας-επιφάνειας (Stark et al. 2003).

Παρόμοια είναι και η επίδραση του ελεύθερου πλάτους. Μικρές τιμές του ελαχιστοποιούν την παραμόρφωση ευπαθών δειγμάτων, κάθε φορά που ακίδα χτυπά την επιφάνεια (Lantz et al. 1999, Pignataro et al. 2002), αλλά μεγαλύτερες τιμές του κάνουν τον πρόβολο ουσιαστικά πιο στιβαρό και τη σάρωση πιο σταθερή (Bhushan 2004). Τυπικά οι τιμές του βρίσκονται στο διάστημα 10-100nm. Στο παράρτημα Α περιγράφεται ο τρόπος υπολογισμού του με τη βοήθεια της καμπύλης πλάτους-απόστασης.

Σχετικά με τις ακίδες, η καταλληλότητά τους για την τεχνική της ταλάντωσης αξιολογείται με τη βοήθεια ενός μεγέθους, το οποίο στη βιβλιογραφία εμφανίζεται με το όνομα παράγοντας Q και υπολογίζεται από τη σχέση:

$$Q = \frac{m\omega_o}{\gamma} \quad (2.8)$$

όπου m είναι η μάζα της ακίδας και του προβόλου, ω_o η συχνότητα συντονισμού τους και γ ο συντελεστής απόσβεσης της ταλάντωσης. Ο παράγοντας Q είναι αντιστρόφως ανάλογος του πλάτους της καμπύλης συντονισμού της ακίδας και μεγάλη τιμή του συνεπάγεται υψηλή ευαισθησία του πλάτους ταλάντωσης στο δυναμικό πεδίο (Bhushan 2004).

Αν και στην συγκεκριμένη έρευνα δεν χρησιμοποιήθηκε, αξίζει να αναφερθεί μια πρόσθετη τεχνική λήψης εικόνων με το AFM, η οποία βασίζεται στην τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας. Αν στη θέση του πλάτους ταλάντωσης, χρησιμοποιηθεί ως σήμα ανάδρασης και διόρθωσης η διαφορά φάσης της εξαναγκασμένης ταλάντωσης, τότε η εικόνα της τοπογραφίας μπορεί να αναπαραχθεί βάσει των μεταβολών της φάσης λόγω της αλληλεπίδρασης με την επιφάνεια (phase imaging)(Chen et al. 2000, Chen et al. 2002). Το πλεονέκτημα αυτής της παραλλαγής έγκειται στο ότι οι μεταβολές της φάσης εξαρτώνται από την απόσβεση της ενέργειας ταλάντωσης στο δείγμα. Συνεπώς, η προκύπτουσα εικόνα αναπαριστά τις ιξωδοελαστικές ιδιότητες κάθε περιοχής του δείγματος και επιτρέπει τον εντοπισμό μαλακών βιολογικών σωματιδίων πάνω σε ένα σκληρό υπόστρωμα (Garcia et al. 2007).

Λειτουργία AFM σε υγρό

Η εξάπλωση της χρήσης του AFM σε τομείς, όπως η βιοϊατρική τεχνολογία, οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη δυνατότητα του να εξετάζει δείγματα σε υγρό περιβάλλον, χωρίς να απαιτείται

κάποιου είδους προετοιμασία του δείγματος. Αυτό, το οποίο αλλάζει στη λειτουργία από τον αέρα στο υγρό, είναι η χρήση της κυψελίδας υγρού (liquid cell) για τη στήριξη της ακίδας.

Η κυψελίδα αυτή είναι κατασκευασμένη από γυαλί, ώστε να επιτρέπει τη διέλευση της δέσμης λέιζερ τόσο πριν όσο και μετά την ανάκλασή της από τον πρόβολο της ακίδας, και έχει την ικανότητα μέσω δυνάμεων επιφανειακής τάσης να συγκρατεί στο διάκενο, το οποίο σχηματίζει με το δείγμα, ελάχιστη ποσότητα υγρού (~0.5ml). Η χρήση της κυψελίδας και εν γένει του AFM με υγρό, προϋποθέτει μεγάλη προσοχή, γιατί η διαρροή υγρού πάνω στον σαρωτή απειλεί τους πιεζοκρυστάλλους του με καταστροφή. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως στο Multimode της Veeco, για αυξημένη ασφάλεια στην περιφέρεια της κυψελίδας εφαρμόζονται δακτύλιοι στεγανοποίησης από σιλικόνη. Η χρήση τους όμως, είναι καλό να αποφεύγεται, τουλάχιστο για εκείνα τα πειράματα στα οποία δεν απαιτείται συνεχής ροή υγρού, καθώς τάσεις στους δακτυλίους, εξαιτίας κακής τοποθέτησής τους, μπορούν να προκαλέσουν σχετική μετακίνηση της κυψελίδας ως προς το δείγμα και να επηρεάσουν τη λήψη των εικόνων/μετρήσεων.

Η λειτουργία του AFM σε υγρό προσφέρει τη δυνατότητα παρατήρησης βιολογικών δειγμάτων σε περιβάλλον, το οποίο προσεγγίζει σε μεγάλο βαθμό το φυσικό τους, δηλαδή μέσα σε υδατικό διάλυμα. Πέρα από τα προφανή οφέλη αυτής της δυνατότητας, υπάρχουν και κάποια άλλα, τα οποία σχετίζονται με τον έλεγχο της ασκούμενης δύναμης από την ακίδα στο δείγμα κατά τη σάρωση με την τεχνική της επαφής. Η εξέταση του δείγματος σε υδατικό περιβάλλον απαλείφει τις προερχόμενες από την ατμοσφαιρική υγρασία τριχοειδείς δυνάμεις (Bhushan 2004), οι οποίες πιέζουν την ακίδα πάνω στο δείγμα, και επιτρέπουν τη σταθερή επαφή ακίδας-επιφάνειας με την ελάχιστη δυνατή εφαρμοζόμενη δύναμη (Lyubchenko et al. 1993, Siedlecki et al. 1994).

Αυτό προϋποθέτει την κατάλληλη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων ακίδας-επιφάνειας, ώστε να επιτυγχάνεται η ισορροπία μεταξύ αυτών και της εφαρμοζόμενης δύναμης από την ακίδα, η οποία υπενθυμίζεται ότι χάρη στον πρόβολο της λειτουργεί σαν ένα μικρό ελατήριο. Οι κυριότερες δυνάμεις, οι οποίες συμβάλλουν στην εξισορρόπηση της εφαρμοζόμενης από την ακίδα δύναμης είναι οι ηλεκτροστατικές και οι van der Waals (Σχήμα 2.6). Οι πρώτες είναι μεγάλου εύρους, συνήθως απωστικές και εξισορροπούν σε μεγάλο βαθμό την ασκούμενη από την ακίδα δύναμη, εξασφαλίζοντας παράλληλα τη σταθερή επαφή της ακίδας με την επιφάνεια. Οι δεύτερες, οι van der Waals, είναι ελκτικές, μικρότερου εύρους και σε αυτές οφείλεται η αντίθεση των χαρακτηριστικών στις απεικονίσεις υψηλής ανάλυσηςⁱ (Muller et al. 1999).

ⁱ Lindsay S., The Scanning Probe Microscope in biology, <http://green.la.asu.edu/review/content.htm>

Σχήμα 2.6. Σχηματική αναπαράσταση δυνάμεων αλληλεπίδρασης μεταξύ της ακίδας και ενός βιολογικού δείγματος σε υγρό. Οι μεγάλοι εύρους ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ του κύριου σώματος της ακίδας και της επιφάνειας αντισταθμίζουν την εφαρμοζόμενη από τον πρόβολο δύναμη, ενώ οι δυνάμεις van der Waals, μεταξύ του υποστρώματος και της κορυφής της, συνεισφέρουν στην ανάλυση των λεπτομερειών (Muller et al. 1999).

Από τα παραπάνω προκύπτει, ότι η απόσταση της ακίδας από την επιφάνεια για τη θέση, όπου η προκαθορισμένη δύναμη σάρωσης (set point) εξισορροπείται από τα δυναμικά πεδία της επιφάνειας και της ακίδας, εξαρτάται από το σχετικό μέγεθος των ηλεκτροστατικών δυνάμεων ως προς τις δυνάμεις van der Waals. Το πόσο πιστά θα διαγράψει η ακίδα την τοπογραφία και το αν η εικόνα, η οποία θα ληφθεί, θα αντιπροσωπεύει την πραγματική επιφάνεια εξαρτάται από τις ίδιες δυνάμεις (Muller & Engel 1997b). Αν μάλιστα συνυπολογιστεί η επίδραση της ιοντικής ισχύος ή του pH στο εύρος των ηλεκτροστατικών δυνάμεων (Κεφ. 2.2.3), προκύπτει ότι η διακριτική ανάλυση της εικόνας καθώς και το ύψος των αναπαριστώμενων χαρακτηριστικών εξαρτώνται από τις τιμές αυτών των μεγεθών για το χρησιμοποιούμενο διάλυμα. Συνεπώς, οι ιδιότητες του διαλύματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως παράμετροι βελτιστοποίησης της ανάλυσης των εικόνων (Rossell et al. 2003) ή μέτρησης του επιφανειακού φορτίου του δείγματος (Heinz & Hoh 1999a, Taboada-Serrano et al. 2005). Σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην αξιολόγηση των εικόνων, οι οποίες λαμβάνονται με την τεχνική της επαφής, καθώς υψομετρικές μεταβολές σε αυτές δεν σημαίνουν απαραίτητα αλλαγή της τοπογραφίας αλλά μεταβολές στη δύναμη αλληλεπίδρασης.

Αναφορικά με τη τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας από την άλλη μεριά, οι ιδιαιτερότητες, τις οποίες εισάγει η λειτουργία του AFM σε υγρό, αφορούν κυρίως την ακίδα. Ενώ στον αέρα με την τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται ακίδες Si με ορθογώνιο πρόβολο, λόγω των υψηλών συχνοτήτων συντονισμού τους (βλ. συσχέτιση με παράγοντα Q), η ψαθυρότητά τους τις καθιστά

ακατάλληλες για χρήση σε υγρό, καθώς σπάνια αντέχουν την επιφανειακή τάση στη διεπιφάνεια υγρού-αέρα, τη στιγμή της εμβάπτισης. Έτσι στο υγρό χρησιμοποιούνται ακίδες Si_3N_4 , όμοιες με αυτές που χρησιμοποιούνται με την τεχνική της επαφής.

Μία άλλη ιδιαιτερότητα της τεχνικής της ταλαντούμενης ακίδας στο υγρό είναι η έντονη απόσβεση της ταλάντωσης εξαιτίας των υδροδυναμικών φαινομένων, η οποία εκφράζεται με μείωση του παράγοντα Q κατά μία τάξη μεγέθους και γίνεται αντιληπτή από τη μείωση της συχνότητας συντονισμού της ακίδας (Dreier et al. 1994). Εκτός από το συντελεστή απόσβεσης της ταλάντωσης στο υγρό, η συχνότητα συντονισμού στο υγρό καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό και από τις ιδιοσυχνότητες της κυψελίδας υγρού, αφού ο πιεζοκρυστάλλος, ο οποίος οδηγεί την ταλάντωση διεγείρει και αυτή. Εναλλακτικά, για την αποφυγή επιδράσεων από την ταλάντωση ολόκληρης της κυψελίδας, η ταλάντωση μπορεί να οδηγηθεί μαγνητικά (Han et al. 1996) και στην περίπτωση αυτή, η ακίδα πρέπει να έχει μαγνητικές ιδιότητες. Αυτή η μέθοδος οδήγησης, αν και πιο πολύπλοκη, προσελκύει το ενδιαφέρον σε περιπτώσεις, όπου απαιτείται υψηλή ακρίβεια στον έλεγχο της συχνότητας διέγερσης, για παράδειγμα στην τεχνική της μη-επαφής, ενώ για την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας η ακουστική οδήγηση με πιεζοκρυστάλλο κρίνεται ικανοποιητική.

Η σάρωση με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας σε υγρό παρουσιάζει ισχυρά πλεονεκτήματα για τη μελέτη βιολογικών δειγμάτων και ειδικότερα πρωτεϊνών σε επιφάνειες. Η λήψη των εικόνων γίνεται σε περιβάλλον υδατικού διαλύματος, οι ιδιότητες του οποίου μπορούν μάλιστα να ρυθμιστούν, ώστε οι συνθήκες να προσεγγίζουν όσο το δυνατό περισσότερο τις φυσιολογικές. Η εξέταση του δείγματος χωρίς κάποιου είδους προετοιμασία προσφέρει τη δυνατότητα παρατήρησης δυναμικών φαινομένων, αν και για την προσρόφηση των πρωτεϊνών, η οποία είναι μια ταχύτατη διαδικασία, αυτό περισσότερο ισοδυναμεί με τη δυνατότητα καταγραφής μοριακών αλληλεπιδράσεων μέσω της τεχνικής μέτρησης δυνάμεων παρά τη διαδοχική λήψη εικόνων. Εξάλλου, όπως αναφέρθηκε ήδη, η τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας εξασφαλίζει την απεικόνιση των προσροφημένων μορίων με την άσκηση της μικρότερης αναγκαίας δύναμης σε αυτά, ελαχιστοποιώντας τον κίνδυνο παραμόρφωσης ή αποκόλλησης τους.

Για όλους τους παραπάνω λόγους η λήψη των εικόνων από τα προσροφημένα μόρια ινωδογόνου πάνω στην επιφάνεια της μίκας σε μεταβαλλόμενες συνθήκες pH και ιοντικής ισχύος έγινε με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας μέσα σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS). Τα ιδιαίτερα τεχνικά χαρακτηριστικά του AFM, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στα συγκεκριμένα πειράματα, μαζί με τη μεθοδολογία προετοιμασίας των δειγμάτων και λήψης των εικόνων θα περιγραφούν στις παραγράφους, οι οποίες ακολουθούν.

2.4 Πειραματική μεθοδολογία

2.4.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Το ινωδογόνο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα αυτής της διατριβής, αγοράστηκε από τη Sigma-Aldrich (fibrinogen from human plasma, ~60% protein, >80% clottable) σε λυοφιλοποιημένη μορφή και μέχρι τη στιγμή της χρήσης του, για την προστασία του από την ατμοσφαιρική υγρασία, διατηρούνταν στους -20°C . Για την αποφυγή μάλιστα της προσρόφησης υγρασίας κατά τα διαδοχικά ανοίγματα του φιαλιδίου, η αρχική ποσότητα διαμοιραζόταν άπαξ σε μερίδες των 10mg σε περιβάλλον ξηρού αζώτου και φυλασσόταν σε στεγανά φιαλίδια στους -20°C . Σε κάθε πείραμα ανοιγόταν ένα από τα φιαλίδια και η σκόνη, που περιείχε, διαλυόταν σε PBS 5mM pH7.4 για το σχηματισμό διαλύματος συγκέντρωσης 1mg/ml. Στη συνέχεια το διάλυμα της πρωτεΐνης αραιωνόταν σε τελική συγκέντρωση 0.1μg/ml στον κατάλληλο διαλύτη.

Για τη μελέτη της επίδρασης της ιοντικής ισχύος στην αλληλεπίδραση του ινωδογόνου με την επιφάνεια, η προσρόφηση πραγματοποιήθηκε από τρία διαφορετικά διαλύματα 5mM PBS pH 7.4, με τελική συγκέντρωση αλάτων, ύστερα από προσθήκη NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 15, 150 και 500mM. Αντίστοιχα, για τη μελέτη της επίδρασης του pH, χρησιμοποιήθηκαν τρία διαλύματα PBS τελικής συγκέντρωσης αλάτων 150mM με pH 3.5, 5.8 και 7.4. Όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάζονταν με τριπλά αποσταγμένο νερό, διηθούνταν με μεμβράνες νιτρικής κυτταρίνης (nitrocellulose, CN, Nalgene, NY, U.S.), οι οποίες είχαν πόρους 0.2μm και συντηρούνταν στους 4°C , ενώ η διαχείρισή τους γινόταν υπό στείρες συνθήκες, δηλαδή στρωτή ροή φιλτραρισμένου αέρα.

Ως υπόστρωμα για την προσρόφηση του ινωδογόνου χρησιμοποιήθηκε μίκα, η οποία αγοράστηκε από την Pelco International, U.S. σε μορφή δισκίων διαμέτρου 9.9 mm. Η επιλογή του συγκεκριμένου υλικού καθώς και των καλυπτρίδων γυαλιού, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στα επόμενα πειράματα, υποδείχθηκε από τις ανάγκες της μικροσκοπίας AFM. Συγκεκριμένα ήταν απαραίτητη η χρήση μιας ατομικά λείας και καθαρής επιφάνειας (Σχήμα 2.7), πάνω στην οποία οι προσροφημένες πρωτεΐνες θα διακρίνονταν από τη διαφορά ύψους. Πριν ακριβώς ξεκινήσει η προετοιμασία των δειγμάτων τα δισκία της μίκας αποσχίζονταν στη μέση, κατά το πάχος τους, δίνοντας δύο καθαρές και ατομικά λείες επιφάνειες. Πέντε τέτοια δείγματα εμβαπτιζόνταν αρχικά σε καθαρό PBS για 30 λεπτά, προκειμένου να επέλθει ισορροπία στη διεπιφάνεια υγρού-μίκας και στη συνέχεια στο αντίστοιχο διάλυμα της πρωτεΐνης. Ύστερα από μία ώρα, τα δείγματα ξεπλένονταν

τρεις φορές με καθαρό PBS, ίδιων χαρακτηριστικών με αυτό, το οποίο χρησιμοποιούταν για την προσρόφηση και μεταφέρονταν στο AFM. Όλη η διαδικασία της προετοιμασίας των δειγμάτων καθώς και η εξέτάσή τους στο AFM πραγματοποιούταν σε θερμοκρασία δωματίου.

Σχήμα 2.7. Εικόνα AFM από επιφάνεια μίκας διαστάσεων $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ (τεχνική ταλαντούμενης ακίδας μέσα σε PBS). Η επιφάνεια φαίνεται λεία και καθαρή, αν εξαιρεθούν ελάχιστα σωματίδια, τα οποία προέρχονται πιθανότατα από το διάλυμα. Κλίμακα ύψους 5nm.

2.4.2 Το Nanoscope III Multimode AFM

Για τη λήψη εικόνων από τα μεμονωμένα μόρια ινωδογόνου, τα οποία είχαν προσροφηθεί στην επιφάνεια της μίκας, χρησιμοποιήθηκε το AFM Multimode της Digital Instruments, Veeco. Το Multimode, είναι από τα πιο εύχρηστα και ευέλικτα όργανα της κατηγορίας του λόγω της δυνατότητάς του με μικρές προσθήκες να χρησιμοποιείται για ένα πλήθος διαφορετικών τεχνικών Μικροσκοπίας Ατομικής Δύναμης, από τη μικροσκοπία σήραγγας ως την τεχνική της μαγνητικής δύναμης.

Η κεντρική διάταξη σάρωσης και λήψης των μετρήσεων φαίνεται στο Σχήμα 2.8. Διακρίνεται η κεφαλή, στην οποία εφαρμόζει ο βραχίονας συγκράτησης της ακίδας ή η κυψελίδα υγρού, ανάλογα με της συνθήκες λειτουργίας, ο σαρωτής, τύπου J στη συγκεκριμένη περίπτωση (για τεχνικές προδιαγραφές βλ. Κεφ. 2.3.1) και η βάση του οργάνου με τις δύο οθόνες ψηφιακών ενδείξεων. Η επάνω εμφανίζει την κάμψη της ακίδας στον κατακόρυφο άξονα για την τεχνική της επαφής ή το RMS του πλάτους ταλάντωσης για την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας, όπως αυτά καταγράφονται με τη μορφή τάσης από το φωτοαισθητήρα, ο οποίος βρίσκεται στην κεφαλή. Η κάτω οθόνη εμφανίζει την οριζόντια κάμψη της ακίδας για την τεχνική της επαφής ή την κατακόρυφη κάμψη της για την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας πάντα σε Volts, καθώς και το συνολικό σήμα του φωτοαισθητήρα. Οι ενδείξεις αυτές είναι χρήσιμες τόσο για την προκαταρκτική ευθυγράμμιση της δέσμης του λέιζερ πάνω στον πρόβολο και της ανάκλασής της στο φωτοαισθητήρα όσο και για την παρακολούθηση της κατάστασης της ακίδας κατά τη σάρωση.

Σχήμα 2.8. Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης τύπου Multimode της Veeco, Santa Barbara, US. (Α) Κεφαλή, η οποία φέρει το βραχίονα συγκράτησης της ακίδας (Δ) και το φωτοαισθητήρα για την καταγραφή της θέσης της δέσμης του λέιζερ. (Β) Σαρωτής για τον έλεγχο της οριζόντιας και κατακόρυφης θέσης του δείγματος. (Γ) Οθόνες ψηφιακών ενδείξεων.

Η μονάδα ελέγχου, η οποία χρησιμοποιήθηκε με το Multimode για τις ανάγκες των πειραμάτων, ήταν τύπου Nanoscope III, επίσης της Digital Instruments, και επικοινωνούσε με ένα ηλεκτρονικό υπολογιστή. Για τη διαχείριση του AFM και του συστήματος ελέγχου του χρησιμοποιήθηκε η έκδοση 4.23r6 του λογισμικού Nanoscope.

2.4.3 Τεχνικές λεπτομέρειες λήψης εικόνων με AFM

Όπως αναφέρθηκε ήδη, οι εικόνες των προσροφημένων μορίων ινωδογόνου ελήφθησαν με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας μέσα σε υγρό. Κάθε δείγμα εξετάστηκε σε καθαρό PBS αντίστοιχο με αυτό, το οποίο χρησιμοποιήθηκε κατά την προετοιμασία του. Η κυψελίδα υγρού χρησιμοποιήθηκε χωρίς τους στεγανωτικούς δακτυλίους, ενώ η εποπτεία της επιφάνειας και της ακίδας μέσα στο διάλυμα γινόταν με τη βοήθεια ενός στερεοσκοπίου Zeiss, Stemi 2000-C, το οποίο είχε προσαρμοστεί πάνω από την κεφαλή του Multimode. Τα δείγματα κολλούσαν με αυτοκόλλητη ταινία διπλής όψης στην επιφάνεια ενός μαγνητικού μεταλλικού δίσκου, ο οποίος στη συνέχεια ακινητοποιούνταν στην ειδική θέση, στην κορυφή του σαρωτή.

Οι ακίδες, κατασκευασμένες από νιτρίδιο του πυριτίου (Si_3N_4), ήταν τύπου NP-S και αγοράστηκαν από τη VeecoProbes. Από τις τέσσερις διαθέσιμες ακίδες κάθε φορέα, χρησιμοποιούνταν αυτές με προβόλους διαστάσεων είτε $115\mu\text{m}$ (μήκος), $17\mu\text{m}$ (πλάτος) είτε $115\mu\text{m}$, $25\mu\text{m}$ (βλ. Πίνακα 2.2). Αφού καθαρίζονταν με εμβάπτιση για 30s σε διάλυμα πιράνχα, 60% H_2SO_4 (98% κατ'όγκον, Merck), 40% H_2O_2 (30% κατ'όγκον, Merck) και ξεπλένονταν με αποσταγμένο και φιλτραρισμένο νερό, στερεώνονταν στην ειδική υποδοχή της κυψελίδας. Όπου χρειάστηκε να

ληφθεί εικόνα με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας σε αέρα, χρησιμοποιήθηκαν ακίδες πυριτίου τύπου OMCL AC240 TS της Olympus.

Τυπικές τιμές των κυριότερων παραμέτρων ελέγχου της σάρωσης, όπως αυτές εισάγονταν στο λογισμικό Nanoscope, εμφανίζονται στον Πίνακα 2.4. Το RMS αναφοράς του πλάτους ταλάντωσης, αν και ρυθμιζόταν αυτόματα από το πρόγραμμα ως ποσοστό του αρχικού ελεύθερου πλάτους (85-90%), συνηθιζόταν να μειώνεται χειροκίνητα μετά την εμπλοκή ακίδας-επιφάνειας αλλά και στη συνέχεια, κατά τη διάρκεια της σάρωσης, για να λαμβάνεται καλύτερη εικόνα του δείγματος (Moller et al. 1999). Το ελεύθερο πλάτος ως εξαρτημένη μεταβλητή της τάση οδήγησης, η οποία στην πλειονότητα των πειραμάτων οριζόταν περίπου 1Volt, είχε τιμή, σε μονάδες τάσης στο φωτοαισθητήρα, γύρω στο 1Volt και σε μονάδες φυσικού μήκους, 10-20 nm (για τον υπολογισμό του βλ. Παράρτημα Α).

Η συχνότητα συντονισμού, καθοριζόμενη από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των χρησιμοποιούμενων ακίδων αλλά κυρίως τις υδροδυναμικές αποσβέσεις από το περιβάλλον διάλυμα, ήταν σε όλες τις περιπτώσεις γύρω στα 9kHz. Η συχνότητα οδήγησης όμως ρυθμιζόταν σε μία τιμή κατά 5% μικρότερη από τη συχνότητα συντονισμού, καθώς έτσι επιτυγχανόταν καλύτερος έλεγχος του συντονισμού της ταλάντωσης στη διεπιφάνεια (Anselmetti et al. 1994).

Αναφορικά με το ρυθμό σάρωσης (scan rate) έχει παρατηρηθεί, ότι χαμηλές τιμές, μικρότερες του 1Hz, δίνουν κακή ποιότητα εικόνων εξαιτίας της αστάθειας του σαρωτή (drift), η επίδραση της οποίας είναι τόσο μεγαλύτερη όσο πιο αργή είναι η σάρωσηⁱⁱ. Συνεπώς, προτιμήθηκαν σχετικά υψηλοί ρυθμοί σάρωσης, 2-5Hz, παρόμοιοι με αυτούς που προτείνονται στη βιβλιογραφία (Facci et al. 2002, Moller et al. 1999, Ta et al. 1998, Wang et al. 2002). Στις υψηλές αυτές ταχύτητες σάρωσης χρειαζόταν συνήθως να μειώνεται το RMS αναφοράς και να αυξάνονται οι ενισχύσεις του σήματος στο βρόγχο ανάδρασης, για να εξασφαλιστεί γρηγορότερη ανάδραση (Abdelhady et al. 2005). Με αφετηρία τις προτεινόμενες τιμές 0.5 και 0.75 για την αναλογική ενίσχυση και την ενίσχυση ολοκλήρωσης αντίστοιχα, και οι δύο ενισχύσεις αυξάνονταν σταδιακά, με σταθερή αναλογία μεταξύ τους 1.2, μέχρι το σημείο εκείνο, για το οποίο δεν εμφανιζόταν στην εικόνα θόρυβος, με τη μορφή υψίσυχνων διακυμάνσεων (aliasing). Οι μέγιστες αυτές τιμές ήταν συνήθως 1 και 1.2 αντίστοιχα.

Εικόνες διαφόρων περιοχών της επιφάνειας των δειγμάτων, διαστάσεων 5μm x 5μm ή 1μm x 1μm, λαμβάνονταν μέσω των σημάτων του πλάτους ταλάντωσης και του ύψους. Η κατακόρυφη

ⁱⁱ βλ. ιστοσελίδα: <http://spmlist.di.com/pipermail/spm/2005-May/000324.html>

κλίμακα των εικόνων είχε μέγιστη τιμή τα 5nm. Τουλάχιστον τέσσερα διαφορετικά δείγματα ετοιμάστηκαν για κάθε μία από τις τιμές της ιοντικής ισχύος και του pH και σε κάθε ένα από αυτά ελήφθησαν εικόνες από διάφορες περιοχές.

Πίνακας 2.4. Τυπικές τιμές για τις παραμέτρους ελέγχου της σάρωσης των δειγμάτων προσροφημένου ινωδογόνου πάνω σε μίκα με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας σε PBS.

Παράμετρος		Τυπική τιμή
Ρυθμός σάρωσης	Scan rate	2-5Hz
Γωνία σάρωσης	Scan angle	0°
Αναλογική ενίσχυση σήματος	Proportional gain	0.5→1
Ενίσχυση ολοκλήρωσης	Integral gain	0.75→1.2
Ενίσχυση πρόβλεψης	Look-ahead gain	0
Κλίμακα z	Z limit	55V
Τάση οδήγησης	Drive amplitude	1V
Ελεύθερο πλάτος	Free Amplitude	~1 V
RMS πλάτους ταλάντωσης	RMS set point	~0.75V
Συχνότητα συντονισμού	Drive Frequency	~9kHz
Εξομάλυνση εικόνας κατά τη σάρωση	Real time plane-fit	Line
Εξομάλυνση εικόνας κατά την αποθήκευση	Off-line plane-fit	none

2.4.4 Επεξεργασία εικόνων και μετρήσεων

Από τις δυο απεικονίσεις, οι οποίες λαμβάνονταν σε κάθε σάρωση μόνο αυτή, η οποία αντιστοιχούσε στο σήμα ύψους, χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή συμπερασμάτων και μετρήσεων, καθώς τα υψομετρικά δεδομένα στην απεικόνιση με βάση τις μεταβολές του πλάτους ταλάντωσης δεν ανταποκρίνονται σε πραγματικά μεγέθη. Η επεξεργασία των εικόνων και ο υπολογισμός της επιφανειακής κάλυψης από τα μεμονωμένα μόρια ινωδογόνου έγιναν με τη βοήθεια του προγράμματος Nanoscope III 5.12r2, με εξαίρεση τις περιπτώσεις της τρισδιάστατης απεικόνισης των μορίων, για τις οποίες χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα WSxM 4.0 Develop 7.1 της Nanotec Electronica S.L.

Οι εικόνες δεν υποβλήθηκαν σε φιλτράρισμα κατά την αποθήκευση. Το πρώτο βήμα στην επεξεργασία τους ήταν η απαλοιφή ενδεχόμενης πλαστής κλίσης ή κυρτότητας με την εφαρμογή της εντολής “flattening”, ύστερα από επιλεκτική εξαίρεση των περιοχών, οι οποίες καλύπτονταν από προσροφημένα μόρια. Αυτό γινόταν για να διατηρηθεί το επίπεδο αναφοράς στο ύψος του υποστρώματος και να μην παραποιηθούν τα υψομετρικά δεδομένα.

Πέρα από την παρατήρηση της διάταξης και της δομής των προσροφημένων μορίων πάνω στη μίκα οι εικόνες, οι οποίες ελήφθησαν, χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση της επιφανειακής κάλυψης λόγω προσρόφησης στις διάφορες συνθήκες pH και ιοντικής ισχύος. Η κατανομή του αριθμού των προσροφημένων μορίων ινωδογόνου ως προς το εμβαδό της προβολής τους πάνω στην επιφάνεια, υπολογίστηκε με τη βοήθεια της εντολής “grain size”, αφού ορίστηκε η απαιτούμενη υψομετρική διαφορά από το υπόστρωμα για τα σωματίδια, τα οποία θα λαμβάνονταν υπόψη στην ανάλυση. Με την εντολή αυτή υπολογίστηκε η μέση τιμή του εμβαδού και ο συνολικός αριθμός των μορίων για κάθε εικόνα. Η αντίστοιχη επιφανειακή κάλυψη προέκυψε ύστερα από διαίρεση του γινόμενου αυτών των δύο μεγεθών με τη συνολική επιφάνεια της εικόνας ($25\mu\text{m}^2$).

Η στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων έγινε με το πρόγραμμα SPSS 12.0. Συγκεκριμένα, για κάθε ομάδα εικόνων υπολογίστηκαν η μέση επιφανειακή κάλυψη και η τυπική απόκλιση. Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών, οι οποίες παρατηρήθηκαν ανάμεσα στις διάφορες συνθήκες προσρόφησης, εκτιμήθηκε με τη βοήθεια της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA), αφού πρώτα ελέγχθηκε η κανονικότητα των δειγμάτων.

2.5 Αποτελέσματα

2.5.1 Εικόνες μεμονωμένων μορίων ινωδογόνου

Οι πρώτες απόπειρες λήψης εικόνας από τα προσροφημένα μόρια ινωδογόνου πάνω στην επιφάνεια της μίκας απέδειξαν με τον πιο προφανή τρόπο την επίδραση της γεωμετρίας της κορυφής της ακίδας στην αναπαραγόμενη τοπογραφία. Η εικόνα του Σχήματος 2.9α ελήφθη από δείγμα γυαλιού, πάνω στο οποίο είχε προσροφηθεί ινωδογόνο από διάλυμα $10\text{ }\mu\text{g/ml}$. Αντί για μεμονωμένα μόρια με τη αναμενόμενη επιμήκη μορφή, η εικόνα εμφανίζει επαναλαμβανόμενα τριγωνικά σωματίδια, με κοινό προσανατολισμό. Παρόμοια σωματίδια φαίνονται και στην εικόνα του Σχήματος 2.9β, η οποία ελήφθη από προσροφημένα μόρια μεταφερίνης (transferrin)(Bergkvist et al. 2001) πάνω σε γυαλί.

Σχήμα 2.9. (α) Εσφαλμένη απεικόνιση μορίων ινωδογόνου πάνω σε γυαλί λόγω της επίδρασης της γεωμετρίας της ακίδας ($1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$, τεχνική ταλαντούμενης ακίδας στον αέρα, ακίδα OMCL AC240TS) (β) Παρόμοια επίδραση κατά τη σάρωση μορίων μεταφερίνης σε υπόστρωμα γυαλιού ($3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$, λοιπές παράμετροι ίδιες με (α)).

Αυτού του είδους οι εικόνες, με επαναλαμβανόμενα χαρακτηριστικά, ο προσανατολισμός των οποίων μάλιστα αλλάζει ανάλογα με σχετική γωνία της ακίδας ως προς τη διεύθυνση σάρωσης, είναι ενδεικτικές της ύπαρξης γεωμετρικών ατελειών στην κορυφή της ακίδας. Οι ατέλειες στις ακίδες προέρχονται είτε από σφάλμα στην κατασκευή τους -τέτοιο παράδειγμα είναι οι διπλές κορυφές (Σχήμα 2.10)- είτε από θραύση κατά τη χρήση τους είτε τέλος, από μόλυνσή τους κατά τη σάρωση σωματιδίων ασθενώς ακινητοποιημένων στην επιφάνεια του δείγματος. Το αποτέλεσμα της σάρωσης μιας επιφάνειας με μία τέτοια ακίδα είναι η συνέλιξη των γεωμετρικών χαρακτηριστικών της ακίδας με αυτά της τοπογραφίας και τελικά η σύνθεση μιας παραπλανητικής εικόνας του δείγματος, στην οποία αναπαράγεται το περίγραμμα της ακίδας (Σχήμα 2.11) (Chen et al. 1997, Williams et al. 1996).

Σχήμα 2.10 (α) Εικόνα Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου (SEM) από ακίδα Si_3N_4 (NP-S, Veecoprobes) (β) Εικόνα από παρόμοια ακίδα με ελάττωμα διπλής κορυφής.

Αν και είναι δυνατή η διόρθωση των εικόνων με βάση την πραγματική γεωμετρία της χρησιμοποιούμενης ακίδας, για το σκοπό αυτό απαιτείται βαθμονόμησή της μέσω σάρωσης σωματιδίων γνωστών διαστάσεων (Abdelhady et al. 2005) ή έστω μια διαδικασία μαθηματικής διόρθωσης των ψηφιακών στοιχείων των αποθηκευμένων εικόνων (Villarrubia 1996). Έτσι, στην πράξη προτιμάται η προσεκτική επιλογή των ακίδων και η απόρριψη όσων μοιάζουν ελαττωματικές, παρά η εκ των υστέρων διόρθωση των εικόνων και η τακτική αυτή ακολουθήθηκε και στα συγκεκριμένα πειράματα.

Σχήμα 2.11. Η σάρωση ενός αιχμηρού τοπογραφικού χαρακτηριστικού (α) με την ακίδα αναπαράγει μια αντεστραμμένη εικόνα της ακίδας, η οποία επαναλαμβάνεται για κάθε κορυφή στην τοπογραφία (β, γ). (δ) Η παραγόμενη εικόνα είναι συνεπώς, το περίγραμμα επικαλυπτόμενων εικόνων αναπαράστασης της ακίδας. (ε, στ, ζ) Σάρωση με ακίδα, που έχει διπλή κορυφή προκαλεί την εμφάνιση περισσότερων τοπικών μέγιστων στην εικόνα από αυτά που πραγματικά υπάρχουν. Προσαρμογή σχήματος από (Williams et al. 1996).

Οι ληφθείσες εικόνες έδειξαν την προσρόφηση ανεξάρτητων μορίων ινωδογόνου πάνω στην επιφάνεια της μίκας για συγκέντρωση διαλύματος 0.1μg/ml και για όλες τις συνθήκες pH και ιοντικής ισχύος, οι οποίες δοκιμάστηκαν (Σχήμα 2.12α). Όταν η συγκέντρωση του διαλύματος αυξήθηκε στο 1μg/ml τα μόρια άρχισαν να μην διακρίνονται το ένα από το άλλο (Σχήμα 2.12β), ενώ για συγκέντρωση 10μg/ml η κάλυψη του υποστρώματος από προσροφημένη πρωτεΐνη ήταν πλήρης (Σχήμα 2.12γ). Στις εικόνες διαστάσεων 5μm x 5μm τα προσροφημένα μόρια φαίνονται διάσπαρτα σε όλη την εξεταζόμενη επιφάνεια, χωρίς ιδιαίτερη προτίμηση για συγκεκριμένες περιοχές. Σωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους από τα υπόλοιπα, τα οποία παρατηρήθηκαν σε κάποιες περιπτώσεις, θεωρούνται συσσωματώματα πρωτεΐνης.

Σχήμα 2.12. (α) Μεμονωμένα μόρια ινωδογόνου προσροφημένα πάνω σε μίκας από διάλυμα συγκέντρωσης 0.1μg/ml σε PBS. (β) Προσροφημένα μόρια από διάλυμα συγκέντρωσης 1μg/ml. (γ) Πλήρες στρώμα προσροφημένου ινωδογόνου από διάλυμα συγκέντρωσης 10μg/ml. Όλες οι εικόνες ελήφθησαν με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας (NP-S) σε PBS, έχουν διαστάσεις 5μm x 5 μm και μέγιστο ύψος 5nm.

Για την καλύτερη παρατήρηση της μορφής και της διάταξης των προσροφημένων μορίων η σάρωση περιορίστηκε σε περιοχές διαστάσεων 1μm x 1μm. Οι σχετικές εικόνες ωστόσο, δεν κατόρθωσαν αποδώσουν την ενδομοριακή δομή του ινωδογόνου καθώς τα προσροφημένα μόρια εμφανίζονταν σφαιροειδή με ακανόνιστο σχήμα και μέση διάμετρο 25nm (Σχήμα 2.13).

Σχήμα 2.13. Εικόνα AFM προσροφημένων μορίων ινωδογόνου πάνω σε μίκας ληφθείσα με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας μέσα σε PBS. Η απεικόνιση της μοριακής δομής της πρωτεΐνης στάθηκε αδύνατη. Διαστάσεις εικόνας 1μm x 1μm, ύψος 5nm.

Μόνο ύστερα από αλληπάλληλες δοκιμές, με καινούργιες ακίδες κάθε φορά, έγινε δυνατό να ληφθούν κάποιες εικόνες με την προσδοκώμενη ανάλυση. Οι εικόνες αυτές αποκάλυψαν την τυπική επιμήκη δομή του ινωδογόνου με τους τρεις σφαιρικούς τομείς του να ξεχωρίζουν αμυδρά και συνολικό μήκος περί τα 42nm (Σχήμα 2.14α). Η προσπάθεια να αυξηθεί η ανάλυση των εικόνων μειώνοντας την επιφάνεια σάρωσης, σε 500nm x 500nm, έδωσε σχετικά καλύτερα αποτελέσματα (Σχήμα 2.14β και γ), αλλά περαιτέρω μείωση των διαστάσεων σάρωσης κρίθηκε άσκοπη λόγω της αύξησης του θορύβου και των επιδράσεων της αστάθειας του σαρωτή στις μετρήσεις.

Σχήμα 2.14. Προσροφημένα μόρια ινωδογόνου πάνω σε μίκας με εμφανή τη μοριακή δομή τους με τους τρεις σφαιρικούς τομείς. Οι εικόνες ελήφθησαν με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας μέσα σε PBS (α) ή HEPES (β). Διαστάσεις εικόνων: (α) $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$, (β) $500\text{nm} \times 500\text{nm}$, ύψος 5nm . (γ) Τρισδιάστατη απεικόνιση μορίων από τμήμα της εικόνας (β).

Οι επιτυχείς αυτές σαρώσεις, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν κυρίως με διάλυμα PBS 150mM pH 7.4, δεν στάθηκε δυνατό να επαναληφθούν συστηματικά σε όλες τις εξεταζόμενες συνθήκες και συνεπώς, δεν μπορεί να γίνει σύγκριση της μοριακής διάταξης του προσροφημένου ινωδογόνου στις διάφορες τιμές pH και ιοντικής ισχύος. Εντούτοις, αντίστοιχες απόπειρες, χρησιμοποιώντας το HEPES 10mM pH 7.4 ως ρυθμιστικό διάλυμα προσρόφησης και εξέτασης στο AFM, κάποιες από τις οποίες ήταν επιτυχείς (Σχήμα 2.14β), απέδειξαν ότι η δυνατότητα απεικόνισης της μοριακής δομής του προσροφημένου ινωδογόνου δεν περιορίζεται από τη χρήση του PBS, αλλά εξαρτάται περισσότερο από την καθαρότητα και την ακρίβεια κατασκευής της ακίδας.

Οι προσπάθειες λήψης εικόνων από τη μοριακή δομή του προσροφημένου ινωδογόνου συνεχίστηκαν και μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων διερεύνησης της επίδρασης του pH και της ιοντικής ισχύος στην προσρόφηση. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι το ινωδογόνο προσροφάται με τη φυσική επιμήκη μορφή του, όχι μόνο πάνω στη μίκας, αλλά και σε επιφάνεια καθαρού γυαλιού από καλυπτρίδες μικροσκοπίου (Σχήμα 2.15α) ή γυαλιού τροποποιημένου χημικά με αιθανολαμίνη για την προσθήκη αμινομάδων στην επιφάνειαⁱⁱⁱ (βλ. κεφ 4.2.2) (Σχήμα 2.15β). Σε σχέση μάλιστα, με την καθαρή επιφάνεια, η τροποποιημένη με αμινομάδες επιφάνεια, αποδείχτηκε καταλληλότερο υπόστρωμα για την ισχυρή πρόσδεση του ινωδογόνου και την αποφυγή της αποκόλλησης των μορίων κατά τη σάρωση λόγω της παρουσίας των θετικά φορτισμένων ομάδων και την επαγόμενης υψηλότερης υδροφοβικότητας. Φάνηκε όμως, ότι η επιμήκης διάταξη της πρωτεΐνης διατηρείται

ⁱⁱⁱ Πληροφορίες για την τροποποίηση των επιφανειών με αιθανολαμίνη δίνονται στην παράγραφο 4.2.2.

μόνο σε υδατικό διάλυμα, γιατί εικόνες από δείγματα ινωδογόνου πάνω σε καθαρό γυαλί, οι οποίες ελήφθησαν μετά από στέγνωμα στον αέρα, έδειξαν ότι τα μόρια λαμβάνουν σφαιρικό σχήμα μόλις έρθουν σε επαφή με τον αέρα (Σχήμα 2.15γ).

Σχήμα 2.15. Εικόνες προσροφημένων μορίων ινωδογόνου πάνω σε καθαρό γυαλί (α) και γυαλί τροποποιημένο επιφανειακά με αιθανολαμίνη (β). Διακρίνεται η επιμήκης δομή και αμυδρά οι τρεις σφαιρικοί τομείς. Τα συσσωματώματα στην εικόνα (α), πιθανώς οφείλονται στην αποκόλληση κατά τη σάρωση ασθενώς προσδεσμένων μορίων στην επιφάνεια του καθαρού γυαλιού. Οι εικόνες ελήφθησαν με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας (NP-S) σε PBS. Διαστάσεις $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$, ύψος 5nm. (γ) Εικόνα προσροφημένων μορίων ύστερα από στέγνωμα του δείγματος στον αέρα, όπου τα μόρια εμφανίζονται με σφαιρική μορφή. Τεχνική ταλαντούμενης ακίδας (OMCL AC240TS) στον αέρα. Λοιπές παράμετροι ίδιες με (α) και (β).

Εικόνες από προσροφημένα πάνω σε μίκα μόρια ινωδογόνου επιχειρήθηκε να ληφθούν και με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM), προκειμένου να συγκριθούν με αυτές του AFM. Δύο ειδών δείγματα ετοιμάστηκαν, το πρώτο υποβλήθηκε σε διαδικασία ξήρανσης με διαδοχικές εμβαπτίσεις σε διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης μετά τη συνήθη προετοιμασία επώασης-ξεπλύματος από το διάλυμα της πρωτεΐνης, ενώ το δεύτερο όχι. Στη συνέχεια τα δείγματα επιχρυσώθηκαν υπό κενό και εξετάστηκαν με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο JSM 6300 της ιαπωνικής εταιρείας Jeol, το οποίο διαθέτει το Πανεπιστήμιο Πατρών. Και στις δύο περιπτώσεις όμως, στάθηκε αδύνατο να ληφθούν εικόνες από τα προσροφημένα μόρια λόγω περιορισμένης διακριτικής δυνατότητας του μικροσκοπίου.

2.5.2 Επίδραση του pH και της ιοντικής ισχύος στην προσρόφηση

Η μελέτη της επίδρασης του pH και της ιοντικής ισχύος στην προσρόφηση του ινωδογόνου βασίστηκε σε εικόνες από τυχαίες περιοχές της επιφάνειας των δειγμάτων, διαστάσεων $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$. Στις εικόνες αυτές τα μεμονωμένα προσροφημένα μόρια του ινωδογόνου εμφανίζονται σφαιρικά και δεν διακρίνεται η ακριβής μοριακή δομή τους. Αυτό δεν μειώνει την αξία της σύγκρισης της επιφανειακής κάλυψης στις διάφορες συνθήκες του διαλύματος προσρόφησης, εφόσον βέβαια, στη σύγκριση δεν συνεκτιμούνται εικόνες, στις οποίες τα πρωτεϊνικά μόρια εμφανίζονται πεπλατυσμένα εξαιτίας ελαττωμάτων της ακίδας. Η προϋπόθεση αυτή περιόρισε το πλήθος των εικόνων, οι οποίες προκρίθηκαν για σύγκριση, σε ένα ποσοστό του συνολικού αριθμού των αποθηκευμένων εικόνων. Παράλληλα, καταβλήθηκε προσπάθεια να χρησιμοποιηθούν όσο το δυνατό λιγότερες διαφορετικές ακίδες για τη σάρωση των δειγμάτων, ώστε να περιοριστεί η επίδραση των διαφορετικών γεωμετριών στο απεικονιζόμενο μέγεθος και σχήμα των μορίων.

Σχήμα 2.16. Ενδεικτικές εικόνες AFM δειγμάτων μίκας με μόρια ινωδογόνου προσροφημένα από διάλυμα 5mM PBS pH 7.4 συγκέντρωσης $0.1\mu\text{g/ml}$, σε διαφορετικές τιμές ιοντικής ισχύος (ρυθμιζόμενες με NaCl): (α) 15mM, (β) 150mM, (γ) 500mM. Διαστάσεις εικόνων $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$, εύρος ύψους 5nm.

Στο Σχήμα 2.16 φαίνονται αντιπροσωπευτικές εικόνες δειγμάτων μίκας, στην επιφάνεια των οποίων έχουν προσροφηθεί μόρια ινωδογόνου στις τρεις τιμές ιοντικής ισχύος, 15, 150 και 500mM, ενώ το pH ήταν σταθερό στο 7.4. Η προσρόφηση φαίνεται να αυξάνει αμυδρά καθώς η συγκέντρωση των αλάτων στο διάλυμα προσρόφησης αυξάνει από 15 σε 150mM, αλλά μειώνεται με περαιτέρω αύξηση στα 500mM. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν από τη στατιστική ανάλυση των μετρήσεων επιφανειακής κάλυψης στις τρεις συνθήκες. Το Σχήμα 2.17 παρουσιάζει τη μέση επιφανειακή κάλυψη και την αντίστοιχη τυπική απόκλιση ως προς την ιοντική ισχύ. Καθώς η

ιοντική ισχύς μεταβάλλεται μεταξύ των τιμών 15, 150 και 500mM η μέση τιμή κάλυψης της επιφάνειας αυξάνει από 1.39% σε 1.57% και στη συνέχεια μειώνεται σε 0.81%.

Σχήμα 2.17. Μέσο ποσοστό και τυπική απόκλιση επιφανειακής κάλυψης μίκας από μεμονωμένα μόρια ινωδογόνου ως προς την ιοντική ισχύ του διαλύματος προσρόφησης. (*) επίπεδο σημαντικότητας της ανάλυσης ANOVA $p < 0.001$. (n) πλήθος εικόνων AFM στο στατιστικό δείγμα για κάθε τιμή ιοντικής ισχύος.

Για τις δεδομένες μετρήσεις δεν ήταν δυνατό να εφαρμοστεί το κριτήριο t του Student για τον έλεγχο της σημαντικότητας της διαφοράς των μέσων τιμών στις διάφορες συνθήκες, καθώς ο έλεγχος κανονικότητας των δειγμάτων έδειξε ότι δεν ακολουθούν όλα την κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό εφαρμόστηκε η μέθοδος της Ανάλυσης των Διακυμάνσεων (one-way ANOVA) με τα κριτήρια Tykey HSD και Scheffe. Από τις διαφορές των τριών ζευγών, 15-150, 15-500 και 150-500, οι δύο τελευταίες βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο σημαντικότητας $p = 0.001$, ενώ η πρώτη όχι. Σε προκαταρκτικά πειράματα ωστόσο, στα οποία η ρύθμιση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος PBS στις τιμές 13, 50 και 300mM έγινε με τα ίδια τα φωσφορικά άλατα (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4) αντί για NaCl, η επιφανειακή κάλυψη εκτός από παρόμοιες τάσεις αυξομείωσης έδειξε και στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο χαμηλότερων τιμών ιοντικής ισχύος (Σχήμα 2.18).

Σχήμα 2.18. Μέσο ποσοστό και τυπική απόκλιση επιφανειακής κάλυψης μίκας από μεμονωμένα μόρια ινωδογόνου ως προς την ιοντική ισχύ του διαλύματος προσρόφησης, η οποία ρυθμίστηκε με τα φωσφορικά άλατα του PBS αντί για την προσθήκη NaCl. (*) επίπεδο σημαντικότητας της ανάλυσης ANOVA $p < 0.001$.

Η επίδραση των μεταβολών του pH από την άλλη μεριά, αποδίδεται μέσω του Σχήματος 2.19, το οποίο παρουσιάζει ενδεικτικές εικόνες προσροφημένων μορίων ινωδογόνου από

διαλύματα PBS ιοντικής ισχύος 150mM και pH 3.5, 5.8 ή 7.4 αντίστοιχα. Η προσρόφηση στο ισοηλεκτρικό σημείο του ινωδογόνου (pH 5.8) φαίνεται να περιλαμβάνει περισσότερα μόρια από ότι σε pH 7.4 ή 3.5. Σε pH 3.5 όχι μόνο τα προσροφημένα μόρια είναι λιγότερα από τις άλλες δύο συνθήκες, αλλά στην επιφάνεια εμφανίζονται και συσσωματώματα.

Σχήμα 2.19. Ενδεικτικές εικόνες AFM δειγμάτων μίκας ύστερα από την προσρόφηση μορίων ινωδογόνου σε διαφορετικές τιμές pH διαλύματος PBS 150mM: (α) pH 7.4, (β) pH 5.8, (γ) pH 3.5. Διαστάσεις εικόνων 5μm x 5μm, μέγιστο ύψος 5nm.

Το Σχήμα 2.20 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης των μετρήσεων, τα οποία συμφωνούν με τις προαναφερθείσες παρατηρήσεις. Η μέγιστη μέση επιφανειακή κάλυψη βρέθηκε για το ισοηλεκτρικό σημείο του ινωδογόνου και υπολογίστηκε βάσει των αντίστοιχων εικόνων του AFM ίση με 1.46%. Η αμέσως μικρότερη τιμή, 0.96%, υπολογίστηκε για το φυσιολογικό pH, ενώ η μικρότερη από όλες, 0.73% για pH 3.5. Οι διαφορές της μέσης επιφανειακής κάλυψης μεταξύ των τιμών pH 3.5 και 5.8 καθώς και μεταξύ των 5.8 και 7.4 βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές, ενώ μεταξύ των τιμών 3.5 και 7.4 η διαφορά δεν ήταν σημαντική (επίπεδο σημαντικότητας $p=0.005$ σε έλεγχο one-way ANOVA).

Σχήμα 2.20. Μέσο ποσοστό και τυπική απόκλιση επιφανειακής κάλυψης μίκας από μεμονωμένα μόρια ινωδογόνου ως προς το pH του διαλύματος προσρόφησης. (*) επίπεδο σημαντικότητας της ανάλυσης ANOVA $p<0.005$. (n) πλήθος εικόνων AFM στο στατιστικό δείγμα για κάθε τιμή pH.

2.6 Συζήτηση αποτελεσμάτων

Αντικείμενο της πρώτης ομάδας πειραμάτων αυτής της διατριβής ήταν η παρατήρηση της προσρόφησης της πρωτεΐνης ινωδογόνο πάνω σε υπόστρωμα μίκας και η σχετική ποσοτικοποίηση της σε μεταβαλλόμενες τιμές pH και ιοντικής ισχύος του διαλύματος προσρόφησης. Από το σύνολο των διεπιφανειακών και διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες παίζουν κάποιο ρόλο στη διαδικασία της προσρόφησης, επιχειρήθηκε η απομόνωση και η μελέτη μόνο αυτών μεταξύ ανεξάρτητων μορίων πρωτεΐνης και υποστρώματος. Στόχος ήταν η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων επιφάνειας-πρωτεΐνης στα πρώτα στάδια της προσρόφησης, όταν τα μόρια προσροφούνται κυρίως σε απόσταση το ένα από το άλλο και η προσρόφηση του ενός δεν επηρεάζει την προσρόφηση του άλλου. Δεδομένης της υψηλής ταχύτητας των διαδικασιών προσρόφησης, ένας έμμεσος τρόπος για να επιτευχθεί αυτό, ήταν η χρησιμοποίηση διαλύματος ινωδογόνου πολύ χαμηλής συγκέντρωσης.

Το ζήτημα του καθορισμού της κατάλληλης συγκέντρωσης για το σκοπό αυτό είναι δυνατό να προσεγγιστεί καταρχάς θεωρητικά. Με την παραδοχή ότι ο μέσος ειδικός όγκος των πρωτεϊνικών μορίων είναι $0.73\text{cm}^3/\text{g}$ (Cassimeris et al. 2001) και γνωρίζοντας ότι το μοριακό βάρος του ινωδογόνου είναι 340 kDa, ο όγκος κάθε μορίου ινωδογόνου υπολογίζεται περίπου 412nm^3 . Αν τα μόρια του ινωδογόνου θεωρηθούν καθ' υπέρβαση σφαιρικά, η μέση διάμετρός τους υπολογίζεται τότε 9nm και η αναμενόμενη επιφάνεια διατομής τους 65nm^2 . Στο βαθμό, που η προσρόφηση δεν προκαλεί ξεδίπλωμα της πρωτεϊνικής δομής και το εμβαδό κάλυψης από κάθε μόριο μετά την προσρόφησης του παραμένει 65nm^2 , η κάλυψη μιας επιφάνειας διαμέτρου 9.9mm, σαν αυτή του δισκίου της μίκας, σε ποσοστό 25% απαιτεί $1.2 \cdot 10^{12}$ μόρια ινωδογόνου ή μάζα 0.67ng. Η παραπάνω ανάλυση δίνει βέβαια, μια πολύ προσεγγιστική εκτίμηση της απαιτούμενης συγκέντρωσης ινωδογόνου στο διάλυμα προσρόφησης, γιατί στην πράξη: i) το ινωδογόνο είναι ισχυρά ενυδατωμένο μόριο, όπως θα συζητηθεί και παρακάτω, και ο ειδικός του όγκος δεν ισούται απαραίτητα με το μέσο προτεινόμενο από τη βιβλιογραφία για τις πρωτεΐνες, ii) κατά την προσρόφηση η δομή του πρέπει να ξεδιπλώνεται και η επιφάνεια του υποστρώματος, την οποία καταλαμβάνει, να αυξάνει και iii) κάποιο ποσοστό της περιεχόμενης στο διάλυμα μάζας προσροφάται στα τοιχώματα του δοχείου προετοιμασίας του δείγματος και όχι αποκλειστικά στην επιφάνεια της μίκας. Συνεκτίμηση των παραμέτρων αυτών καθώς και μια διαδικασία δοκιμής και λάθους οδήγησε τελικά στη χρήση διαλύματος προσρόφησης συγκέντρωσης 0.1μg/ml σε ινωδογόνο.

Όπως αναφέρθηκε ήδη, η απεικόνιση της μοριακής δομής του προσροφημένου ινωδογόνου ήταν αποτέλεσμα επίμονων προσπαθειών. Η πλειοψηφία των δοκιμών, στο πλαίσιο των πειραμάτων μέτρησης της επιφανειακής κάλυψης σε μεταβλητές συνθήκες pH και ιοντικής ισχύος, έδωσε εικόνες μορίων, τα οποία είχαν ακανόνιστο σφαιροειδές σχήμα. Τότε, θεωρήθηκε ότι η αδυναμία απόδοσης του ακριβούς σχήματος των μορίων οφείλεται στις πεπερασμένες διαστάσεις της ακίδας (ονομαστική ακτίνα καμπυλότητας περίπου 20nm), η οποία ίσως να αμβλυνόταν ακόμα περισσότερο μετά την αντίδραση με το διάλυμα πιράνχα ή με τη φθορά λόγω χρήσης. Πραγματικά, διαδοχικές δοκιμές χρησιμοποιώντας κάθε φορά νέες ακίδες, οι οποίες δεν υποβάλλονταν πλέον σε καθαρισμό με διάλυμα πιράνχα, έδωσαν κάποια θετικά, αν και σπάνια, αποτελέσματα. Αποδείχτηκε έτσι, ότι η ποιότητα των λαμβανόμενων εικόνων βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην ακρίβεια κατασκευής των ακίδων, μια παράμετρο, την οποία δεν εγγυάται η κατασκευάστρια εταιρεία.

Η λήψη εικόνων με ικανοποιητική ανάλυση παραμένει δύσκολο εγχείρημα και για έναν ακόμα λόγο, τη μόλυνση της ακίδας από μόρια ινωδογόνου, τα οποία είναι ασθενώς δεσμευμένα στο υπόστρωμα και αποκολλούνται κατά τη σάρωση. Η μόλυνση της ακίδας με πρωτεΐνη μπορεί να προκαλέσει ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προσροφημένων μορίων στην επιφάνεια και των μορίων, τα οποία έχουν μολύνει την ακίδα, με κατάληξη τη μέτρηση παραμορφωμένων εικόνων (Cullen & Lowe 1994, Marchant et al. 2002). Αποτέλεσμα του φαινομένου αυτού είναι να χάνεται η υψηλή ανάλυση της σάρωσης ξαφνικά, τη στιγμή δηλαδή κατά την οποία το μόριο της πρωτεΐνης ή οποιοδήποτε άλλο σωματίδιο προσκολλάται στην ακίδα μολύνοντας την. Χρειάζεται να σημειωθεί στο σημείο αυτό, ότι ακόμα και αν οι πεπερασμένες διαστάσεις της ακίδας δεν περιόριζαν την ανάλυση των λαμβανόμενων εικόνων, η τελευταία δεν θα μπορούσε να ξεπεράσει την ψηφιακή ανάλυση, η οποία ενδεικτικά για εικόνες 512 σημείων ανά γραμμή σάρωσης, διαστάσεων 1μm x1μm είναι 2nm.

Η εικόνα των μορίων του ινωδογόνου πάνω στην επιφάνεια της μίκας, όπως αναπαράχθηκε με τη βοήθεια της τεχνικής της ταλαντούμενης ακίδας του AFM σε διάλυμα PBS (ή HEPES), συμφωνεί με την προτεινόμενη από τη βιβλιογραφία δομή της (βλ. Κεφ. 1.3.1). Αρκετές προσπάθειες έχουν γίνει εξάλλου, και από άλλους ερευνητές για την απεικόνιση προσροφημένων μορίων ινωδογόνου με τη χρήση του AFM. Ο Πίνακας 2.5 παρουσιάζει μια επισκόπηση των σχετικών δημοσιευμένων εργασιών με αναφορά στη διαδικασία προετοιμασίας και εξέτασης των δειγμάτων, το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα και την εμφανιζόμενη δομή των μορίων σε κάθε μία από αυτές.

Η πρώτη παρατήρηση αφορά τις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις για την προσρόφηση ανεξάρτητων μορίων πάνω στην επιφάνεια. Όπως διαπιστώθηκε και στα πειράματά μας, η

συγκέντρωση του ινωδογόνου δεν πρέπει να ξεπερνά τα $5\mu\text{g}/\text{ml}^{\text{iv}}$, αν επιθυμείται η αποφυγή σχηματισμού ενός πλήρους στρώματος πρωτεΐνης. Αντίθετα, για το σχηματισμό ενός συμπαγούς στρώματος προσροφημένου ινωδογόνου η ελάχιστη απαιτούμενη συγκέντρωση, σύμφωνα με τα στοιχεία του πίνακα, είναι $40\mu\text{g}/\text{ml}$.

Η μοριακή δομή του ινωδογόνου, σε εκείνες τις περιπτώσεις, όπου κατορθώθηκε να απεικονιστεί, περιγράφεται σαν επιμήκης με εμφανείς τους τρεις σφαιρικούς τομείς, οι οποίοι συνθέτουν το μόριο (Agnihotri & Siedlecki 2004, Jung et al. 2003, Marchin & Berrie 2003, Sit & Marchant 1999, Sit & Marchant 2001, Taatjes et al. 1997). Σε μία από αυτές μάλιστα, αναφέρεται η δυνατότητα διάκρισης δύο επιπλέον σφαιρικών τομέων, πιθανότατα των απολήξεων αC των Αα αλυσίδων (Cacciafesta et al. 2000). Το μέσο μήκος των μορίων υπολογίζεται περίπου 55nm , τιμή η οποία πλησιάζει αρκετά τις δικές μας παρατηρήσεις. Η σχετική μεγέθυνση ως προς το θεωρητικό μήκος (Κεφ. 1.3.1), ενδεχομένως οφείλεται στην επίδραση της καμπυλότητας της ακίδας, χωρίς να αποκλείεται η πιθανότητα απλώματος του μορίου λόγω των αλληλεπιδράσεων με την επιφάνεια.

Πίνακας 2.5. Επισκόπηση εργασιών απεικόνισης προσροφημένου ινωδογόνου με το AFM.

Διαδικασία προετοιμασίας/εξέτασης δειγμάτων	Υπόστρωμα	Δομή μορίων	Αναφορά
<ul style="list-style-type: none"> Επώαση για 10 λεπτά σε διάλυμα $0.05\text{-}10\mu\text{g}/\text{ml}$ σε 50mM PBS pH 7 Ξέπλυμα με νερό Millipore Στέγνωμα με N_2 Τεχνική ταλαντούμενης ακίδας στον αέρα 	Μίκας	Σφαιρικά μόρια $31\text{nm} \times 26\text{nm}$, ύψους 1.71nm	(Marchin & Berrie 2003)
<ul style="list-style-type: none"> Πλήρωση κυψελίδας υγρού με PBS 10mM pH7.4 Ροή διάλυμα ινωδογόνου $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ($0.6\text{-}0.8\text{ ml}/\text{min}$) Μετά από 30 λεπτά παροχή καθαρού PBS Τεχνική επαφής 	Γραφίτης (HOPG)	Επιμήκη μόρια με τρία σφαιρίδια μήκους 62 nm , πλάτους 28nm , ύψους 1.05nm	
<ul style="list-style-type: none"> Επώαση σε διάλυμα $73\mu\text{g}/\text{ml}$ σε PBS pH 7.2 Τεχνική επαφής στον αέρα 	Μίκας	Σχηματισμός συμπαγούς μονοστρώματος	(Ta et al. 1998)
<ul style="list-style-type: none"> Επώαση σε διάλυμα $73\mu\text{g}/\text{ml}$ σε PBS pH 7.2 Τεχνική επαφής στον αέρα 	Επιχρυσωμένο γυαλί	Συμπαγές στρώμα ύψους 6.5nm , $5\text{ng}/\text{mm}^2$	(Snopok et al. 1998)

^{iv} Σε περιπτώσεις επώασης μικρής διάρκειας (10 λεπτών) μπορεί να φτάσει και τα $10\mu\text{g}/\text{ml}$ (βλ. (Marchin & Berrie 2003))

<ul style="list-style-type: none"> Επώαση σε διάλυμα 9.3μg/ml σε PBS pH 7.2 Τεχνική επαφής στον αέρα 		Σωματίδια μήκους 90 και 140 nm, ύψους 10nm.	
<ul style="list-style-type: none"> Επώαση για 1 ώρα σε διάλυμα 3 μg/ml σε 0.1M PBS pH 7.4 Ξέπλυμα με αποσταγμένο νερό Τεχνική ταλαντούμενης ακίδας σε αποσταγμένο νερό 	TiO ₂	Ανεξάρτητα μόρια μήκους 46nm, ύψους 1.4 nm με περισσότερους των τριών σφαιρικούς τομείς, ενωμένα μέσω των D τομέων.	(Cacciafesta et al. 2000)
<ul style="list-style-type: none"> Επώαση για 4 ώρες σε διάλυμα 70 μg/ml σε οξικό (pH 4, 4.7), φωσφορικό (pH 6, 7) ή βορικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH 8, 9) μεταβαλλόμενη συγκέντρωση NaCl 2-300 mM Ξέπλυμα με αποσταγμένο νερό Στέγνωμα με N₂ Τεχνική ταλαντούμενης ακίδας στον αέρα 	Si	Συμπαγές στρώμα	(Ortega-Vinuesa et al. 1998a)
<ul style="list-style-type: none"> Εισαγωγή PBS 1mM pH 7.4 στην κυψελίδα υγρού Αντικατάσταση με διάλυμα ινωδογόνου 50ng/ml (37°C) Μετά από 60 λεπτά παροχή καθαρού PBS (25°C) Τεχνική ταλαντούμενης ακίδας σε PBS 	Μίκας	Μεμονωμένα μόρια μήκους 45.8nm Τομέας D: ύψος 2.3 nm, πλάτος 10.3 Τομέας E: ύψος 2.5nm, πλάτος 8.4nm	(Sit & Marchant 1999)
	Γυαλί τροποποιημένο με δεκαοκτυλτριχλωροσιλάνιο (OTS)	Μεμονωμένα μόρια μήκους 63.7nm Τομέας D: ύψος 1.2nm, πλάτος 14.3nm Τομέας E: ύψος 1.4nm, πλάτος 13.8nm	
	Γυαλί τροποποιημένο με αμινοπροπυλτριαίθοξυσιλάνιο (APTES)	Μεμονωμένα μόρια μήκους 55.7nm Τομέας D: ύψος 1.9nm, πλάτος 10.8nm Τομέας E: ύψος 1.8nm, πλάτος 9.5nm	
<ul style="list-style-type: none"> Επώαση υπό ανακίνηση 10s-1ώρα σε διάλυμα 20 μg/ml σε διάλυμα Hank's 150mM pH 7 (για το σχηματισμό μονοστρώματος επώαση για 4 ώρες σε διάλυμα 40μg/ml σε 2mM, pH=6) Ξέπλυμα με διάλυμα Hank's και αποσταγμένο νερό Στέγνωμα με N₂ Τεχνική ταλαντούμενης ακίδας στον αέρα 	Si τροποποιημένο με διμεθυλδιχλωροσιλάνιο (DDS)	Αναδιάταξη προσροφημένων μορίων σε σχηματισμούς σταγόνων σε υδρόφοβες επιφάνειες με γωνία επαφής >78°	(Ortega-Vinuesa et al. 1998b)

<ul style="list-style-type: none"> • Εισαγωγή PBS 1mM pH 7.4 στην κυψελίδα υγρού • Αντικατάσταση με διάλυμα ινωδογόνου 0.1-0.5 µg/ml • Μετά από 1ώρα λήψη εικόνων με τεχνική ταλαντούμενης ακίδας (παρακολούθηση φάσης) 	<p>Μίκας</p> <p>Πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS)</p> <p>Πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας</p> <p>Πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE)</p>	<p>Επιφανειακή συγκέντρωση: 5 μόρια/µm² (από διάλυμα 0.1 µg/ml)</p> <p>Επιφανειακή συγκέντρωση: 10 μόρια/µm² (από διάλυμα 0.5 µg/ml)</p> <p>Ασθενώς προσκολλημένα μόρια, παρασυρόμενα από την ακίδα στην τεχνική της σταθερής δύναμης.</p> <p>Απουσία προσρόφησης</p>	<p>(Holland & Marchant 2000)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Πλήρωση κυψελίδας υγρού με 20mM HEPES pH 7.4, NaCl 150mM, 5mM N-αμινοκαπροϊκό οξύ • Εισαγωγή διαλύματος ινωδογόνου 1-10µg/ml για το γραφίτη, 1-2 µg/ml για τη μίκας (37°C) • Προσθήκη θρομβίνης 0.12-10 µg/ml • Προσθήκη μονομερών ινώδους 2-16 µg/ml • Τεχνική ταλαντούμενης ακίδας 	<p>Μίκας</p> <p>Γραφίτης (HOPG)</p>	<p>Ινωδογόνο: δομή με τρία σφαιρίδια</p> <p>Θρομβίνη: σφαιρίδιο ύψους 0.7nm πλάτους 5.5 nm</p> <p>Μονομερή ινώδους: στοίχιση σε πολλαπλά στρώματα</p> <p>Ινωδογόνο: δομή με τρία σφαιρίδια (δεν μοιάζει τόσο με τη διαλυτή μορφή όσο στη μίκας)</p> <p>Θρομβίνη: σφαιρίδιο ύψους 1nm πλάτους 6.5 nm</p> <p>Μονομερή ινώδους: ευθυγράμμιση και σχηματισμός πυκνού δικτύου</p>	<p>(Sit & Marchant 2001)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Επικάλυψη μίκας με 0.1% πολυ-λ-λυσίνης • Ξέπλυμα και στέγνωμα • Προσθήκη 100µl διαλύματος ινωδογόνου 1ng/ml σε Tris pH 7.3 • Επώαση για 45 λεπτά • Τεχνική ταλαντούμενης ακίδας σε Tris 	<p>Μίκας</p>	<p>Μόρια με δομή τριών σφαιριδίων: ύψος 2.4-4.1nm μήκος 61.5-69.3 nm</p>	<p>(Taatjes et al. 1997)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Πλήρωση κυψελίδας υγρού με PBS 1mM pH 7.4 • Ροή διαλύματος ινωδογόνου 0.5-1µg/ml (0.05 ml/min) • Μετά από 10-15 λεπτά αντικατάσταση με καθαρό PBS 	<p>Μίκας</p>	<p>Μεμονωμένα μόρια με δομή τριών σφαιριδίων. Το ύψος αυξάνει με το χρόνο ως τα 2.1nm.</p>	<p>(Agnihotri & Siedlecki 2004)</p>

• Τεχνική ταλαντούμενης ακίδας	Γραφίτης (HOPG)	Μεμονωμένα μόρια με δομή τριών σφαιριδίων. Το ύψος μειώνεται με το χρόνο ως το 1nm. Κάποια μόρια χάνουν τη δομή των τριών σφαιριδίων.	
• Επώαση σε διάλυμα 5 ή 0.5 µg/ml σε PBS pH 8 ή 3.2 για 20 λεπτά	SiO ₂	Μεμονωμένα μόρια με δομή τριών σφαιριδίων μήκους 59.8 nm, ύψους 2.5 nm.	(Jung et al. 2003)
• Τεχνική ταλαντούμενης ακίδας		Επιφανειακή κάλυψη: 2.5% από διάλυμα 0.5µg/ml 32% από διάλυμα 5µg/ml	
• Επώαση για 10 λεπτά σε διάλυμα βόειου ινωδογόνου 1ppm σε PBS pH 7.4	Si, γυαλί και αντικειμενο-φόροι	Μεμονωμένα μόρια με δομή τριών σφαιριδίων ύψος 2-3nm μήκος 47 nm πλάτος 8-10nm	(Toscano & Santore 2006)
• Ξέπλυμα με H ₂ O και στέγνωμα με N ₂			
• Ξήρανση για 1 ώρα στους 120°C			
• Τεχνική ταλαντούμενης ακίδας στον αέρα			
• Εμβάπτιση δειγμάτων σε διάλυμα ινωδογόνου 0.01µg/ml σε PBS pH 7.4 για 5 λεπτά	Γραφίτης (HOPG)	Μεμονωμένα επιμήκη μόρια ύψους ~1.4nm, μήκους ~53nm, με διακριτούς τομείς	(Ohta et al. 2006)
• Ξέπλυμα με PBS και 10 φορές με H ₂ O			
• Στέγνωμα με N ₂			
• Τεχνική μη επαφής στον αέρα			

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αναφορά των Marchin και Berrie (Marchin & Berrie 2003) για προσρόφηση μορίων ινωδογόνου πάνω σε μίκα με σφαιρική μορφή, γιατί είναι πιθανόν να θεωρηθεί ότι αντικρούει τις δικές μας παρατηρήσεις. Σε μια προσπάθεια ερμηνείας παρατηρήσεων σαν αυτών του Marchin και των συνεργατών του έχει προταθεί ένα μοντέλο προσρόφησης για τα μόρια του ινωδογόνου πάνω σε υδρόφιλες αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες, όπως είναι η μίκα, το οποίο προβλέπει την προσκόλληση των μορίων στην επιφάνεια μέσω των θετικά φορτισμένων στελεχών αC, ενώ οι τρεις κύριοι τομείς του (D και E) επικάθονται με μία συμπαγή σφαιρική μορφή πάνω σε αυτούς (Ta et al. 1998, Jung et al. 2003). Αυτό που πρέπει να τονιστεί όμως είναι, ότι η συγκεκριμένη εργασία αναφέρεται σε εικόνες ινωδογόνου, οι οποίες ελήφθησαν στον αέρα ύστερα από στέγνωμα του δείγματος. Παρόμοια εικόνα παρουσίασαν τα μόρια του ινωδογόνου και στα δείγματα καθαρού γυαλιού τα οποία εξετάσαμε με το AFM στον αέρα. Δεν πρέπει λοιπόν, να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η σφαιρική μορφή των προσροφημένων μορίων να οφείλεται σε συρρίκνωσή τους εξαιτίας φαινομένων αφυδάτωσης και επίδρασης της

επιφανειακής τάσης κατά το στέγνωμα. Το ινωδογόνο εξάλλου, έχει αναφερθεί ως μια πρωτεΐνη με βαθμό ενυδάτωσης μεταξύ 33-66%, ποσοστό το οποίο μεταφράζεται σε 4000 μόρια νερού ανά μόριο πρωτεΐνης ή πρόσθετο όγκο 136nm^3 (Sit & Marchant 1999). Στην ενυδάτωσή του έχουν αποδοθεί επίσης, διαφορές στις μετρούμενες διαστάσεις του ανάμεσα σε εικόνες SEM και AFM.

Η επιβεβαίωση της προσρόφησης του ινωδογόνου σε εκτεταμένη μορφή και με επιμήκη διάταξη των τριών σφαιρικών τομέων του μέσω των εικόνων, οι οποίες ελήφθησαν στο διάλυμα, έχει ιδιαίτερη σημασία. Αποδεικνύει ότι τα μόρια του ινωδογόνου διατηρούν και μετά την προσρόφησή τους τη φυσιολογική δομή και τα στελέχη τους (Αα και γ αλυσίδες) είναι πιθανώς, ακόμα ικανά να συμμετάσχουν στη διαδικασία πολυμερισμού με γειτονικά μόρια και σχηματισμού του ινώδους.

Συγκρίνοντας το ύψος των προσροφημένων μορίων στις εικόνες, τις οποίες λάβαμε με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας μέσα σε διάλυμα, με τα καταγεγραμμένα ύψη του Πίνακα 2.5 διαπιστώνουμε, ότι ενώ η μέση μετρούμενη τιμή είναι περίπου 1.7nm με δύο εξαιρέσεις, όπου αναφέρονται ύψη 3nm (Toscano & Santore 2006) και 4.1nm (Taates et al. 1997), στις δικές μας εικόνες το ύψος αγγίζει τα 5nm . Οι διαφορές αυτές είναι δυνατό να οφείλονται σε εγγενή προβλήματα βαθμονόμησης του σαρωτή στην κατακόρυφη διεύθυνση. Η επίδραση των ελαστικών χαρακτηριστικών της πρωτεΐνης στην ταλάντωση της ακίδας, αν και έχει αναφερθεί ως πιθανή αιτία υψομετρικών διαφορών (Fritz et al. 1995, Garcia & Paolo 1999) δεν εξετάζεται ως υπεύθυνη εδώ, γιατί θα αναμέναμε την ίδια επίδραση και στις μετρήσεις της βιβλιογραφίας, οι οποίες έγιναν σε παρόμοιες συνθήκες.

Παρόλο το ενδιαφέρον, το οποίο συγκεντρώνει η ακριβής απεικόνιση της δομής του προσροφημένου ινωδογόνου, η σημασία της δεν είναι τόσο μεγάλη για τα πειράματα διερεύνησης της επίδρασης του pH και της ιοντικής ισχύος στην έκταση της προσρόφησης. Αυτό συμβαίνει, γιατί η σχετική μελέτη βασίζεται σε σύγκριση της επιφανειακής κάλυψης στις διάφορες συνθήκες και τα αποτελέσματα της σύγκρισης μένουν ανεπηρέαστα από την επίδραση της ακίδας στις λαμβανόμενες εικόνες, αν αυτή θεωρηθεί όμοια για όλα τα δείγματα.

Μία άλλη παρατήρηση, η οποία αφορά την εικόνα των προσροφημένων μορίων στις διάφορες τιμές pH και ιοντικής ισχύος, σχετίζεται με την επίδραση αυτών των ιδιοτήτων του διαλύματος εξέτασης στο καταγραφόμενο ύψος. Σε αντίθεση με όσα αναφέρθηκαν για τον τρόπο, με τον οποίο το pH και η ιοντική ισχύς μπορούν να αλλοιώσουν τις μετρήσεις ύψους στην τεχνική της επαφής, στις εικόνες, οι οποίες ελήφθησαν με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας δεν παρατηρήθηκαν υψομετρικές διαφορές ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο διάλυμα, αλλά το μέσο

ύψος των μορίων ήταν σταθερά 5nm. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι η μεταβολή του πλάτους ταλάντωσης της ακίδας εξαρτάται όχι απλά από το μέγεθος των ασκούμενων σε αυτή δυνάμεων, αλλά από την παράγωγό τους ως προς την απόσταση (Garcia & Paolo 1999). Συνεπώς, αν αυξομειώσεις της ιοντικής ισχύος και του pH προκαλούν μικρές διαφοροποιήσεις στο ρυθμό μεταβολής των ηλεκτροστατικών δυνάμεων με την απόσταση ή πιο απλά στο ηλεκτροστατικό δυναμικό, τότε η επίδρασή τους στο ύψος μπορεί να είναι αμελητέα ή τόσο μικρή, ώστε μην είναι δυνατό να παρατηρηθεί.

Ανεξάρτητα όμως από αυτό, η επίδραση της ιοντικής ισχύος στην προσρόφηση του ινωδογόνου και πιο συγκεκριμένα στο ποσοστό της επιφανειακής κάλυψης ήταν αντιληπτή και μετρήθηκε. Η μείωση της επιφανειακής κάλυψης, καθώς η συγκέντρωση των αλάτων στο διάλυμα προσρόφησης αυξήθηκε από 15mM σε 150mM ερμηνεύεται από τη θεωρία του διπλού στρώματος διάχυσης. Η αύξηση της ιοντικής ισχύος προκαλεί μείωση του πάχους του διπλού στρώματος, η οποία μαθηματικά εκφράζεται με μείωση του μήκους Debye (Εξίσωση 2.3) και η οποία συνεπάγεται μείωση της ενέργειας άπωσης ανάμεσα σε ομόσημα φορτισμένες επιφάνειες (Εξισώσεις 2.4 και 2.5) (Koutsoukos et al. 1982, Valle-Delgado et al. 2004a). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η αύξηση της ιοντικής ισχύος από 15 σε 150mM και 500mM ισοδυναμεί με μείωση του μήκους Debye από 2.48nm σε 0.79nm και τελικά σε 0.43nm. Σε pH 7.4 τόσο η επιφάνεια της μίκας όσο και τα μόρια του ινωδογόνου είναι αρνητικά φορτισμένα και συνεπώς, η αύξηση της ιοντικής ισχύος μειώνει την ηλεκτροστατική άπωση μεταξύ τους και ενισχύει την προσρόφηση. Η επίδραση αυτή είναι εμφανής για τις δύο χαμηλότερες τιμές ιοντικής ισχύος του PBS, έστω κι αν η διαφορά της επιφανειακής κάλυψης δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Αντιθέτως, στατιστικά σημαντική ήταν η μείωση της επιφανειακής κάλυψης, όταν η ιοντική ισχύς αυξήθηκε μόλις από 13mM σε 40mM με ρύθμιση της συγκέντρωσης του δισθενούς και μονοσθενούς φωσφορικού άλατος. Η παρατήρηση αυτή υποστηρίζει το ενδεχόμενο, τα δισθενή άλατα να ενισχύουν τη προσρόφηση όχι μόνο “καλύπτοντας” τις απωστικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις, αλλά δρώντας και ως γέφυρες μεταξύ φορτισμένων μορίων (Muller et al. 1997a). Σχετική με αυτή τη θεώρηση είναι η δυνατότητα δισθενών ιόντων, όπως το Ca^{2+} ή το Mg^{2+} , να μπλοκάρουν μοριακά επίτοπα, τα οποία προορίζονταν για δέσμευση μετάλλων, και να προκαλούν συσσωμάτωση πρωτεϊνών (Fuss et al. 2001, Lee et al. 2004, Zhang et al. 2005).

Για τη δικαιολόγηση του περιορισμού της προσρόφησης, όταν η ιοντική ισχύς αυξήθηκε περαιτέρω στα 500mM, χρειάζεται να ληφθεί υπόψη η επίδραση της υψηλής συγκέντρωσης αλάτων στις ενδομοριακές και διαμοριακές δυνάμεις. Σε υψηλές τιμές ιοντικής ισχύος η άπωση μεταξύ των

φορτισμένων τμημάτων των πρωτεϊνών και γενικότερα των πολυμερών περιορίζεται λόγω της μείωσης του πάχους του διπλού στρώματος διάχυσης γύρω τους. Έτσι, τα μόρια αφ' ενός λαμβάνουν μια πιο συμπαγή μορφή και αφ' ετέρου εμφανίζουν την τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα (Frank & Belfort 2003, Kiriya et al. 2003). Η συρρίκνωση των μορίων είναι γενικά πιο εύκολη, αν αυτά βρίσκονται σε διάλυμα από ότι αν είναι προσροφημένα, γιατί στη δεύτερη περίπτωση εμποδίζεται από τις διεπιφανειακές δυνάμεις van der Waals (Roiter et al. 2006). Από τη στιγμή πάντως, που τα μόρια θα λάβουν μια πιο συμπαγή δομή στο διάλυμα, από το οποίο προσροφούνται, η αλληλεπίδρασή τους με την επιφάνεια και το ξεδίπλωμα της αλυσίδας τους για την σταθεροποίηση της προσρόφησης δυσχεραίνεται. Επιπλέον, η συσσωμάτωση των πρωτεϊνικών μορίων στο διάλυμα μειώνει τη δραστική τους συγκέντρωση (Lee et al. 2004), ένα φαινόμενο το οποίο είναι γνωστό ως εξαλάτωση. Και τα δύο αυτά φαινόμενα έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της προσρόφησης. Αναφορές στη βιβλιογραφία, οι οποίες υποστηρίζουν το φαινόμενο της περιορισμένης προσρόφησης από διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης αλάτων, μπορεί κανείς να βρει για την πρωτεΐνη λυσοζύμη (Pasche et al. 2005, Su et al. 1998, Zhang & Sun 2002). Παρόλα αυτά απαιτείται επιφυλακτικότητα στο συσχέτισμό των αποτελεσμάτων τους με τα αυτά, της παρούσας έρευνας, γιατί η λυσοζύμη στο φυσιολογικό pH είναι θετικά φορτισμένη (Koehler et al. 2000) και συνεπώς, η αλληλεπίδρασή της με αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες ελέγχεται από ελκτικές δυνάμεις, αλλά και επειδή η δομή της είναι συμπαγής και άκαμπτη, δηλαδή αρκετά διαφορετική από αυτή του ινωδογόνου.

Η υπόθεση των Czajkowsky και Shao (Czajkowsky & Shao 2003), ότι η ανταλλαγή των ιόντων K^+ από το μοριακό πλέγμα της μίκας με τα ιόντα του ηλεκτρολυτικού διαλύματος^ν εμποδίζει την προσρόφηση των πρωτεϊνών στην επιφάνειά της, θα μπορούσε να προσφέρει μια πρόσθετη αιτιολόγηση για τη μείωση της προσρόφησης του ινωδογόνου στην υψηλότερη τιμή ιοντικής ισχύος. Τα πειραματικά αποτελέσματα των ίδιων συγγραφέων απέδειξαν όμως, ότι η ελάχιστη συγκέντρωση αλάτων NaCl, η οποία απαιτείται για την αποτροπή της προσρόφησης των πρωτεϊνών λυσοζύμη, GroES, CTB ή GroEL στη μίκας, είναι πολύ μεγαλύτερη (>2200mM) από τη χρησιμοποιούμενη στα δικά μας πειράματα. Εξάλλου, η τιμή της ιοντικής ισχύος, η οποία αντιστοιχεί στην ελάχιστη συγκέντρωση ιόντων K^+ , που είναι απαραίτητη για την εξουδετέρωση του επιφανειακού φορτίου της μίκας και η οποία έχει βρεθεί 77mM (Toprakcioglu et al. 1987) δεν φάνηκε να είναι κρίσιμη για την αποτροπή της προσρόφησης του ινωδογόνου στα πειράματά μας.

^νΠερισσότερες πληροφορίες για το φαινόμενο αυτό αναφέρονται στο Κεφ. 3.6.

Συμπληρωματικά των παραπάνω υποθέσεων θα πρέπει να αναφερθεί μία ακόμα πιθανή δικαιολόγηση του περιορισμού της προσρόφησης στη μεγαλύτερη από τις τρεις δοκιμαζόμενες τιμές ιοντικής ισχύος. Αυτή σχετίζεται με τις απωστικές δυνάμεις ενυδάτωσης, οι οποίες, όπως αναφέρθηκε στην αρχή του κεφαλαίου, γίνονται πιο εμφανείς σε υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων Na^+ . Ο έλεγχος αυτής της υπόθεσης θα γίνει με τη βοήθεια των πειραμάτων μέτρησης δυνάμεων, τα οποία θα περιγραφούν στο επόμενο κεφάλαιο.

Η ερμηνεία της επίδρασης του pH από την άλλη μεριά, στην προσρόφηση του ινωδογόνου και ειδικότερα στο ποσοστό της επιφανειακής κάλυψης δεν μπορεί να στηριχθεί ευθέως στη μεταβολή των ηλεκτροστατικών δυνάμεων, αν και η ελάττωση της ισχύος τους είναι αναμενόμενη, όσο η τιμή του pH πλησιάζει ή πέφτει κάτω από το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης (pH 5.8) ή της μίκας (pH 3). Στη σχετική βιβλιογραφία (Bajrai 2005, Chen et al. 1997, Matsumoto et al. 2003, Ortega-Vinuesa et al. 1998a) επικρατεί η άποψη, ότι η προσρόφηση των πρωτεϊνών ενισχύεται στο ισοηλεκτρικό σημείο τους, γιατί i) η πλευρική ηλεκτροστατική άπωση ανάμεσα στα προσροφούμενα μόρια εξαλείφεται, ii) η επιφανειακή πυκνότητα αυξάνει λόγω της συμπαγούς δομής τους και iii) η διαλυτότητα των μορίων μειώνεται. Εντούτοις, τα φαινόμενα αυτά ελάχιστη επίδραση μπορούν να έχουν στα αποτελέσματα των πειραμάτων της συγκεκριμένης έρευνας, τα οποία σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να αποκλειστεί ο ρόλος των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων πάνω στην επιφάνεια.

Επιπλέον, η εξάλειψη της ηλεκτροστατικής άπωσης ανάμεσα στα πρωτεϊνικά μόρια και το υπόστρωμα λόγω του μηδενισμού του φορτίου του ινωδογόνου στο pH 5.8 αναμένεται να έχει μικρή επίδραση στην προσρόφηση λόγω της τιμής της ιοντικής ισχύος, η οποία ήταν 150mM. Σε αυτή την τιμή, όπως επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση της επιφανειακής κάλυψης, οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις συγκαλύπτονται εξαιτίας της μείωσης του πάχους του διπλού στρώματος διάχυσης. Συνεπώς, η αύξηση της προσρόφησης στο ισοηλεκτρικό σημείο του ινωδογόνου πρέπει να συνδέεται με την αναδιάταξη της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, όταν τα φορτία των αμινοξέων της εξισώνονται. Ενδεχομένως τότε, ο υδρόφοβος πυρήνας του μορίου να εκτίθεται με μεγαλύτερη ευκολία προς την επιφάνεια μετά την προσρόφηση (Koehler et al. 2000), ενώ δεσμοί υδρογόνου και οι δυνάμεις van der Waals να συνεισφέρουν για τη συγκράτηση του πάνω σε αυτήν (Matsumoto et al. 2003). Δεν μπορεί να αποκλειστεί εξάλλου, η πιθανότητα τα συνολικά ουδέτερα μόρια του ινωδογόνου να προσροφούνται στην αρνητικά φορτισμένη μίκα μέσω των θετικών καταλοίπων τους (Koutsoukos et al. 1983).

Στο pH 3.5 το ινωδογόνο έχει θετικό συνολικό φορτίο και η μίκας σχεδόν μηδενικό ($pI=3-3.5$ (Roiter et al. 2006, Ta et al. 1998)). Και πάλι όμως, η συγκέντρωση των αλάτων στο διάλυμα, η οποία ήταν 150mM, αποκλείει το ενδεχόμενο η έκταση της προσρόφησης σε αυτή την τιμή pH να επηρεάστηκε από τη μεταβολή των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, καθώς αυτές ούτως ή άλλως είναι συγκαλυμμένες. Υποθέτουμε λοιπόν, ότι στη χαμηλή αυτή τιμή του pH συμβαίνουν αναδιατάξεις της μοριακής δομής του ινωδογόνου στο διάλυμα, οι οποίες υποκινούν το σχηματισμό συσσωματωμάτων και εμποδίζουν την προσρόφηση στο υπόστρωμα. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι οι ληφθείσες εικόνες σε pH 3.5 εμφανίζουν συσσωματώματα ινωδογόνου πάνω στην μίκας. Το παράδοξο ωστόσο είναι, ότι για τη διάλυση ινωδογόνου και την αποφυγή πολυμερισμού του στη βιβλιογραφία προτείνονται ρυθμιστικά διαλύματα όξινου pH (Verklich et al. 1993). Περισσότερες ενδείξεις, για το τι ακριβώς συμβαίνει σε αυτό την τιμή pH, μπορούν να προσφέρουν οι μετρήσεις της δύναμης αλληλεπίδρασης μεταξύ τροποποιημένων με πρωτεΐνη ακίδων και της επιφάνειας της μίκας.

Προτού παρουσιαστούν αναλυτικά αυτά τα πειράματα και τα αποτελέσματά τους, καλό είναι να συζητηθεί η σημασία των πειραμάτων προσρόφησης στις διάφορες συνθήκες ιοντικής ισχύος και pH από βιολογική άποψη. Έχει ήδη υπογραμμιστεί, ότι οι παράμετροι αυτές για τα βιολογικά διαλύματα είναι σαφώς προσδιορισμένες και δεν είναι βέβαιο ότι τα μόρια του ινωδογόνου διατηρούν τη δραστικότητά τους, όταν τούτες μεταβληθούν πέρα από κάποια όρια. Τα πειράματα όμως, που παρουσιάστηκαν σε αυτό το κεφάλαιο, όπως και οι μετρήσεις των δυνάμεων, οι οποίες θα περιγραφούν στο αμέσως επόμενο, δεν εξέτασαν τη διατήρηση της δραστικότητας του ινωδογόνου, ως βιολογικού μορίου, αλλά εστίασαν στην αλληλεπίδρασή του με την επιφάνεια της μίκας και τη φυσικοχημική πλευρά του φαινομένου της προσρόφησης. Αξίζει εξάλλου, να αναφερθεί ότι η διερεύνηση της συμπεριφοράς του ινωδογόνου στην τιμή pH 5.8 δεν στερείται τελείως εγκυρότητας από βιολογική άποψη, καθώς το pH στην περιοχή των ορθοπεδικών εμφυτευμάτων έχει αναφερθεί ότι πέφτει στην τιμή 5 (Sun et al. 2001, Zhang et al. 2005).

Ολοκληρώνοντας αυτή τη συζήτηση, πρέπει να αιτιολογηθεί η επιλογή, το διάλυμα εξέτασης στο AFM να έχει ίδιες ιδιότητες, pH και συγκέντρωση αλάτων, με το διάλυμα προσρόφησης. Αυτό έγινε για να αποφευχθεί ενδεχόμενη επίδραση των ιδιοτήτων του τελευταίου στη σειρά χρησιμοποιούμενου διαλύματος στα προσροφημένα μόρια και συνεπώς επισκίαση της ιστορία της προσρόφησης, ειδικά αν η τελευταία περιλαμβάνει και αντιστρεπτά φαινόμενα. Έτσι εξασφαλίζεται ότι η τελική μετρούμενη επιφανειακή κάλυψη ανταποκρίνεται στις συνθήκες προσρόφησης και δεν αντανακλά το αποτέλεσμα μεταγενέστερων διαδικασιών.

Κεφάλαιο 3

Μέτρηση δυνάμεων μεταξύ τροποποιημένης ακίδας και επιφάνειας

3.1 Εισαγωγή

Στο πρώτο μέρος της διατριβής διερευνήθηκε η επίδραση των ιδιοτήτων του διαλύματος στην επιφανειακή κάλυψη δειγμάτων μίκας από ανεξάρτητα μόρια ινωδογόνου και πιο συγκεκριμένα ο ρόλος του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος στη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων, από τις οποίες εξαρτάται η προσρόφηση. Τα σχετικά αποτελέσματα εντούτοις, άφησαν αναπάντητα ερωτήματα, όπως το γιατί η προσρόφηση του ινωδογόνου μειώνεται δραματικά στα 500mM ή σε pH 3.5, ή πώς είναι δυνατό να επιδρούν μεταβολές του pH στην προσρόφηση υπό συνθήκες συγκαλυμμένων ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων δηλαδή στην τιμή 150mM για τη ιοντική ισχύ.

Προκειμένου να μελετηθούν καλύτερα οι παράγοντες προσρόφησης του ινωδογόνου στην πρότυπη επιφάνεια της μίκας σε μία δεύτερη ομάδα πειραμάτων, στρώμα ινωδογόνου δεσμεύτηκε σε σφαιρίδια προσαρτημένα σε ακίδες AFM και οι δυνάμεις αλληλεπίδρασης μεταξύ αυτών των τροποποιημένων ακίδων/αισθητήρων και της επιφάνειας της μίκας μετρήθηκαν μέσα σε διαλύματα PBS διαφορετικής ιοντικής ισχύος και pH. Η ακινητοποίηση του στρώματος της πρωτεΐνης έγινε με ομοιοπολική πρόσδεση των μορίων της πάνω στην επιφάνεια των σφαιριδίων, τα οποία είχαν προηγουμένως προσκολληθεί στον πρόβολο των ακίδων και καλυφθεί μέσω επεξεργασίας πλάσματος με πολυμερισμένο ακρυλικό οξύ.

Για τη μέτρηση της δύναμης αλληλεπίδρασης των αισθητήρων με την επιφάνεια της μίκας χρησιμοποιήθηκε η αντίστοιχη τεχνική του AFM, με τη βοήθεια της οποίας καταγράφηκε η κάμψη του προβόλου κατά την προσέγγιση και απομάκρυνση του αισθητήρα από το υπόστρωμα προσρόφησης. Ύστερα από βαθμονόμηση της σταθεράς ελατηρίου των προβόλων οι μετρούμενες καμπύλες κάμψης-μετατόπισης μετατράπηκαν σε καμπύλες δύναμης-απόστασης και τα παρατηρούμενα φαινόμενα αλληλεπίδρασης ερμηνεύτηκαν ως σύνθεση των σημαντικότερων δυνάμεων, οι οποίες αναπτύσσονται ανάμεσα στην πρωτεΐνη και το υπόστρωμα στις εκάστοτε συνθήκες του διαλύματος. Η ερμηνεία αυτή των μετρήσεων προϋποθέτει τον προσδιορισμό του χαρακτήρα και του μεγέθους των δυνάμεων, οι οποίες εκτιμάται ότι εμφανίζονται σε κάθε πειραματική συνθήκη. Για τον υπολογισμό τους, οι ενεργειακές συνεισφορές στη μεταβολή της

ελεύθερης ενέργειας του συστήματος κατά την προσρόφηση, οι οποίες παρουσιάστηκαν στην αρχή του Κεφαλαίου 2, χρειάστηκε να μετασχηματιστούν σε μεγέθη δύναμης. Η σχετική θεωρητική προσέγγιση παρουσιάζεται πιο κάτω (Κεφ. 3.2), ενώ στη συνέχεια θα παρουσιαστεί η τεχνική της μέτρησης των δυνάμεων με το AFM, θα περιγραφεί η προετοιμασία των αισθητήρων και η διαδικασία των μετρήσεων και τέλος, θα αναφερθούν τα αποτελέσματα και τα σχετικά συμπεράσματα.

3.2 Διεπιφανειακές δυνάμεις

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν στο Κεφ. 2.2.3, οι κύριες συνεισφορές στη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος πρωτεΐνη-διάλυμα-επιφάνεια κατά την προσρόφηση μπορούν να ομαδοποιηθούν ανάλογα με τη φύση της προέλευσης τους σε τέσσερις κατηγορίες: i) τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, ii) τις επιδράσεις των δυνάμεων van der Waals, iii) τα φαινόμενα ενυδάτωσης ή υδροφοβικότητας και iv) τις αναδιατάξεις της πρωτεϊνικής δομής. Από αυτές οι πρώτες τρεις μπορούν να μετασχηματιστούν σε μεγέθη δύναμης και με αυτή τη μορφή να εκτιμηθεί η συμβολή τους στο δυναμικό πεδίο, το οποίο σχηματίζεται ανάμεσα στην πρωτεΐνη και την επιφάνεια προσρόφησης.

Ηλεκτροστατικές δυνάμεις

Ένας άμεσος τρόπος υπολογισμού της δύναμης αλληλεπίδρασης, αν είναι γνωστή η μαθηματική έκφραση της αντίστοιχης ενεργειακής συνεισφοράς, είναι μέσω της αρνητικής παραγώγου της τελευταίας. Για την περίπτωση των ηλεκτροστατικών δυνάμεων αυτό συνεπάγεται την παραγωγή της Εξίσωσης 2.4 ή 2.5 ως προς τη μεταβλητή της απόστασης, αφού ληφθεί υπόψη ότι το δυναμικό της πρωτεΐνης Ψ_n και της επιφάνειας Ψ_e μεταβάλλονται με την απόσταση. Το αποτέλεσμα εξαρτάται από τις ληφθείσες συνοριακές συνθήκες και το αν αυτές έχουν θεωρηθεί ως σταθερού επιφανειακού φορτίου ή σταθερού δυναμικού. Καθώς όμως, οι δύο αυτές λύσεις συγκλίνουν για αποστάσεις μεγαλύτερες των μερικών nm, για την περιγραφή των ηλεκτροστατικών δυνάμεων έχει επικρατήσει μια απλούστερη μαθηματική έκφραση, η οποία εξαρτάται από τα επιφανειακά φορτία των αλληλεπιδρώντων σωμάτων (Heinz & Hoh 1999a, Israelachvili 1992, Muller & Engel 1997b). Αν θεωρήσουμε μια σφαίρα ακτίνας R και επιφανειακού φορτίου σ_n πάνω από μια επίπεδη επιφάνεια με επιφανειακό φορτίο σ_e τότε η ηλεκτροστατική δύναμη ανάμεσά τους περιγράφεται από τη σχέση:

$$F_{\eta\lambda\epsilon\kappa} = \frac{4\pi\sigma_{\Pi}\sigma_{\epsilon}R\lambda}{\epsilon\epsilon_o} e^{-\frac{x}{\lambda}} \quad (3.1)$$

όπου x είναι η απόστασή τους, λ το μήκος Debye (Εξίσωση 2.3), ϵ_o η διαπερατότητα του κενού και ϵ η διηλεκτρική σταθερά του μέσου.

Τα επιφανειακά φορτία σ_{Π} και σ_{ϵ} συσχετίζονται με τα αντίστοιχα επιφανειακά δυναμικά Ψ_o μέσω της σχέσης:

$$\sigma = \frac{\epsilon\epsilon_o\Psi_o}{\lambda} \quad (3.2)$$

η οποία προκύπτει για χαμηλά δυναμικά, μικρότερα των 25mV, από την εξίσωση του Graham (Israelachvili 1992, Raviv et al. 2002):

$$\sigma = \sqrt{8k_B T \epsilon \epsilon_o} \sinh\left(\frac{e\Psi_o}{2k_B T}\right) \left[C_1 + C_2 \left(2 + e^{-\frac{e\Psi_o}{k_B T}} \right) \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3.3)$$

όπου k_B είναι η σταθερά του Boltzmann, T η απόλυτη θερμοκρασία, e το φορτίο του ηλεκτρονίου, C_1 η συγκέντρωση άλατος του μονοσθενούς ηλεκτρολύτη και C_2 η συγκέντρωση άλατος του δισθενούς ηλεκτρολύτη.

Δυνάμεις van der Waals – Θεωρία DLVO

Ο υπολογισμός της μαθηματικής έκφρασης των δυνάμεων van der Waals είναι πιο απλός. Η παραγωγή της Εξίσωσης 2.6 οδηγεί στη σχέση:

$$F_{vdWaals} = -\frac{A \cdot R}{6x^2} \quad (3.4)$$

η οποία περιγράφει τις δυνάμεις van der Waals μεταξύ μιας σφαίρας ακτίνας R και μιας επίπεδης επιφάνειας σε απόσταση x (Israelachvili 1992, Muller et al. 1999). Υπενθυμίζεται ότι A είναι η σταθερά Hamaker.

Οι δυνάμεις van der Waals, όπως αναφέρθηκε ήδη, είναι πάντα ελκτικές για το είδος των συστημάτων, τα οποία αποτελούν αντικείμενο της παρούσας διατριβής, δηλαδή για βιομόρια, τα οποία αλληλεπιδρούν με επιφάνειες μίκας μέσα σε υδατικά διαλύματα. Αντίθετα, οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις μπορεί να είναι ελκτικές ή απωστικές ανάλογα με το αν τα επιφανειακά φορτία είναι ομόσημα ή ετερόσημα. Η ανταγωνιστική δράση των δύο αυτών δυνάμεων περιγράφεται από τη θεωρία DLVO των Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (Derjaguin & Landau 1941, Verwey, E. J. W. & Overbeek, J. Th. G. 1948), η οποία συνεκτιμά τις ηλεκτροστατικές και τις

δυνάμεις van der Waals, αλλά αγνοεί τις δυνάμεις ενυδάτωσης, τις στερεοχημικές απώσεις, τις επιδράσεις των ιοντικών ακτίνων και άλλες ειδικές αλληλεπιδράσεις. Η μαθηματική έκφραση του μοντέλου DLVO προκύπτει από την άθροιση των Εξισώσεων 3.1 και 3.4 και είναι η εξής:

$$F = F_{\eta\lambda\epsilon\kappa} + F_{vdWaals} = \frac{4\pi\sigma_{\Pi}\sigma_{\epsilon}R\lambda}{\epsilon\epsilon_0} e^{-\frac{x}{\lambda}} - \frac{A \cdot R}{6x^2} \quad (3.5)$$

Στην περίπτωση, όπου η πρωτεΐνη έχει αντίθετο φορτίο από την επιφάνεια, η μεταβολή της ηλεκτροστατικής δύναμης, των δυνάμεων van der Waals και της συνισταμένης τους συναρτήσει της απόστασης πρωτεΐνης-επιφάνειας παριστάνεται γραφικά στο Σχήμα 3.1. Η υπέρθεση της απωστικής ηλεκτροστατικής δύναμης στις ελκτικές van der Waals έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας θέσης ασταθούς ισορροπίας για τα αλληλεπιδρώντα σώματα (σημείο I), στην οποία διατηρούνται σε ελάχιστη απόσταση χωρίς να οδηγούνται στη θέση ισορροπίας του συστήματος, δηλαδή σε επαφή (σημείο III). Αυτό οφείλεται στην παρουσία του ενεργειακού φράγματος στο σημείο II, το οποίο είναι τόσο υψηλότερο όσο μεγαλύτερη είναι η ηλεκτροστατική άπωση σε σχέση με την έλξη των δυνάμεων van der Waals. Αν η άπωση είναι αρκετά μεγάλη, τότε το ενεργειακό φράγμα εμποδίζει την πρωτεΐνη να έρθει σε επαφή με την επιφάνεια και η προσρόφηση αποτρέπεται. Αν είναι τόσο μικρή ώστε να υπερκαλυφθεί από τις δυνάμεις van der Waals, το ενεργειακό φράγμα εκμηδενίζεται, η προσέγγιση είναι ανεμπόδιστη και η διαδικασία της προσρόφησης προχωρά.

Σχήμα 3.1. Υπέρθεση απωστικών ηλεκτροστατικών δυνάμεων και ελκτικών δυνάμεων van der Waals σύμφωνα με τη θεωρία DLVO. Στο τοπικό ελάχιστο, [σημείο (I)] τα αλληλεπιδρώντα σώματα διατηρούνται σε ασταθή ισορροπία. Αν όμως, καταφέρουν να περάσουν το ενεργειακό φράγμα στο σημείο (II), τότε μπορούν να έρθουν σε επαφή [σημείο (III)].

Με την Εξίσωση 3.5 γίνεται εύκολος ο υπολογισμός της συνολικής ασκούμενης δύναμης σε ένα πρωτεϊνικό μόριο, το οποίο προσεγγίζει μια επιφάνεια και η πρόβλεψη της πιθανότητας προσρόφησης. Γίνεται λόγος για “πρόβλεψη της πιθανότητας”, επειδή η τελική έκβαση της προσρόφησης εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, όπως η σταθερότητα της πρωτεϊνικής δομής, στην οποία έχει γίνει ήδη αναφορά, αλλά και από άλλες δυνάμεις με σημαντικότερη τη δύναμη ενυδάτωσης.

Δύναμη ενυδάτωσης

Έχει αναφερθεί ήδη, ότι η προσρόφηση των πρωτεϊνών πάνω σε υποστρώματα, τα οποία βρίσκονται μέσα σε υδατικά διαλύματα συνοδεύεται από φαινόμενα, όπως είναι η ενυδάτωση των κατιόντων, τα οποία συγκεντρώνονται πάνω από τις αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες και τείνουν να εξουδετερώσουν το φορτίο τους (Pashley 1981), η αναδιοργάνωση των μορίων νερού ανάμεσα στις πρωτεΐνες και την επιφάνεια προσρόφησης (Janshoff et al. 2000) ή η αύξηση της εντροπίας λόγω της αποδέσμευσης υδατικών μορίων από υδρόφοβες επιφάνειες (Haynes & Norde 1994). Τα δύο πρώτα φαινόμενα αθροιστικά προκαλούν την εμφάνιση μια απωστικής δύναμης, η οποία ασκείται στα πρωτεϊνικά μόρια και τα εμποδίζει ως κάποιο βαθμό να προσεγγίσουν την επιφάνεια και να προσροφηθούν σε αυτή. Η δύναμη αυτή εκφράζεται μέσω μιας εμπειρικής σχέσης, η οποία έχει την ακόλουθη εκθετική μορφή:

$$F_{\text{ενυδ}} = F_0 e^{-\frac{x}{\mu}} \quad (3.6)$$

Η δύναμη σε μηδενική απόσταση από την επιφάνεια, F_0 , εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά ενυδάτωσης των αλληλεπιδρώντων σωμάτων, τα οποία είναι συνάρτηση του επιφανειακού τους φορτίου και κατ' επέκταση του pH του διαλύματος (Valle-Delgado et al. 2004a). Η σταθερά απόσβεσης, μ , εκφράζει το μήκος εξασθένησης της άπωσης και εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ιόντων στο διάλυμα καθώς και την ακτίνα ενυδάτωσής τους (Pashley 1981). Ενδεικτικά αναφέρεται, ότι οι ακτίνες ενυδάτωσης των κατιόντων Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} είναι 0.38nm, 0.36nm, 0.33nm και 0.41nm αντίστοιχα (Israelachvili 1992). Τα ανιόντα, λόγω της μεγαλύτερης διαμέτρου τους, αφού έχουν κερδίσει ένα ηλεκτρόνιο, και του πολύ μικρότερου χρόνου συγκράτησης πολικών μορίων νερού γύρω τους, θεωρείται ότι δεν ενυδατώνονται. Τυπικές τιμές της σταθεράς μ κυμαίνονται στο διάστημα 0.6-1.1nm, χωρίς να αποκλείονται μεγαλύτερες τιμές (Petsev & Vekilov 2000).

Ολοκληρώνοντας την επισκόπηση των κυριότερων δυνάμεων, οι οποίες εμφανίζονται ανάμεσα στα πρωτεϊνικά μόρια και τις επιφάνειες προσρόφησης, πρέπει να γίνει αναφορά και σε

κάποιες άλλου είδους δυνάμεις, τις στερεοχημικές (steric forces). Αυτές δημιουργούνται από την επικάλυψη των ηλεκτρονικών τροχιακών των ατόμων, τα οποία συνθέτουν τα αλληλεπιδρώντα σώματα (Willemsen et al. 1999) και είναι αυστηρά απωστικές. Επειδή όμως, η δράση τους περιορίζεται σε αποστάσεις μικρότερες του 1nm και λειτουργεί εξισορροπιστικά προς τις δυνάμεις van der Waals (Meagher & Griesser 2002), η ρόλος τους στην προσρόφηση των πρωτεϊνών θεωρείται αμελητέος και στη συγκεκριμένη εργασία δεν θα ληφθούν υπόψη. Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί μία περίπτωση, όπου αποκτούν σημασία, και αυτό συμβαίνει όταν τμήματα της πρωτεϊνικής αλυσίδας προεξέχουν στο διάλυμα και εμποδίζουν την προσέγγιση σε μικρές αποστάσεις (Valle-Delgado et al. 2004b, Zhang et al. 2005).

3.3 Μέτρηση δυνάμεων με το AFM

3.3.1 Η τεχνική

Η τεχνική μέτρησης δυνάμεων με το AFM δεν είναι μια απόλυτα αυθύπαρκτη τεχνική, καθώς την αρχή λειτουργίας της, την καταγραφή δηλαδή της κάμψης του προβόλου της ακίδας καθώς αυτή έλκεται ή απωθείται από την επιφάνεια του δείγματος, εκμεταλλεύεται και η τεχνική της επαφής για την αναπαραγωγή της τοπογραφίας του δείγματος. Η διαφορά όμως, της μέτρησης δυνάμεων από τις τεχνικές απεικόνισης είναι, ότι στην περίπτωση της δεν πραγματοποιείται σάρωση του δείγματος από την ακίδα στο οριζόντιο επίπεδο, ούτε το κύκλωμα ανάδρασης ελέγχει τη σχετική απόσταση ακίδας-επιφάνειας.

Κατά τη μέτρηση δυνάμεων η οριζόντια παλινδρομική κίνηση του σαρωτή σταματά και το σύστημα ελέγχου τον τροφοδοτεί αποκλειστικά με ένα σήμα, το οποίο ορίζει την περιοδική διαστολή και συστολή του πιεζοκρυστάλλου του στην κατακόρυφη διεύθυνση. Όσο ο πιεζοκρυστάλλος διαστέλλεται, η απόσταση ανάμεσα στην ακίδα και την επιφάνεια του δείγματος μειώνεται. Όταν η μεταξύ τους απόσταση γίνει μικρότερη του εύρους των δυνάμεων αλληλεπίδρασης ακίδας-επιφάνειας, η ακίδα αρχίζει να κάμπτεται προς τα επάνω ή προς τα κάτω, ανάλογα με τη διεύθυνση της συνισταμένης των ασκούμενων δυνάμεων (Σχήμα 3.2, σημείο I). Σε πολύ μικρότερη απόσταση και αν υποθεθεί ότι η ακίδα έλκεται από την επιφάνεια με συνεχώς αυξανόμενη δύναμη, η δυσκαμψία του προβόλου δεν μπορεί να εξισορροπήσει τη δύναμη αυτή με αποτέλεσμα η ακίδα να μεταπηδά ακαριαία στην επιφάνεια (snap-in, σημείο II). Καθώς ο σαρωτής εξακολουθεί να διαστέλλεται, η ακίδα μετακινείται μόνιμα σε επαφή με την επιφάνεια και η προς

τα κάτω κάμψη του προβόλου της αρχίζει σταδιακά να μειώνεται, ωστόσο επιστρέφει στην οριζόντια θέση (σημείο III) και στη συνέχεια να αρχίσει να κάμπτεται προς τα επάνω μέχρι το σημείο της μέγιστης διαστολής του πιεζοκρυστάλλου (σημείο IV). Η κάμψη της ακίδας μεταβάλλεται κατά αντίστροφο τρόπο, καθώς ο σαρωτής αρχίζει να συστέλλεται. Ο πρόβολος περνά και πάλι από τη θέση ισορροπίας του, αλλά οι διεπιφανειακές δυνάμεις συγκρατούν την ακίδα σε επαφή με την επιφάνεια με αποτέλεσμα αυτή να κάμπτεται ολοένα και περισσότερο προς τα κάτω (σημείο V). Όταν όμως η δύναμη, η οποία ασκείται στην ακίδα λόγω της αυξανόμενης κάμψης του προβόλου της, ξεπεράσει τη δύναμη συγκράτησής της στην επιφάνεια, η ακίδα αποκολλάται από την επιφάνεια με μία απότομη αναπήδηση (pull-off, σημείο VI) και ο πρόβολος επανέρχεται στη θέση ισορροπίας του. Έτσι συνεχίζει να απομακρύνεται από την επιφάνεια καθώς ο πιεζοκρυστάλλος μειώνει το ύψος του.

Σχήμα 3.2. Αλληλεπίδραση της ακίδας με την επιφάνεια κατά την καταγραφή καμπύλων δύναμης-μετατόπισης με το AFM.ⁱ

ⁱ Σχήμα δανεισμένο από το εγχειρίδιο Multimode SPM Instruction Manual Version 4.31ce, Digital instruments, Inc.

Η κάμψη της ακίδας στις διάφορες φάσεις αλληλεπίδρασής της με την επιφάνεια παρακολουθείται μέσω της μετατόπισης του σήματος πάνω στο φωτοαισθητήρα και καταγράφεται συναρτήσει της κατακόρυφης μετακίνησης, την οποία προκαλεί ο σαρωτής. Μια τέτοια τυπική καμπύλη κάμψης- μετακίνησης φαίνεται στο Σχήμα 3.3, όπου θετικές τιμές του κατακόρυφου άξονα αντιστοιχούν σε κάμψη του προβόλου προς τα επάνω και αρνητικές σε κάμψη προς τα κάτω. Η καμπύλη ξεκινά από τα δεξιά και το οριζόντιο τμήμα της, καθώς προχωρά προς τα αριστερά, αντιπροσωπεύει την προσέγγιση ακίδας-επιφάνειας, ενώ ο πρόβολος παραμένει άκαμπτος. Όταν η απόσταση μειωθεί τόσο, ώστε η ακίδα να εισέλθει στο δυναμικό πεδίο αλληλεπίδρασης με την επιφάνεια, αρχίζει να κάμπτεται προς τα κάτω και στο σημείο I έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια. Το επόμενο τμήμα της καμπύλης με τη σταθερή θετική κλίση, αναπαριστά τη μετακίνηση της ακίδας σε επαφή με την επιφάνεια, καθώς ο σαρωτής συνεχίζει να επιμηκύνεται και συνεπώς, η κατακόρυφη μετατόπιση από το αρχικό σημείο αναφοράς να αυξάνει. Η παράλληλη αυτή μετακίνηση ακίδας και επιφάνειας συνεχίζεται μέχρι το σημείο II, όπου ξεκινά η συστολή του σαρωτή στην κατακόρυφη διεύθυνση. Έτσι, η ακίδα περνά από τη θέση ισορροπίας του προβόλου, ο οποίος αρχίζει να κάμπτεται προς τα κάτω καθώς η ακίδα παραμένει προσκολλημένη στην επιφάνεια. Τελικά όμως, αποκολλάται αιφνίδια (σημείο III) και η απομάκρυνση ακίδας-επιφάνειας συνεχίζεται με τον πρόβολο στην θέση ισορροπίας.

Σχήμα 3.3. Τυπική καμπύλη κάμψης της ακίδας (κατακόρυφος άξονας) κατά τη μεταβολή του ύψους του σαρωτή (οριζόντιος άξονας). Η πράσινη γραμμή αντιστοιχεί στην προσέγγιση ακίδας-επιφάνειας, ενώ η μαύρη στην απομάκρυνσή τους.

Η μέτρηση των δυνάμεων αλληλεπίδρασης ακίδας-υποστρώματος και εν γένει η εξαγωγή ποσοτικών παρατηρήσεων από τις καταγεγραμμένες καμπύλες κάμψης- μετακίνησης προϋποθέτει μια διαδικασία επεξεργασίας τους, η οποία αποτελείται από τρία βήματα.

Το πρώτο αφορά τη βαθμονόμηση του σήματος τάσης του φωτοαισθητήρα, ώστε οι μονάδες του κατακόρυφου άξονα της καμπύλης να ανταποκρίνονται σε ρεαλιστικά μεγέθη κάμψης του προβόλου. Η βαθμονόμηση αυτή στηρίζεται στην υπόθεση ότι, όσο η ακίδα κινείται σε επαφή με την επιφάνεια, η μεταβολή της κάμψης της ισούται με τη μεταβολή του ύψους του πιεζοκρυστάλλου. Συνεπώς, η κλίση του αντίστοιχου τμήματος της καμπύλης (ευθεία μεταξύ σημείων I και II, Σχήμα 3.3) πρέπει να είναι ίση με τη μονάδα. Πρακτικά, η βαθμονόμηση γίνεται αυτόματα από το λογισμικό ελέγχου του μικροσκοπίου, αν κατά τη λήψη της καμπύλης χαραχθεί μια ευθεία παράλληλη προς το τμήμα, το οποίο έχει σταθερή κλίση, και ζητηθεί η διόρθωση της υπολογιζόμενης κλίσης. Πρέπει να τονιστεί, ότι η βαθμονόμηση είναι απαραίτητη εξαιτίας των ενδεχόμενων διαφορών στην ευθυγράμμιση της δέσμης λέιζερ στην πίσω πλευρά του προβόλου ή τη γεωμετρία των προβόλων και για το λόγο αυτό επιβάλλεται να γίνεται κάθε φορά, που αντικαθίσταται η ακίδα ή αλλάζει η ευθυγράμμιση.

Το δεύτερο βήμα επεξεργασίας των καμπύλων κάμψης-μετακίνησης σχετίζεται με τον οριζόντιο άξονα και αφορά το μετασχηματισμό της σχετικής μετατόπισης του σαρωτή σε πραγματική απόσταση ανάμεσα στην ακίδα και το υπόστρωμα. Ο μετασχηματισμός αυτός γίνεται μέσω της ισότητας:

$$x = (d - d_0) + z \quad (3.7)$$

όπου με x συμβολίζεται η απόλυτη απόσταση ανάμεσα στην ακίδα και την επιφάνεια, με d η σχετική μετατόπιση του πιεζοκρυστάλλου, με d_0 η σχετική μετατόπιση του πιεζοκρυστάλλου για το σημείο μηδενικής απόστασης ακίδας-επιφάνειας και με z η κάμψη της ακίδας. Ως σημείο μηδενικής απόστασης ακίδας-επιφάνειας λαμβάνεται το σημείο, στο οποίο η καμπύλη αποκτά σταθερή θετική κλίση καθώς η ακίδα αρχίζει να κινείται σε επαφή με την επιφάνεια.

Τέλος, για να είναι δυνατή η εκτίμηση του μεγέθους των δυνάμεων, πρέπει οι καμπύλες κάμψης-απόστασης να μετατραπούν σε καμπύλες δύναμης-απόστασης μέσω της εξίσωσης του Hook:

$$F = k \cdot z \quad (3.8)$$

όπου F είναι η δύναμη, η οποία ασκείται από τον πρόβολο στην ακίδα για την εξισορρόπηση της δύναμης αλληλεπίδρασής της με την επιφάνεια, και k η δυσκαμψία ή αλλιώς, η σταθερά ελατηρίου του προβόλου. Μετά και από αυτή τη μετατροπή είναι εύκολο να προσδιοριστεί το μέγεθος της

δύναμης, το οποίο ενδιαφέρει κάθε φορά, όπως για παράδειγμα η δύναμη αποκόλλησης από την επιφάνεια ως η κατακόρυφη απόσταση ανάμεσα στο σημείο αναπήδησης της ακίδας (σημείο III, Σχήμα 3.3) και το οριζόντιο τμήμα της καμπύλης.

Ολοκληρώνοντας την περιγραφή της τεχνικής μέτρησης δυνάμεων, πρέπει να τονιστεί ότι η μέτρηση της δύναμης αλληλεπίδρασης ανάμεσα στην ακίδα και το υπόστρωμα έχει νόημα μόνο σε υγρό περιβάλλον, γιατί η συμπίκνωση της ατμοσφαιρικής υγρασίας στην επιφάνεια των δειγμάτων, όταν αυτά εξετάζονται στο αέρα, οδηγεί στην κάλυψη των αλληλεπιδράσεων των δύο σωμάτων από τις τριχοειδείς δυνάμεις. Η τεχνική μέτρησης δυνάμεων μπορεί να εφαρμοστεί ακόμα και με ταλαντούμενη ακίδα με στόχο τη μείωση της επίδρασης του θορύβου στην αναπαράσταση του δυναμικού πεδίου και τη μεγαλύτερη ακρίβεια των μετρήσεων (Chtcheglova et al. 2004, Kienberger et al. 2000). Σε κάθε περίπτωση όμως, η μέτρηση δυνάμεων απαιτεί τη χρήση ακίδων από νιτρίδιο του πυριτίου (Si_3N_4), επειδή οι ακίδες πυριτίου σπάνε πιο εύκολα, όταν πιέζονται πάνω στην επιφάνεια.

3.3.2 Διακριτική ικανότητα μετρήσεων

Το ιδιαίτερο πλεονέκτημα της χρήσης του AFM για τη μέτρηση δυνάμεων είναι η διακριτική του ικανότητα, η οποία φθάνει τα μερικά pN. Το μέγεθος της ελάχιστης μετρήσιμης δύναμης σε κάθε πείραμα ωστόσο, δεν είναι δεδομένο αλλά εξαρτάται από: ⁱⁱ

- την ευαισθησία του οπτικού συστήματος του φωτοαισθητήρα
- τις ιδιότητες του προβόλου και ειδικότερα τη δυσκαμψία του
- το θόρυβο, ο οποίος υπεισέρχεται στις μετρήσεις.

Οι διακριτική ικανότητα του φωτοαισθητήρα χαρακτηρίζεται από τη δυνατότητά του να αντιλαμβάνεται όσο το δυνατό μικρότερες μεταβολές της κάμψης του προβόλου και να τις μετατρέπει σε σήματα τάσης. Οι τιμές ανάλυσης στη φωτοδιόδο, τις οποίες εγγυώνται συνήθως οι κατασκευαστές, φθάνουν σε μονάδες πραγματικού μήκους κάμψης τα 0.1nm (Bhushan 2004). Για να είναι εφικτή αυτή η απόδοση της φωτοδιόδου χρειάζεται να περιοριστούν τα φαινόμενα οπτικής παρεμβολής, τα οποία οφείλονται στην ανάκλαση μέρους της δέσμης λέιζερ από το υπόστρωμα και στη συμβολή του με την ανάκλαση από το πίσω μέρος του προβόλου. Τα προβλήματα οπτικής παρεμβολής εμφανίζονται πιο έντονα στην τεχνική μέτρηση δυνάμεων σε σχέση με τις τεχνικές απεικόνισης εξαιτίας των μεγάλων αυξομειώσεων της απόστασης ακίδας-υποστρώματος, αλλά

ⁱⁱ JPG Instruments, Technical Report, Tech 12/04

είναι δυνατό να αντιμετωπιστούν με χρήση υπερευαίσθητων φωτοαισθητήρων χαμηλού θορύβου και ακτίνων λέιζερ υψηλής συνοχής. Είναι ευνόητο ότι η ευαισθησία του οπτικού συστήματος του μικροσκοπίου αποτελεί παράμετρο, στην οποία ο χειριστής του AFM δεν μπορεί να παρέμβει προκειμένου να αυξήσει την ανάλυση των μετρήσεων.

Αντίθετα, πρέπει να ιδιαίτερα προσεκτικός στην επιλογή των χρησιμοποιούμενων ακίδων, αφού η σταθερά ελατηρίου του προβόλου τους σε συνδυασμό με τη ευαισθησία του φωτοαισθητήρα καθορίζει την ελάχιστη μετρήσιμη δύναμη. Για να γίνει αυτό κατανοητό, υπενθυμίζεται η Εξίσωση 3.8, από την οποία προκύπτει ότι η μέτρηση μικρών δυνάμεων, F , δεδομένης της ελάχιστης δυνατής κάμψης, z , που μπορεί να καταγραφεί από το οπτικό σύστημα, απαιτεί όσο το δυνατό μικρότερη δυσκαμψία, k , του προβόλου. Αν λοιπόν, θεωρηθεί ότι η ευαισθησία του φωτοαισθητήρα για την κατακόρυφη κάμψη είναι 0.1nm, πρόβολοι με σταθερά ελατηρίου μεταξύ 0.1-10 N/m, θα μπορέσουν να μετρήσουν δυνάμεις τόσο μικρές έως και 10pN (Allen et al. 2003). Οι δυνάμεις αυτές είναι συγκρίσιμες με την αντοχή των χημικών δεσμών, όπως για παράδειγμα του ομοιοπολικού, η οποία είναι περίπου 1nN (Dietz et al. 2006) ή του δεσμού υδρογόνου, η οποία είναι μόλις 10pN (Bhushan 2004).

Βέβαια η δυσκαμψία η δυσκαμψία του προβόλου δεν πρέπει να είναι η πολύ μικρή, γιατί τότε η ακίδα δεν θα είναι ικανή να ακολουθεί με ακρίβεια τις απότομες μεταβολές των δυναμικών πεδίων (Bhushan 2004). Ας θεωρήσουμε για παράδειγμα, το δυναμικό πεδίο, το οποίο φαίνεται στο Σχήμα 3.4. Καθώς η ακίδα προσεγγίζει την επιφάνεια κάμπτεται προς κάτω λόγω των ελκτικών δυνάμεων (van der Waals, υδροφοβικών κα.) μέχρι το σημείο Α, όπου λόγω στερεοχημικών απώσεων αρχίζει να κάμπτεται προς τα επάνω. Η διακεκομμένη γραμμή αναπαριστά την κάμψη του προβόλου λόγω των ασκούμενων στην ακίδα δυνάμεων και η κλίση της ταυτίζεται με τη σταθερά ελατηρίου του k . Αν η κλίση της δύναμης στο σημείο Β γίνει μεγαλύτερη από τη σταθερά ελατηρίου k , ο πρόβολος δεν θα μπορέσει να ακολουθήσει το δυναμικό και η ακίδα θα μεταπηδήσει σε επαφή με την επιφάνεια στη θέση Γ υπό την επίδραση της απότομης αύξησης της ελκτικής δύναμης (Janshoff et al. 2000, Meagher & Griesser 2002). Αντίθετα, κατά την απομάκρυνση της ακίδας από την επιφάνεια, όσο η κλίση της καμπύλης της δύναμης είναι μικρότερη από τη σταθερά k του προβόλου ($k > \frac{\partial F}{\partial x}$), η ακίδα δεν αναπηδά από την επιφάνεια με αποτέλεσμα η μετρούμενη δύναμη αποκόλλησης (σημείο Δ) να διαφέρει από την πραγματική δύναμη του δεσμού (σημείο Α). Μόνο αν ο πρόβολος είναι αρκετά εύκαμπτος, δηλαδή έχει χαμηλή τιμή k , ή το δυναμικό αρκετά

απότομο, καταφέρνει το σύστημα ακίδας-προβόλου να αποδώσει με ακρίβεια το ελάχιστο του ελκτικού δυναμικού.

Σχήμα 3.4 Μεταβολή της δύναμης συναρτήσει της απόστασης ανάμεσα στην ακίδα και την επιφάνεια (συνεχής γραμμή). Η διακεκομμένες γραμμές παρουσιάζουν το δυναμικό πεδίο, το οποίο ακολουθεί η ακίδα, στην πραγματικότητα, λόγω της δυσκαμψίας της k κατά την προσέγγιση (B→Γ) και απομάκρυνση (Δ→Ε) από την επιφάνεια. (Α) Το ελάχιστο του δυναμικού πεδίου.

Η χρήση ακίδων με προβόλους μικρής δυσκαμψίας μπορεί να προσφέρει πιστότητα στην απόδοση του δυναμικού πεδίου και μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα στις μετρήσεις αποκόλλησης, αλλά αυξάνει την επίδραση του θερμικού θορύβου. Η θερμική κίνηση των μορίων του ρευστού, το οποίο περιβάλλει το σύστημα προβόλου-ακίδας, το αναγκάζει να ταλαντώνεται στη συχνότητα συντονισμού του, με συνέπεια κάθε μέτρηση δυνάμεων, εφόσον πραγματοποιείται σε εύρος συχνοτήτων, το οποίο περιλαμβάνει τη συχνότητα συντονισμού, να αντανakλά την υπέρθεση του θορύβου στα υπόλοιπα δεδομένα. Σύμφωνα με τη σχέση:

$$U_{\text{προβ}} = \frac{1}{2} k \langle z^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T \quad (3.9)$$

η μέση τιμή των τετραγώνων των διαταραχών της ακίδας λόγω θερμικών ταλαντώσεων, $\langle z^2 \rangle$, είναι αντιστρόφως ανάλογη της σταθεράς ελατηρίου του προβόλου και για μία τιμή της τάξης των 0.1N/m στους 27°C η τετραγωνική της ρίζα υπολογίζεται γύρω στα 0.2nm ή 20pN (Fritz et al. 1998). Στην πράξη βέβαια, στις μετρήσεις παρατηρείται μεγαλύτερος θόρυβος (Baumgartner et al. 2000, Gergely et al. 2001), ο οποίος αποδίδεται σε μηχανικές ταλαντώσεις προερχόμενες από το περιβάλλον του μικροσκοπίου. Η πηγή προέλευσης των τελευταίων μπορεί να εντοπιστεί, αν υπολογιστεί η περίοδος τους. Για παράδειγμα αναφέρεται, ότι θόρυβος με συχνότητα 60Hz πιθανότατα οφείλεται σε κάποιο ηλεκτρικό κύκλωμα. Οι ανταγωνιστικές τάσεις για αύξηση της ευαισθησίας των μετρήσεων από τη μία μεριά και μείωση της επίδρασης του θορύβου από την

άλλη συμβιβάζονται με χρήση προβόλων χαμηλής δυσκαμψίας (0.01-0.1N/m) και μικρού μήκους (μικρότερο από 50μm) (Hinterdorfer & Dufrene 2006).

Όσα αναφέρθηκαν ήδη, αποκαλύπτουν την ιδιαίτερη σημασία, την οποία έχει η σταθερά ελατηρίου του προβόλου για τα αποτελέσματα των μετρήσεων με το AFM. Λόγω αυτού, αν και η τιμή της δίνεται από τους κατασκευαστές των ακίδων, είναι καλύτερο να προσδιορίζεται για κάθε ένα από τους χρησιμοποιούμενους προβόλους χωριστά. Για το σκοπό αυτό μπορεί να εφαρμοστεί μία από τις μεθόδους, οι οποίες περιγράφονται στη συνέχεια.

3.3.2 Βαθμονόμηση της σταθεράς ελατηρίου του προβόλου της ακίδας

Στο κεφάλαιο αυτό θα περιγραφούν οι ακόλουθες τέσσερις μέθοδοι βαθμονόμησης της δυσκαμψίας του προβόλου της ακίδας:

1. Εκτίμηση βάσει της τυπικής γεωμετρίας
2. Προσθήκη μάζας στον πρόβολο
3. Θερμικός συντονισμός
4. Υπολογισμός με το υδροδυναμικό μοντέλο

Πρέπει να υπογραμμιστεί ότι η σταθερά του ελατηρίου ως εγγενές χαρακτηριστικό του προβόλου δεν εξαρτάται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Συνεπώς, η σταθερά k , η οποία υπολογίζεται στον αέρα, ισχύει και σε υγρό ή στο κενό. Από τις τέσσερις μεθόδους, ο θερμικός συντονισμός είναι ο ευρύτερα χρησιμοποιούμενος, χάρη κυρίως στην ενσωμάτωση της σχετικής διαδικασίας βαθμονόμησης στα περισσότερα από τα λογισμικά ελέγχου των AFM με τη μορφή μιας αυτόματα εκτελέσιμης εντολής.

Εκτίμηση βάσει της τυπικής γεωμετρίας

Η μέθοδος αυτή βαθμονόμησης στηρίζεται στην υπόθεση, ότι τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά και οι ιδιότητες του υλικού είναι κοινά για όλους τους προβόλους μιας συγκεκριμένης κατηγορίας με μόνη εξαίρεση το πάχος τους, το οποίο μπορεί να διαφέρει εξαιτίας των ιδιαίτερων συνθηκών κατασκευής. Έτσι, σε κάθε κατηγορία προβόλων αποδίδεται ένας συντελεστής b και η σταθερά ελατηρίου k υπολογίζεται με τη βοήθεια της σχέσης:

$$k=b \cdot f^3 \quad (3.10)$$

όπου f είναι η συχνότητα συντονισμού του εκάστοτε προβόλου στον αέρα, η οποία υπολογίζεται εύκολα με τη βοήθεια του προγράμματος ελέγχου του AFM. Τυπική τιμή του συντελεστή b για τους

τριγωνικούς προβόλους των ακίδων από Si_3N_4 είναι $7 \cdot 10^{-15} \text{ N}\cdot\text{s}^3/\text{m}$, ενώ για του ορθογώνιους προβόλους από Si είναι $4 \cdot 10^{-15} \text{ N}\cdot\text{s}^3/\text{m}$ ⁱⁱⁱ.

Το μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η αβεβαιότητα σχετικά με την ακριβή γεωμετρία του προβόλου. Αν τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του ήταν γνωστά, η δυσκαμψία για την απλή περίπτωση του ορθογώνιου προβόλου θα μπορούσε να υπολογιστεί από τη σχέση:

$$k = \frac{Et^3w}{4L^3} \quad (3.11)$$

όπου E είναι το μέτρο ελαστικότητας του υλικού, από το οποίο είναι κατασκευασμένος ο πρόβολος, t το πάχος του, w το πλάτος και L το μήκος του (Bhushan 2004). Η μέτρηση όμως, των διαστάσεων κάθε προβόλου χωριστά θα ήταν μια επίπονη διαδικασία και συνεπώς, ο παραπάνω τύπος δεν παρουσιάζει πρακτική χρησιμότητα.

Προσθήκη μάζας στον πρόβολο

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μέτρηση της συχνότητας συντονισμού του προβόλου πριν και μετά την προσθήκη μιας στοιχειώδους γνωστής μάζας στο άκρο του (Cleveland et al. 1993). Εδώ θα παρουσιαστεί για την περίπτωση ενός ορθογώνιου προβόλου. Η συχνότητα συντονισμού, f, ενός τέτοιου προβόλου μάζας m υπολογίζεται σύμφωνα με τη σχέση:

$$f_0 = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (3.12)$$

όπου ω είναι η κυκλική συχνότητα συντονισμού, ενώ μετά την προσθήκη της γνωστής μάζας M από τη σχέση:

$$f_1 = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{M+m}} \quad (3.13)$$

Οι παραπάνω δύο εξισώσεις σχηματίζουν ένα σύστημα, το οποίο μπορεί να λυθεί ως προς τη σταθερά ελατηρίου k και τη μάζα m του προβόλου, αν οι συχνότητες f_1 και f_2 προσδιοριστούν:

$$k = (2\pi)^2 \frac{M}{\frac{1}{f_1^2} - \frac{1}{f_0^2}} \quad (3.14)$$

$$m = M \frac{f_1^2}{f_0^2 - f_1^2} \quad (3.15)$$

ⁱⁱⁱ dl MultiMode PicoForce, Software version 6, Instruction Manual, 004-101-000, Revision D

Η ακρίβεια της μεθόδου εξαρτάται από τον προσδιορισμό της προστιθέμενης μάζας, δεδομένου ότι οι συχνότητες f_0 και f_1 μπορούν να μετρηθούν εύκολα και με υψηλή ακρίβεια.

Αν στην Εξίσωση 3.12 η σταθερά ελατηρίου k αντικατασταθεί σύμφωνα με την 3.11, προκύπτει η εξίσωση εξάρτησης της συχνότητας f από τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του προβόλου:

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{Et^3w}{4L^3m}} \quad (3.16)$$

Λύνοντας την εξίσωση αυτή ως προς το πάχος t , αντικαθιστώντας πίσω στην 3.11 και λαμβάνοντας υπόψη ότι η μάζα m υπολογίζεται από τον τύπο $m=\rho \cdot t \cdot w \cdot L$, με ρ την πυκνότητα του υλικού του προβόλου, καταλήγουμε στη σχέση:

$$k = 2\pi^3 L^3 w f_0^3 \sqrt{\frac{\rho^3}{E}} \quad (3.17)$$

η οποία αποδεικνύει την εξάρτηση της σταθεράς k από την τρίτη δύναμη της συχνότητας συντονισμού (βλ. Εξίσωση 3.10).

Θερμικός συντονισμός

Η τρίτη αυτή μέθοδος βαθμονόμησης (Florin et al. 1995, Gibson et al. 2004) είναι συντομότερη και ακριβέστερη από τις άλλες τρεις και για αυτό προτιμάται. Για την εφαρμογή της απαιτείται η συλλογή για ένα χρονικό διάστημα, περίπου 10s, δεδομένων κάμψης του προβόλου, ενώ η ακίδα βρίσκεται μακριά από την επιφάνεια. Η κίνηση Brown των μορίων του αέρα γύρω από τον πρόβολο τον αναγκάζουν να ταλαντώνεται τυχαία κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας. Αν από τη καταγεγραμμένη χρονοσειρά των διαταραχών του προβόλου υπολογιστεί μέσω του μετασχηματισμού Fourier η πυκνότητα του φάσματος ισχύος (power spectral density, PSD), το εμβαδό κάτω από την υψηλότερη κορυφή του φάσματος δίνει την ισχύ συντονισμού P λόγω του θερμικού θορύβου. Η τελευταία είναι ίση με το μέσο τετράγωνο των διαταραχών στο πεδίο του χρόνου, δηλαδή $P=\langle z^2 \rangle$. Συνεπώς, η κινητική ενέργεια του προβόλου εξαιτίας των θερμικών διαταραχών είναι:

$$U = \frac{1}{2} m \omega_o^2 \langle z^2 \rangle = \frac{1}{2} m \omega_o^2 P \quad (3.18).$$

Η ίδια ενέργεια όμως, μπορεί να εκφραστεί με βάση το θεώρημα της ισοκατανομής της ενέργειας των Maxwell-Boltzmann ως συνάρτηση της θερμοκρασίας T και της σταθεράς k_B ,

$$U = \frac{1}{2} k_B T \quad (3.19).$$

Από το συνδυασμό των Εξισώσεων 3.17 και 3.18, αφού ληφθεί υπόψη ότι $\omega_o^2 = k/m$, προκύπτει τελικά:

$$k = \frac{k_B T}{\rho} \quad (3.20).$$

Η ακρίβεια, με την οποία υπολογίζεται η σταθερά ελατηρίου του προβόλου σύμφωνα με την Εξίσωση 3.20, εξαρτάται όχι μόνο από την απομόνωση των μη θερμικών συνεισφορών στο φάσμα αλλά και από την ευαισθησία του τελευταίου καθώς και το εύρος του. Όσον αφορά στην ανάλυση του φάσματος αυτή φτάνει τα 25Hz, τιμή, η οποία θεωρείται ικανοποιητική. Από την άλλη μεριά το θεώρημα του Nyquist εγγυάται ακρίβεια στο μετασχηματισμό Fourier για συχνότητες έως και το μισό του ρυθμού δειγματοληψίας. Δεδομένου ότι ένα τυπικό σύστημα ελέγχου AFM μπορεί να συλλέξει τα δεδομένα κάμψης με μέγιστη συχνότητα δειγματοληψίας 64kHz, το φάσμα μπορεί να αποκαλύψει συχνότητες συντονισμού μέχρι 32kHz. Το γεγονός αυτό καθιστά τη συγκεκριμένη μέθοδο ακατάλληλη για τη βαθμονόμηση της δυσκαμψίας προβόλων με υψηλή συχνότητα συντονισμού ή μικρό μήκος, όπως για παράδειγμα των προβόλων από Si (βλ. Πίνακα 2.2). Αντίθετα, ενδείκνυται για τη βαθμονόμηση των τριγωνικών προβόλων, οι οποίοι χρησιμοποιούνται κατά κόρον στις μετρήσεις δυνάμεων μέσα σε υγρό.

Υπολογισμός με το υδροδυναμικό μοντέλο

Η μέθοδος αυτή, η οποία εφαρμόζεται μόνο σε ορθογώνιους προβόλους, στηρίζεται στη σύγκριση του συντονισμού του προβόλου στο κενό με το συντονισμό του ίδιου προβόλου σε κάποιο ρευστό (Sader et al. 1999). Η σταθερά ελατηρίου k υπολογίζεται συναρτήσει της υδροδυναμικής συνάρτησης $\Gamma(\omega)$, η οποία εξαρτάται από τον αριθμό Reynolds, των χαρακτηριστικών συντονισμού και των διαστάσεων του προβόλου σύμφωνα με την εξίσωση:

$$k = 0.1906 \rho_p w^2 L Q_p \Gamma_i(\omega_p) \omega_p^2 \quad (3.21)$$

όπου ρ_p είναι η πυκνότητα του ρευστού, Q_p είναι ο παράγοντας Q για τον πρόβολο στο ρευστό, ω_p είναι η συχνότητα συντονισμού του προβόλου στο ρευστό και $\Gamma_i(\omega_p)$ είναι το φανταστικό μέρος της υδροδυναμικής συνάρτησης $\Gamma(\omega)$ (για τον υπολογισμό της βλ. (Sader 1998)).

Η μέθοδος αυτή βαθμονόμησης έχει περισσότερο θεωρητικό ενδιαφέρον παρά πρακτικό, λόγω περιορισμών σχετικά με τη γεωμετρία των ορθογώνιων προβόλων, οι οποίοι πρέπει να έχουν μεγάλο μήκος σε σχέση με το πλάτος τους ($L/W > 5$), και τον παράγοντα Q_p , ο οποίος πρέπει να είναι

αρκετά μεγαλύτερος της μονάδας. Εξαιτίας μάλιστα του δεύτερου περιορισμού η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί στον αέρα αλλά όχι στο νερό.

3.3.3 Μέθοδοι ακινητοποίησης πρωτεϊνών στην ακίδα

Η μέτρηση δυνάμεων με το AFM έχει εξελιχθεί σε μια πολύτιμη τεχνική για τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών με τεχνητές ή βιολογικές επιφάνειες, μέσω της ακινητοποίησης των πρώτων στην ακίδα. Το συγκριτικό της πλεονέκτημα έναντι άλλων τεχνικών με παρόμοιο σκοπό (βλ. Κεφ. 1.4.2) είναι, εκτός από την αμεσότητα της εφαρμογής της, η ευαισθησία της. Αποτέλεσμα της υψηλής διακριτικής ανάλυσης των μετρήσεων με το AFM είναι η δυνατότητα διερεύνησης της αλληλεπίδρασης μεμονωμένων βιομορίων με επιφάνειες, όπως θα φανεί στο επόμενο, τρίτο μέρος αυτής της εργασίας. Εκτός όμως, από μεμονωμένα μόρια, το AFM έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα και για τη μέτρηση της δύναμης αλληλεπίδρασης μεταξύ επιφανειών και ακίδων, τροποποιημένων με ένα πρωτεϊνικό στρώμα. Συνήθης πρακτική για την προετοιμασία τέτοιων τροποποιημένων ακίδων είναι η προσκόλληση στην άκρη του προβόλου ενός σφαιριδίου διαστάσεων μερικών μm για τη δημιουργία του λεγόμενου κολλοειδούς αισθητήρα (colloid probe), χωρίς να είναι ωστόσο, σπάνια τα πειράματα με κάλυψη μόνο των ίδιων των ακίδων από το πρωτεϊνικό στρώμα.

Η μέτρηση της δύναμης μεταξύ πρωτεϊνικών στρωμάτων και επιφανειών παρουσιάζει ενδιαφέρον, γιατί μπορεί να θεωρηθεί ότι η συνισταμένη βιοφυσική συμπεριφορά των μορίων, τα οποία συνθέτουν το στρώμα, αντικατοπτρίζει τη μέση τάση της πρωτεΐνης στο διάλυμα (Meagher & Griesser 2002). Η υπόθεση αυτή αληθεύει αν τα μόρια της πρωτεΐνης έχουν τυχαίο προσανατολισμό στο στρώμα (Sethuraman et al. 2004) και για αυτό το σκοπό προτιμούνται μη-ειδικές μέθοδοι ακινητοποίησης, όπως είναι η πρόσδεση μέσω των λυσίνων ή των τελικών αμινομάδων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Η χρήση των κολλοειδών αισθητήρων, αν και αυξάνει την επιφάνεια, η οποία επιδρά στις μετρήσεις, μειώνοντας την ανάλυσή τους σε μεγέθη, που δεν σχετίζονται με τις διαστάσεις των πρωτεϊνών, παρουσιάζει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα σε σχέση με την απλή επικάλυψη της ακίδας:

1. Αυξάνει το εύρος και την ένταση των ασκούμενων δυνάμεων, επιτρέποντας την ευκολότερη καταγραφή και αναγνώριση μικρών δυνάμεων (Muller & Engel 1997b).
2. Συμβάλλει στην αποφυγή προβλημάτων, τα οποία πηγάζουν από τις ατέλειες της γεωμετρίας της ακίδας.

3. Μειώνει την πιθανότητα αλληλεπίδρασης με το υπόστρωμα, το οποίο κρύβεται κάτω από στρώματα χημικής τροποποίησης, λόγω της μικρότερης οξύτητάς του σε σχέση με την ακίδα (McGurk et al. 1999).
4. Δεν επηρεάζεται από τοπικές ανομοιομορφίες, όπως για παράδειγμα ελαττώματα στην επικάλυψη ή μολύνσεις (Pasche et al. 2005).

Ανεξάρτητα όμως, από το αν χρησιμοποιείται κολλοειδής αισθητήρας ή απλή ακίδα, οι μέθοδοι κάλυψης με το πρωτεϊνικό στρώμα είναι ίδιες. Συνήθως προτιμάται η ακινητοποίηση να γίνεται μέσω ομοιοπολικών δεσμών και όχι μέσω προσρόφησης με φυσικές δυνάμεις, για να εξασφαλιστεί η πρόσδεση της πρωτεΐνης στον αισθητήρα με ισχυρότερες δυνάμεις από αυτές, οι οποίες μετρούνται (Hinterdorfer & Dufrene 2006, Wagner 1998). Έτσι, μειώνεται ο κίνδυνος σύγχυσης των δυνάμεων απόσχισης του πρωτεϊνικού στρώματος με τις μετρούμενες δυνάμεις αποκόλλησης από την επιφάνεια του δείγματος.

Για την ακινητοποίηση των βιομορίων στις ακίδες του AFM έχουν αναπτυχθεί μια σειρά μεθόδων, οι πιο γνωστές από τις οποίες είναι η σύνδεση αβιδίνης-βιοτίνης, το σύστημα ιστιδίνης-νιτριλοτριοξικού οξέος (NTA-His₆) και ο σχηματισμός διασταυρούμενων δεσμών ύστερα από χημική επεξεργασία των επιφανειών με αλκανοθειόλες ή σιλάνια. Περισσότερες πληροφορίες για τη διαδικασία τροποποίησης των επιφανειών και πρόσδεσης των πρωτεϊνικών μορίων σε κάθε μία από αυτές δίνονται στη συνέχεια.

Σύστημα αβιδίνης-βιοτίνης

Η ακινητοποίηση των πρωτεϊνών με αυτή τη μέθοδο πραγματοποιείται σε τρία βήματα. Στο πρώτο φυσιολοφάται στην επιφάνεια της ακίδας ή του μικροσφαιριδίου αλβουμίνη, σημασμένη με βιοτίνη. Στη συνέχεια, προστίθεται αβιδίνη ή σπανιότερα στρεπταβιδίνη, η οποία συνδέεται στη βιοτίνη της προσροφημένης αλβουμίνης και τέλος, σημασμένη με βιοτίνη πρωτεΐνη προσκολλάται στις ελεύθερες υποδοχές της αβιδίνης (Hinterdorfer & Dufrene 2006).

Η σήμανση των πρωτεϊνών με βιοτίνη μπορεί να γίνει με τη βοήθεια ενός υδροξυ-θειο-ηλεκτριμιδικού εστέρα (NHS), ο οποίος αντιδρά με τις διαθέσιμες αμινομάδες στην επιφάνειά τους. Η αλβουμίνη για παράδειγμα, έχει 30-35 τέτοιες ομάδες στην επιφάνειά της. Στη θέση της σχετικά ακριβής αβιδίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα συνθετικό υποκατάστατό της, το οποίο φέρει την εμπορική ονομασία NeutrAvidin™ και έχει σταθερά αντίδρασης με τη βιοτίνη, $K_a=10^{15} \text{M}^{-1}$ ^{iv}.

^{iv} 2005/2006 Applications Handbook and Catalog, Pierce Biotechnology, Inc.

Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η μικρή αντοχή των σχηματιζόμενων δεσμών, η οποία είναι αρκετά χαμηλότερη αυτής των ομοιοπολικών δεσμών. Αυτό έχει ως συνέπεια, στις πειραματικές μετρήσεις να καταγράφονται πολλαπλές, παράλληλες ρήξεις και να μην είναι εύκολο να εντοπιστούν εκείνες, οι οποίες αντιστοιχούν στην αποκόλληση της πρωτεΐνης από την επιφάνεια του δείγματος.

Σύστημα NTA-His₆

Η μέθοδος αυτή πρωτοεφαρμόστηκε στην τεχνολογία της χρωματογραφίας και της κατασκευής βιοαισθητήρων και βασίζεται στο σχηματισμό δεσμού ανάμεσα στην ιστιδίνη (His₆) και το νιτριλοτριξικό οξύ (NTA). Έτσι, σημασμένες με ιστιδίνη πρωτεΐνες είναι δυνατό να προσκολληθούν στην επιφάνεια της ακίδας ή του κολλοειδούς αισθητήρα, ύστερα από χημική τροποποίηση των τελευταίων με NTA ή αλκανοθειόλες, που φέρουν στο άκρο τους τη χημική ομάδα NTA.

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται η δυνατότητα επιλογής του σημείου πρόσδεσης και συνεπώς ο προσδιορισμός του προσανατολισμού των συνδεδεμένων μορίων καθώς και ο έλεγχος της πρόσδεσης μέσω του Ni²⁺, το οποίο λειτουργεί ως μοριακός διακόπτης του δεσμού NTA-His₆ (Bhushan 2004). Μειονέκτημα, εντούτοις, και αυτής της τεχνικής είναι η μικρή αντοχή των σχηματιζόμενων δεσμών, η οποία δεν ξεπερνά τα 150-200pN (Hinterdorfer & Dufrene 2006).

Αντίδραση θειομάδων

Ένας άλλος τρόπος πρόσδεσης των πρωτεϊνικών μορίων στην ακίδα είναι μέσω του σχηματισμού ομοιοπολικών δεσμών ανάμεσα στις θειομάδες των μορίων και επιφανειακό στρώμα χρυσού (Bonanni et al. 2005). Αν και οι περισσότερες πρωτεΐνες δεν διαθέτουν εύκολα προσβάσιμες θειομάδες (Klein et al. 2003), τέτοιες μπορούν να δημιουργηθούν με μία από τις ακόλουθες μεθόδους (Bhushan 2004, Hinterdorfer & Dufrene 2006, Hinterdorfer et al. 2000):

- Αντίδραση του ετεροδιπλοδραστικού συνδέτη N-3-(S-ακετυλοθειοπροπιονικό) ηλεκτριμίδιο (SATP) με τις λυσίνες των πρωτεϊνών και αποκάλυψη του δεσμού με NH₂OH.
- Απόσχιση δισουλφιδικών δεσμών στην πεπτιδική αλυσίδα με 2-θειοαιθυλαμίνη HCl ή αποδόμηση των πρωτεϊνών με χρήση παπαΐνης για την εμφάνιση ελεύθερων κυστεϊνών.
- Σύνδεση του 2-πυριδυλοδιθειοπροπιονικού αζιδίου (PDP) στις αμίνες της πρωτεΐνης.

Εναλλακτικά της δημιουργίας ελεύθερων θειομάδων, η πρόσδεση των πρωτεϊνικών μορίων σε υποστρώματα καλυμμένα με χρυσό είναι δυνατή μέσω αυτο-οργανούμενων μονομοριακών

στρωμάτων (SAMs) αλκανοθειόλων (Prime & Whitesides 1991). Το άκρο αυτών των αλυσίδων, το οποίο φέρει τη θειομάδα συνδέεται στο υπόστρωμα, ενώ το άλλο αντιδρά με την πρωτεΐνη. Οι αλκανοθειόλες, οι οποίες φέρουν καρβοξυλομάδα στο ελεύθερο άκρο τους, αντιδρούν με τις αμινομάδες της πρωτεΐνης παρουσία του N-υδροξυ-ηλεκτριμιδίου (NHS), ύστερα από εστεροποίηση με N-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)-N'-αιθυλοκαρβοδιιμιδίο (EDC) (Kidoaki & Matsuda 1999, Kidoaki et al. 2001). Αντίθετα αλκανοθειόλες, οι οποίες φέρουν αμινομάδες, δημιουργούν δεσμούς με τις πρωτεΐνες μέσω της καρβοξυμεθυλαμύλωσης, η οποία ενεργοποιείται με το NHS και το EDC.

Χρήσιμη για την εκτίμηση της τελικής συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στην επιφάνεια είναι η γνώση της επιφανειακής πυκνότητας των αλκανοθειόλων. Μια προσεγγιστική τιμή για την επιφάνεια, την οποία καταλαμβάνει κάθε αλυσίδα αλκανοθειόλης, είναι 21Å (Kokkoli & Zukoski 2000).

Τροποποίηση επιφανειών με αμινομάδες

Μία άλλη μέθοδος ακινητοποίησης πρωτεϊνών, η οποία δεν απαιτεί την κάλυψη της επιφάνειας της ακίδας ή του κολλοειδούς αισθητήρα με χρυσό, είναι μέσω της προσθήκης αμινομάδων. Η τροποποίηση των επιφανειών πυριτίου με αμινομάδες γίνεται με επεξεργασία είτε με κάποιο κατάλληλο σιλάνιο (Hinterdorfer et al. 1998), όπως είναι το 3-αμινοπροπυλο-τριαθοξυ-σιλάνιο (APTES)^ν, το 3-αμινοπροπυλο-διμεθυλ-αιθοξυσιλάνιο (APDES)(Vansteenkiste et al. 2000) ή η τριμεθοξυ-σιλυλο-προπυλο-διαιθυλενοτριαμίνη (DETA) (Fritz et al. 1995) είτε με αιθανολαμίνη (Kienberger et al. 2000, Klein et al. 2003). Τρεις διαφορετικές διαδικασίες χημικών τροποποιήσεων αυτού του είδους δοκιμάστηκαν στα πειράματα, τα οποία θα περιγραφούν στο Κεφάλαιο 4 και εκεί θα δοθούν περισσότερες πληροφορίες για αυτές.

Για την πρόσδεση των πρωτεϊνών στις τροποποιημένες με αμινομάδες επιφάνειες χρησιμοποιείται στη συνέχεια, η γλουταραλδεΐδη, η οποία χάρη στις δύο αλδεΐδες (-CH=O) στα άκρα της, δρα ως συνδετικός κρίκος ανάμεσα στις αμινομάδες του υποστρώματος και τις λυσίνες της πρωτεΐνης (Facci et al. 2002, Wang et al. 2002). Εναλλακτικά, έχει αναφερθεί η χρήση του N-5-2-νιτροβενζοϋλοξυ-ηλεκτριμιδικού αζιδίου (ANB-NOS), το οποίο ενεργοποιείται μέσω ακτινοβολίας (Karrasch et al. 1993, Wagner 1998). Δυνατή είναι ακόμα, η χρήση ενός συνδέτη, ο οποίος στο ένα άκρο του φέρει ένα υδροξυ-ηλεκτριμιδικό (NHS) και στο άλλο ένα 2-πυριδυλο-διθειοπροπιονικό εστέρα (PDP). Η ομάδα NHS συνδέεται ομοιοπολικά με τις αμινομάδες του υποστρώματος, ενώ η

^ν Biological Sample Preparation, Veeco Support Note 331, Revision A

PDP με τις θειομάδες στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, εφόσον υπάρχουν τέτοιες (Haselgrubler et al. 1995).

Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται συνοπτικά μέθοδοι ακινητοποίησης πρωτεϊνών σε ακίδες AFM, οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί σε πειράματα μέτρησης των δυνάμεων αποκόλλησης από επιφάνειες, και τα αποτελέσματά των πειραμάτων αυτών. Η σχετική βιβλιογραφική ανασκόπηση έχει σκοπίμως περιοριστεί σε μεθόδους σιλιανοποίησης, χρήσης αλκανοθειόλων και φυσιορόφησης, καθώς και οι τρεις εμφανίζονταν ελκυστικότερες για εφαρμογή στα πειράματα αυτής της διατριβής.

Πίνακας 3.1. Μέθοδοι ακινητοποίησης και αποτελέσματα πειραμάτων μέτρησης δυνάμεων με τροποποιημένες ακίδες AFM.

Τροποποίηση ακίδας	Μετρούμενες δυνάμεις ^{vi}	Αναφορά
Αντίδραση θειομάδων		
1. Εναπόθεση σε κενό πρώτα χρωμίου και στη συνέχεια χρυσού στην επιφάνεια ακίδων Si ₃ N ₄	Οι δυνάμεις αποκόλλησης ακίδων από τροποποιημένες επιφάνειες με -CH ₃ , -NH ₂ , -COOH και -OH μειώνονται σύμφωνα με τη σειρά:	(Kidoaki & Matsuda 1999)
2. Εμβάπτιση σε διάλυμα HS(CH ₂) ₁₁ COOH 1mM σε αιθανόλη	CH ₃ (4nN) >>NH ₂ >OH>COOH (0nN)	
3. Εμβάπτιση σε διάλυμα EDC και NHS (1:9)	Οι μεγαλύτερες δυνάμεις καταγράφηκαν για το ινωδογόνο.	
4. Εμβάπτιση σε διάλυμα αλβουμίνης, ανοσοσφαιρίνης ή ινωδογόνου 1mg/ml για 3 ώρες	Δεν καταγράφηκαν δυνάμεις αποκόλλησης μεταξύ ακίδων και επιφανειών ομοίως τροποποιημένων με πρωτεΐνη.	
1. Βήματα 1,2,3 όπως στην προηγούμενη αναφορά	Δυνάμεις αποκόλλησης μεταξύ:	(Kidoaki et al. 2001)
2. Εμβάπτιση σε διάλυμα αλβουμίνης ή λυσοζύμης 1mg/ml για 3 ώρες	• αλβουμίνης-N,N διμεθυλακρυλαμιδίου: ενδείξεις συμπίεσης στρώματος πολυμερους και δυνάμεις αποκόλλησης μόνο για μικρές αλυσίδες πολυμερούς	
	• αλβουμίνης-πολυ(ακρυλικού οξέος): συμπίεση κατά την προσέγγιση, “οδοντωτές” δυνάμεις αποκόλλησης	
	• λυσοζύμης- πολυ(ακρυλικού οξέος): ηλεκτροστατική έλξη και ισχυρή προσκόλληση	
1. Προσκόλληση σφαιριδίων Si (20μm) σε προβόλους ακίδων Si ₃ N ₄ καθαρισμένων προηγουμένως με πλάσμα	Δύναμη αποκόλλησης μεταξύ:	233mN/m ^{vii}
2. Επικάλυψη κολλοειδών αισθητήρων και δειγμάτων γυαλιού ή Si με στρώμα τιτανίου 1.5nm και χρυσού 50nm.	• όμοιων SAMs σε αισθητήρα και επιφάνεια: για τα υδρόφοβα μονοστρώματα (-CH ₃ , -CF ₃ , -OCH ₃ , -OPh, -CN),	
3. Εμβάπτιση των αισθητήρων σε διάλυμα	για τα υδρόφιλα(-OH, -EG ₃ OH,-CONH ₂) 5mN/m	
	• όμοιων πρωτεϊνών:	

^{vi} Όπου αναφέρονται τιμές, αντιστοιχούν σε μέσους όρους επί των μετρήσεων.

^{vii} Οι δυνάμεις έχουν κανονικοποιηθεί ως προς την ακτίνα της κολλοειδούς σφαίρας.

αλκανοθειόλων, που φέρουν στα άκρα την ομάδα -CH ₃ , -CF ₃ , -OCH ₃ , -OPh, -CN, -OH, -EG ₃ OH, ή -CONH ₂ και των δειγμάτων γυαλιού/Si σε διάλυμα HS(CH ₂) ₁₁ COOH σε αιθανόλη για 12 ώρες	RNAση A	0.5mN/m	
	λυσοζύμη	0.3 mN/m	
	αλβουμίνη	1.8 mN/m	
	ανοσοσφαιρίνη	0.3 mN/m	
	γ-σφαιρίνης	0.2 mN/m	(Sethuraman et al. 2004)
4. Εμβάπτιση των δειγμάτων γυαλιού/Si ύστερα από εστεροποίηση με NHS σε διάλυμα πρωτεΐνης: αλβουμίνης βόειου ορού, λυσοζύμης, ανοσοσφαιρίνης, γ-σφαιρίνης, πυροσταφυλικής κινάσης, ριβονουκλεάσης A ή ινωδογόνου	ινωδογόνου	20.4 mN/m	
	• πρωτεϊνών και SAMs: η δύναμη προσκόλλησης αυξάνει με το μοριακό βάρος και την περιεκτικότητα σε α-έλικες των πρωτεϊνών καθώς και με την υδροφοβικότητα των SAMs		
1. Καθαρισμός ακίδων Si ₃ N ₄ σε διάλυμα πιράνχα για 30 λεπτά	Δυνάμεις αποκόλλησης τροποποιημένης με αλβουμίνη ακίδας από:		
2. Επικάλυψη με στρώμα χρωμίου (0.1nm) και χρυσού(25nm)	• αλβουμίνη προσροφημένη σε υπόστρωμα Si: 0.07nN		
3. Επώαση σε διάλυμα HS(CH ₂) ₁₆ COOH 1mM σε αιθανόλη 50%	• αντι-αλβουμίνη σε Si:	0.61nN	
4. Εμβάπτιση σε διάλυμα N,N-διμεθυλο-φορμαμίδιου, τριαιθυλαμίνης και τριφθοροξικού ανυδρίτη για τη μετατροπή των ελεύθερων καρβοξυλομάδων σε ανυδρίτες, που αντιδρούν με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών	• μονόστρωμα -CH ₃ :	0.87nN	
	• μονόστρωμα -OH:	2.54nN	(Wang et al. 2004)
	• μονόστρωμα -COOH:	0.98nN	
	• μονόστρωμα -NH ₂ :	0.38nN	
5. Εμβάπτιση σε διάλυμα αλβουμίνης βόειου ορού 5mg/ml	• Dextran:	0.09nN	
Τροποποίηση επιφανειών με αμινομάδες			
1. Προσκόλληση γυάλινων σφαιριδίων (47μm) τροποποιημένων με αμινομάδες στους προβόλους ακίδων	Δύναμη αποκόλλησης μεταξύ: • αλβουμίνης-πολυστερενίου 7nN • αλβουμίνης-PEO-PPO-PEO ^{viii} (11-16-11) 2.8nN		
2. Εμβάπτιση των αισθητήρων σε διάλυμα γλουταραλδεΐδης 1% για 2 ώρες	• αλβουμίνης-PEO-PPO-PEO (3-30-3)	1nN	(McGurk et al. 1999)
3. Επώαση σε διάλυμα αλβουμίνης 0.1% για 12 ώρες	• αλβουμίνης-PEO-PPO-PEO (98-67-98) δεν παρατηρήθηκε προσκόλληση • αλβουμίνης-αλβουμίνης: δεν παρατηρήθηκε προσκόλληση		
1. Οξείδωση ακίδων Si ₃ N ₄ με πλάσμα O ₂	Δύναμη αποκόλλησης μεταξύ:		
2. Εμβάπτιση σε διάλυμα APDES 4% σε τολουόλη για 2 ώρες	• αλβουμίνης-πολυστερενίου:	2.84nN	
3. Εμβάπτιση σε διάλυμα γλουταραλδεΐδης 2.5% για 30 λεπτά	• αλβουμίνης-πολυουρεθάνης:	495pN	
4. Εμβάπτιση σε διάλυμα αλβουμίνης ανθρώπινου ορού 0.01%	• αλβουμίνης-πολυουρεθάνης καλυμμένης με πολυαιθυλενική γλυκόλη (PEG): 65pN		(Vansteenkiste et al. 2000)
1. Έκθεση σφαιριδίων γυαλιού (4μm) σε διάλυμα APDES 5% για 2 ώρες	Δύναμη μετατόπισης των σφαιριδίων από την ακίδα σε υπόστρωμα:		
2. Εμβάπτιση σε διάλυμα γλουταραλδεΐδης	• υδρόφοβου πολυστερενίου:		

^{viii} Πολυαιθυλενοξείδιο-οξείδιο πολυπροπυλενίου-πολυαιθυλενοξείδιο (οι αριθμοί στην παρένθεση δείχνουν το πλήθος των μονομερών στο πολυμερές)

2.5%	αλβουμίνη	99nN	
3. Επώαση σε διάλυμα αλβουμίνης, φερριτίνης, λυσοζύμης ή μυοσφαιρίνης (1mg/ml)	μυοσφαιρίνη	163nN	
	φερριτίνη	3.1nN	
	λυσοζύμη	41nN	
4. Ρόφηση τροποποιημένων σφαιριδίων σε υπόστρωμα γυαλιού ή πολυστυρενίου	• υδρόφιλου πολυστυρενίου:		
	αλβουμίνη	1.8nN	(Sagvolden et al. 1998)
	μυοσφαιρίνη	18nN	
	φερριτίνη	0.22nN	
	λυσοζύμη	4.3nN	
	• γυαλιού:		
	αλβουμίνη	0.07nN	
	μυοσφαιρίνη	4.6nN	
	φερριτίνη	0.04nN	
	λυσοζύμη	1nN	
1. Σιλιανοποίηση ακίδων Si_3N_4 σε διάλυμα APDES 4% σε τολουόλη	Μεταξύ:		
2. Εμβάπτιση σε διάλυμα γλουταραλδεϋδης 25%	• ακίδας τροποποιημένης με αλβουμίνη και καθαρού πολυστυρενίου (PS): ισχυρή προσκόλληση		
3. Επώαση των ακίδων σε διάλυμα αλβουμίνης βόειου ορού ή πλήρωση της κυψελίδας υγρού με διάλυμα αλβουμίνης 0.001, 0.01 ή 1mg/ml	• ακίδας τροποποιημένης με αλβουμίνη και αλβουμίνης προσροφημένη σε PS: μικρή προσκόλληση		(Chen et al. 1997)
1. Προσκόλληση σφαιριδίων Si (5μm) σε προβόλους ακίδων	Φυσιολόγηση		
2. Προσρόφηση αλβουμίνης βόειου ορού (3 ώρες) ή αποφερριτίνης (1 ώρα) στην επιφάνεια των κολλοειδών αισθητήρων και δειγμάτων Si μέσω πλήρωσης της κυψελίδας υγρού με διάλυμα 1mg/ml	• Σε $\text{pH} < \text{pI}$ (4, 4.7) και $\text{pH} > \text{pI}$ παρατηρήθηκε ηλεκτροστατική απώθηση		
	• Σε $\text{pH} = \text{pI}$: σε μικρές αποστάσεις (<3-4nm) έλξη λόγω δυνάμεων van der Waals		
	• pH 3: η απώθηση μειώνεται καθώς η ιοντική ισχύς αυξάνει από 0.01 σε 1M		(Valle-Delgado et al. 2004b)
	• pH 5: η απώθηση αυξάνει με την αύξηση της ιοντικής ισχύος		
	• pH 7: μείωση απώθησης με αύξηση της ιοντικής ισχύος		
1. Προσκόλληση σφαιριδίων Si (4-5μm) στους προβόλους ακίδων Si_3N_4	• Σε 0.2, 1mM KNO_3 η απώθηση μεταξύ των στρωμάτων της λακτοφερρίνης παρουσιάζει δύο κλίσσεις, μία μικρή για αποστάσεις >10nm και μία μεγαλύτερη για αποστάσεις <10nm		
2. Εναπόθεση N-επτυλ-αμίνης από πλάσμα στους κολλοειδείς αισθητήρες και σε οξειδωμένα δείγματα Si	• Σε 150mM KNO_3 το μήκος εξασθένισης της απώθησης εξαρτάται από το pH (9.55, 8.2, 6.9, 5.2, 4.15): μικρότερο για pH 8.9(=pI) και 4.7		(Meagher & Griesser 2002)
3. Εισαγωγή διαλύματος λακτοφερρίνης (1mg/ml) στην κυψελίδα υγρού.	• Αύξηση της συγκέντρωσης λακτοφερρίνης (0.2 → 0.5mg/ml) αυξάνει τις δυνάμεις αλληλεπίδρασης		
4. Αντικατάσταση με καθαρό ρυθμιστικό διάλυμα KNO_3 μετά από 1 ώρα			
Επώαση ακίδων Si_3N_4 σε διάλυμα ινωδογόνου 100μg/ml για 3 ώρες	Οι δυνάμεις αποκόλλησης ινωδογόνου από επιφάνεια γυαλιού αυξάνονται με το χρόνο παραμονής της ακίδας σε επαφή με την επιφάνεια (5, 50, 200, 1000 2000ms): 300pN → 1.4nN		(Hemmerle et

	Ελάχιστος απαιτούμενος χρόνος για να προσκολληθεί το ινωδογόνο στο υπόστρωμα: 50-200ms	al. 1999)
1. Προσκόλληση σφαιριδίων Si (5μm) σε προβόλους ακίδων Si ₃ N ₄	Μεταξύ αλβουμίνης-αλβουμίνης:	
2. Επώαση των κολλοειδών αισθητήρων και δειγμάτων μίκας σε διάλυμα υαλονεκτίνης (5μg/ml) σε διαλύτη προσομοίωσης φυσιολογικών υγρών (SBF) για 3 ώρες	<ul style="list-style-type: none"> • σε 0.001, 0.01, 0.1, 0.5 M NaCl pH 7.4: με την αύξηση της ιοντικής ισχύος μειώνεται η απωστική δύναμη κατά την προσέγγιση καθώς και η δύναμη αποκόλλησης (2.5nN→0.5nN) • σε pH 9.4, 7.4, 5, 4, 0.01M NaCl: η μικρότερη απώθηση παρατηρήθηκε σε pH 5 (αιφνίδια μεταπήδηση στην επιφάνεια) και η μεγαλύτερη σε pH 9.4, η μεγαλύτερη προσκόλληση σε pH 5 (4nN) και η μικρότερη σε pH 9.4 (0.2nN) 	(Zhang et al. 2005)

3.4 Πειραματική μεθοδολογία

3.4.1. Τροποποίηση ακίδων

Για τη μέτρηση με τη βοήθεια του AFM της δύναμης αλληλεπίδρασης και προσκόλλησης του ινωδογόνου στην επιφάνεια της μίκας χρησιμοποιήθηκαν κολλοειδείς αισθητήρες, στους οποίους ακινητοποιήθηκε η πρωτεΐνη μέσω πεπτιδικών δεσμών (O=C-N). Τα σχετικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Βιοφυσικής και Επιφανειακών Αναλύσεων του Πανεπιστημίου του Nottingham (Laboratory of Biophysics and Surface Analysis, LBSA, School of Pharmacy, The University of Nottingham) και προέβλεπαν την εναπόθεση στην επιφάνεια των σφαιριδίων στρώματος ακρυλικού οξέος, πολυμερισμένου μέσω επεξεργασίας πλάσματος και ενεργοποίηση των καρβοξυλικών ομάδων, ώστε να αντιδράσουν με τις αμινομάδες των πρωτεϊνικών μορίων. Η τεχνική αυτή προτιμήθηκε λόγω της ευκολίας της διαδικασίας εναπόθεσης του στρώματος του πολυακρυλικού οξέος και της βεβαιότητας, ότι στην επιφάνεια του ινωδογόνου υπάρχουν διαθέσιμες αμινομάδες (Doolittle 1992).

Για κατασκευή των κολλοειδών αισθητήρων χρησιμοποιήθηκαν ακίδες νιτριδίου του πυριτίου (τύπου NP-S, Veecorprobes) με τριγωνικούς προβόλους μήκους και πλάτους στελεχών 119μm και 23μm αντίστοιχα (μακριοί, λεπτοί πρόβολοι). Πριν τροποποιηθούν, οι πρόβολοι ξεπλένονταν με ακετόνη και η σταθερά ελατηρίου k υπολογιζόταν για καθένα ξεχωριστά με τη μέθοδο του θερμικού συντονισμού. Έτσι, βαθμονομήθηκε ένα σύνολο 16 προβόλων και η μέση τιμή

των μετρήσεων βρέθηκε $0.078 \pm 0.008 \text{ N/m}$. Το αποτέλεσμα αυτό φανερώνει μια απόκλιση 30% από την ονομαστική τιμή, την οποία δίνει η κατασκευάστρια εταιρεία και η οποία είναι 0.060 N/m .

Τα σφαιρίδια του οξειδίου του πυριτίου (Duke Scientific Corp., Fremont, U.S.), τα οποία προσαρτήθηκαν στους προβόλους, είχαν διάμετρο $4.9 \pm 0.5 \text{ }\mu\text{m}$. Η προσκόλλησή τους στην άκρη του προβόλου έγινε με μια διαδικασία διαδοχικής επαφής της άκρης κάθε προβόλου σε σταγονίδια κόλλας Araldite Rapid Resin δύο συστατικών και σε ανεξάρτητα σφαιρίδια, τα οποία βρίσκονταν απλωμένα πάνω σε μια επιφάνεια. Για το χειρισμό των προβόλων στη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκε η βάση και η κεφαλή ενός Multimode AFM ως μικρομετρικός μετακινητής. Η προσκόλληση των σφαιριδίων επιβεβαιώθηκε για κάθε πρόβολο χωριστά μέσω εικόνων, οι οποίες ελήφθησαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (JSM-6060, Jeol, Japan) σε τάση 20 keV και μεγέθυνση $2400\times$.

Οι κολλοειδείς αισθητήρες, οι οποίοι κατασκευάζονταν με τον παραπάνω τρόπο, προτού επικαλυφθούν με το στρώμα του πολυακρυλικού οξέος:

οξειδώνονταν με πλάσμα O_2 για 5 λεπτά μέσα σε ένα θάλαμο πλάσματος κατασκευασμένο κατά παραγγελία. Ο πολυμερισμός και η εναπόθεση του ακρυλικού οξέος γινόταν στον ίδιο θάλαμο με την ακόλουθη διαδικασία. Καταρχάς, με τη βοήθεια μια αντλίας κενού το ακρυλικό οξύ (acrylic acid, purum, anhydrous, $\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich), υποβαλλόταν σε ένα κύκλο ψύξης-κενού-τήξης, προκειμένου να απομακρυνθούν από τα μονομερή του τα πτητικά πολυμερή, τα οποία είχαν τυχόν σχηματιστεί. Στη συνέχεια δημιουργούταν στο θάλαμο κενό, 25 mTorr , και ατμοί ακρυλικού οξέος αφήνονταν να εισέλθουν, μέχρι η πίεση στο εσωτερικό του να φτάσει τα 300 mTorr . Τότε ενεργοποιούνταν το πλάσμα και η παρεχόμενη ισχύς ρυθμιζόταν στα 20 W , για όσο χρόνο απαιτείτο για την εναπόθεση ενός στρώματος πολυμερούς πάχους 40 nm . Ο έλεγχος του πάχους του στρώματος ήταν εφικτός χάρη σε ένα μικροζυγό κρυστάλλου χαλαζία (QCM), ο οποίος ήταν προσαρμοσμένος στο εσωτερικό του θαλάμου. Μετά την τροποποίηση και μέχρι τη χρήση τους, οι κολλοειδείς αισθητήρες διατηρούνταν σε ένα ξηραντήρα υπό κενό.

Για τον έλεγχο της επεξεργασίας πλάσματος, δείγματα καλυπτρίδων γυαλιού διαμέτρου 12 mm , τα οποία είχαν προηγουμένως καθαριστεί σε διάλυμα πιράνχα για 15 λεπτά, καθώς και δείγματα μίκας τροποποιούνταν παράλληλα. Από την επιφάνεια τους λαμβάνονταν στη συνέχεια,

εικόνες με το AFM Nanoscope IIIa Multimode της Veeco, ενώ με το γωνιόμετρο Cam 200 της KSV, Inc., Finland, μετριόταν η γωνία επαφής σταγόνων αποσταγμένου νερού.

Η ομοιοπολική πρόσδεση των μορίων ινωδογόνου στην τροποποιημένη επιφάνεια των αισθητήρων προϋπόθετε την ενεργοποίηση των καρβοξυλομάδων του πολυακρυλικού οξέος με τις χημικές ενώσεις EDC και θειο-NHS. Ο ρόλος του EDC ήταν να διευκολύνει το σχηματισμό δεσμών ανάμεσα στις καρβοξυλομάδες του πολυμερούς και τις αμινομάδες της πρωτεΐνης μέσω της μετατροπής των πρώτων σε O-ακυλισουρία (Σχήμα 3.5). Η προσθήκη του θειο-NHS απέβλεπε στη σταθεροποίηση αυτού του ενδιάμεσου εστέρα, ο οποίος διαφορετικά θα υδρολυόταν εύκολα δίνοντας πάλι τη καρβοξυλική ομάδα. Η διαδικασία εστεροποίησης προέβλεπε την εμβάπτιση των κολλοειδών αισθητήρων σε διάλυμα PBS, το οποίο περιείχε 6mM EDC (*N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimide hydrochloride, Sigma-Aldrich) και 15mM θειο-NHS (*N*-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt, puriss., ≥98.5% Fluka, Buchs SG, Switzerland), για 15 λεπτά. Το pH του διαλύματος ρυθμιζόταν στο 6, ώστε να επιβραδυνθεί η υδρόλυση του ενεργοποιημένου εστέρα, ο οποίος σχηματιζόταν (Hermanson 1996).

Σχήμα 3.5. Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού ανάμεσα στο πολυακρυλικό οξύ και τα μόρια του ινωδογόνου μέσω εστεροποίησης με το EDC παρουσία θειο-NHS.

Οι αισθητήρες, αφού ξεπλένονταν με PBS, εμβάπτιζονταν σε διάλυμα ινωδογόνου συγκέντρωσης 10μg/ml σε PBS, pH 7.4, ιοντικής ισχύος 150mM για 2 ώρες, προκειμένου στην επιφάνεια του σφαιριδίου να δεσμευτούν πρωτεϊνικά μόρια μέσω του σχηματισμού πεπτιδικών δεσμών με τις αμινομάδες τους. Το ινωδογόνο αγοράστηκε λυοφιλοποιημένο από τη Sigma-Aldrich

(fibrinogen from human plasma, ~60% protein, >80% clottable) και χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό του.

3.4.2 Μέτρηση δυνάμεων και επεξεργασία καμπύλων

Οι μετρήσεις των δυνάμεων αλληλεπίδρασης των τροποποιημένων ακίδων με την επιφάνεια της μίκας πραγματοποιήθηκαν με το 1D Molecular Force Probe, MFP-1D, της Asylum Research (Σχήμα 3.6), το οποίο ελεγχόταν από το πρόγραμμα Igor Pro 4.01. Η κυριότερη διαφορά αυτού του AFM από το Multimode της Veeco είναι ότι ο σαρωτής έχει τη δυνατότητα να μεταβάλλει τις διαστάσεις του μόνο στην κατακόρυφη διεύθυνση και όχι στο οριζόντιο επίπεδο. Το χαρακτηριστικό αυτό σε συνδυασμό με την υψηλή ακρίβεια ελέγχου της κατακόρυφης απόστασης ακίδας-δείγματος, καθώς ο σαρωτής είναι κλειστού βρόγχου (closed loop scanner), καθιστά το MFP-1D ιδανικό μικροσκόπιο για τη μέτρηση δυνάμεων, αλλά ακατάλληλο για τη λήψη εικόνων από την επιφάνεια των δειγμάτων. Μια ακόμα διαφορά του MFP-1D σε σχέση με το Multimode είναι ότι ο σαρωτής ελέγχει την κατακόρυφη μετακίνηση της ακίδας και όχι του δείγματος. Εξάλλου, το σύστημα οπτικής παρατήρησης της ακίδας και του δείγματος, με το οποίο είναι εξοπλισμένο το MFP-1D, λειτουργεί υπό την προϋπόθεση διαφανών υποστρωμάτων.

Σχήμα 3.6. Το Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης MFP-1D της Asylum Research.

Καμπύλες δύναμης-μετακίνησης καταγράφηκαν με τον κολλοειδή αισθητήρα να προσεγγίζει και να απομακρύνεται από την επιφάνεια της μίκας μέσα σε πέντε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Η ιοντική ισχύς διαλύματος 5mM PBS pH 7.4 ρυθμίστηκε με NaCl σε 15, 150 και 500mM ή το pH του ίδιου ρυθμιστικού, ιοντικής ισχύος 150mM, πέρα από 7.4, ρυθμίστηκε στις τιμές 5.8 και 3.5. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν με πέντε διαφορετικές ακίδες-αισθητήρες σε όλα τα διαλύματα και τουλάχιστο εκατό καμπύλες συλλέχθηκαν με κάθε ακίδα σε κάθε συνθήκη ιοντικής ισχύος και pH. Τα διαλύματα αλλάζονταν με τυχαία σειρά για να είναι δυνατή η παρατήρηση

ενδεχόμενων μη αντιστρεπτών επιδράσεων των εκάστοτε συνθηκών στο ακινητοποιημένο πρωτεϊνικό στρώμα.

Η συχνότητα του κύκλου προσέγγισης-απομάκρυνσης ήταν 1Hz και η ταχύτητα του αισθητήρα για ένα εύρος κατακόρυφης μετακίνησης 400nm, 800nm/s. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε, η μέγιστη ασκούμενη δύναμη στον πρόβολο κατά τη συμπίεση του αισθητήρα πάνω στην επιφάνεια να μην ξεπερνά τα 800pN, ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα μόνιμης παραμόρφωσης του στρώματος του πολυμερούς και της πρωτεΐνης. Ο χρόνος παραμονής του αισθητήρα στην επιφάνεια της μίκας είχε οριστεί μηδενικός και συνεπώς, η διάρκεια της επαφής των μορίων του ινωδογόνου με τη μίκα υπολογιζόταν κατά προσέγγιση από την ταχύτητα του αισθητήρα v , τη σταθερά ελατηρίου του k και τη μέγιστη ασκούμενη δύναμη $F_{\max}$, σύμφωνα με τη σχέση:

$$t = \frac{2 \cdot F_{\max}}{v \cdot k} \quad (3.22).$$

Για τις τιμές των μεγεθών αυτών, όπως προσδιορίστηκαν παραπάνω, ο χρόνος επαφής t υπολογίζεται περίπου 26ms. Σημειώνεται ότι ο περιορισμός της μέγιστης ασκούμενης δύναμης στον αισθητήρα δεν επέτρεπε συχνά, λόγω της συμπίεσης του στρώματος των πρωτεϊνών και του πολυμερούς, την εμφάνιση της περιοχής σταθερής κλίσης στην καμπύλη. Για το λόγο αυτό, η βαθμονόμηση της κάμψης του προβόλου στο φωτοαισθητήρα γινόταν μετά το τέλος κάθε σειράς μετρήσεων και οι καταγεγραμμένες καμπύλες αναπροσαρμόζονταν εκ των υστέρων, αυτόματα από το πρόγραμμα Igor Pro βάσει της προκύπτουσας τιμής μετασχηματισμού.

Οι μετρούμενες δυνάμεις αλληλεπίδρασης και προσκόλλησης καταγράφηκαν με τη μορφή καμπύλων κάμψης-μετακίνησης. Για τη μετατροπή τους στη μορφή καμπύλων δύναμης-απόστασης τα δεδομένα των μετρήσεων υποβλήθηκαν σε μια σειρά μετασχηματισμών με τη βοήθεια του προγράμματος Microsoft Office Excel. Τα βήματα αυτών των μετασχηματισμών ήταν τα ακόλουθα:

1. Μετατόπιση της καμπύλης στον οριζόντιο άξονα (άξονας μετακίνησης), ώστε το σημείο $x=0$ να συμπίπτει με το σημείο x_0 , στο οποίο η καμπύλη αποκτά σταθερή κλίση λόγω της κάμψης του προβόλου, καθώς η ακίδα μετατοπίζεται σε επαφή με την επιφάνεια $\rightarrow$ αφαίρεση της μετακίνησης x_0 από όλα τα δεδομένα μετακίνησης.
2. Μετατόπιση της καμπύλης στον κατακόρυφο άξονα (άξονας κάμψης), ώστε ο οριζόντιος άξονας να συμπίπτει με την ευθεία μετακίνησης, όταν ο πρόβολος βρίσκεται σε απόσταση από την επιφάνεια και η πραγματική του κάμψη, z_0 , είναι μηδενική $\rightarrow$ αφαίρεση της κάμψης z_0 από όλα τα δεδομένα κάμψης.

3. Υπολογισμός της σχετικής απόστασης ανάμεσα στον καμπτόμενο κολλοειδή αισθητήρα και την επιφάνεια → πρόσθεση της αλγεβρικής τιμής της διορθωμένης κάμψης (βήμα 2) στη μετακίνηση, την οποία έχει προκαλέσει ο πιεζοκρύσταλλος, για κάθε σημείο.
4. Υπολογισμός της δύναμης αλληλεπίδρασης αισθητήρα-επιφάνειας → πολλαπλασιασμός των δεδομένων της διορθωμένης κάμψης με τη σταθερά ελατηρίου του χρησιμοποιούμενου κάθε φορά προβόλου^{ix}.

Αποτέλεσμα των παραπάνω βημάτων ήταν ο μετασχηματισμός καμπύλων σαν αυτή, η οποία φαίνεται στο Σχήμα 3.7α, σε καμπύλες της μορφής β. Από τις καμπύλες δύναμης-απόστασης ήταν δυνατό στη συνέχεια, να εξαχθούν σημαντικές παρατηρήσεις, όπως θα φανεί και από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, η οποία ακολουθεί.

Σχήμα 3.7. (α) Τυπική πειραματική καμπύλη κάμψης-μετακίνησης και (β) η καμπύλη δύναμης-απόστασης, η οποία προκύπτει ύστερα από την επεξεργασία της. Το σημείο x_0 υποδεικνύει τη θέση, στην οποία η καμπύλη αποκτά σταθερή κλίση λόγω της κάμψης του προβόλου καθώς η ακίδα μετακινείται σε επαφή με την επιφάνεια, ενώ το σημείο z_0 τη θέση, στην οποία ο πρόβολος βρίσκεται σε απόσταση από την επιφάνεια και η πραγματική του κάμψη είναι μηδενική.

3.5 Μετρήσεις-Αποτελέσματα

3.5.1 Έλεγχος τροποποίησης ακίδων

Ένας από τους δέκα κολλοειδείς αισθητήρες, οι οποίοι κατασκευάστηκαν για τα πειράματα, φαίνεται στην εικόνα SEM του Σχήματος 3.8. Η εναπόθεση του στρώματος του πολυακρυλικού

^{ix} Λόγω της γωνίας, την οποία σχηματίζει ο πρόβολος με το οριζόντιο επίπεδο στο φορέα στήριξης (11°), η πραγματική δύναμη αλληλεπίδρασης είναι η κατακόρυφη συνιστώσα της δύναμης κάμψης του προβόλου και υπολογίζεται από τη σχέση $F = k'z/\cos 11^\circ$.

οξέος στους κολλοειδείς αισθητήρες εξετάστηκε με την παράλληλη τροποποίηση δειγμάτων μίκας και γυαλιού. Οι μετρήσεις της γωνίας επαφής αμέσως μετά την επεξεργασία με το πλάσμα του ακρυλικού οξέος έδειξαν μια αύξηση της υδροφοβικότητας και στα δύο υποστρώματα: $79 \pm 9.6^\circ$ από $3 \pm 1.2^\circ$ στη μίκας και $67 \pm 5.0^\circ$ από $22 \pm 1.6^\circ$ στις καλυπτρίδες γυαλιού (μέσες τιμές τριών δειγμάτων). Παρόλα αυτά, ύστερα από επώαση για 1 ώρα σε διάλυμα PBS και στέγνωμα με N_2 η ενυδάτωση της μίκας επέστρεψε σε επίπεδα όμοια με αυτά πριν από την τροποποίηση με το πλάσμα, ενώ τα δείγματα του γυαλιού διατήρησαν την υδροφοβικότητά τους.

Σχήμα 3.8. Κολλοειδής αισθητήρας αποτελούμενος από σφαιρίδιο Si προσκολλημένο στην άκρη τριγωνικού προβόλου ακίδας Si_3N_4 .

Οι εικόνες AFM, οι οποίες ελήφθησαν στον αέρα από τα δύο υποστρώματα μετά την επεξεργασία του πλάσματος, δείχνουν μια κοκκώδη τοπογραφία με χαρακτηριστικά, των οποίων το ύψος δεν ξεπερνά τα 4nm, ενδεικτική της εναπόθεσης του πολυακρυλικού οξέος (Σχήμα 3.9α και β). Οι εικόνες αντίθετα, οι οποίες ελήφθησαν μέσα σε PBS, έδειξαν ότι τα δείγματα της μίκας απέκτησαν πάλι την αρχική τους λεία επιφάνεια (Σχήμα 3.9γ), ενώ το στρώμα του πολυακρυλικού οξέος στα δείγματα του γυαλιού διογκώθηκε ελαφρά (Σχήμα 3.9δ).

Οι δυνάμεις αλληλεπίδρασης ανάμεσα στους κολλοειδείς αισθητήρες και τις καθαρές επιφάνειες μίκας καταγράφηκαν και στα δύο βήματα της διαδικασίας τροποποίησης, δηλαδή μετά την εναπόθεση του πολυμερούς από το πλάσμα και μετά την ομοιοπολική πρόσδεση των μορίων ινωδογόνου μέσω του EDC και του θειο-NHS. Στόχος αυτού του ελέγχου ήταν να επιβεβαιωθεί η ακινητοποίηση της πρωτεΐνης στα σφαιρίδια και ότι οι μετρούμενες δυνάμεις προέρχονται από το πρωτεϊνικό στρώμα, το οποίο αλληλεπιδρά με τη μίκας, και όχι από το στρώμα του πολυακρυλικού οξέος. Όλες οι καμπύλες, οι οποίες καταγράφηκαν με ακίδες τροποποιημένες μόνο με πολυακρυλικό οξύ, δεν έδειξαν προσκόλληση στην επιφάνεια της μίκας κατά την απομάκρυνση (Σχήμα 3.10α). Αντίθετα, οι καμπύλες των τροποποιημένων με ινωδογόνο αισθητήρων έδειξαν προσκόλληση πρωτεϊνικών μορίων στην επιφάνεια (Σχήμα 3.10β).

Σχήμα 3.9. Εικόνες AFM, ληφθείσες στον αέρα, από πολυακρυλικό οξύ πάνω (α) σε μίκα και (β) σε γυαλί. Μετά την εμβάπτιση σε PBS το στρώμα του πολυμερούς φαίνεται να ξεπλύθηκε από την επιφάνεια της μίκας (γ) και διογκώθηκε στην επιφάνεια του γυαλιού (δ). Όλες οι εικόνες ελήφθησαν με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας (γ και δ μέσα σε PBS), διαστάσεις εικόνων $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$, μέγιστο ύψος 5nm.

Σχήμα 3.10. Καμπύλες δύναμης-απόστασης κατά την προσέγγιση (—) και απομάκρυνση (---) (α) ενός αισθητήρα καλυμμένου με πολυακρυλικό οξύ και (β) ενός αισθητήρα, στον οποίο έχει ακινητοποιηθεί ινωδογόνο, από επιφάνεια μίκας μέσα σε PBS 15mM pH 7.4. Οι τροποποιημένες μόνο με το πολυμερές ακίδες δεν δείχνουν προσκόλληση στην επιφάνεια σε αντίθεση με τις καλυμμένες με πρωτεΐνη ακίδες, οι οποίες εμφανίζουν ξεδίπλωμα των πρωτεϊνικών μορίων ή/και του υποστρώματος του πολυμερούς πριν από την αποκόλληση.

Από τις πρώτες κιόλας καμπύλες δύναμης-απόστασης, οι οποίες καταγράφηκαν, υπολογίστηκε ο θόρυβος, ο οποίος υπεισέρχεται στις σχετικές μετρήσεις. Η τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγώνου των διακυμάνσεων της δύναμης (RMS) για το οριζόντιο τμήμα των καμπύλων υπολογίστηκε περίπου 13pN, δηλαδή εντός του ορίου των 18pN, το οποίο υπολογίζεται από την Εξίσωση 3.9, δεδομένου ότι $k=0.78\text{N/m}$.

3.5.2 Καμπύλες δύναμης-απόστασης σε διάφορες συνθήκες ιοντικής ισχύος

Το Σχήμα 3.11 δείχνει τρεις αντιπροσωπευτικές καμπύλες δύναμης-απόστασης, οι οποίες καταγράφηκαν κατά την προσέγγιση του καλυμμένου με ινωδογόνο αισθητήρα στην επιφάνεια της μίκας σε διαλύματα PBS pH 7.4 διαφόρων τιμών ιοντικής ισχύος. Σε συγκέντρωση αλάτων 15mM οι καμπύλες έδειξαν σταδιακά αυξανόμενη απώθηση του αισθητήρα από την επιφάνεια, όταν η σχετική τους απόσταση γινόταν μικρότερη των 15nm. Όταν η ιοντική ισχύς ήταν 150mM, ο αισθητήρας δεν απωθούνταν από τη επιφάνεια, αλλά αντίθετα, έλκονταν και σε ορισμένες περιπτώσεις καταγράφηκε απότομη μεταπήδησή του σε επαφή με την επιφάνεια. Σε τιμές ιοντικής ισχύος 500mM δεν παρατηρήθηκε ούτε απώθηση ούτε έλξη και ο πρόβολος του αισθητήρα παρέμενε σχεδόν άκαμπτος μέχρι το σημείο, όπου ερχόταν σε επαφή με την επιφάνεια της μίκας.

Σχήμα 3.11. Δυνάμεις αλληλεπίδρασης συναρτήσει της απόστασης κατά την προσέγγιση ενός τροποποιημένου με ινωδογόνο αισθητήρα στην επιφάνεια της μίκας σε 15, 150 και 500mM PBS pH 7.4 (ιοντική ισχύς ρυθμισμένη με NaCl).

Πρέπει να τονιστεί ότι οι πειραματικές καμπύλες δύναμης-απόστασης έχουν μετατοπιστεί και τοποθετηθεί ως προς την αρχή των αξόνων με βάση τη θεώρηση, η οποία περιγράφηκε στην παράγραφο 3.4.2. Αυτό σημαίνει ότι ως σημείο μηδενικής απόστασης θεωρήθηκε το σημείο, στο οποίο το σφαιρίδιο του αισθητήρα αρχίζει να κινείται σε επαφή με την επιφάνεια της μίκας, αφού

έχει ξεπεράσει τα στάδια συμπίεσης των στρωμάτων τροποποίησης^x. Η επαφή όμως, του αισθητήρα με τη μίκα ξεκινά νωρίτερα και η θέση, στην οποία συμβαίνει αυτό, μπορεί να εκτιμηθεί από το σημείο αντιστροφής της έλξης σε άπωση πάνω στην καμπύλη των 150mM. Για την καμπύλη του Σχήματος 3.11, όπως και για όλες σχεδόν τις καταγεγραμμένες καμπύλες στα 150mM, το σημείο αυτό βρίσκεται περίπου στα 6nm. Έτσι, η διεπιφάνεια του πρωτεϊνικού στρώματος με το διάλυμα τοποθετείται σε αυτήν την απόσταση, όπως φαίνεται και από την κατακόρυφη γραμμή στο ίδιο σχήμα, και η διαφορά των 6nm φανερώνει την απόσταση λόγω συμπίεσης του πολυμερικού και πρωτεϊνικού στρώματος πάνω στο σφαιρίδιο του κολλοειδούς αισθητήρα.

Εκτός από την έλξη ή την άπωση κατά την προσέγγιση, πληροφορίες για την αλληλεπίδραση των μορίων του ινωδογόνου με την επιφάνεια της μίκας μπορούν να εξαχθούν και από τα μεγέθη των δυνάμεων αποκόλλησης. Για το λόγο αυτό καταγράφηκαν οι καμπύλες δύναμης-απόστασης και κατά την απομάκρυνση του κολλοειδούς αισθητήρα από το δείγμα της μίκας στις διάφορες συνθήκες ιοντικής ισχύος και στο Σχήμα 3.12 παρουσιάζεται από μία ενδεικτική καμπύλη για κάθε τέτοια συνθήκη. Για συγκέντρωση αλάτων 15 και 150mM στο διάλυμα PBS καταγράφηκαν δυνάμεις αποκόλλησης έως και 1nN, ενώ για 500mM δεν φάνηκε προσκόλληση της πρωτεΐνης στην επιφάνεια. Η απουσία της προσκόλλησης του ινωδογόνου στην επιφάνεια της μίκας παρατηρούνταν συστηματικά, κάθε φορά, που το διάλυμα των μετρήσεων άλλαζε σε PBS με ιοντική ισχύ 500mM. Επιπλέον, το φαινόμενο αυτό ήταν μη αντιστρέψιμο ανεξάρτητα από τις μεταβολές της ιοντικής ισχύος ή του pH, που ακολουθούσαν, με εξαίρεση μία περίπτωση (pH 3.5), η οποία θα περιγραφεί στη συνέχεια.

Σχήμα 3.12. Καμπύλες δύναμης κατά την απομάκρυνση ενός αισθητήρα τροποποιημένου με ινωδογόνο από την επιφάνεια μίκας σε 15, 150 και 500 mM PBS pH 7.4 (ρύθμιση ιοντικής ισχύος με NaCl). Η προσκόλληση της πρωτεΐνης πάνω στη μίκα, η οποία καταγράφεται στις δυο χαμηλότερες τιμές ιοντικής ισχύος, δεν παρατηρείται στα 500mM.

^x Συχνά το σημείο αυτό, το οποίο δηλώνεται με την αφετηρία της γραμμής σταθερής κλίσης, δεν φαινόταν στις καμπύλες δύναμης-απόστασης λόγω του υφιστάμενου περιορισμού στη μέγιστη ασκούμενη δύναμη στον αισθητήρα.

Αν οι καμπύλες προσέγγισης και απομάκρυνσης παρασταθούν σε κοινό διάγραμμα για κάθε τιμή ιοντικής ισχύος, το εμβαδό ανάμεσα τους φανερώνει την ενέργεια προσκόλλησης (Chen et al. 1997). Η ενέργεια αυτή σχετίζεται με τις μη αντιστρεπτές διαδικασίες της προσρόφησης, όπως για παράδειγμα τις αναδιατάξεις της πρωτεϊνικής δομής, και μπορεί να δώσει μία ένδειξη για το βαθμό ξεδιπλώματος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας πάνω στο υπόστρωμα για όσο χρόνο διαρκεί η επαφή τους. Για τις καμπύλες, οι οποίες παρουσιάζονται στα Σχήματα 3.11 και 3.12 η ενέργεια προσκόλλησης υπολογίστηκε $115 \cdot 10^{-18} \text{J}$, $138 \cdot 10^{-18} \text{J}$ και $1 \cdot 10^{-18} \text{J}$ για τα 15, 150 και 500mM, αντίστοιχα.

3.5.3 Καμπύλες δύναμης-απόστασης σε διάφορες συνθήκες pH

Οι καμπύλες δύναμης-απόστασης κατά την προσέγγιση του κολλοειδούς αισθητήρα στην επιφάνεια της μίκας έδειξαν την ίδια τάση και στις τρεις διαφορετικές τιμές του pH. Τόσο στο φυσιολογικό pH (7.4), όσο και σε pH 5.8 και 3.5, ο αισθητήρας φαινόταν να έλκεται προς την επιφάνεια για αποστάσεις μικρότερες των 10nm, με τη διαφορά όμως, ότι η ελκτική δύναμη ήταν μεγαλύτερη σε pH 5.8 και 3.5 σε σχέση με το pH 7.4 (Σχήμα 3.13). Αν και στο Σχήμα 3.13 το στρώμα του ινωδογόνου φαίνεται να έλκεται προς την επιφάνεια της μίκας με μεγαλύτερη δύναμη σε pH 3.5 από ότι σε pH 5.8, η παρατήρηση αυτή δεν ισχύει για όλες τις καμπύλες, οι οποίες καταγράφηκαν.

Σχήμα 3.13 Δυνάμεις αλληλεπίδρασης συναρτήσει της απόστασης κατά την προσέγγιση ενός τροποποιημένου με ινωδογόνο αισθητήρα στην επιφάνεια της μίκας σε 150mM PBS pH 7.4, 5.8 ή 3.5.

Οι καμπύλες απομάκρυνσης του αισθητήρα από την επιφάνεια της μίκας έδειξαν προσκόλληση του ινωδογόνου και για τις τρεις τιμές του pH (Σχήμα 3.14). Εκτίμηση ωστόσο, μιας μέσης τιμής αποκόλλησης για κάθε pH ή εξαγωγή συμπεράσματος για το pH, στο οποίο παρατηρήθηκε η μέγιστη προσκόλληση, κρίνεται παρακινδυνευμένη, καθώς οι σχετικές δυνάμεις παρουσίαζαν μεγάλη διακύμανση ακόμα και για τον ίδιο αισθητήρα στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα.

Σχήμα 3.14. Καμπύλες δύναμης κατά την απομάκρυνση ενός αισθητήρα τροποποιημένου με ινωδογόνο από την επιφάνεια μίκας σε 150mM PBS pH 7.4, 5.8 ή 3.5.

Εντούτοις, ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον φαινόμενο παρατηρείτο, όταν τα διαλύματα μέτρησης άλλαζαν με μία συγκεκριμένη σειρά: από PBS 500mM, pH 7.4 σε PBS 150mM pH 3.5 και μετά πάλι σε PBS 500mM pH 7.4. Όπως αναφέρθηκε ήδη, η αύξηση της συγκέντρωσης αλάτων σε 500mM είχε ως συνέπεια τη μη-αντιστρεπτή εξάλειψη της προσκόλλησης του ινωδογόνου στην επιφάνεια. Η μόνη περίπτωση, στην οποία η προσκόλληση επανεμφανιζόταν, ήταν μετά τη μείωση του pH σε 3.5 (Σχήμα 3.15).

Σχήμα 3.15. Καμπύλες δύναμης κατά την απομάκρυνση του αισθητήρα από την επιφάνεια της μίκας πρώτα σε PBS 500mM pH 7.4, έπειτα σε PBS 150mM pH 3.5 και ύστερα πάλι σε PBS 500mM pH 7.4. Η προσκόλληση του ινωδογόνου στη μίκας, η οποία εξαλειφόταν κάθε φορά, που η ιοντική ισχύς αυξανόταν στα 500mM, επανεμφανιζόταν μετά από αλλαγή του pH σε 3.5.

3.6 Συζήτηση αποτελεσμάτων

3.6.1 Τροποποίηση κολλοειδών αισθητήρων

Οι εικόνες AFM και οι μετρήσεις της γωνίας επαφής σταγόνων νερού παρείχαν σημαντικές ενδείξεις για την εναπόθεση στρώματος πολυακρυλικού οξέος στην επιφάνεια των δειγμάτων μίκας και γυαλιού μέσω της επεξεργασίας πλάσματος. Οι σχετικά υψηλές τιμές των γωνιών επαφής μπορούν να συσχετιστούν με την υψηλή ισχύ, η οποία εφαρμόστηκε (20W). Γενικά, διαδικασίες πλάσματος υψηλής ισχύος συνεπάγονται μεγαλύτερο ρυθμό εναπόθεσης πολυμερούς, μικρότερη περιεκτικότητα του πολυμερούς σε δραστικές ομάδες λόγω του έντονου κατακερματισμού του

αρχικού μονομερούς και σχηματισμό ενός πυκνότερου δικτύου διασταυρούμενων δεσμών, από ότι οι διαδικασίες χαμηλής ισχύος (Candan et al. 1998, Favia et al. 2002). Για την περίπτωση των κολλοειδών αισθητήρων, η μειωμένη συγκέντρωση δραστικών καρβοξυλομάδων στην επιφάνεια του πολυμερούς δεν θεωρείται μειονέκτημα της μεθόδου, καθώς το μέγεθος της πρωτεΐνης και η πληθώρα των αμινομάδων στην επιφάνεια της εξασφαλίζουν την πρόσδεση της στο υπόστρωμα του πολυμερούς ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις ελεύθερων καρβοξυλομάδων.

Η ανάκτηση από τα δείγματα της μίκας, ύστερα από την εμβάπτισή τους σε PBS, της υδροφιλικότητας και της λείας τοπογραφίας, την οποία είχαν πριν την επεξεργασία πλάσματος, μπορεί να αποδοθεί στην ασθενή πρόσφυση του πολυμερούς στην επιφάνεια της μίκας και τη διάλυσή του μέσα στο υδατικό διάλυμα. Για το φαινόμενο αυτό υπεύθυνες δεν είναι μόνο οι παράμετροι της διαδικασίας πλάσματος, όπως για παράδειγμα η εφαρμοζόμενη ισχύς, αλλά και οι ιδιότητες του υλικού της μίκας. Η μοριακή δομή της τελευταίας σχηματίζεται από τη στοίχιση τετράεδρων με στοιχειομετρία $\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{OH})_2$ σε φύλλα, τα οποία συγκρατούνται μέσω ιόντων K^+ (Czajkowsky & Shao 2003). Όταν επιφάνειες μίκας έρχονται σε επαφή με υδατικά διαλύματα, τα ιόντα K^+ των αποσχισμένων διεπιφανειών απελευθερώνονται στο διάλυμα αντικαθιστάμενα από άλλα μονοσθενή ή πολυσθενή κατιόντα (Osman et al. 1999). Η ανταλλαγή αυτή των ιόντων, στο διάλυμα του PBS, είναι πιθανό να οδήγησε σε σταδιακή αποδέσμευση του στρώματος του πολυακρυλικού οξέος.

Ανεξάρτητα όμως, από τη συμπεριφορά των τροποποιημένων δειγμάτων μίκας, το στρώμα του πολυμερούς στην επιφάνεια του γυαλιού αποδείχτηκε σταθερό παρά τη διόγκωσή του, πιθανόν λόγω απορρόφησης νερού (Griesser & Chatelier 1990). Έτσι, η συγγένεια της χημικής σύστασης του γυαλιού με τα σφαιρίδια του SiO_2 μας επέτρεψε να προχωρήσουμε στην πρόσδεση των μορίων ινωδογόνου πάνω στην επιφάνεια των σφαιριδίων των κολλοειδών αισθητήρων. Εξαιτίας της απορρόφησης του νερού ωστόσο, φαινόμενα συμπίεστικότητας του στρώματος του πολυακρυλικού οξέος και επίδρασής τους στις τελικές μετρήσεις ήταν αναμενόμενα.

Σε καμπύλες, όπως αυτή του Σχήματος 3.10β, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα του ταυτόχρονου τεντώματος της πρωτεΐνης και του υποκείμενου πολυμερικού στρώματος. Εντούτοις, το ενδεχόμενο αυτό δεν μειώνει την αξία της παρατήρησης των φαινομένων αποκόλλησης, αφού αυτά αντιπροσωπεύουν αλληλεπίδραση των μορίων ινωδογόνου και μόνο, με την επιφάνεια της μίκας. Οι ιδιότητες του στρώματος του πολυακρυλικού οξέος θα μπορούσαν ακόμα, να επιδράσουν στον τρόπο, με τον οποίο οι συνθήκες της ιοντικής ισχύος και του pH επηρεάζουν την αλληλεπίδραση του κολλοειδούς αισθητήρα με την επιφάνεια. Μια τέτοια επίδραση είναι όμως,

περιορισμένη, επειδή το μεγαλύτερο ποσοστό του ηλεκτροστατικού φορτίου του πολυακρυλικού οξέος εξουδετερώνεται μετά την εστεροποίηση των καρβοξυλίων του από τα πρωτεϊνικά κατάλοιπα.

3.6.2 Ο ρόλος της ιοντικής ισχύος στην αλληλεπίδραση του ινωδογόνου με τη μίκα

Οι καμπύλες δύναμης-απόστασης, οι οποίες καταγράφηκαν κατά την προσέγγιση του αισθητήρα στην επιφάνεια της μίκας μέσα σε διάλυμα PBS pH 7.4 ιοντικής ισχύος 15mM, έδειξαν άπωση για μεταξύ τους αποστάσεις μικρότερες των 10nm, αν θεωρηθεί ότι η επιφάνεια του πρωτεϊνικού στρώματος βρίσκεται στα 6nm (Σχήμα 3.11). Η άπωση αυτή μπορεί να αποδοθεί στην ηλεκτροστατική δύναμη, η οποία αναπτύσσεται ανάμεσά τους και η οποία είναι απωστική λόγω του ότι και οι δύο επιφάνειες είναι αρνητικά φορτισμένες σε pH 7.4 ($\rho_{\text{ινωδογόνου}}=5.8$ (Cacciafesta et al. 2000, Ortega-Vinuesa et al. 1998a), $\rho_{\text{μίκας}}\approx 3$ (Roiter et al. 2006, Ta et al. 1998)). Η αύξηση σε 150mM της συγκέντρωσης των αλάτων NaCl στο διάλυμα μετρήσεων συνέβαλε στη μείωση του πάχους του διπλού στρώματος διάχυσης πάνω από τις επιφάνειες τόσο του πρωτεϊνικού στρώματος όσο και της μίκας από 2.48 σε 0.79 nm (Εξίσωση 2.3), με αποτέλεσμα να μειωθεί το εύρος της ηλεκτροστατικής άπωσης και σε μικρές αποστάσεις να κυριαρχήσουν οι ελκτικές δυνάμεις van der Waals.

Η παραπάνω θεωρητική ερμηνεία των δυνάμεων αλληλεπίδρασης ινωδογόνου-μίκας επιβεβαιώνεται από τη σύγκριση των πειραματικών καμπύλων με τις μαθηματικές καμπύλες, οι οποίες προκύπτουν από την Εξίσωση 3.5 για τις δύο διαφορετικές τιμές ιοντικής ισχύος του διαλύματος μέτρησης (Σχήμα 3.16α). Η χάραξη των θεωρητικών καμπύλων στηρίχθηκε στην υπόθεση, ότι η διεπιφάνεια πρωτεϊνικού στρώματος-διαλύματος βρίσκεται στα 6nm και ότι το επίπεδο προέλευσης των δυνάμεων DLVO βρίσκεται στη διεπιφάνεια αυτή. Συνεπώς, η μεταβλητή x στην Εξίσωση 3.5 αντικαταστάθηκε από τη μεταβλητή $x'=x-d$, όπου $d=6\text{nm}$, και η εξίσωση πήρε τη μορφή:

$$F = F_{\eta\lambda\epsilon\kappa} + F_{vdWaals} = \frac{4\pi\sigma_{\pi}\sigma_{\epsilon}R\lambda}{\epsilon\epsilon_0} e^{\frac{x-d}{\lambda}} - \frac{AR}{6(x-d)^2} \quad (3.23).$$

Στη σταθερά Hamaker, A , δόθηκε η τιμή $7.5\cdot 10^{-21}\text{J}$ (Valle-Delgado et al. 2004a), ενώ οι τιμές των επιφανειακών φορτίων του πρωτεϊνικού στρώματος και της μίκας, $\sigma_{\pi}=-0.0046\text{C/m}^2$ και $\sigma_{\epsilon}=-0.0035\text{C/m}^2$, υπολογίστηκαν ύστερα από βελτιστοποίηση της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων από τις μαθηματικές καμπύλες, χρησιμοποιώντας ως αφετηρία, τιμές, οι οποίες προτείνονται στη βιβλιογραφία (Heinz & Hoh 1999a, Meagher & Griesser 2002). Πρέπει να τονιστεί

ότι, καθώς η ιοντική ισχύς του διαλύματος αυξανόταν, τα επιφανειακά φορτία της μίκας και του ινωδογόνου διατηρούνταν σταθερά και ίσα με τις προαναφερόμενες τιμές.

Σχήμα 3.16. (α) Προσαρμογή των πειραματικών μετρήσεων δύναμης-απόστασης από τις θεωρητικές καμπύλες, οι οποίες προκύπτουν από το μοντέλο DLVO (Εξίσωση 3.23) για τιμές ιοντικής ισχύος 15 και 150mM. (β) Η προσαρμογή με βάση το ίδιο μοντέλο στα 500mM δεν κρίνεται ικανοποιητική, αλλά βελτιώνεται με την ενσωμάτωση των δυνάμεων ενυδάτωσης (Εξίσωση 3.24). Και στα δύο σχήματα η προσαρμογή των πειραματικών μετρήσεων έγινε μέχρι τα 6nm, καθώς σε αυτή την απόσταση βρίσκεται η διεπιφάνεια πρωτεΐνης διαλύματος.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.16α, οι πειραματικές καμπύλες προσέγγισης του αισθητήρα, σε ιοντική ισχύ 15mM και 150mM, προσαρμόζονται με ακρίβεια από τις θεωρητικές μέχρι την απόσταση των 6nm. Η σχετική ευκαμψία βέβαια του προβόλου δεν επιτρέπει την παρακολούθηση του απότομου θεωρητικού δυναμικού σε πολύ μικρές αποστάσεις, καθώς η ακίδα μεταπηδά σε επαφή με το υπόστρωμα με αποτέλεσμα να παρατηρούνται αποκλίσεις μεταξύ των πειραματικών και θεωρητικών καμπύλων στη διεπιφάνεια. Στη διεπιφάνεια εξάλλου οι στερεοχημικές απώσεις και τα φαινόμενα συμπίεσης αποκτούν σημαντική ισχύ δυσκολεύοντας την περιγραφή της πραγματικής αλληλεπίδρασης από το μοντέλο DLVO, το οποίο λαμβάνει υπόψη μόνο τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις και τις δυνάμεις van der Waals. Εν γένει χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή για την αξιολόγηση της προσαρμογής των πειραματικών καμπύλων δύναμης από μαθηματικές εξισώσεις, σαν την 3.23 σε αποστάσεις μικρότερες των 1-2nm από τη διεπιφάνεια. Εκτός από την παρουσία στερεοχημικών δυνάμεων σε αυτές αποστάσεις η σταθερά Hamaker έχει διαφορετική τιμή από το κυρίως διάλυμα, λόγω φαινομένων υστέρησης μεταξύ των διπόλων των επιφανειών ή/και συμπίεσης των κατιόντων του ηλεκτρολυτικού διαλύματος. Εντούτοις, οι αποκλίσεις αυτές δεν φαίνεται να περιορίζουν την

ικανότητα του μαθηματικού μοντέλου να περιγράψει με ακρίβεια τις πειραματικές μετρήσεις σε αποστάσεις μεγαλύτερες των 2nm, όπως εξάλλου αποδεικνύεται από το Σχήμα 3.16α.

Η Εξίσωση 3.23 αδυνατεί ωστόσο, να περιγράψει μαθηματικά την πειραματική καμπύλη δύναμης-απόστασης σε ιοντική ισχύ 500mM (Σχήμα 3.16β). Αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς η σχετική πειραματική καμπύλη, όπως και όλες οι άλλες, οι οποίες καταγράφηκαν στα 500mM, δεν παρουσίαζαν την έλξη van der Waals, η οποία σύμφωνα με τη θεωρία του διπλού στρώματος διάχυσης θα έπρεπε να κυριαρχεί στο προφίλ της δύναμης για την υψηλή αυτή τιμή ιοντικής ισχύος. Δημιουργείται συνεπώς, η ανάγκη να διερευνηθεί η φύση της απωστικής δύναμης, η οποία υπερκαλύπτει την έλξη van der Waals για αυτή τη συγκέντρωση αλάτων στο διάλυμα μετρήσεων.

Ενίσχυση των στερεοχημικών απώσεων σε υψηλές τιμές ιοντικής ισχύος θεωρείται απίθανη, καθώς η μείωση του εύρους των ενδομοριακών και διαμοριακών ηλεκτροστατικών απώσεων επιτρέπει στα μόρια του πρωτεϊνικού στρώματος να λάβουν μια πιο συμπαγή μορφή. Άρα, οι στερεοχημικές δυνάμεις δεν μπορούν να θεωρηθούν υπεύθυνες για το προφίλ των καμπύλων στα 500mM.

Από τη άλλη μεριά, οι απωστικές δυνάμεις ενυδάτωσης μεταξύ αρνητικά φορτισμένων επιφανειών γίνονται ιδιαίτερως σημαντικές σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων NaCl, εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των ενυδατωμένων ιόντων Na^+ , τα οποία εγκλωβίζονται ανάμεσά τους. Για να ελέγξουμε, αν η υπόθεση αυτή ισχύει στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης ινωδογόνου-μίκας, ενσωματώσαμε ένα όρο ενυδάτωσης στην Εξίσωση 3.23 και εξετάσαμε την ακρίβεια προσαρμογής των πειραματικών καμπύλων από τις προκύπτουσες θεωρητικές. Το Σχήμα 3.16β δείχνει, ότι η προσαρμογή της ενδεικτικής για τα 500mM πειραματικής καμπύλης από την εξίσωση:

$$F = F_{\eta\lambda\epsilon\kappa} + F_{vdWaals} + F_{\epsilon\nu\delta} = \frac{4\pi\sigma_{\pi}\sigma_{\epsilon}R\lambda}{\epsilon\epsilon_o} e^{\frac{x-d}{\lambda}} - \frac{AR}{6(x-d)^2} + F_o \text{Re}^{\frac{x-d}{\mu}} \quad (3.24)$$

είναι ικανοποιητική. Στη σταθερά F_o δόθηκε η τιμή 0.8mN/m, ενώ στη σταθερά απόσβεσης μ η τιμή 1.8nm. Οι τιμές αυτές είναι αρκετά κοντά στις προτεινόμενες από τη βιβλιογραφία με το μήκος απόσβεσης να είναι σχεδόν διπλάσιο της διαμέτρου των ενυδατωμένων ιόντων Na^+ , η οποία ισούται με 0.72nm (Israelachvili 1992).

Μεταξύ των πειραματικών καμπύλων δύναμης κατά την προσέγγιση στις διάφορες τιμές ιοντικής ισχύος και του βαθμού προσρόφησης μεμονωμένων μορίων ινωδογόνου, όπως μετρήθηκε στην πρώτη ομάδα πειραμάτων αυτής της εργασίας, φαίνεται να υπάρχει ισχυρή συσχέτιση. Έτσι, η αύξηση της προσρόφησης, καθώς η συγκέντρωση των αλάτων αυξάνει από 15 σε 150mM,

δικαιολογείται από τη μετατροπή της δύναμης αλληλεπίδρασης ινωδογόνου-μίκας από απωστική στα 15mM σε ελκτική στα 150mM. Ακόμα, ο περιορισμός της προσρόφησης στα 500mM, ο οποίος είχε αποδοθεί στη συσσωμάτωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα προσρόφησης, πλέον δικαιολογείται και από την εμφάνιση των απωστικών δυνάμεων ενυδάτωσης, οι οποίες καλύπτουν τις ελκτικές van der Waals.

Η απουσία της προσκόλλησης του κολλοειδούς αισθητήρα στην επιφάνεια της μίκας, καθώς απομακρύνεται από αυτή στα 500mM, φανερώνει ένα ακόμα λόγο, για τον οποίο η προσρόφηση του ινωδογόνου μειώνεται σε αυτή την τιμή ιοντικής ισχύος. Όπως αναφέρθηκε ήδη, η υψηλή συγκέντρωση αλάτων στο διάλυμα μειώνει το εύρος των ηλεκτροστατικών απώσεων ανάμεσα στα πρωτεϊνικά κατάλοιπα (Erickson & Carrell 1983, Frank & Belfort 2003) και συνεπώς, τα μόρια του ινωδογόνου λαμβάνουν μια συμπαγή μορφή, η οποία τα εμποδίζει να σχηματίσουν δεσμούς με την επιφάνεια της μίκας. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τη σύγκριση των ενεργειών προσκόλλησης, οι οποίες υπολογίστηκαν από το εμβαδό των βρόγχων ανάμεσα στους κλάδους προσέγγισης και απομάκρυνσης για τις τρεις ενδεικτικές καμπύλες, σύμφωνα με την οποία στα 500mM τα φαινόμενα μη αντιστρεπτών αναδιατάξεων των πρωτεϊνικών μορίων στην επιφάνεια ελαχιστοποιούνται (ενέργεια προσκόλλησης μόλις $1 \cdot 10^{-18}$ J). Μπορούμε επομένως, να συμπεράνουμε, ότι μια μεγάλη αύξηση των αλάτων στο πρωτεϊνικό διάλυμα παρεμποδίζει την προσρόφηση, όχι μόνο μέσω των δυνάμεων ενυδάτωσης αλλά και μέσω μετασχηματισμών της μοριακής δομής, οι οποίοι ακυρώνουν τη δραστηριότητα των σημείων πρόσδεσης. Μια παρόμοια επίδραση έχει αναφερθεί και για την πρωτεΐνη υαλονεκτίνη, η διαμοριακή δύναμη προσκόλλησης της οποίας βρέθηκε να μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης NaCl στα 500mM (Zhang et al. 2005).

Πρέπει να υπογραμμιστεί ότι οι μετρήσεις των δυνάμεων αποκόλλησης του πρωτεϊνικού στρώματος από την επιφάνεια της μίκας δεν εκφράζουν κατά απόλυτο τρόπο τη συνολική συμπεριφορά του ινωδογόνου κατά τη διαδικασία προσρόφησης του, γιατί ο χρόνος επαφής του αισθητήρα με τη μίκα ήταν μόλις μερικά δεκάδες ms και τα πρωτεϊνικά μόρια ήταν ακινητοποιημένα σε ένα στρώμα. Για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις προσαρμογές της δομής των πρωτεϊνών στις διεπιφάνειες, απαιτούνται μετρήσεις με μεγαλύτερους χρόνους επαφής (Hemmerle et al. 1999), κατά τη διάρκεια μάλιστα των οποίων τα πρωτεϊνικά μόρια πρέπει να έχουν τη δυνατότητα να αναδιαταχθούν.

3.6.3 Ο ρόλος του pH στην αλληλεπίδραση του ινωδογόνου με τη μίκα

Οι μεταβολές του pH του διαλύματος μετρήσεων θεωρητικά επηρεάζουν την αλληλεπίδραση των μορίων του στρώματος του ινωδογόνου με την επιφάνεια της μίκας, επιδρώντας στο ηλεκτροστατικό φορτίο και των δύο. Έτσι, σε pH 5.8, το οποίο είναι το ισοηλεκτρικό σημείο του ινωδογόνου και σε pH 3.5, το οποίο είναι κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο της μίκας, η αλληλεπίδρασή τους αναμενόταν να είναι πιο ελκτική από ότι σε pH 7.4. Δεδομένου όμως, ότι οι μετρήσεις έγιναν σε διάλυμα PBS ιοντικής ισχύος 150mM, στο οποίο, όπως αποδείχτηκε, οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις συγκαλύπτονται σε μεγάλο βαθμό, λόγω της μείωσης του πάχους του διπλού στρώματος διάχυσης, η συμβολή αυτού του είδους των δυνάμεων στα πειραματικά αποτελέσματα προβλέπεται να είναι μικρή. Πραγματικά η προσαρμογή των καμπύλων προσέγγισης του Σχήματος 3.13 βάσει της Εξίσωσης 3.23 και των τιμών των επιφανειακών φορτίων, που φαίνονται στον Πίνακα 3.2, κατέληξε σε τρεις επικαλυπτόμενες καμπύλες (Σχήμα 3.17).

Πίνακας 3.2. Τιμές επιφανειακού φορτίου, οι οποίες προέκυψαν για τη μίκα (σ_e) και το στρώμα της πρωτεΐνης (σ_p) ύστερα από διαδικασία βελτιστοποίησης της προσαρμογής των καμπύλων DLVO στα πειραματικά δεδομένα στις τρεις τιμές pH.

		pH 7.4	pH 5.8 (pI ινωδογόνου)	pH 3.5 (pI μίκας)
150mM	$\sigma_p =$	- 0,0035 C/m ²	0 C/m ²	0,005 C/m ²
	$\sigma_s =$	- 0,0046 C/m ²	- 0,002 C/m ²	- 0,001 C/m ²

Η ισχυρότερη έλξη μεταξύ του κολλοειδούς αισθητήρα και της επιφάνειας της μίκας στο pH 5.8 ή 3.5, από ότι στο φυσιολογικό, θα μπορούσε να δικαιολογηθεί και πάλι από τις δυνάμεις ενυδάτωσης. Η συγκέντρωση των ενυδατωμένων ιόντων Na⁺ ανάμεσα στις επιφάνειες είναι μεγαλύτερη σε pH 7.4 σε σύγκριση με τις χαμηλότερες τιμές pH, γιατί όσο πιο βασικό είναι το pH τόσο περισσότερο αρνητικά είναι αυτές φορτισμένες. Αυτό συνεπάγεται την εμφάνιση της σχετικής άπωσης λόγω οσμωτικής πίεσης, η οποία καλύπτει εν μέρει τις ελκτικές δυνάμεις van der Waals. Όταν το pH γίνει πιο όξινο και οι επιφάνειες αποκτήσουν ουδέτερο ή ακόμα και θετικό φορτίο, οι δυνάμεις ενυδάτωσης παύουν να είναι σημαντικές, καθώς τα ανιόντα Cl⁻, τα οποία συγκεντρώνονται κοντά στις επιφάνειες τείνοντας να εξουδετερώσουν το φορτίο τους, δεν είναι

ενυδατωμένα. Συνεπώς, οι ελκτικές δυνάμεις van der Waals εμφανίζονται αμείωτες στις πειραματικές καμπύλες δύναμης για τις δύο χαμηλότερες τιμές pH.

Σχήμα 3.17. Προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων δύναμης-απόστασης κατά την προσέγγιση, σε διάφορες τιμές pH από τις θεωρητικές καμπύλες (συνεχείς γραμμές), οι οποίες προκύπτουν από το μοντέλο DLVO (Εξίσωση 3.23).

Δεν πρέπει ωστόσο, να αποκλειστεί το ενδεχόμενο, η ασυμφωνία πειραματικών και θεωρητικών καμπύλων δύναμης-απόστασης να οφείλεται στο ότι, στο μαθηματικό μοντέλο δεν προβλέφθηκε η αντιστροφή των ηλεκτροστατικών επιφανειακών φορτίων σε πολύ μικρές αποστάσεις. Κάτι τέτοιο είναι πιθανό και τεκμηριώνεται θεωρητικά (Hunter 1987, McCormack et al. 1995), λόγω της συμπίεσης των ιόντων του ηλεκτρολυτικού διαλύματος προς τις δύο προσεγγιζόμενες επιφάνειες, των οποίων το δυναμικό έχει θεωρηθεί σταθερό. Η αντιστροφή μάλιστα, των ηλεκτροστατικών φορτίων, η οποία θα οδηγούσε στην εμφάνιση ελκτικών δυνάμεων σε αποστάσεις μικρότερες των 2-3nm, είναι πιθανότερη σε pH 5.8 από ότι σε 7.4, επειδή σε χαμηλές τιμές pH η μίκα και το ινωδογόνο διαθέτουν μικρότερο επιφανειακό φορτίο.

Η ισχυρή έλξη του στρώματος του ινωδογόνου από τη μίκα στο διάλυμα με pH 3.5 φαίνεται να αντικρούει το συμπέρασμα, στο οποίο είχαμε καταλήξει μετά τη σύγκριση της επιφανειακής κάλυψης στις τρεις τιμές pH (Κεφ. 2.5.2). Από τα αποτελέσματα της προηγούμενης ομάδας πειραμάτων φάνηκε, ότι σε αυτό το pH η προσρόφηση μειώνεται, γεγονός το οποίο είχε αποδοθεί στη συσσωμάτωση των μορίων ινωδογόνου μέσα στο διάλυμα. Οι καμπύλες, οι οποίες καταγράφηκαν κατά την απομάκρυνση του κολλοειδούς αισθητήρα από την επιφάνεια, στις τρεις τιμές pH, δεν προσέφεραν κάποια χρήσιμη πληροφορία, καθώς έδειξαν έντονα φαινόμενα προσκόλλησης και στα τρία διαλύματα. Παρόλα αυτά, η επανεμφάνιση της προσκόλλησης του ινωδογόνου μέσα σε διάλυμα PBS 500mM pH 7.4, μόνο μετά το πέρασμα από διάλυμα PBS pH 3.5, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στο όξινο pH το ινωδογόνο αναδιατάσσεται και πιθανόν ορισμένοι τομείς του αποκολλούνται από το κυρίως σώμα του ή/και εκτίθενται στην επιφάνειά του.

Άλλοι συγγραφείς (Jung et al. 2003, Verklich et al. 1993) έχουν επίσης υποστηρίξει την ιδέα των μοριακών αναδιατάξεων του ινωδογόνου σε pH 3.5, τις οποίες περιέγραψαν ως αποκολλήσεις των καρβοξυτελικών άκρων των Αα αλυσίδων (αC στελέχη) από τον κεντρικό τομέα, E, του μορίου. Τα στελέχη αC είναι θετικά φορτισμένα (βλ. Κεφ. 1.3.1) και επομένως, αν αποδεσμευτούν από τον τομέα E, μπορούν να κολλήσουν στην αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια της μίκας. Από την άλλη μεριά, είναι δυνατό να παίζουν κάποιο κρίσιμο ρόλο στον πολυμερισμό του ινωδογόνου σε ινώδες, καθώς η αποκόλλησή τους από τον κεντρικό τομέα αφήνει ακάλυπτα τα ινωδοπεπτίδια A και B. Ο συνδυασμός των δύο αυτών δράσεων μπορεί να οδηγήσει σε συσσωμάτωση της πρωτεΐνης πάνω στην επιφάνεια προσρόφησης ή στο διάλυμα. Συνεπώς, η μείωση της προσρόφησης από το διάλυμα ινωδογόνου σε pH 3.5 παράλληλα με την καταγραφή έντονης προσκόλλησης του τροποποιημένου σφαιριδίου στη μίκα δεν πρέπει να εκπλήσσει, αφού και τα δύο φαινόμενα δικαιολογούνται από τις αναδιατάξεις των πρωτεϊνικών μορίων.

Κεφάλαιο 4

Μέτρηση δύναμης αποκόλλησης μεμονωμένων μορίων ινωδογόνου από επιφάνεια

4.1 Εισαγωγή

Η ευελιξία και η ακρίβεια της τεχνικής μέτρησης δυνάμεων με το AFM έχει προσφέρει εντυπωσιακή ώθηση στην έρευνα της δυναμικής συμπεριφοράς μεμονωμένων βιομορίων ανοίγοντας το δρόμο για την ανάπτυξη εφαρμογών, οι οποίες μέχρι πρόσφατα φαίνονταν αδύνατες. Μέσω της τροποποίησης των ακίδων με το κατάλληλο πρόσδεμα (ligand) (ή αντίγονο) είναι δυνατό καταρχάς να μετρηθεί η δύναμη του ειδικού δεσμού με τον αντίστοιχο υποδοχέα (receptor) (ή αντίσωμα), ο οποίος ακινητοποιείται για αυτό το σκοπό στην επιφάνεια του δείγματος. Αν και οι σχετικές εφαρμογές είναι πολυάριθμες και μια εκτενής ανασκόπησή τους έχει παρουσιαστεί από το Lin και τους συνεργάτες του (Lin et al. 2005), αναφέρουμε ενδεικτικά τη μέτρηση με αυτή τη μέθοδο της αντοχής του δεσμούⁱ ανάμεσα στην αβιδίνη και τη βιοτίνη (De Paris et al. 2000), την αλβουμίνη και την αντι-αλβουμίνη (Hinterdorfer et al. 1996), ομόλογες καντερίνες (Hinterdorfer et al. 2000), την κονκαναβαλίνη A και τη μανόζη (Ratto et al. 2004) και την $\alpha_5\beta_1$ ιντεγκρίνη και την ινονεκτίνη (Li et al. 2003).

Προέκταση αυτού του είδους των πειραμάτων μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι η μέτρηση δυνάμεων για τη μοριακή αναγνώριση της επιφάνειας βιολογικά σύνθετων δειγμάτων (molecular recognition force spectroscopy) (Heinz & Hoh 1999b). Σε αυτή την περίπτωση η τροποποιημένη με το πρόσδεμα ακίδα χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της δύναμης αποκόλλησης από διαφορετικά σημεία της επιφάνειας του δείγματος, για παράδειγμα μιας κυτταρικής μεμβράνης, και η εμφάνιση ειδικών αλληλεπιδράσεων σε συγκεκριμένα σημεία υποδηλώνει την παρουσία των προβλεπόμενων υποδοχέων σε αυτά (Hinterdorfer et al. 1996, Hull et al. 2007).

ⁱ Αν και η αντοχή ενός υλικού ορίζεται ως η τάση, στην οποία αυτό αστοχεί/θραύεται, εδώ ο όρος αντοχή χρησιμοποιείται με την έννοια της δύναμης, η οποία προκαλεί ρήξη του μοριακού δεσμού, ισοδυναμεί δηλαδή με την τάση αστοχίας ύστερα από αναγωγή της στην επιφάνεια ενός μοριακού δεσμού.

Οι ειδικοί δεσμοί τύπου προσδέματος-υποδοχέα ή αντιγόνου-αντισώματος δεν είναι οι μόνοι δεσμοί, των οποίων η αντοχή μπορεί να μετρηθεί με τη βοήθεια του AFM. Η μη ειδική αλληλεπίδραση και προσκόλληση μεμονωμένων πρωτεϊνικών μορίων με τεχνητές επιφάνειες μπορεί να διερευνηθεί με παρόμοιο τρόπο, προκειμένου να συλλεχθούν πληροφορίες σχετικά με τη βιοσυμβατότητα του εξεταζόμενου υλικού. Αυτή την προοπτική έχουν και τα πειράματα μέτρησης της δύναμης αποκόλλησης μεμονωμένων μορίων ινωδογόνου από την επιφάνεια γυαλιού, τα οποία πραγματοποιήθηκαν στο τελευταίο στάδιο της συγκεκριμένης διατριβής.

Αξίζει να αναφερθεί ότι εκτός από τη μέτρηση της αντοχής δεσμών, το AFM μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τη μελέτη των ενδομοριακών μηχανικών ιδιοτήτων και των μηχανισμών ξεδιπλώματος βιομορίων, όπως για παράδειγμα του DNA ή μεγάλων πρωτεϊνών με επαναλαμβανόμενες ομάδες αμινοξέων, σαν την τιτίνη, αλλά και του ίδιου του ινωδογόνου (Brown et al. 2007, Hertadi & Ikai 2002, Oberdorfer et al. 2000). Αυτού του είδους τα πειράματα, για τα οποία είναι απαραίτητη η αγκίστρωση των μορίων τόσο στην ακίδα όσο και στο υπόστρωμα, προσφέρουν πληροφορίες, που δύσκολα θα μπορούσαν να αντληθούν με άλλη τεχνική, σχετικά με τη θέση και την αντοχή των ενδομοριακών δεσμών (Dietz et al. 2006, Fisher et al. 1999).

Οι εφαρμογές βέβαια, της τεχνικής μέτρησης δυνάμεων μεμονωμένων μορίων με το AFM δεν εξαντλούνται σε όσα προαναφέρθηκαν και συνεχώς εμφανίζονται καινούργιες, όπως ο πρωτοποριακός μοριακός ζυγός του Gaub και των συνεργατών του (Albrecht et al. 2006), η λειτουργία του οποίου βασίζεται στην αντοχή ενός πρότυπου συμπλέγματος μορίων.

Ανεξάρτητα όμως, από τον χαρακτήρα της εφαρμογής η μέτρηση δυνάμεων με μεμονωμένα μόρια προϋποθέτει την πρόσδεσή τους στην ακίδα του AFM με κατάλληλο τρόπο, ο οποίος συνήθως ισοδυναμεί με τη χρήση ενός συνδέτη (linker). Οι λόγοι, οι οποίοι επιβάλλουν κάτι τέτοιο καθώς και οι εναλλακτικές μέθοδοι για την πρόσδεση των μορίων θα αναφερθούν στην ενότητα, η οποία ακολουθεί. Στην ίδια ενότητα θα παρουσιαστούν και τα συμπεράσματα των δοκιμών, οι οποίες έγιναν για την επιλογή της μεθόδου, που τελικά χρησιμοποιήθηκε για την πρόσδεση του ινωδογόνου στην ακίδα. Στη συνέχεια θα περιγραφεί η διαδικασία λήψης των μετρήσεων της δύναμης αποκόλλησης του ινωδογόνου από την επιφάνεια του γυαλιού καθώς και ο αλγόριθμος αυτόματης επεξεργασίας των πειραματικών δεδομένων για την εξαγωγή των δυνάμεων αποκόλλησης από τις καμπύλες τάνυσης των μορίων. Οι καμπύλες αυτές προσαρμόστηκαν με το θεωρητικό μοντέλο WLC (Worm-Like Chain model), ενώ εξετάστηκε και ο βαθμός, στον οποίο η μεταβολή της αντοχής των δεσμών με την επιφάνεια συναρτήσκει του ρυθμού φόρτισής τους, μπορεί να προβλεφθεί από τη θεωρία των Bell και Evans. Τέλος, βάσει των ιδιαίτερων

χαρακτηριστικών των καταγεγραμμένων συμβάντων αποκόλλησης προτάθηκαν δύο θεωρητικά μοντέλα για την εκτίμηση της σχετικής διάταξης των μορίων ινωδογόνου κατά την απομάκρυνση της ακίδας από το υπόστρωμα.

4.2 Πρόσδεση των μορίων ινωδογόνου στην ακίδα

4.2.1 Επισκόπηση μεθόδων πρόσδεσης

Ο τρόπος ακινητοποίησης των πρωτεϊνών ή άλλων βιομορίων στην ακίδα του AFM αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την επιτυχή μέτρηση της δύναμης αλληλεπίδρασης μεμονωμένων μορίων με τα ομόλογά τους ή με επιφάνειες. Καταρχάς, η πρόσδεση της πρωτεΐνης στην ακίδα πρέπει να είναι ισχυρότερη από τις δυνάμεις, τις οποίες θέλουμε να μετρήσουμε, και όπως έχει ήδη αναφερθεί, αυτό μπορεί να εξασφαλιστεί μέσω ομοιοπολικών δεσμών. Οι τεχνικές όμως ομοιοπολικής σύνδεσης, οι οποίες αναφέρθηκαν στο Κεφ. 3.3.3, είναι δυνατό να αποβούν καταστρεπτικές για τα πρωτεϊνικά μόρια προκαλώντας από μικρές αναδιατάξεις της δομής τους μέχρι την πλήρη αποδιάταξή τους πάνω στην επιφάνεια της ακίδας (Muller et al. 1997a). Το εμπόδιο αυτό μπορεί να ξεπεραστεί, αν για την ομοιοπολική πρόσδεση χρησιμοποιηθεί ένας συνδέτης, δηλαδή ένα πολυμερικό μόριο με πεπερασμένο μήκος. Με τη χρήση τέτοιων εύκαμπτων συνδετών αποφεύγονται οι στερεοχημικοί περιορισμοί, οι οποίοι συνήθως συνοδεύουν την ακινητοποίηση των μορίων σε μία επιφάνεια και οι οποίοι ευθύνονται για τις παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των δυνάμεων, που μετρούνται με μόρια ακινητοποιημένα σε επιφάνεια, και αυτών, που μετρούνται με μόρια σε διάλυμα (Hinterdorfer et al. 1998, Janshoff et al. 2000). Η εξάρτηση της μετρούμενης δύναμης από τη διάταξη, τον προσανατολισμό και την κινητικότητα της δεσμευμένης στην ακίδα πρωτεΐνης είναι περισσότερο εμφανής στις περιπτώσεις ειδικών δεσμών και έχει αναφερθεί χαρακτηριστικά για την περίπτωση της ινονεκτίνης και των υποδοχέων της στην επιφάνεια του στρεπτόκοκκου της ομάδας B (Hull et al. 2007).

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα ωστόσο, το οποίο προσφέρει η χρήση των πολυμερικών συνδετών για την ακινητοποίηση των πρωτεϊνών στην ακίδα, είναι η δυνατότητα διάκρισης των ειδικών δεσμών από τις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις ακίδας-επιφάνειας (Bhushan 2004). Αυτό είναι εφικτό χάρη στο παραβολικό σχήμα, το οποίο λαμβάνει η καμπύλη δύναμης-απόστασης στο AFM, όταν το προσδεδεμένο μέσω του συνδέτη βιομόριο προσκολλάται στην επιφάνεια του δείγματος αναγκάζοντας την πολυμερική αλυσίδα του συνδέτη να τεντωθεί και να αναπτυχθεί, καθώς η ακίδα

απομακρύνεται από το υπόστρωμα (Heinz & Hoh 1999b) (Σχήμα 4.1). Έτσι, η εμφάνιση της χαρακτηριστικής καμπύλης τάνυσης του πολυμερούς-συνδέτη χρησιμοποιείται για την αναγνώριση των γεγονότων αποκόλλησης της συζευγμένης πρωτεΐνης από το υπόστρωμα του δείγματος και μάλιστα την ταυτοποίηση της αποκόλλησης μεμονωμένων μορίων της, αφού στην άκρη του συνδέτη μπορεί να δεσμευτεί μόνο ένα μόριο κάθε φορά. Επειδή η ακριβής μορφή της καμπύλης εξαρτάται από τα ελαστικά χαρακτηριστικά και το μήκος του συνδέτη, συμπεραίνουμε ότι η επιτυχία των σχετικών πειραμάτων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την επιλογή του συνδέτη, αφού όσο καλύτερα προσδιορισμένες είναι οι ιδιότητές του τόσο ασφαλέστερη είναι η εξακρίβωση των μεμονωμένων γεγονότων αποκόλλησης.

Σχήμα 4.1. Σχηματική αναπαράσταση χαρακτηριστικών καμπύλων κάμψης προβόλου κατά την απομάκρυνση της ακίδας από την επιφάνεια. (α) Απουσία προσκόλλησης της ακίδας στην επιφάνεια. (β) Μη ειδική προσκόλληση της ακίδας λόγω φυσικών δυνάμεων, για παράδειγμα υδροφοβικών ή ηλεκτροστατικών. (γ) Πολλαπλές αποκολλήσεις συνδεδεμένων στην ακίδα μορίων από την επιφάνεια. (δ) Αποκόλληση βιομορίου από το υπόστρωμα μετά την τάνυση της πολυμερικής αλυσίδας, μέσω της οποίας το πρώτο συνδέεται στην ακίδα.

Ένας από τους ευρύτερα χρησιμοποιούμενους συνδέτες για την πρόσδεση των πρωτεϊνών στην ακίδα του AFM είναι το πολυαιθυλενοξείδιο ή αλλιώς πολυαιθυλενική γλυκόλη [poly(ethylene glycol), PEG]:

Τα συγκριτικά του πλεονεκτήματα ως προς άλλους συνδέτες σχετίζονται με την ενυδάτωσή του και τον εύκολο προσδιορισμό του μήκους του. Σε αντίθεση με το πολυμεθυλενοξείδιο, το πολυπροπυλενοξείδιο και τα πολυμερή υψηλότερης τάξης, το PEG είναι διαλυτό όχι μόνο σε οργανικούς διαλύτες αλλά και στο νερό (Raviv et al. 2002). Λόγω των διπόλων των ατόμων οξυγόνου, που περιέχει, δείχνει ιδιαίτερη προτίμηση για τα μόρια του νερού, ενώ λόγω του μη ιοντικού του χαρακτήρα δεν επηρεάζεται από τις συγκεντρώσεις των αλάτων στο διάλυμα (Oesterhelt et al. 1999). Το μήκος του εξαρτάται από το πλήθος των μονομερών στην αλυσίδα του,

το οποίο προσδιορίζεται από το μοριακό του βάρος. Αν και το τελευταίο ακολουθεί μια κατανομή, ακόμα και για πολυμερή, τα οποία παράγονται βάσει συγκεκριμένης διαδικασίας, τεχνικές διαχωρισμού εγγυώνται σε μεγάλο βαθμό ότι οι χρησιμοποιούμενοι συνδέτες έχουν μοριακό βάρος ίσο με την τιμή που δίνουν οι προμηθευτές. Το ονομαστικό μήκος των μονομερών αιθυλενοξειδίου έχει υπολογιστεί ίσο με 3.36 Å (Ratto et al. 2004). Κατά συνέπεια το μήκος μιας αλυσίδας PEG μοριακού βάρους 800 εκτιμάται περίπου 8nm, το οποίο επιβεβαιώνεται και πειραματικά από την υψηλή συχνότητα εμφάνισης συμβάντων αποκόλλησης για αυτή την απόσταση ακίδας-υποστρώματος (Hinterdorfer et al. 1996).

Ένας ακόμα λόγος, για τον οποίο έχει διαδοθεί η χρήση του PEG ως συνδέτη στα πειράματα με το AFM, είναι η δυνατότητα προσθήκης στα άκρα της αλυσίδας του συγκεκριμένων χημικών ομάδων, οι οποίες μπορούν στη συνέχεια να αντιδράσουν από τη μία μεριά με την κατάλληλα τροποποιημένη επιφάνεια της ακίδας και από την άλλη με τα πρωτεϊνικά μόρια (Haselgrubler et al. 1995). Τρεις από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες τέτοιες χημικές ομάδες είναι η αμινομάδα ($-NH_2$), ο 2-πυριδυλοδιθειοπροπιονικός εστέρας (PDP) και το υδροξυ-ηλεκτριμίδιο (NHS) (Σχήμα 4.2).

Σχήμα 4.2. Χημική δομή μορίου πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG), στο αριστερό άκρο της οποίας έχει προστεθεί η ομάδα 2-πυριδυλοδιθειοπροπιονικός εστέρας (PDP) και στο δεξί ένα υδροξυ-ηλεκτριμίδιο (NHS).

Οι αμινομάδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνδεση του PEG σε επιχρυσωμένες επιφάνειες ύστερα από κάλυψή τους με ένα μονομοριακό στρώμα 16-θειοδεκαεξανικού οξέος ($HS(CH_2)_{16}COOH$) και ενεργοποίηση των καρβοξυλομάδων του στρώματος με 1,1-καρβονυλοδιιμιδαζόλιο (Ratto et al. 2006). Είναι ακόμα δυνατό να χρησιμοποιηθούν για την αντίδρασή του PEG με άλλες αμινομάδες ή θειομάδες, οι οποίες βρίσκονται είτε στην επιφάνεια της ακίδας είτε στην πρωτεΐνη. Για την αντίδραση με τις αμινομάδες απαιτείται η παρουσία του συνδέτη 1,4-φαινυλο-δισοθειο-κυάνιο (PDITC), ενώ για την αντίδραση με τις θειομάδες, του εστέρα μαλεϊμιδο-βενζολο-N-υδροξυ-ηλεκτριμίδιο (MBS).

Η χημική ομάδα NHS είναι ένας εστέρας, ο οποίος όταν βρίσκεται στην άκρη της αλυσίδας μπορεί να αντικατασταθεί άμεσα από μία ρίζα, που φέρει αμινομάδα. Έτσι αλυσίδες PEG, που έχουν ομάδα NHS στο ένα άκρο τους, συνδέονται εύκολα σε επιφάνειες, οι οποίες έχουν προηγουμένως καλυφθεί με ένα στρώμα αμινομάδων μέσω σιλανοποίησης (Ratto et al. 2006) ή αντίδρασης με αιθανολαμίνη (Bonanni et al. 2005, Hinterdorfer et al. 2000, Hull et al. 2007). Συνήθως στο άλλο άκρο του PEG βρίσκεται η ομάδα PDP, η οποία αντιδρά με τις κυστεΐνες, δηλαδή τις θειομάδες των πρωτεϊνικών μορίωνⁱⁱ (Hinterdorfer et al. 1996, Hull et al. 2007). Υπάρχει όμως η δυνατότητα, η πρωτεΐνη να συνδεθεί στην επιφάνεια μέσω των λυσίνων της, δηλαδή των αμινομάδων της, και στην περίπτωση αυτή το PEG φέρει την ομάδα NHS και στο άλλο άκρο του (Ratto et al. 2006). Εναλλακτικά της ομάδας NHS το δεύτερο άκρο του PEG μπορεί να έχει μια αλδεϋδομάδα, μέσω της οποίας συνδέεται στις λυσίνες της πρωτεΐνης (Bonanni et al. 2005).

Εξάλλου, η χρήση PEG με ομάδες NHS και στα δύο του άκρα δεν είναι ο μοναδικός τρόπος να συνδεθούν πρωτεϊνικά μόρια μέσω των λυσίνων τους σε επιφάνεια, η οποία είναι τροποποιημένη με αμινομάδες. Για τον ίδιο σκοπό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η γλουταραλδεϋδη (Chtcheglova et al. 2004), η οποία αντιδρά με τις πρωτεΐνες ή οποιαδήποτε άλλα μόρια, που φέρουν αμινομάδες, προς το σχηματισμό ενώσεων τύπου Schiffⁱⁱⁱ. Εντούτοις, η μέθοδος αυτή είναι καλό να αποφεύγεται, γιατί μέσα σε υδατικά διαλύματα η γλουταραλδεϋδη πολυμερίζεται δημιουργώντας σύμπλοκα με περισσότερα των δύο δραστικά άκρα (Hermanson 1996). Έτσι, υφίσταται ο κίνδυνος κάθε μόριο γλουταραλδεϋδης να συνδέει περισσότερα του ενός μόρια πρωτεΐνης με την ακίδα, με αποτέλεσμα να περιπλέκεται η ερμηνεία των μετρήσεων και να μειώνεται η επαναληψιμότητα των φαινομένων αποκόλλησης.

Ολοκληρώνοντας αυτή την επισκόπηση, οφείλουμε να αναφέρουμε ότι η σύνδεση των πρωτεϊνικών μορίων πάνω στην ακίδα είναι δυνατό να γίνει με τη χρήση όχι μόνο των αλυσίδων PEG αλλά ενός κατάλληλου συνδέτη απειροελάχιστου μήκους. Ένας τέτοιος συνδέτης είναι το 3-2-πυριδυλοδιθειοπροπιονικό-N-ηλεκτριμίδιο (SPDP), το οποίο συνδέει τα πρωτεϊνικά μόρια μέσω των θειομάδων τους με τις αμινομάδες της τροποποιημένης επιφάνειας (Hertadi & Ikaï 2002). Η χρήση

ⁱⁱ Πληροφορίες για τις μεθόδους δημιουργίας ελεύθερων θειομάδων στην πρωτεϊνική αλυσίδα δίνονται στην παράγραφο “Αντίδραση θειομάδων” του Κεφ.3.3.3.

ⁱⁱⁱ Στις ενώσεις Schiff, η αμινομάδα έχει αντικαταστήσει το οξυγόνο της αλδεϋδομάδας, χωρίς διάσπαση του διπλού δεσμού ($R-N=CH-R'$). Η αντίδραση, στη συνέχεια, των ενώσεων Schiff με $NaCNBH_3$ μετατρέπει το διπλό δεσμό σε απλό, σταθεροποιώντας το δεσμό της αμινομάδας.

των συνδετών αυτών ωστόσο, αντενδείκνυται στα πειράματα διερεύνησης της αποκόλλησης μεμονωμένων μορίων, επειδή δεν εισάγουν κάποιο χαρακτηριστικό μήκος στην καμπύλη δύναμης-απόστασης. Μπορούν όμως, να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα τάνυσης μεγάλων εκτατών μορίων, τα οποία από μόνα τους εμφανίζουν ένα συγκεκριμένο μήκος ικανό για την ταυτοποίηση ανεξάρτητων μορίων.

Για τις ανάγκες των πειραμάτων αυτής της εργασίας, διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα της σύνδεσης των μορίων ινωδογόνου πάνω στην ακίδα μέσω τριών διαφορετικών συνδετών: i) του δι-υδροξυ-θειο-ηλεκτριμιδικού εστέρα (BS^3), ii) ενός PEG, το οποίο φέρει στο ένα άκρο του την ομάδα NHS και στο άλλο μια αμινομάδα προστατευμένη από το 9- φθορενυλο-μεθοξυ-καρβονύλιο (NHS-PEG-NH-fmoc) και iii) ενός PEG, το οποίο φέρει και στα δύο του άκρα την ομάδα NHS (διπλο-NHS-PEG). Παράλληλα εξετάστηκε η τροποποίηση της επιφάνειας της ακίδας με αμινομάδες μέσω τριών διαφορετικών αντιδράσεων. Η διαδικασία των ελέγχων αυτών καθώς και τα σχετικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στις παραγράφους, οι οποίες ακολουθούν.

4.2.2 Έλεγχος μεθόδων τροποποίησης ακίδας με αμινομάδες

Από το σύνολο των προτεινόμενων τεχνικών για τη δέσμευση των μορίων ινωδογόνου πάνω στην ακίδα του AFM, το ενδιαφέρον συγκεντρώθηκε εξ αρχής σε εκείνες, οι οποίες προέβλεπαν την κάλυψη της επιφάνειας της ακίδας με αμινομάδες και τη σύνδεση έπειτα της πρωτεΐνης σε αυτές μέσω των λυσίνων της με τη χρήση ενός συνδέτη. Για τη δημιουργία του στρώματος των αμινομάδων δοκιμάστηκαν τρία διαφορετικά αντιδραστήρια, η αιθανολαμίνη, το αμινοπροπυλο-τριάιθοξυ-σιλάνιο (APTES) και το αμινοπροπυλο-διμεθυλ-αιθοξυσιλάνιο (APDES).

Ο έλεγχος της αποτελεσματικότητάς τους στη δημιουργία του επιθυμητού μονομοριακού στρώματος βασίστηκε πέρα από τις καμπύλες αλληλεπίδρασης τροποποιημένων ακίδων με πρότυπες επιφάνειες, στην εξέταση δειγμάτων γυαλιού και σε ορισμένες περιπτώσεις πυριτίου, τα οποία τροποποιούνταν με την ίδια διαδικασία, που ακολουθούσαν και για τις ακίδες. Η επιλογή των συγκεκριμένων υποστρωμάτων δικαιολογείται από τη χημική τους σύσταση, η οποία προσεγγίζει σε μεγάλο βαθμό αυτή των ακίδων νιτριδίου του πυριτίου, καθώς και από την ατομικά λεία επιφάνειά τους, η οποία επιτρέπει την άμεση παρατήρηση της τοπογραφίας των στρωμάτων τροποποίησης με τη βοήθεια του AFM. Στην τελευταία φάση των ελέγχων δοκιμάστηκε η τροποποίηση και δειγμάτων νιτριδίου του πυριτίου, ώστε να επιβεβαιωθεί η συμβατότητα της επιλεχθείσας μεθόδου με τον ακριβή χημικό χαρακτήρα των ακίδων. Η αξιολόγηση των μεθόδων βασίστηκε στη σύγκριση της

ομοιογένειας και της τραχύτητας των σχηματιζόμενων μονομοριακών στρωμάτων στην επιφάνεια των δειγμάτων με τη βοήθεια εικόνων AFM, τη χημική ανάλυση της επιφάνειας τους με φασματοσκοπία XPS, τη μέτρηση της γωνίας διαβροχής και τη σήμανση των επιφανειακών αμινομάδων με ένα φθορίζοντα δείκτη.

Στις παραγράφους, οι οποίες ακολουθούν, περιγράφεται για κάθε μία από τις μεθόδους τροποποίησης, οι οποίες δοκιμάστηκαν, η ακολουθούμενη διαδικασία και παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ελέγχων βάσει των κριτηρίων, τα οποία προαναφέρθηκαν.

Αμινοπροπυλο-τριαιθοξυ-σιλάνιο (APTES)

Το APTES είναι ένα σιλάνιο, το οποίο έχει την ικανότητα να σχηματίζει ομοιοπολικούς δεσμούς με οξειδωμένες επιφάνειες πυριτίου (Σχήμα 4.3) εισάγοντας σε αυτές αμινομάδες. Η χρήση του APTES και εν γένει των τεχνικών σιλιανοποίησης πλεονεκτεί σε σχέση με άλλες τεχνικές επιφανειακής τροποποίησης, π.χ. αντίδραση θειομάδων, λόγω της χαμηλής πυκνότητας των δραστικών ομάδων, οι οποίες προστίθενται στην επιφάνεια (περίπου $6 \text{ NH}_2/\text{nm}^2$) (Hinterdorfer & Dufrene 2006, Karrasch et al. 1993). Αυτό είναι αρκετά σημαντικό για τα πειράματα μέτρησης δυνάμεων ανεξάρτητων μορίων, γιατί συνεπάγεται χαμηλότερη επιφανειακή συγκέντρωση δεσμευμένων μορίων ($\sim 1600 \text{ μόρια}/\mu\text{m}^2$) (Klein et al. 2003). Από την άλλη μεριά όμως, τα σιλάνια παρουσιάζουν το μειονέκτημα της εξαιρετικής ευαισθησίας στην υγρασία της ατμόσφαιρας, με συνέπεια η ποιότητα της τροποποίησης να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες συντήρησής τους^{iv} και την αυστηρή τήρηση των προδιαγραφών της διαδικασίας σιλιανοποίησης (Wagner 1998).

Σχήμα 4.3. Τροποποίηση οξειδωμένης επιφάνειας γυαλιού με αμινο-προπυλο-τριαίθοξυ-σιλάνιο [(3-aminopropyl)triethoxysilane, APTES].

^{iv} Συστήνεται συντήρηση υπό ατμόσφαιρα αδρανούς αερίου (Ar ή N₂) και σε χαμηλή θερμοκρασία.

Οι τεχνικές σιλιανοποίησης των επιφανειών με το APTES διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, αυτές οι οποίες γίνονται σε κενό και αυτές οι οποίες πραγματοποιούνται σε διάλυμα. Για την τροποποίηση υπό κενό, τα δείγματα τοποθετούνται στο εσωτερικό ενός ξηραντήρα μαζί με μία μικρή ποσότητα APTES, (π.χ. 30μl)^ν, και διατηρούνται εκεί για 30 λεπτά μέχρι 2 ώρες, αφού εξαχθεί ο αέρας από τον ξηραντήρα (Wang et al. 2002). Αν η τροποποίηση πραγματοποιηθεί σε υψηλή θερμοκρασία, π.χ. 100°C, η απόδοση της αντίδρασης του APTES με την επιφάνεια αυξάνει. Κάτι τέτοιο, όμως δεν είναι απαραίτητο, καθώς ο σημαντικότερος λόγος, για τον οποίο προτιμάται η σιλιανοποίηση υπό κενό, είναι η επίτευξη χαμηλής συγκέντρωσης σιλανίων στην επιφάνεια, όχι μόνο για την αποφυγή του πολυμερισμού τους και της αύξηση της τραχύτητας της επιφάνειας αλλά και για τη μείωση του πλήθους των τελικά δεσμευμένων βιομορίων (Riener et al. 2003). Για τον επιπλέον μάλιστα, περιορισμό της συγκέντρωσης των αμινομάδων στην τροποποιούμενη επιφάνεια η σιλιανοποίηση μπορεί να γίνει από μίγμα ατμών APTES και μεθυλοτριαιθοξυσιλάνιου (methyltriethoxysilane, MTES) σε αναλογία του πρώτου ως προς το δεύτερο 1:250 (Ratto et al. 2006).

Η σιλιανοποίηση σε διάλυμα προϋποθέτει τη χρήση ενός οργανικού διαλύτη, καθώς σε υδατικά διαλύματα το APTES πολυμερίζεται. Συνήθως χρησιμοποιείται τολουόλη (Riener et al. 2003, Sagvolden et al. 1998, Vansteenkiste et al. 2000) και πιο σπάνια ακετόνη (Karrasch et al. 1993) ή χλωροφόρμιο (Facci et al. 2002, Sit & Marchant 1999), στο οποίο το APTES διαλύεται σε τελική συγκέντρωση περίπου 5% κατ'όγκον. Ο χρόνος της αντίδρασης ορίζεται συνήθως στη μία ώρα, αλλά μετά το ξέπλυμα των δειγμάτων/ακίδων με καθαρό διαλύτη απαιτείται περαιτέρω θερμική κατεργασία τους (curing) σε υψηλή θερμοκρασία, 100°C (Karrasch et al. 1993, Ratto et al. 2004, Ratto et al. 2006), προκειμένου να αφαιρεθούν τα υπολείμματα διαλύτη από την επιφάνεια και οι αλυσίδες του APTES να ευθυγραμμιστούν σε όσο το δυνατό πιο κατακόρυφη διάταξη.

Για την τροποποίηση των ακίδων (NP-S, Veeco probes) και των δειγμάτων καλυπτρίδων γυαλιού (διάμετρου 13mm, πάχους 0.08-0.12 mm, Fisher Scientific, U.K.), στο πλαίσιο της αξιολόγησης των διαφόρων μεθόδων, δοκιμάστηκε τόσο η σιλιανοποίηση σε κενό όσο και σε διάλυμα. Για λόγους όμως καλύτερου ελέγχου της καθαρότητας των παραγόμενων επιφανειών προτιμήθηκε η τροποποίηση σε διάλυμα, η οποία περιελάμβανε τα ακόλουθα βήματα:

^ν Biological Sample Preparation, Veeco Support Note 331 Revision A

1. Οξείδωση των επιφανειών του γυαλιού (για 10 λεπτά) και των ακίδων (για 30 δευτερόλεπτα) με εμβάπτιση σε διάλυμα πιράνχα^{vi}. Ξέπλυμα τους με αποσταγμένο νερό και στέγνωμά τους για 1 ώρα στους 100°C.
2. Εμβάπτιση των επιφανειών και των ακίδων σε διάλυμα APTES ((3-Aminopropyl)triethoxysilane, Fluka, Buchs SG, Switzerland) 0.1% σε τολουόλη (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) για μία ώρα. Όλοι οι οργανικοί διαλύτες, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την ομάδα πειραμάτων καθαρίζονταν πριν τη χρήση τους με διήθηση μέσω μεμβρανών πολυτετραφθοροαιθυλενίου (polytetrafluoroethylene, PTFE), σπών 0.2μm (Fisher Scientific, U.K).
3. Ξέπλυμα με τολουόλη και ξήρανση για μία ώρα στους 100°C.
4. Ξέπλυμα με τολουόλη και στέγνωμα σε ροή αζώτου.

Το Σχήμα 4.4 παρουσιάζει εικόνες AFM από τροποποιημένα δείγματα καλυπτρίδων γυαλιού. Σε σχέση με την ακατέργαστη αλλά καθαρισμένη με πιράνχα επιφάνεια (Σχήμα 4.4α), η τροποποιημένη επιφάνεια του γυαλιού δεν εμφάνισε αυξημένη τραχύτητα παρά μόνο ελάχιστα περισσότερα σωματίδια-βρωμιές (Σχήμα 4.4β). Αυτό σημαίνει ότι το σιλάνιο δεν πολυμερίστηκε στην επιφάνεια και πιθανότατα οι αλυσίδες του ήταν ομοιόμορφα διατεταγμένες πάνω στην επιφάνεια. Επιπλέον, το γεγονός ότι οι χαρακτηριστικές για την επιφάνεια του γυαλιού σπές εξακολουθούσαν να διακρίνονται στην τροποποιημένη επιφάνεια συνηγορεί ότι το APTES είχε σχηματίσει το πολύ ένα μονομοριακό στρώμα πάνω σε αυτή.

Οι εικόνες AFM, οι οποίες ελήφθησαν μέσα σε PBS έδειξαν μια ελαφρά διαφοροποιούμενη τοπογραφία της επιφάνειας, η οποία εμφανίστηκε κοκκώδης (Σχήμα 4.4γ). Υποθέτουμε ότι οι παρουσιαζόμενοι κόκκοι δημιουργήθηκαν από τις υδρόφοβες ή ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των αμινομάδων στα άκρα των αλυσίδων του APTES (Karrasch et al. 1993). Σε ορισμένες μάλιστα περιπτώσεις παρατηρήθηκαν κυκλικοί σχηματισμοί στην επιφάνεια (Σχήμα 4.4δ), οι οποίοι ίσως οφείλονται στην προσπάθεια των μορίων του APTES να μειώσουν την διεπιφανειακή τους τάση.

Οι μετρήσεις της γωνίας διαβροχής των τροποποιημένων επιφανειών γυαλιού έγιναν με το γωνιόμετρο Cam 101 (KSV, Inc., Helsinki, Finland), αμέσως μετά τη ξήρανση τους στους 100°C. Από τις μετρήσεις σε οκτώ τέτοιες επιφάνειες προέκυψε μέση τιμή και τυπική απόκλιση για τη γωνία

^{vi} Η οξείδωση είναι απαραίτητη για τη δημιουργία δραστικών ριζών –OH στην πυριτική επιφάνεια. Μπορεί να γίνει μέσω κατεργασίας με πλάσμα O₂ ή εμβάπτισης σε διάλυμα πιράνχα, τριφθοροοξικού οξέος (CF₃COOH) ή υδροφθόριου (HF).

επαφής των σταγόνων νερού, $55^{\circ} \pm 12^{\circ}$. Από τη σύγκριση των τιμών αυτών με τις αντίστοιχες για το καθαρό γυαλί, οι οποίες βρέθηκαν ίσες με $29^{\circ} \pm 5^{\circ}$, προκύπτει το συμπέρασμα, ότι η τροποποίηση αύξησε την υδροφοβικότητα του γυαλιού. Η αύξηση αυτή μπορεί να αποδοθεί στην αντικατάσταση των υδροξυλίων, τα οποία εν γένει ενυδατώνονται εύκολα, στην επιφάνεια του γυαλιού από τις θετικά φορτισμένες αμινομάδες μετά τη σιλιανοποίηση. Εντούτοις, η συσχέτιση της αύξησης της γωνίας επαφής με την αποτελεσματικότητα της τροποποίησης έγινε με επιφύλαξη, γιατί κάποια από τα δείγματα καθαρού γυαλιού, τα οποία εμβαπτίστηκαν σε καθαρή τολουόλη για 1 ώρα ή παρέμειναν εκτεθειμένα στην ατμόσφαιρα για 1-3 ώρες, έδειξαν παρόμοια αύξηση της υδροφοβικότητας τους, αν και όχι τόσο μεγάλη όσο τα δείγματα τα οποία είχαν τροποποιηθεί με APTES. Το τελευταίο αυτό φαινόμενο πιθανώς οφείλεται στη “μόλυνση” της επιφάνειας από κατάλοιπα του οργανικού διαλύτη ή υδρογονάνθρακες της ατμόσφαιρας.

Σχήμα 4.4. Εικόνες AFM από επιφάνειες καλυπτρίδων γυαλιού καθαρισμένων με διάλυμα πιρανχα (α) και τροποποιημένων με APTES (β,γ,δ). Οι εικόνες (α) και (β) ελήφθησαν στον αέρα, ενώ οι (γ) και (δ) σε PBS με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας. Διαστάσεις εικόνων $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ [για τη (δ) $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$]. Μέγιστο ύψος 5nm.

Τα αποτελέσματα της επεξεργασίας με το APTES επιβεβαιώθηκαν και από τις μετρήσεις των δυνάμεων αλληλεπίδρασης τροποποιημένων ακίδων με καθαρές επιφάνειες γυαλιού μέσω του AFM. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.5 οι καμπύλες δύναμης-απόστασης, οι οποίες καταγράφηκαν με καθαρές ακίδες σε διάλυμα PBS pH 7.4, δεν έδειξαν καμία αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα του γυαλιού, σε αντίθεση με τις καμπύλες, οι οποίες καταγράφηκαν με τροποποιημένες ακίδες. Στις τελευταίες εμφανιζόταν μια μικρή έλξη μεταξύ της ακίδας και της επιφάνειας, καθώς η μία προσέγγιζε την άλλη, αλλά και μία ισχυρή προσκόλληση κατά την απομάκρυνσή τους. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές, οι οποίες αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκαν με την ίδια ένταση και μεταξύ καθαρών ακίδων και τροποποιημένων επιφανειών γυαλιού, δικαιολογούνται από την ηλεκτροστατική έλξη ανάμεσα στις θετικά φορτισμένες αμινομάδες της τροποποιημένης ακίδας (ή επιφάνειας) και την αρνητικά φορτισμένη καθαρή επιφάνεια (ή ακίδα)^{vii}.

Σχήμα 4.5. Καμπύλες AFM κάμψης προβόλου κατά την προσέγγιση και απομάκρυνση (α) καθαρής ακίδας και (β) ακίδας τροποποιημένης με APDES από επιφάνεια γυαλιού μέσα σε PBS.

^{vii} Το νίτριδιο του πυριτίου και το οξείδιο του πυριτίου έχουν ισοηλεκτρικά σημεία χαμηλότερα από 7.4 και συνεπώς, σε αυτό το pH οι επιφάνειές τους είναι αρνητικά φορτισμένες.

Άμεση επιβεβαίωση της τροποποίησης των δειγμάτων έγινε μέσω της σήμανσης των επιφανειακών αμινομάδων με τη φθορίζουσα ισοθειοκυανική φθορισεΐνη (fluorescein isothiocyanate isomer I, FITC, Sigma Aldrich)(Fixe et al. 2004). Η FITC απορροφά στα 494nm και εκπέμπει στα 512nm, ενώ παράλληλα έχει την ικανότητα να συνδέεται με ελεύθερες αμινομάδες σχηματίζοντας δεσμούς θειουρίας (Σχήμα 4.6). Για τις ανάγκες του ελέγχου της σιλιανοποίησης των επιφανειών του γυαλιού χρησιμοποιήθηκαν διαλύματά της σε PBS συγκέντρωσης 100μg/ml (Schroder et al. 2002). Τα δείγματα παρέμεναν στο διάλυμα για 1 ώρα προστατευμένα από το φως και στη συνέχεια ξεπλένονταν με καθαρό PBS τρεις φορές, με την τελευταία πλύση να κρατά 12 ώρες. Η εξέταση των δειγμάτων έγινε με το μικροσκόπιο φθορισμού Nikon Eclipse TE200 και αντικειμενικό φακό 20x. Τα τροποποιημένα δείγματα έδειξαν έντονο φθορισμό σε αντίθεση με τα καθαρά δείγματα γυαλιού, αποδεικνύοντας την παρουσία δραστικών αμινομάδων στην επιφάνεια, ως αποτέλεσμα της επεξεργασίας με το APTES (Σχήμα 4.7).

Σχήμα 4.6. Αντίδραση της φθορίζουσας ισοθειοκυανικής φθορισεΐνης με ελεύθερες αμινομάδες για τη σήμανση μορίων ή επιφανειών μέσω του σχηματισμού δεσμών θειουρίας.

Σχήμα 4.7. Εικόνες δειγμάτων γυαλιού από μικροσκόπιο φθορισμού (20x) ύστερα από σήμανσή τους με ισοθειοκυανική φθορισεΐνη (FITC). (α) Δείγμα ελέγχου γυαλιού, (β) δείγμα γυαλιού τροποποιημένου με APTES. Οι εικόνες ελήφθησαν με την κάμερα DXM 1200 της Nikon.

Ολοκληρώνοντας την αναφορά στη σιλιανοποίηση με τη χρήση του APTES, αξίζει να σημειώσουμε δυο ακόμα ελέγχους, οι οποίοι έγιναν. Ο πρώτος αφορούσε τον απαραίτητο χρόνο επώασης των δειγμάτων στο διάλυμα του APTES. Όταν ο χρόνος αυτός αυξήθηκε από 1 ώρα σε 12 ώρες, στην επιφάνεια των δειγμάτων εμφανίστηκαν συσσωματώματα πολυμερισμένων σιλανίων, γεγονός που απέδειξε ότι η αύξηση της διάρκειας επώασης θα μπορούσε να έχει δυσμενείς συνέπειες για την ομοιογένεια του στρώματος τροποποίησης. Ο δεύτερος έλεγχος αφορούσε το ενδεχόμενο, οι αλυσίδες του σιλανίου να προσροφόνται στο υπόστρωμα με φυσικές δυνάμεις, αντί να σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με τις $-SiOH$ ομάδες του. Πολύωρες αποπλύσεις τροποποιημένων δειγμάτων σε τολουόλη δεν έδειξαν ωστόσο, να επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας, όπως για παράδειγμα το φθορισμό ή τη γωνία διαβροχής των δειγμάτων, επιβεβαιώνοντας έτσι, την ομοιοπολική πρόσδεση των σιλανίων στο υπόστρωμα.

Αναφορικά με τη σταθερότητα της τροποποίησης σε υδατικό περιβάλλον πρέπει τέλος να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκε σημαντική πτώση της γωνίας διαβροχής (περίπου 50%) καθώς και μικρή μείωση της έντασης φθορισμού ύστερα από εμβάπτιση των τροποποιημένων δειγμάτων σε αποσταγμένο νερό. Αν οι παρατηρήσεις αυτές συσχετιστούν με τις εικόνες των δειγμάτων μέσα σε PBS, οι οποίες φανέρωσαν αναδιατάξεις των αλυσίδων των σιλανίων στην επιφάνεια, προκύπτει το συμπέρασμα, ότι η αλληλεπίδραση με τα μόρια του νερού διαταράσσει τη δομή του μονομοριακού στρώματος και περιορίζει τη δραστηριότητα των αμινομάδων. Αυτό πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη στα επόμενα βήματα της διαδικασίας πρόσδεσης των μορίων ινωδογόνου στις ακίδες και να αποφευχθεί, όπου είναι δυνατό, η χρήση υδατικών διαλυμάτων.

Αιθανολαμίνη

Η αιθανολαμίνη είναι μια άλλη χημική ουσία, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προσθήκη αμινομάδων σε μία οξειδωμένη πυριτική επιφάνεια (Σχήμα 4.8). Οι αναφορές στην ομοιογένεια των μονομοριακών στρωμάτων, τα οποία σχηματίζει πάνω στις επιφάνειες (Klein et al. 2003), αποτέλεσαν ισχυρό κίνητρο για τη δοκιμή της αποτελεσματικότητάς της στην τροποποίηση των ακίδων και την πρόσδεση των μορίων ινωδογόνου. Ένα ακόμα αναφερόμενο πλεονέκτημα της τροποποίησης με αιθανολαμίνη είναι η απουσία μη ειδικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των επεξεργασμένων ακίδων και των καθαρών επιφανειών (Hinterdorfer et al. 1998), οι οποίες θα μπορούσαν να επηρεάσουν τις μετρήσεις των ειδικών δυνάμεων μεταξύ των βιομορίων και του υποστρώματος. Είναι όμως, και αυτή μια ευαίσθητη στην εφαρμογή της τεχνική, καθώς η υδρόλυση

και ο πολυμερισμός της αιθανολαμίνης, η οποία χρησιμοποιείται στη μορφή συμπλόκου με υδροχλώριο, ανταγωνίζεται το σχηματισμό δεσμών της με τις -SiOH ομάδες του υποστρώματος.

Σχήμα 4.8. Τροποποίηση οξειδωμένης επιφάνειας γυαλιού με αιθανολαμίνη.

Η διαδικασία τροποποίησης των ακίδων και των δειγμάτων του γυαλιού με την αιθανολαμίνη βασίστηκε, με ορισμένες παραλλαγές, στη μεθοδολογία του Hinterdorfer και των συνεργατών του (Hinterdorfer et al. 1998, Hull et al. 2007). Τα βήματα της ακριβούς διαδικασίας, η οποία ακολουθήθηκε, είναι τα εξής:

1. Καθάρισμα και οξείδωση των ακίδων (για 30 δευτερόλεπτα) και των δειγμάτων γυαλιού (για 10 λεπτά) σε διάλυμα πιράνχα. Ξέπλυμα τους με αποσταγμένο νερό και στέγνωμα για 1 ώρα στους 100°C .
2. Επώαση των δειγμάτων και των ακίδων για 1 ώρα σε διάλυμα αιθανολαμίνης-υδροχλωρίου (ethanolamine hydrochloride 99+%, Sigma-Aldrich), συγκέντρωσης 500mg/ml, σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide, DMSO, Sigma-Aldrich) θερμοκρασίας 100°C .
3. Ξέπλυμα με DMSO και ύστερα με αιθανόλη.
4. Ξήρανση (curing) στους 100°C για 1 ώρα.

Η επιφανειακή πυκνότητα των αμινομάδων σε υπόστρωμα νιτριδίου του πυριτίου ύστερα από μια τέτοια διαδικασία έχει αναφερθεί 723 ομάδες/ μm^2 ενώ η τραχύτητα του μονομοριακού στρώματος μικρότερη από 0.5nm (Klein et al. 2003).

Η πολύ μικρή τραχύτητα του προστιθέμενου στρώματος επιβεβαιώθηκε και από τις εικόνες, τις οποίες λάβαμε με το AFM στον αέρα από τροποποιημένα δείγματα (Σχήμα 4.9α). Όπως και στην περίπτωση του APTES όμως, η επαφή των τροποποιημένων επιφανειών με υδατικά διαλύματα προκάλεσε την αναδιάταξη των αλυσίδων της αιθανολαμίνης, με συνέπεια η επιφάνεια να αποκτήσει τη γνωστή από το APTES κοκκώδη μορφή (Σχήμα 4.9β).

Σχήμα 4.9. Εικόνες AFM από επιφάνεια γυαλιού τροποποιημένου με αιθανολαμίνη. Η εικόνα (α) ελήφθη στον αέρα ενώ η (β) σε PBS, και οι δύο με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας. Διαστάσεις εικόνων 1μm x 1μm, μέγιστο ύψος 5nm.

Μία αρχική ένδειξη της τροποποίησης των επιφανειών με αμινομάδες θα μπορούσε να προέλθει από τη μέτρηση της γωνίας επαφής σταγόνων νερού, η οποία βρέθηκε κατά μέσο όρο $56^{\circ} \pm 9^{\circ}$ για ένα πλήθος 16 διαφορετικών δειγμάτων γυαλιού. Όπως συνέβη και με το APTES, η εμφάνιση των δειγμάτων σε νερό οδήγησε σε συγκριτική μείωση της γωνίας αυτής για κάθε δείγμα. Για να βεβαιωθούμε ότι η αύξηση της υδροφοβικότητας οφείλεται στην παρουσία των αμινομάδων στην επιφάνεια, εξετάσαμε το φθορισμό των επεξεργασμένων με αιθανολαμίνη δειγμάτων ύστερα από εμφάνισή τους σε διάλυμα FITC (100μg/ml σε PBS, 1 ώρα, 3 ξεπλύματα, 12 ώρες το τελευταίο). Η διαφορά της έντασης του φθορισμού των επεξεργασμένων δειγμάτων από τα δείγματα του καθαρού γυαλιού ήταν μηδαμινή, γεγονός το οποίο υποδηλώνει απουσία δραστικών αμινομάδων στις επιφάνειες τροποποίησης.

Για να διερευνηθούν οι δύο παραπάνω αντιφατικές ενδείξεις εξετάστηκε η επιφανειακή χημική σύσταση των δειγμάτων με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας XPS (για τα τεχνικά χαρακτηριστικά του χρησιμοποιηθέντος συστήματος και το σύνολο των αποτελεσμάτων της ανάλυσης βλ. Παράρτημα Β). Η στοιχειομετρική ανάλυση έδειξε αύξηση της περιεκτικότητας των επιφανειών σε άζωτο, από 1.6% σε 3.2%, και άνθρακα, από 10.6% σε 11.9%, μετά την επεξεργασία τους με την αιθανολαμίνη (Πίνακας 4.1). Αντίστοιχα, η περιεκτικότητα της επιφάνειας σε οξυγόνο μειώθηκε από 62.8% σε 58%. Οι μεταβολές αυτές είναι δυνατό να ερμηνευτούν από την αντικατάσταση των υδροξυλίων και εν γένει των οξειδίων στην επιφάνεια του γυαλιού από τις αλυσίδες ($\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$) της αιθανολαμίνης.

Πίνακας 4.1. Στοιχειομετρική ανάλυση επιφάνειας δειγμάτων γυαλιού πριν και μετά την τροποποίησή τους με αιθανολαμίνη.

	C(%)	N(%)	O(%)	Si(%)
καθαρό γυαλί	10.6	1.6	62.8	25.0
γυαλί-αιθανολαμίνη	11.9	3.2	58.0	26.9

Περισσότερες πληροφορίες για τη δομή του στρώματος τροποποίησης προέκυψαν από την ανάλυση του φάσματος ενέργειας δέσμευσης των μορίων αζώτου στην επεξεργασμένη επιφάνεια. Σύμφωνα με το Σχήμα 4.10 το εν λόγω φάσμα μπορεί να αποσυνελιχθεί σε δύο κύριες συνεισφορές, αυτή των πρωτοταγών αμινών, οι οποίες εμφανίζουν μια κορυφή στα 401.4 eV, και μία άλλη στα 399.8eV, η οποία αποδίδεται σε πολυμερή της μορφής $(-C_6H_4-NH-)_n$. Η παρουσία αυτής της δεύτερης κορυφής, η οποία είναι μάλιστα υψηλότερη από την κορυφή των αμινομάδων, φανερώνει τον πολυμερισμό της αιθανολαμίνης στην επιφάνεια και δικαιολογεί την απουσία ελεύθερων αμινομάδων σε αυτή. Τεκμηρίωση του πολυμερισμού της αιθανολαμίνης μπορεί να βρει κανείς και στη βιβλιογραφία, όπου ο σχηματισμός διμερών της δικαιολογείται μέσω της δημιουργίας δεσμών υδρογόνου (Vorobyov et al. 2002).

Σχήμα 4.10. Ανάλυση κορυφής αζώτου από το φάσμα, το οποίο ελήφθη με XPS, από δείγμα γυαλιού τροποποιημένου με αιθανολαμίνη.

Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα η χρήση της αιθανολαμίνης κρίνεται επισφαλής για την εισαγωγή δραστικών αμινομάδων στην επιφάνεια των ακίδων. Έτσι, μια τρίτη τεχνική, η οποία χρησιμοποιεί το αμινοπροπυλο-διμεθυλ-αιθοξυσιλάνιο, εξετάστηκε ως προς την αποτελεσματικότητά της για τον ίδιο σκοπό.

Αμινοπροπυλο-διμεθυλ-αιθοξυσιλάνιο (APDES)

Αν και η τροποποίηση των δειγμάτων γυαλιού και των ακίδων με το APTES φάνηκε να ικανοποιεί τα επιθυμητά κριτήρια σχετικά με την ομοιογένεια του σχηματιζόμενου μονομοριακού

στρώματος και την εισαγωγή δραστικών αμινομάδων στις επιφάνειες, η αστάθεια των στρωμάτων σε υδατικό περιβάλλον αποτέλεσε αιτία για τη διερεύνηση των ενδεχομένως καλύτερων αποτελεσμάτων με τη χρήση του αμινοπροπυλο-διμεθυλ-αιθοξυσιλανίου (APDES)(Vinckier et al. 1995). Το APDES είναι ένα σιλάνιο, το οποίο μοιάζει αρκετά με το APTES με τη διαφορά ότι διαθέτει μόνο ένα αλκοξείδιο αντί για τρία, που διαθέτει το APTES (Σχήμα 4.11). Αυτό το χαρακτηριστικό, παρόλο που περιορίζει την απόδοση της αντίδρασής του με τα οξείδια του πυριτίου, το καθιστά λιγότερο επιρρεπές σε αντιδράσεις υδρόλυσης και πολυμερισμού (Arkles et al. 1992). Έτσι, η χρήση του προτιμάται, αν η αποφυγή της συσσωμάτωσης των σιλανίων στην επιφάνεια είναι το ζητούμενο.

Σχήμα 4.11. Χημική δομή αμινοπροπυλο-διμεθυλ-αιθοξυ-σιλανίου (APDES).

Η διαδικασία τροποποίησης, η οποία ακολουθήθηκε ήταν ακριβώς ίδια με αυτή για το APTES με εξαίρεση ότι η τολουόλη, η οποία χρησιμοποιήθηκε, ήταν άνυδρη και αγοράστηκε από τη Sigma Aldrich σε φιάλη με ειδικό στόμιο ασφαλείας, ενώ το APDES (3-(ethoxydimethylsilyl)propylamine 97%, Sigma-Aldrich) είχε διαιρεθεί υπό ατμόσφαιρα αζώτου σε μερίδες, οι οποίες φυλάσσονταν σε ξεχωριστά αεροστεγή φιαλίδια, για να αποφευχθεί η επαφή του με την υγρασία της ατμόσφαιρας.

Οι εικόνες AFM, οι οποίες ελήφθησαν από τις τροποποιημένες επιφάνειες γυαλιού στον αέρα, έδειξαν παρόμοια ομοιογένεια με τα μονομοριακά στρώματα του APTES (Σχήμα 4.12α). Οι εικόνες σε PBS (Σχήμα 4.12β) από την άλλη μεριά, έδειξαν ότι η χρήση του APDES στη θέση του APTES δεν είναι ικανή να εξαλείψει τα φαινόμενα αναδιάταξης των αλυσίδων των σιλανίων μέσα στο υδατικό διάλυμα. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι οι κόκκοι, οι οποίοι εμφανίζονται στις επεξεργασμένες επιφάνειες, όταν διαβρέχουν από το PBS, οφείλονται μάλλον στις αλληλεπιδράσεις των φορτισμένων αμινομάδων παρά στην υδρόλυση των αδέσμευτων αλκοξειδίων των σιλανίων.

Σχήμα 4.12. Εικόνες AFM από επιφάνεια γυαλιού τροποποιημένου με αμινο-προπυλο-διμεθυλ-αιθοξυ-σιλάνιο (APDES). Η εικόνα (α) ελήφθη στον αέρα ενώ η (β) σε PBS, και οι δύο με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας. Διαστάσεις εικόνων $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$, μέγιστο ύψος 5nm.

Σχήμα 4.13. Εικόνες AFM από (α) καθαρή επιφάνεια πυριτίου και (β) επιφάνεια πυριτίου τροποποιημένη με APDES. Οι εικόνες ελήφθησαν στον αέρα με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας. Διαστάσεις εικόνων $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$, μέγιστο ύψος 5nm.

Η σιλανοποίηση με χρήση του APDES δοκιμάστηκε και σε επιφάνειες καθαρού πυριτίου, προκειμένου να προσεγγιστούν καλύτερα οι χημικές ιδιότητες των ακίδων του AFM. Εντούτοις, αποδείχτηκε ότι η τροποποίηση δεν λειτουργεί εξίσου αποτελεσματικά στα εν λόγω υποστρώματα, όπως φάνηκε από τις νησίδες, τις οποίες σχημάτισε το σιλάνιο πάνω στο πυρίτιο (Σχήμα 4.13). Η παρατήρηση αυτή μας ώθησε να ελέγξουμε την τοπογραφία των σχηματιζόμενων από το APDES μονοστρωμάτων και σε επιφάνειες νιτριδίου του πυριτίου. Δείγματα Si_3N_4 τύπου N-As, με προσανατολισμό κρυστάλλων $(100) \pm 0.5^\circ$, πάχους $525 \pm 25\text{nm}$ και ειδικής αντίστασης $0.002\text{--}0.010\Omega\text{cm}$ αγοράστηκαν από τη Siltronix, Archamps, France. Σημειώνεται ότι τα δείγματα καθαρίζονταν στο διάλυμα πιράνχα μόλις για 5 λεπτά, για να μην καταστραφεί το επιφανειακό

στρώμα του νιτριδίου. Η τοπογραφία της επιφάνειάς τους πριν και μετά την τροποποίηση με το APDES φαίνεται στο Σχήμα 4.14. Παρόλο που η επιφάνεια του Si_3N_4 δεν είναι λεία σαν αυτή των καλυπτρίδων γυαλιού ή του καθαρού πυριτίου, αλλά εμφανίζει διάσπαρτα σφαιρίδια διαμέτρου περίπου 100nm, η σύγκριση των δύο εικόνων μπορεί να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι το APDES αντέδρασε ομοιόμορφα με το υπόστρωμα.

Σχήμα 4.14. Εικόνες AFM από επιφάνεια νιτριδίου του πυριτίου (Si_3N_4) (α) πριν και (β) μετά την τροποποίηση με APDES, ληφθείσες με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας στον αέρα. Διαστάσεις εικόνων 5μm x 5μm, μέγιστο ύψος 30nm.

Η αποτελεσματικότητα της τροποποίησης με APDES τόσο των επιφανειών του γυαλιού όσο και των επιφανειών του νιτριδίου του πυριτίου επιβεβαιώθηκε από τις μετρήσεις της γωνίας διαβροχής και τη σήμανση με FITC. Η μέση γωνία επαφής για δύο τροποποιημένα δείγματα γυαλιού μετρήθηκε $62^\circ \pm 8^\circ$ και μάλιστα μειώθηκε μόνο κατά 16% ύστερα από εμβάπτιση τους σε νερό για μία ώρα. Αντίστοιχα στα δείγματα Si_3N_4 η γωνία επαφής αυξήθηκε από $22^\circ \pm 16^\circ$ σε $76^\circ \pm 12^\circ$ (μέσες τιμές τριών δειγμάτων). Επιπλέον, και τα δύο επεξεργασμένα υποστρώματα φάνηκαν να φθορίζουν έντονα μετά την αντίδρασή τους με τη FITC (Σχήμα 4.15), γεγονός το οποίο απέδειξε την ύπαρξη και κυρίως τη δραστικότητα των ελεύθερων αμινομάδων στην επιφάνειά τους.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η επιφανειακή πυκνότητα των ελεύθερων αμινομάδων θα μπορούσε να ποσοτικοποιηθεί μέσω της σήμανσης με τη FITC, αν το φάσμα απορρόφησης των δειγμάτων στα 490-530nm μπορούσε να καταγραφεί με τη βοήθεια ενός φασματοφωτόμετρου (Gessner et al. 2004). Η συγκέντρωση των σημασμένων ομάδων στην επιφάνεια, d, θα υπολογιζόταν τότε, από την εξίσωση των Beer και Lambert:

$$d = \frac{0.5 \cdot 6.02 \cdot 10^6 A}{\epsilon} \quad (4.1)$$

όπου A είναι η απορρόφηση του δείγματος και ϵ ο συντελεστής εξάλειψης (extinction coefficient), ο οποίος για τη FITC ισούται με $74500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Griesser & Chatelier 1990).

Σχήμα 4.15. Εικόνες δειγμάτων γυαλιού και νιτριδίου του πυριτίου ληφθείσες με μικροσκοπία φθορισμού ύστερα από σήμανσή τους με FITC. (α) Δείγμα ελέγχου γυαλιού, (β) δείγμα γυαλιού τροποποιημένου με APDES, γ) δείγμα ελέγχου νιτριδίου του πυριτίου, (β) δείγμα νιτριδίου του πυριτίου τροποποιημένου με APDES.

Εναλλακτικά της FITC, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί κάποια τεχνική σήμανσης με ένζυμο, όπως για παράδειγμα η σύνδεση της ραφανδικής υπεροξειδάσης (horseradish peroxidase) μέσω στρεπταβιδίνης σε βιοτίνη, η οποία έχει προηγουμένως τροποποιηθεί με υδροξυ-ηλεκτριμίδια για να προσδένεται στις αμινομάδες (Hinterdorfer et al. 1998). Η τεχνική της νινυδρίνης, από την άλλη μεριά, η οποία χρησιμοποιείται στις ιστολογικές αναλύσεις για τη βαφή των αμινομάδων και με την οποία έχει υπολογιστεί ο βαθμός τροποποίησης με αμινομάδες σωματιδίων πυριτίου (Lee et al. 2006, Taylor & Howard 1993), δεν έδωσε μετρήσιμη απορρόφηση φωτός, όταν δοκιμάστηκε στα τροποποιημένα δείγματα των καλυπτρίδων γυαλιού. Πιθανότατα αυτό οφείλεται στη μικρή συγκέντρωση των αμινομάδων στην τροποποιημένη επιφάνεια, η οποία ήταν χαμηλότερη της ευαισθησίας της τεχνικής.

Οι καμπύλες δύναμης-απόστασης, οι οποίες καταγράφηκαν με APDES ακίδες έδειξαν την αναμενόμενη ηλεκτροστατική έλξη κατά την προσέγγιση καθώς και προσκόλληση κατά την απομάκρυνση των ακίδων από καθαρές επιφάνειες γυαλιού.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των πραγματοποιηθέντων ελέγχων καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η σιλιανοποίηση των επιφανειών του γυαλιού και κυρίως του νιτριδίου του πυριτίου με το APDES είναι εξίσου αποτελεσματική με τη σιλιανοποίηση με το APTES. Για τους λόγους όμως, οι οποίοι αναφέρθηκαν στην αρχή αυτής της ενότητας, η τροποποίηση των ακίδων για τη πρόσδεση των μορίων ινωδογόνου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του APDES. Δόθηκε βέβαια, ιδιαίτερη προσοχή, οι τροποποιημένες ακίδες να παραμένουν όσο το δυνατό λιγότερο εκτεθειμένες στην ατμοσφαιρική υγρασία και για αυτό η διαδικασία πρόσδεσης του ινωδογόνου στις ακίδες ξεκινούσε αμέσως μετά την ολοκλήρωση της σιλιανοποίησης κάθε ακίδας.

4.2.3 Έλεγχος συνδετών για την πρόσδεση του ινωδογόνου στις τροποποιημένες ακίδες

Το δεύτερο βήμα στην επεξεργασία των ακίδων αφορούσε την προσθήκη ενός συνδέτη, μέσω του οποίου τα ανεξάρτητα μόρια του ινωδογόνου θα προσδένονταν στην επιφάνεια της ακίδας. Για το σκοπό αυτό, όπως αναφέρθηκε ήδη, συνήθως χρησιμοποιούνται αλυσίδες πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG) και σπανιότερα χημικές ενώσεις απειροελάχιστου μήκους. Στην προκειμένη μελέτη εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα τριών διαφορετικών συνδετών, του δι-θειο-υδροξυ-ηλεκτριμιδικού εστέρα (BS^3), ενός PEG με υδροξυ-ηλεκτριμίδιο (NHS) στο ένα άκρο και προστατευμένη αμινομάδα στο άλλο (NHS-PEG-NH-fmoc) και τέλος ενός PEG με NHS ομάδες και στα δύο του άκρα (διπλο-NHS-PEG).

Ο έλεγχος της πρόσδεσης αυτών των συνδετών στην επιφάνεια της ακίδας και της δυνατότητά τους να δεσμεύουν ανεξάρτητα μόρια ινωδογόνου στηρίχθηκε κυρίως στην καταγραφή μέσω του AFM της αλληλεπίδρασης τροποποιημένων ακίδων με επιφάνειες καθαρού γυαλιού. Αυτό το οποίο επιδιωκόταν ήταν οι καμπύλες απομάκρυνσης να εμφανίζουν λίγο πριν την αποκόλλησή της ακίδας από την επιφάνεια παραβολές, ενδεικτικές της κάμψης του προβόλου της ακίδας καθώς η αλυσίδα του συνδέτη τεντώνεται. Προτού όμως προστεθούν τα μόρια της πρωτεΐνης, η επιτυχής τροποποίηση των ακίδων ελέγχθηκε έμμεσα με σήμανση των δραστικών ελεύθερων άκρων των συνδετών σε ομοίως τροποποιημένες επιφάνειες δειγμάτων γυαλιού ή νιτριδίου του πυριτίου με τη φθορίζουσα ουσία φθουορεσαμίνη καθώς και μέσω της μέτρησης της γωνίας διαβροχής των ίδιων

επιφανειών. Η περιγραφή καθενός από τους συνδέτες, οι οποίοι δοκιμάστηκαν, και τα συμπεράσματα από τον έλεγχο της αποτελεσματικότητάς τους παρουσιάζονται στις επόμενες παραγράφους.

Δι-υδροξυ-θειο-ηλεκτριμιδικός εστέρας (BS³)

Ο δι-υδροξυ-θειο-ηλεκτριμιδικός εστέρας είναι ένας χημικός συνδέτης, ο οποίος διατίθεται από την εταιρεία Pierce, Rockford, IL, U.S., υπό την εμπορική ονομασία BS³. Η χημική δομή του παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.16, από την οποία φαίνεται ότι η δραστικότητά του οφείλεται στους δύο υδροξυ-ηλεκτριμιδικούς εστέρες (NHS), που καταλαμβάνουν τα άκρα του. Χάρη στους δύο αυτούς εστέρες, οι οποίοι αντιδρούν άμεσα με αμινομάδες, το BS³ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνδεση πρωτεϊνικών μορίων μέσω των λυσίνων τους ή των αμινοτελικών άκρων τους σε τροποποιημένες επιφάνειες, οι οποίες φέρουν επίσης αμινομάδες. Για την καλύτερη μάλιστα, διαλυτότητα του συνδέτη σε υδατικούς διαλύτες, στους NHS εστέρες έχουν προστεθεί φορτισμένες θειομάδες (NaSO₃⁺). Η παραμονή ωστόσο, του BS³ σε υδατικό περιβάλλον πρέπει να είναι όσο τη δυνατό περιορισμένη, λόγω του κινδύνου υδρόλυσης των NHS εστέρων και συνεπώς, απώλειας της δραστικότητάς του. Για τον ίδιο λόγο προτιμούνται χαμηλές τιμές pH στα χρησιμοποιούμενα διαλύματα (συνιστώμενο εύρος pH 7-9)^{viii}.

Σχήμα 4.16. Χημική δομή του δι-θειο-υδροξυ-ηλεκτριμιδικού εστέρα (BS³).

Καθώς το μήκος του BS³ είναι μόλις 11.4 Å, η συμβολή του στην αναγνώριση συμβάντων αποκόλλησης ανεξάρτητων μορίων από την επιφάνεια στις καμπύλες AFM θα ήταν μικρή σύμφωνα με όσα έχουν προαναφερθεί. Παρόλα αυτά η χρησιμότητά του στην πρόσδεση του ινωδογόνου και τη μέτρηση της δύναμης αποκόλλησης μεμονωμένων μορίων του τελευταίου από επιφάνειες διερευνήθηκε, γιατί θεωρήθηκε ότι η τάνυση της αλυσίδας μιας μεγάλης πρωτεΐνης, όπως είναι το ινωδογόνο, μπορεί από μόνη της να προσδώσει στην καταγραφόμενη καμπύλη εκείνα τα χαρακτηριστικά, τα οποία βοηθούν στην αναγνώριση της αποκόλλησης μεμονωμένων μορίων.

^{viii} 2005/2006 Applications Handbook and Catalog, Pierce Biotechnology, Inc.

Σύμφωνα με αυτό το σκεπτικό ο ρόλος του συνδέτη περιορίζεται απλά στην ομοιοπολική πρόσδεση των μορίων στην ακίδα και παραβλέπεται η σημασία της εκτατότητάς του.

Η σύνδεση του BS^3 στις ακίδες Si_3N_4 και τα δείγματα από καλυπτρίδες γυαλιού, τα οποία είχαν μόλις τροποποιηθεί με APDES, έγινε μέσω εμβάπτισής τους σε διάλυμα του διπλοδραστικού συνδέτη, συγκέντρωσης 3mg/ml σε 15mM PBS pH 7.4 για 30 λεπτά. Μετά την αντίδραση, τα δείγματα και οι ακίδες ξεπλένονταν με καθαρό PBS και για την πρόσδεση των μορίων ινωδογόνου εμβάπτιζονταν σε διάλυμα της πρωτεΐνης συγκέντρωσης 2.5-20μg/ml στο ίδιο ρυθμιστικό για 1 ώρα. Έπειτα ξεπλένονταν και πάλι με PBS και μεταφέρονταν στο AFM για το έλεγχο των καμπύλων αποκόλλησης από καθαρισμένες με πιράνχα επιφάνειες καλυπτρίδων γυαλιού.

Η συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου διαλύματος BS^3 προσδιορίστηκε στη συγκεκριμένη τιμή, προκειμένου να υπάρχει περίσσεια μορίων συνδέτη ως προς τον αριθμό των αμινομάδων της επιφανείας και να αποφευχθεί η σύνδεση και των δύο άκρων του στην επιφάνεια. Θεωρώντας την επιφανειακή συγκέντρωση των αμινομάδων ίση με $6NH_2/nm^2$ (Karrasch et al. 1993), ο συνολικός αριθμός τους σε μία επιφάνεια διαμέτρου 10mm υπολογίζεται περίπου $4 \cdot 10^{10}$. Αν ακόμα, η επιφάνεια αυτή καλύπτεται με 1ml διαλύματος, τότε η αναγκαία συγκέντρωση του BS^3 για 1:1 αντίδραση είναι $7.8 \cdot 10^{-7}M$. Με στόχο όμως, την περίσσεια των διπλοδραστικών μορίων η συγκέντρωση του διαλύματος BS^3 ορίστηκε σχεδόν 6000 φορές μεγαλύτερη, δηλαδή στα 5mM ή 3mg/ml. Η συγκέντρωση αυτή είναι εξάλλου, μικρότερη της τιμής 10mM, η οποία ορίζει το όριο διαλυτότητα του BS^3 στο νερό.

Μετά την αντίδραση του BS^3 με το μονόστρωμα των αμινομάδων στην επιφάνεια του γυαλιού, η γωνία επαφής διατηρήθηκε στην ίδια τιμή, η οποία είχε μετρηθεί για κάθε δείγμα μετά την τροποποίηση με το APDES. Αυτό είναι δυνατό να οφείλεται στην ομοιότητα των πολικών χαρακτηριστικών των επιφανειών μετά από τις δύο τροποποιήσεις, καθώς και στις δύο περιπτώσεις εκτίθενται στην επιφάνεια θετικά φορτισμένες ομάδες, αμινομάδες στην πρώτη και θειομάδες στην δεύτερη. Εντούτοις, οι μετρήσεις φάνηκαν να ακολουθούν πιστά τις διακυμάνσεις των γωνιών διαβροχής, οι οποίες είχαν μετρηθεί πριν την επεξεργασία με το BS^3 , γεγονός το οποίο μπορεί να υπονοεί ότι ο συνδέτης δεν προστέθηκε τελικά στην επιφάνεια.

Περισσότερα στοιχεία για την πρόσδεση ή όχι του BS^3 προέκυψαν από τις καμπύλες αποκόλλησης τροποποιημένων ακίδων, οι οποίες ελήφθησαν με το AFM σε PBS. Οι καμπύλες, οι οποίες καταγράφηκαν με ακίδες, τροποποιημένες μόνο με BS^3 , δεν έδειξαν κάποιου είδους προσκόλληση στην επιφάνεια του γυαλιού (Σχήμα 4.17α), όπως εξάλλου είχε παρατηρηθεί και με τις καθαρές, μη τροποποιημένες ακίδες (Σχήμα 4.5α). Αντίθετα οι καμπύλες των ακίδων, στις οποίες

είχε προστεθεί και το ινωδογόνο (Σχήμα 4.17β) έδειξαν έντονη προσκόλληση στην επιφάνεια. Τα γεγονότα αποκόλλησης ωστόσο, τα οποία καταγράφηκαν στην τελευταία περίπτωση, δύσκολα χαρακτηρίζουν την αλληλεπίδραση ανεξάρτητων μορίων πρωτεΐνης με την επιφάνεια, γιατί αποτελούνται από πολλαπλές ρίξεις, οι οποίες δεν ακολουθούν καμπύλες εμφανούς τάνυσης ανεξάρτητων πρωτεϊνικών αλυσίδων.

Σχήμα 4.17. Καμπύλες AFM κάμψης προβόλου κατά την προσέγγιση και απομάκρυνση ακίδων τροποποιημένων με APDES και BS³ (α) πριν και (β) μετά την πρόσδεση μορίων ινωδογόνου σε αυτές, από επιφάνειες γυαλιού μέσα σε PBS. Οι πράσινες γραμμές αντιστοιχούν στην προσέγγιση των ακίδων και οι μαύρες στην απομάκρυνση.

Συνδυάζοντας τις παραπάνω παρατηρήσεις συμπεράναμε, ότι το BS³ δεν καταφέρνει να συνδεθεί στην επιφάνεια των τροποποιημένων με APDES ακίδων και δειγμάτων, πιθανώς γιατί οι NHS εστέρες του υδρολύονται στο PBS πριν προλάβουν να αντιδράσουν με τις αμινομάδες των επιφανειών. Έτσι, το προστιθέμενο ινωδογόνο προσροφάται μαζικά και με φυσικές δυνάμεις, απευθείας πάνω στο στρώμα των αμινομάδων και σε αυτό οφείλονται οι πολλαπλές αποκολλήσεις, οι οποίες καταγράφηκαν στις καμπύλες δύναμης-απόστασης.

PEG με υδροξυ-ηλεκτριμίδιο (NHS) και προστατευμένη αμινομάδα (NHS-PEG-NH-Fmoc)

Ο δεύτερος συνδέτης, ο οποίος δοκιμάστηκε για την πρόσδεση του ινωδογόνου στις ακίδες, είναι ένα PEG, μια αλυσίδα δηλαδή πολυαιθυλενικής γλυκόλης, το ένα άκρο της οποίας καταλήγει σε NHS εστέρα ενώ το άλλο σε μια 9-φθορο-μεθοξυ-καρβονυλική ομάδα (fmoc), η οποία προστατεύει μια αμινομάδα (Σχήμα 4.18). Ο NHS εστέρας μπορεί να αντιδράσει κατά τα γνωστά με τις αμινομάδες των τροποποιημένων επιφανειών, ενώ η αμινομάδα, μετά την αποκάλυψή της, με τις καρβοξυλομάδες των πρωτεϊνικών μορίων. Το συγκεκριμένο PEG, το οποίο αγοράστηκε από την εταιρεία Nektar (San Carlos, California), είχε μοριακό βάρος 3400. Θεωρήθηκε συνεπώς, ότι αποτελείτο από 68 μονομερή και το μήκος του υπολογίστηκε ίσο με περίπου 30 nm. Χάρη στο χαρακτηριστικό του μήκος, αναμενόταν, ότι η τάνυση της αλυσίδας του καθώς η ακίδα θα απομακρυνόταν από την επιφάνεια ενώ η πρωτεΐνη θα παρέμενε προσκολλημένη σε αυτή, θα προσέφερε μια ισχυρή ένδειξη της αλληλεπίδρασης ανεξάρτητων μορίων με την επιφάνεια.

Σχήμα 4.18. Χημική δομή μορίου πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG), στο αριστερό άκρο της οποίας έχει προστεθεί η ομάδα 9-φθορο-μεθοξυ-καρβονύλιο (fmoc) και στο δεξί ένας υδροξυ-ηλεκτριμιδικός εστέρας (NHS).

Για τη σύνδεση των μορίων ινωδογόνου μέσω του NHS-PEG-fmoc στην επιφάνεια των επεξεργασμένων με APDES ακίδων ακολουθήθηκε η παρακάτω μεθοδολογία:

1. Οι ακίδες αμέσως μετά την τροποποίηση τους με το APDES εμβαπτίζονταν σε διάλυμα NHS-PEG-NH-fmoc συγκέντρωσης 1mg/ml σε 15mM PBS pH 7.4, προκειμένου ο NHS εστέρας να αντιδράσει με τις αμινομάδες στην επιφάνειά τους.
2. Μετά από 2 ώρες οι ακίδες ξεπλένονταν με καθαρό PBS.
3. Εμβαπτίζονταν για 30 λεπτά σε διάλυμα πιπεριδίνης 20% κατ'όγκον σε διμεθυλοφορμαμίδιο (dimethylformamide, DMF, Sigma-Aldrich) για να απομακρυνθεί η ομάδα fmoc και να αποκαλυφθούν οι αμινομάδες των προσδεδεδεμένων στην ακίδα μορίων PEG. Το διάλυμα ανακινούταν περιοδικά.

4. Οι ακίδες ξεπλένονταν με καθαρό διμεθυλοφορμαμίδιο και στη συνέχεια με PBS.
5. Εμβαπτίζονταν σε διάλυμα ινωδογόνου 10μg/ml σε PBS, το οποίο περιείχε 1mg/ml *N*-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)-*N'*-αιθυλοκαρβοδιιμίδιο, υδροχλωρίο (*N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC, Sigma-Aldrich) και 3mg/ml υδροξυθειο-ηλεκτριμιδικό νάτριο (*N*-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt, puriss., ≥98.5% Fluka)^{ix}. Μετά από 1 ώρα ξεπλένονταν με καθαρό PBS.

Για τον έλεγχο της σύνδεσης του PEG στην επιφάνεια των ακίδων καταγράφηκαν με το AFM καμπύλες αποκόλλησής τους από επιφάνειες γυαλιού σε τρία στάδια της διαδικασίας τροποποίησης: μετά την προσθήκη του NHS-PEG-NH-fmoc, μετά την αποκάλυψη της αμινομάδας και μετά την προσθήκη του ινωδογόνου. Οι καμπύλες ελέγχου στα τρία στάδια λαμβάνονταν συνήθως με την ίδια ακριβώς ακίδα, έτσι ώστε να αποκλειστούν ενδεχόμενες επιδράσεις της διαφορετικότητας των ακίδων στις συγκρίσεις και την εξαγωγή των συμπερασμάτων.

Οι καμπύλες, οι οποίες καταγράφηκαν με τις ακίδες που έφεραν το PEG, πριν και μετά την αποκάλυψη της αμινομάδας, δεν έδειξαν καμία προσκόλληση στην επιφάνεια γυαλιού (Σχήμα 4.19α). Αυτό είναι παράδοξο, γιατί παρόλη την ευκινησία του PEG και τη μικρή αντοχή του φυσικού δεσμού, ο οποίος θα μπορούσε να δημιουργηθεί μεταξύ της μοναδικής αμινομάδας ή ομάδας fmoc στην άκρη του PEG και της επιφάνειας, αναμενόταν κάποια ένδειξη προσκόλλησης του PEG. Από την άλλη μεριά, μετά την προσθήκη του ινωδογόνου οι ακίδες φάνηκαν να προσκολλούνται στην επιφάνεια. Όμως, όπως και στην περίπτωση του BS³, τα γεγονότα αποκόλλησης ήταν πολλαπλά και δυσδιάκριτα μεταξύ τους (Σχήμα 4.19β).

Καταλήξαμε επομένως στο συμπέρασμα, ότι ούτε το NHS-PEG-NH-fmoc είναι αποτελεσματικό για την πρόσδεση του ινωδογόνου στις ακίδες του AFM και την παρατήρηση της αλληλεπίδρασης ανεξάρτητων μορίων της πρωτεΐνης με το υπόστρωμα. Αυτό ίσως οφείλεται στην υδρόλυση του NHS εστέρα από την υγρασία της ατμόσφαιρας ή τα υδατικά μόρια του χρησιμοποιούμενου PBS, αλλά είναι πιθανότερο να αντικατοπτρίζει την αδυναμία εύρεσης ελεύθερης καρβοξυλομάδας στην επιφάνεια του ινωδογόνου για το σχηματισμό δεσμού με την αμινομάδα του PEG. Ένας ακόμα λόγος, για τον οποίο η τεχνική της πρόσδεσης του ινωδογόνου μέσω του NHS-PEG-NH-fmoc απορρίφθηκε, είναι ότι η παρουσία του EDC και του NHS στο διάλυμα

^{ix} Η παρουσία των αντιδραστηρίων EDC και NHS στο διάλυμα ήταν απαραίτητη για την ενεργοποίηση των καρβοξυλομάδων της πρωτεΐνης και το σχηματισμό δεσμών με τις αμινομάδες των αλυσίδων PEG (βλ. Κεφ. 3.4.1).

του ινωδογόνου στο τελευταίο βήμα της διαδικασίας κρίβει το κίνδυνο του πολυμερισμού των πρωτεϊνικών μορίων, μέσω αντίδρασης των καρβοξυλομάδων με τις αμινομάδες τους. Δεν μπορεί συνεπώς, να αποκλειστεί το ενδεχόμενο, το ινωδογόνο να προσδέεται στην ακίδα με τη μορφή πολυμερών του.

Σχήμα 4.19. Ενδεικτικές καμπύλες AFM δύναμης–μετακίνησης ακίδων, στις οποίες είχε προσδεθεί ο συνδέτης fmoc-NH-PEG-NHS (α) και στη συνέχεια μόρια ινωδογόνου (β). Οι κόκκινες γραμμές αντιστοιχούν στην προσέγγιση και οι μπλε στην απομάκρυνση των ακίδων από επιφάνεια γυαλιού μέσα σε PBS.

PEG με διπλό υδροξυσουκινιμιδικό εστέρα (διπλό-NHS-PEG)

Οι προαναφερθείσες δοκιμές συγκλίνουν στο συμπέρασμα, ότι τις μεγαλύτερες πιθανότητες επιτυχίας για την πρόσδεση του ινωδογόνου στην ακίδα και την παρατήρηση της αποκόλλησης μεμονωμένων μορίων από το υπόστρωμα, θα είχε ένας συνδέτης με πεπερασμένο μήκος, ο οποίος θα στόχευε στις αμινομάδες τις πρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε να δοκιμαστεί η αποτελεσματικότητα ενός PEG, το οποίο φέρει από ένα υδροξυ-ηλεκτρμιδικό εστέρα σε κάθε άκρο του (διπλό-NHS-PEG, *O,O'*-Bis[2-(N-Succinimidyl-succinylamino)ethyl]polyethylene glycol 3'000) (Ratto et al. 2006) (Σχήμα 4.20).

Σχήμα 4.20. Χημική δομή μορίου πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG), με υδροξυ-ηλεκτριμιδικούς εστέρες (NHS) στα δύο άκρα του.

Το πρόβλημα, το οποίο προκύπτει από τη χρήση ενός συνδέτη με ομοίως δραστικά άκρα, είναι ο κίνδυνος να σχηματίσει βρόγχους πάνω στην επιφάνεια μέσω της αντίδρασης και των δύο άκρων του με τις χημικές ομάδες του τροποποιημένου υποστρώματος. Για να αποφευχθεί αυτό το ενδεχόμενο, η συγκέντρωση του διπλό-NHS-PEG στο διάλυμα εμβάπτισης των ακίδων ορίστηκε σε σχετικά υψηλή τιμή, δέκα φορές μεγαλύτερη από τη συνήθως προτεινόμενη στη βιβλιογραφία, ώστε να επέρχεται γρήγορα κορεσμός των αμινομάδων της επιφάνειας της ακίδας από τη μία μόνο NHS ομάδα των δεσμευόμενων αλυσίδων PEG, ενώ η άλλη παραμένει ελεύθερη για τη σύνδεση με τα μόρια της πρωτεΐνης (Klein et al. 2003).

Παράλληλα δόθηκε ιδιαίτερη σημασία στην προστασία του διπλό-NHS-PEG από την υγρασία. Η ποσότητα, η οποία αγοράστηκε από τη Sigma-Aldrich σε μορφή σκόνης, διαιρέθηκε σε μερίδες των 10mg υπό ατμόσφαιρα ξηρού N_2 και οι μερίδες αυτές φυλάσσονταν μέχρι τη χρήση τους σε αεροστεγή φιαλίδια στους $-20^{\circ}C$. Κάθε φιαλίδιο ανοιγόταν μία φορά και η ποσότητα, που περιείχε, καταναλωνόταν σε ένα μοναδικό πείραμα. Επιπλέον, για το διάλυμα του PEG επιλέχθηκε ένας οργανικός διαλύτης, με στόχο την αποτροπή της υδρόλυσης των NHS εστέρων του αλλά και την προστασία της δομής του μονομοριακού στρώματος των αμινομάδων στην τροποποιημένη με APDES επιφάνεια, οι οποίες, όπως αποδείχθηκε, μεταβάλλουν τη διάταξη τους, όταν έρθουν σε επαφή με υδατικά διαλύματα.

Έτσι, για την πρόσδεση του PEG, ακίδες και δείγματα γυαλιού ή Si_3N_4 , προηγουμένως τροποποιημένα με APDES, εμβάπτιζονταν για 1 ώρα σε διάλυμα διπλό-NHS-PEG συγκέντρωσης 10mg/ml σε χλωροφόρμιο (άνυδρο σε αεροστεγή φιάλη, Sigma-Aldrich). Στο διάλυμα προσθέταμε 5μl/ml τριαιθυλαμίνης (triethylamine >99%, Sigma-Aldrich) ως καταλύτη, ενώ μετά την αντίδραση, τα δείγματα και οι ακίδες ξεπλένονταν με χλωροφόρμιο.

Χρήση διαλύματος διπλό-NHS-PEG συγκέντρωσης, τόσο υψηλής όσο τα 10mg/ml, έχει αναφερθεί και σε άλλα πειράματα (Ratto et al. 2004). Ο λόγος όμως, για τον οποίο εφαρμόστηκε σε αυτή την εργασία, είναι εκτός από την αποφυγή σχηματισμού βρόγχων στην επιφάνεια οι ενδείξεις πολύ μικρής κάλυψης από διαλύματα μικρότερης συγκέντρωσης, τις οποίες παρείχαν οι μετρήσεις φασματοσκοπίας XPS. Συγκεκριμένα, η στοιχειομετρική ανάλυση επιφάνειας γυαλιού, η οποία τροποποιήθηκε αρχικά με αιθανολαμίνη και έπειτα με διπλό-NHS-PEG από διάλυμα συγκέντρωσης 1mg/ml έδειξε τα ποσοστά, που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2. Δεδομένου ότι το χρησιμοποιούμενο PEG είχε μοριακό βάρος 3000 και ονομαστικό μήκος 27nm, ένα πλήρες μονομοριακό στρώμα δεν θα επέτρεπε την ανίχνευση του πυριτίου του υποστρώματος, καθώς η διακριτική ικανότητα της XPS φθάνει τα 10nm. Σε αντίθεση με αυτό οι μετρήσεις έδειξαν υψηλό

ποσοστό Si (25.4%), γεγονός το οποίο συνηγορεί ότι το υπόστρωμα του γυαλιού δεν είχε καλυφθεί πλήρως από το PEG.

Πίνακας 4.2. Στοιχειομετρική ανάλυση δειγμάτων γυαλιού πριν και μετά την τροποποίησή τους με διπλό-NHS-PEG.

	C(%)	N(%)	O(%)	Si(%)
καθαρό γυαλί	10.6	1.6	62.8	25.0
γυαλί-αιθανολαμίνη	11.9	3.2	58.0	26.9
γυαλί-αιθανολαμίνη-PEG	17	2.7	54.9	25.4

Η ανάλυση ωστόσο, των αντίστοιχων φασμάτων έδειξε ότι μια μικρή ποσότητα PEG είχε όντως δεσμευτεί στην επιφάνεια, αφού οι κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν σε άνθρακες συνδεδεμένους με οξυγόνο (C-O και O=CN) φάνηκαν να ενισχύονται στο δείγμα με το PEG σε σχέση με το δείγμα της αιθανολαμίνης (Σχήμα 4.21). Αυτό αποδεικνύει ότι η μικρή κάλυψη της επιφάνειας από το PEG δεν οφειλόταν αποκλειστικά στην περιορισμένη δραστικότητα του υποστρώματος της αιθανολαμίνης (βλ. Κεφ. 4.2.2), αλλά και στη χαμηλή συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου διαλύματος PEG.

Σχήμα 4.21. Ανάλυση κορυφής άνθρακα στα φάσματα XPS, τα οποία ελήφθησαν από δείγματα γυαλιού τροποποιημένου με αιθανολαμίνη (α) πριν και (β) μετά την προσθήκη του συνδέτη διπλό-NHS-PEG. Η κορυφή στα 285eV αντιστοιχεί σε δεσμούς C-H ή C-C, η κορυφή στα 286.4 eV σε δεσμούς C-O ή C-N και η κορυφή στα 288.5eV σε δεσμούς O=CO.

Οι μετρήσεις με φασματοσκοπία XPS δεν επαναλήφθηκαν στα δείγματα, τα οποία προετοιμάστηκαν με την υψηλότερη συγκέντρωση PEG στο διάλυμα (10mg/ml). Οι εικόνες

εντούτοις, που ελήφθησαν με το AFM από τα δείγματα των καλυπτρίδων γυαλιού μέσα σε PBS, έδειξαν ομοιόμορφη κάλυψη του υποστρώματος από σωματίδια, τα οποία μπορεί να υποτεθεί ότι αντιστοιχούν σε συσπειρωμένες αλυσίδες PEG (Σχήμα 4.22). Το ύψος τους εξάλλου, το οποίο μετρήθηκε μεταξύ 8-10nm, ήταν μεγαλύτερο από αυτό των κόκκων, οι οποίοι παρατηρήθηκαν στο μονομοριακό στρώμα του APDES (Σχήμα 4.12β).

Σχήμα 4.22. Ενδεικτική εικόνα AFM αλυσίδων PEG προσδεσμένων στην επιφάνεια καλυπτρίδας γυαλιού τροποποιημένης με APDES. Η εικόνα ελήφθη με την τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας μέσα σε PBS. Διάσταση 1μm x 1μm, μέγιστο ύψος 8nm.

Από τις μετρήσεις της γωνίας επαφής σταγόνων νερού σε τροποποιημένα υποστρώματα γυαλιού και νιτριδίου του πυριτίου, προέκυψαν οι μέσες τιμές $43^{\circ} \pm 7.0^{\circ}$ (7 δείγματα) και $65^{\circ} \pm 0.7^{\circ}$ (2 δείγματα) αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές, οι οποίες είναι σαφώς υψηλότερες από εκείνες στο καθαρό γυαλί ή το Si_3N_4 αλλά λίγο μικρότερες από εκείνες στις τροποποιημένες με αμινομάδες επιφάνειες, δικαιολογούνται ποιοτικά από τις αμφίρροπες τάσεις των τμημάτων του διπλό NHS-PEG. Ενώ η πολυμερική αλυσίδα του PEG είναι υδρόφιλη (Tirelli et al. 2002, Zdyrko et al. 2004), ο NHS εστέρας στο άκρο της είναι υδρόφοβος, με αποτέλεσμα η τελική υδροφοβικότητα της επιφανείας να εξαρτάται από τη σχετική διάταξη του συνδέτη στην επιφάνεια. Οι μετρήσεις της γωνίας διαβροχής όμως, δεν μπορούν να δώσουν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την τελευταία και ειδικότερα για τη διαθεσιμότητα των NHS ομάδων στην τροποποιημένη επιφάνεια.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μια φθορίζουσα ουσία, η φθουορεσαμίνη (fluoresceinamine, Fluka), η οποία, παράλληλα με τη δυνατότητα απορρόφησης φωτός στα 494nm και εκπομπής στα 512nm, έχει την ικανότητα να συνδέεται με NHS ομάδες (Raviv et al. 2002) (Σχήμα 4.23). Δείγματα τροποποιημένων με διπλό-NHS-PEG καλυπτρίδων γυαλιού και επιφανειών Si_3N_4 εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα φθουορεσαμίνης συγκέντρωσης 100μg/ml σε αποσταγμένο νερό για 1

ώρα και ύστερα από τρία ξεπλύματα, το τελευταίο εκ των οποίων είχε διάρκεια 12 ωρών, εξετάστηκαν κάτω από το μικροσκόπιο φθορισμού^x.

Σχήμα 4.23. Χημική δομή φθουορεσαμίνης. Η παρουσία της αμινομάδας δίνει τη δυνατότητα σήμανσης με τη φθουορεσαμίνη ουσιών, οι οποίες φέρουν δραστικούς υδροξυ-ηλεκτρίμιδικούς εστέρες (NHS).

Αρχικά, τα τροποποιημένα δείγματα γυαλιού δεν έδειξαν καμία διαφορά στο φθορισμό σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου καθαρού γυαλιού, τα οποία είχαν υποβληθεί στην ίδια διαδικασία σήμανσης με τη φθουορεσαμίνη. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει την απουσία δραστικών NHS εστέρων στο υπόστρωμα, η οποία αποδόθηκε στο σχηματισμό βρόγχων από το διπλό-NHS-PEG πάνω σε αυτό. Για τούτο το λόγο δοκιμάστηκε, πριν από τη προσθήκη του διπλό-NHS-PEG, η μερική κάλυψη των αμινομάδων του υποστρώματος από ένα άλλο PEG, το οποίο στο ένα άκρο του έφερε έναν NHS εστέρα, ενώ στο άλλο μια αδρανή μεθυλομάδα (μεθυλο-PEG-NHS, *O*-[(N-Succinimidyl)succinyl-aminoethyl]-*O*'-methylpolyethylene glycol 2'000, Fluka). Τα τροποποιημένα με APDES δείγματα εμβαπτιζόνταν σε διάλυμα μέθυλο-PEG-NHS συγκέντρωσης 1mg/ml σε χλωροφόρμιο με 5μl/ml τριαιθυλαμίνη για 1 ώρα, προτού αντιδράσουν με το διάλυμα του διπλό-NHS-PEG κατά τη συνήθη διαδικασία. Και πάλι όμως, τα δείγματα δεν έδειξαν να φθορίζουν, ίσως γιατί η επιφανειακή συγκέντρωση των NHS εστέρων ήταν πλέον πολύ μικρή (Σχήμα 4.24α και β).

Παρόλα αυτά, όταν επιχειρήθηκε τροποποίηση σε διάλυμα διπλό-NHS-PEG χωρίς την προσθήκη τριαιθυλαμίνης, τα δείγματα του γυαλιού φάνηκαν να φθορίζουν κάτω από το μικροσκόπιο. Ακόμα πιο έντονος ήταν ο φθορισμός των επεξεργασμένων δειγμάτων Si_3N_4 , (Σχήμα 4.24δ), ο οποίος μάλιστα αποδείχτηκε ότι δεν εξαρτάται από την επεξεργασία των δειγμάτων με το μέθυλο-PEG-NHS. Έτσι η σχετική προεργασία δεν κρίθηκε απαραίτητη να εφαρμοστεί για την τροποποίηση των ακίδων.

^x Καθόλη τη διαδικασία τα δείγματα προστατεύονταν από το φως.

Σχήμα 4.24. Εικόνες δειγμάτων γυαλιού και νιτριδίου του πυριτίου ληφθείσες με μικροσκόπιο φθορισμού ύστερα από σήμανσή τους με φθοουρεσαμίνη για τον έλεγχο της παρουσίας δραστικών NHS ομάδων. (α) Δείγμα ελέγχου γυαλιού, (β) δείγμα γυαλιού, στο οποίο έχουν προσδεθεί μόρια διπλό-NHS-PEG, ύστερα από μερική κάλυψη των αμινομάδων του υποστρώματος από μόρια μέθυλο-PEG-NHS, γ) δείγμα ελέγχου νιτριδίου του πυριτίου, (β) δείγμα νιτριδίου του πυριτίου, στο οποίο έχουν προσδεθεί μόρια διπλό-NHS-PEG, χωρίς όμως την προσθήκη τριαιθυλαμίνης για την αντίδραση.

Η δυνατότητα του διπλό-NHS-PEG να συνδέεται στην επιφάνεια των ακίδων επιβεβαιώθηκε και από τις καμπύλες αποκόλλησης, οι οποίες καταγράφηκαν με το AFM κατά την απομάκρυνση τροποποιημένων ακίδων από καθαρές επιφάνειες γυαλιού μέσα σε PBS. Αν και φαινόμενα αποκόλλησης σαν αυτό, το οποίο παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.25, δεν παρατηρούνταν συχνά, η μικρή αντοχή του δεσμού με την επιφάνεια και η απόσταση αποκόλλησης, η οποία είναι ίση με το μήκος πλήρους ανάπτυξης του χρησιμοποιούμενου PEG (27nm), συνηγορούν στο ότι η εξεταζόμενη ακίδα φέρει τουλάχιστον μία συνδεδεμένη αλυσίδα PEG.

Σχήμα 4.25. Καμπύλη AFM ενδεικτική της προσκόλλησης αλυσίδας PEG στην επιφάνεια του δείγματος γυαλιού. Το μήκος της εμφανιζόμενης παραβολικής καμπύλης, το οποίο είναι περίπου 30nm, μαρτυρεί την τάνυση του PEG, καθώς η ακίδα απομακρύνεται από την επιφάνεια.

Η δυνατότητα τέτοιων συνδεδεμένων αλυσίδων PEG να δεσμεύουν μεμονωμένα μόρια ινωδογόνου αποδείχτηκε εύκολα στη συνέχεια, όταν οι τροποποιημένες ακίδες αντέδρασαν με το διάλυμα της πρωτεΐνης και εξετάστηκαν με το AFM. Τα σχετικά στοιχεία παρουσιάζονται μαζί με την αξιολόγηση των πειραματικών μετρήσεων σε επόμενη ενότητα (Κεφ. 4.4.1).

4.3 Πειραματική διαδικασία

Οι ακίδες, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της δύναμης αποκόλλησης ανεξάρτητων μορίων ινωδογόνου, ήταν τύπου NP-S της VeecoProbes. Από τους τέσσερις τριγωνικούς προβόλους κάθε φορέα χρησιμοποιούνταν μόνο αυτοί με τα λεπτά και μακριά στελέχη (μήκος 196μm και πλάτος 23μm). Η σταθερά ελατηρίου k υπολογιζόταν για κάθε πρόβολο χωριστά, πριν την τροποποίησή του, με την τεχνική του θερμικού συντονισμού και η προκύπτουσα τιμή εισαγόταν στο σχετικό πεδίο του προγράμματος ελέγχου του AFM, για να είναι διαθέσιμη για τους μετέπειτα υπολογισμούς. Συνολικά βαθμονομήθηκαν 11 ακίδες και η μέση τιμή ($\pm$ τυπική απόκλιση) της δυσκαμψίας του προβόλου τους βρέθηκε 0.116 ± 0.013 N/m.

Οι ακίδες καθαρίζονταν με εμβάπτιση σε διάλυμα πιράνχα για 30 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια τροποποιούνταν επιφανειακά με APDES σύμφωνα με τη διαδικασία, η οποία περιγράφηκε στο Κεφ. 4.2.2. Για την πρόσδεση των μορίων ινωδογόνου χρησιμοποιούνταν το διπλό-NHS-PEG σύμφωνα με τη μεθοδολογία, η οποία περιγράφηκε στο Κεφ. 4.2.3. Σημειώνεται, ότι στο διάλυμα του PEG προσθέταμε τριαιθυλαμίνη. Τα μόρια της πρωτεΐνης προσδένονταν πάνω στην ακίδα μέσω αντίδρασης ενός από τους δύο NHS εστέρες της αλυσίδας του PEG με κάποια από τις επιφανειακές αμινομάδες τους. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιούνταν με εμβάπτιση των ακίδων σε διάλυμα ινωδογόνου συγκέντρωσης 10μg/ml σε 15mM PBS pH 7.4 για 1 ώρα. Έπειτα, οι ακίδες ξεπλένονταν με καθαρό PBS και προσαρμόζονταν στην κυψελίδα υγρού του AFM.

Οι μετρήσεις των δυνάμεων αποκόλλησης πραγματοποιήθηκαν μέσα σε PBS pH 7.4, ιοντικής ισχύος 150mM. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν καλυπτρίδες γυαλιού διαμέτρου 13mm, πάχους 0.08-0.12 mm (Fisher Scientific, U.K.), οι οποίες καθαρίζονταν σε διάλυμα πιράνχα για 10 λεπτά και ξεπλένονταν με αποσταγμένο νερό, προτού εφαρμοστούν στο επάνω μέρος του σαρωτή του AFM μέσω του ειδικού μαγνητικού δίσκου, στον οποίο κολλούνταν με αυτοκόλλητη ταινία διπλής όψης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα μόρια του ινωδογόνου δεσμεύτηκαν στην επιφάνεια τέτοιων δειγμάτων γυαλιού αντί για τις ακίδες, προκειμένου να μετρηθεί η δύναμη αποκόλλησης τους από την επιφάνεια καθαρών ακίδων. Η τροποποίηση αυτών των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την ίδια διαδικασία, η οποία εφαρμόστηκε και για τις ακίδες.

Για την παρακολούθηση και την καταγραφή της αλληλεπίδρασης των ακίδων με τις επιφάνειες χρησιμοποιήθηκε ένα Picoforce AFM της Veeco, Santa Barbara. Ουσιαστικά πρόκειται για το ίδιο μικροσκόπιο Multimode, που χρησιμοποιήθηκε στην πρώτη ομάδα πειραμάτων της διατριβής (Κεφ. 2.4.2), το οποίο όμως αναβαθμίστηκε με ένα σαρωτή κλειστού βρόγχου στην κατακόρυφη διεύθυνση (picoforce scanner) και μια μονάδα ελέγχου Nanoscope IIID. Το Picoforce AFM διαθέτει επιπλέον, ένα πιο ευαίσθητο σύστημα λέιζερ-φωτοαισθητήρα, χάρη στο οποίο ήταν δυνατή η ακριβέστερη παρακολούθηση της κάμψης του προβόλου. Ο έλεγχος του AFM γινόταν μέσω του λογισμικού Nanoscope 6.13r1.

Οι καμπύλες κάμψης-μετακίνησης καταγράφηκαν σε πέντε διαφορετικές ταχύτητες προσέγγισης-απομάκρυνσης της ακίδας από την επιφάνεια^{xi}. Με δεδομένη την επιθυμητή ταχύτητα και το εύρος της κατακόρυφης μετακίνησης του σαρωτή, υπολογιζόταν η συχνότητα του κύκλου προσέγγισης-απομάκρυνσης (Πίνακας 4.3) και η σχετική τιμή εισαγόταν στο αντίστοιχο πεδίο του προγράμματος ελέγχου.

Για τον περιορισμό της ασκούμενης δύναμης στην τροποποιημένη ακίδα η μέγιστη επιτρεπόμενη κάμψη του προβόλου είχε οριστεί σε 5nm (trigger threshold), η οποία αντιστοιχεί σε ασκούμενη δύναμη 580pN, αν υποτεθεί ότι η σταθερά ελατηρίου των χρησιμοποιούμενων προβόλων ισούται με τη μέση μετρηθείσα τιμή τους, $k=0.116\text{N/m}$. Με τη βοήθεια της Εξίσωσης 3.22 υπολογίστηκε ο χρόνος επαφής της ακίδας με την επιφάνεια και, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.3, ο χρόνος αυτός διαφέρει για κάθε μία από τις εφαρμοζόμενες ταχύτητες. Προκειμένου να

^{xi} Στην πραγματικότητα είναι η επιφάνεια του δείγματος αυτή, η οποία προσεγγίζει και απομακρύνεται από την αμετακίνητη ακίδα, αλλά εδώ χρησιμοποιούμε την ισοδύναμη θεώρηση της μετακινούμενης ακίδας και της ακίνητης επιφάνειας, επειδή έχει καθιερωθεί στη σχετική βιβλιογραφία.

εξαλειφθούν οι επιδράσεις των διαφορών αυτών στις μετρούμενες δυνάμεις αποκόλλησης, ορίστηκε μια πρόσθετη καθυστέρηση της ακίδας πάνω στην επιφάνεια, έτσι ώστε ο συνολικός χρόνος επαφής ακίδας επιφάνειας να είναι σε όλες τις περιπτώσεις ίσος με 100ms.

Πίνακας 4.3. Συχνότητα κύκλου, χρόνος επαφής ακίδας-επιφάνειας και πρόσθετη καθυστέρηση της ακίδας σε επαφή με την επιφάνεια για πέντε διαφορετικές ταχύτητες προσέγγισης-απομάκρυνσης και τα αντίστοιχα εύρη μετακίνησης.

ταχύτητα (nm/s)	εύρος μετακίνησης (nm)	συχνότητα (Hz)	χρόνος επαφής ακίδας- επιφάνειας (ms)	καθυστέρηση σε επαφή (ms)
100	500	0.1	100	-
500	500	0.5	20	80
1000	500	1	10	90
2000	500	2	5	95
11000	1000	5.8	1	99

Η επεξεργασία των καταγεγραμμένων καμπύλων και η μέτρηση των δυνάμεων αποκόλλησης έγινε αυτόματα με τη βοήθεια ενός κώδικα, ο οποίος γράφτηκε στη Matlab v5.3, The MathWorks, Inc. Περισσότερες λεπτομέρειες για αυτό θα δοθούν σε επόμενη ενότητα, αφού πρώτα περιγραφεί η μορφή των πειραματικών καμπύλων και ερμηνευτούν τα χαρακτηριστικά, τα οποία χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των συμβάντων αποκόλλησης μεμονωμένων μορίων ινωδογόνου.

4.4 Επεξεργασία πειραματικών μετρήσεων

4.4.1 Αξιολόγηση πειραματικών καμπύλων

Η χρήση ακίδων τροποποιημένων με μόρια ινωδογόνου σύμφωνα με τη διαδικασία, η οποία περιγράφηκε παραπάνω, δεν σημαίνει ότι το σύνολο των καταγεγραμμένων καμπύλων παρουσίαζαν αποκολλήσεις μεμονωμένων μορίων από το υπόστρωμα. Κριτήριο για το χαρακτηρισμό μιας καμπύλης ως συμβάντος αποκόλλησης ενός μοναδικού μορίου πρωτεΐνης ήταν

η εμφάνιση παραβολικής κάμψης του προβόλου, προτού η ακίδα αναπηδήσει αποκολλούμενη από την επιφάνεια (Σχήμα 4.26α)(Lin et al. 2005).

Η εμφάνιση της παραβολής αυτής οφείλεται στον αυξανόμενο ρυθμό κάμψης του προβόλου, καθώς η ακίδα απομακρύνεται από την επιφάνεια και οι σε σειρά αλυσίδες του PEG και του ινωδογόνου, που παραμένει προσκολλημένο με την άκρη του στην επιφάνεια, αρχίζουν να φορτίζονται ολοένα και περισσότερο. Αν το PEG και το ινωδογόνο ήταν ιδανικά ελατήρια, η φόρτισή τους θα υποδηλωνόταν από μία ευθύγραμμη κάμψη του προβόλου. Εξαιτίας όμως του σταθερού τους μήκους, όσο περισσότερο τεντώνονται αναπτύσσοντας την αλυσίδα τους από την τυχαία διάταξη, την οποία είχαν όντας ελεύθερα στο διάλυμα, τόσο μειώνεται η δυνατότητά τους να επεκταθούν επιπλέον, με αποτέλεσμα η φόρτισή τους να εμφανίζει τη μορφή παραβολής. Δεδομένου ότι το χρησιμοποιούμενο PEG είχε ονομαστικό μήκος 27nm, ενώ το μόριο του ινωδογόνου στη φυσική, μη ανεπτυγμένη διάταξή του έχει μήκος περίπου 50nm, το εκτιμώμενο μήκος, το οποίο έπρεπε να έχει μια παραβολική καμπύλη για να αποδοθεί στη φόρτιση ενός ανεξάρτητου μορίου, ήταν 77 nm. Λίγο μικρότερα μήκη ήταν επίσης, αποδεκτά υπό τη θεώρηση της δέσμευσης (ή της προσκόλλησης) του ινωδογόνου στην ακίδα (ή την επιφάνεια) σε άλλα σημεία πέρα από τα άκρα του (Oesterhelt et al. 1999), ενώ μεγαλύτερα μήκη μπορούν να υποδηλώνουν ανάπτυξη της μοριακής δομής της πρωτεΐνης λόγω της φόρτισής της πριν την αποκόλληση.

Παντελής απουσία καμπύλων με τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά ανάμεσα στις καταγραφόμενες με μια συγκεκριμένη ακίδα, αποδείκνυε την αποτυχία πρόσδεσης ανεξάρτητων μορίων ινωδογόνου πάνω της, οπότε αυτή απορριπτόταν. Κάτι τέτοιο συνέβη με την ακίδα, στην οποία δοκιμάστηκε να προσδεθεί το ινωδογόνο μέσω του διπλό-NHS-PEG ύστερα από μερική κάλυψη των αμινομάδων στην επιφάνεια της ακίδας μέσω του μέθυλο-PEG-NHS. Οι πολλαπλές αποκολλήσεις, καμία από τις οποίες δεν εμφάνιζε τα χαρακτηριστικά τάνυσης ενός μοναδικού μορίου, σε κάθε καμπύλη απομάκρυνσης της ακίδας από την επιφάνεια (Σχήμα 4.26β) αποδόθηκαν στη μαζική προσρόφηση μορίων ινωδογόνου πάνω στο υπόστρωμα των μεθυλομάδων μέσω φυσικών δυνάμεων. Η εκτίμηση αυτή στηρίχθηκε στην ομοιότητα αυτών των καμπύλων με εκείνες, τις οποίες κατέγραψαν ο Gergely και οι συνεργάτες του ύστερα από φυσική προσρόφηση του ινωδογόνου στην επιφάνεια των ακίδων (Gergely et al. 2000).

Σχήμα 4.26. Ενδεικτικές καμπύλες αποκόλλησης μορίων ινωδογόνου από επιφάνεια γυαλιού. Για τις καμπύλες (α), (γ) και (δ) το ινωδογόνο είχε προσδεθεί μέσω διπλό-NHS-PEG σε τροποποιημένες με APDES ακίδες, ενώ για τη (β) οι αμινομάδες της ακίδας είχαν προηγουμένως καλυφθεί μερικώς με μέθυλο-PEG-NHS. Όλες οι καμπύλες καταγράφηκαν σε PBS.

Αλλά και με τις ακίδες, στις οποίες το ινωδογόνο φαινόταν να έχει προσδεθεί με τον επιθυμητό τρόπο μέσω του PEG, η καταγραφή συμβάντων αποκόλλησης ανεξάρτητων μορίων από την επιφάνεια δεν ήταν δεδομένη για κάθε καμπύλη απομάκρυνσης, η οποία λαμβανόταν. Στην πλειοψηφία αυτών των καμπύλων, και μάλιστα στο αρχικό τους τμήμα, καταγραφόταν η ισχυρή προσκόλληση της ακίδας στο υπόστρωμα λόγω φυσικών δυνάμεων (Σχήμα 4.26γ), ενώ σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρούνταν διαδοχικά περισσότερες της μίας αποκολλήσεις με παραβολική μορφή (Σχήμα 4.26δ). Αν και κάποιες από τις τελευταίες μπορούν να αποδοθούν στην αποκόλληση ενός μόνο μορίου, το οποίο έχει σχηματίσει πολλαπλούς δεσμούς με την επιφάνεια, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο αλληλεπίδρασης πολλών διαφορετικών μορίων πρωτεΐνης με το υπόστρωμα, όπως θα περιγραφεί στη συνέχεια. Για το λόγο αυτό, καμπύλες με πολλαπλές αποκολλήσεις δεν προκρίνονταν για επεξεργασία. Αντίθετα, οι καμπύλες, οι οποίες εμφάνιζαν, πριν από την τάνυση της πρωτεΐνης, μη ειδική προσκόλληση της ακίδας στην επιφάνεια λόγω φυσικών

δυνάμεων, χρησιμοποιήθηκαν χωρίς ενδοιασμό, αφού η θέση και η μορφή της μη ειδικής προσκόλλησης επιτρέπουν την εύκολη διάκριση και απομόνωσή της.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η καταγραφή της αλληλεπίδρασης μεμονωμένων μορίων ινωδογόνου με την επιφάνεια ήταν μια χρονοβόρα διαδικασία, η οποία περιελάμβανε την καταγραφή εκατοντάδων καμπύλων, ελάχιστες από τις οποίες χρησιμοποιούνταν τελικά για τη μέτρηση της δύναμης αποκόλλησης. Η συλλογή αρκετών μετρήσεων για κάθε μία από τις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες, για παράδειγμα την ταχύτητα φόρτισης του δεσμού ινωδογόνου-υποστρώματος, είχε ιδιαίτερη σημασία λόγω της έντονης στοχαστικότητας, την οποία παρουσιάζουν αυτού του είδους τα πειράματα με το AFM. Η στοχαστικότητα αυτή οφείλεται στον διαφορετικό τρόπο με τον οποίο είναι δεσμευμένα τα βιομόρια σε κάθε μία από τις χρησιμοποιούμενες ακίδες, αλλά και στον τυχαίο τρόπο με τον οποίο αυτά τα μόρια αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα (Gergely et al. 2001).

Γίνεται επομένως, φανερό ότι τα πειράματα μέτρησης δυνάμεων μεμονωμένων μορίων συνεπάγονται ένα μεγάλο όγκο δεδομένων, η επεξεργασία των οποίων συνηθίζεται να γίνεται αυτόματα με κάποιο εξειδικευμένο πρόγραμμα (Igor Pro, Punias^{xii}). Στη συγκεκριμένη εργασία όμως, προτιμήθηκε να γραφεί ένας πρωτότυπος κώδικας στη Matlab, ο οποίος περιγράφεται στο κεφάλαιο που ακολουθεί.

4.4.2 Αλγόριθμος επεξεργασίας πειραματικών καμπύλων και μετρήσεων

Οι αλγόριθμοι επεξεργασίας των δεδομένων, τα οποία προκύπτουν από τα πειράματα με μεμονωμένα μόρια στο AFM, στοχεύουν κυρίως στον προσδιορισμό της δύναμης αποκόλλησης από το υπόστρωμα, της θέσης αποκόλλησης ως απόσταση από το σημείο επαφής ακίδας-υποστρώματος και πιο σπάνια των ελαστικών ιδιοτήτων του μορίου καθώς αυτό ξεδιπλώνεται. Τέτοιοι αλγόριθμοι, αφού προσδιορίσουν τις ζητούμενες παραμέτρους για κάθε μία από τις καμπύλες δύναμης-απόστασης που επεξεργάζονται, τις συγκεντρώνουν σε κοινά ιστογράμματα, στα οποία προσαρμόζουν την κανονική ή κάποια άλλη στατιστική κατανομή (Hertadi & Ikai 2002, Hinterdorfer et al. 1998).

Τα μαθηματικά κριτήρια, τα οποία χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή των ζητούμενων δεδομένων από τις πειραματικές καμπύλες, ποικίλουν. Σύμφωνα με ένα από αυτά, για κάθε σημείο

^{xii} Το πρόγραμμα διατίθεται ελεύθερα στην ηλεκτρονική διεύθυνση:

<http://site.voila.fr/punias/klmenu/punias0.htm>

της πειραματικής καμπύλης γίνεται προσαρμογή των γειτονικών του σημείων με δύο πολυωνυμικές εξισώσεις, μία για τα σημεία δεξιά του και μία άλλη για τα σημεία στα αριστερά του, και τα συμβάντα αποκόλλησης υποδηλώνονται από σημαντικές διαφορές μεταξύ αυτών των εξισώσεων για συγκεκριμένα σημεία (Baumgartner et al. 2000, Hull et al. 2007). Για την εύρεση, από την άλλη μεριά, του σημείου επαφής ακίδας-επιφάνειας έχει προταθεί η σύγκριση της κλίσης σε κάθε σημείο της καμπύλης με την κλίση στην περιοχή επαφής, η οποία είναι και η μεγαλύτερη για όλη την καμπύλη (Hinterdorfer et al. 1998). Το πρώτο σημείο, καθώς η απόσταση ακίδας-επιφάνειας αυξάνει, στο οποίο η κλίση γίνεται σημαντικά μικρότερη της μέγιστης, ταυτίζεται με το ακραίο σημείο επαφής. Αξίζει να σημειωθεί ακόμα, ότι για πειράματα διερεύνησης της ενδομοριακής ελαστικότητας συνηθίζεται η τεχνική της κανονικοποίησης των μετρούμενων αποστάσεων με βάση ένα μήκος αναφοράς, για παράδειγμα το μήκος του ελαστικού μορίου στη θέση αποκόλλησής του από την επιφάνεια, προκειμένου να υπάρχει ταύτιση των καμπύλων φόρτισης για μόρια με διαφορετικά μήκη (Janshoff et al. 2000, Kienberger et al. 2000).

Ο κώδικας Matlab, ο οποίος συντάχθηκε για τις ανάγκες αυτής της διατριβής, στηρίχτηκε στον αλγόριθμο του Gergely και των συνεργατών του (Gergely et al. 2001). Ο προσδιορισμός των σημείων αποκόλλησης βασίστηκε στην εύρεση των σημαντικών τοπικών ελαχίστων στην καμπύλη απομάκρυνσης ύστερα από εξομάλυνση της τελευταίας. Για τον έλεγχο της σημαντικότητας ενός ελαχίστου χρησιμοποιήθηκε η διαφορά της τιμής του από τα γειτονικά ακρότατα, η οποία έπρεπε να ξεπερνά μια κρίσιμη τιμή ανάλογη του παρατηρούμενου θορύβου στην καμπύλη.

Ολόκληρος ο κώδικας συνοδευόμενος από σχολιασμό των επιμέρους εντολών του παρατίθεται στο Παράρτημα Γ. Για την εφαρμογή του ήταν αναγκαία η εξαγωγή των πειραματικών καμπύλων κάμψης-μετακίνησης από το πρόγραμμα ελέγχου του AFM, Nanoscope 6.13r1, με τη μορφή ανεξάρτητων αρχείων δεδομένων (ASCII). Αν και κάθε καταγεγραμμένη καμπύλη αποτελούταν από ένα κλάδο προσέγγισης και ένα κλάδο απομάκρυνσης, στο αρχείο δεδομένων εξάγονταν μόνο τα στοιχεία του δεύτερου κλάδου, σε μονάδες μάλιστα, απόστασης (nm) τόσο για την κάμψη του προβόλου όσο και για τη μετακίνηση του πιεζοκρυστάλλου.

Η αυτόματη επεξεργασία μιας ομάδας πειραματικών καμπύλων γινόταν μέσω εκτέλεσης του κώδικα `distribution.m`. Ο κώδικας αυτός καλούσε αρχικά έναν άλλο κώδικα, τον `single_force.m`, μέσω του οποίου προσδιορίζονταν για κάθε καμπύλη ξεχωριστά, οι δυνάμεις και οι θέσεις των συμβάντων αποκόλλησης. Τα στοιχεία αυτά εξάγονταν με τη μορφή δύο πινάκων, κάθε στοιχείο των οποίων αντιστοιχούσε σε ένα διαφορετικό συμβάν ρήξης δεσμού με την επιφάνεια, επειδή τα

συμβάντα αυτά μπορεί να ήταν περισσότερα από ένα για κάθε καμπύλη. Στη συνέχεια αναφέρονται συνοπτικά οι διαδικασίες, τις οποίες εκτελούσε ο κώδικας `single_force.m`:

1. Ανάκτηση των τιμών της σταθεράς ελατηρίου του χρησιμοποιούμενου προβόλου, της ταχύτητας απομάκρυνσης της ακίδας από την επιφάνεια και του πλήθους των δεδομένων από την εισαγωγική επικεφαλίδα του αρχείου δεδομένων.
2. Ανάγνωση των τιμών κάμψης του προβόλου και μετατόπισης, που προκαλούσε ο πιεζοκρύσταλλος.
3. Προσδιορισμός του σημείου επαφής ακίδας-επιφάνειας ως το σημείο τομής της πειραματικής καμπύλης με την ευθεία προσαρμογής του τελευταίου οριζόντιου τμήματός της.
4. Μετατόπιση της πρωτογενούς καμπύλης κάμψης-μετακίνησης, ώστε η αρχή των αξόνων να συμπίπτει με το σημείο επαφής ακίδας-επιφάνειας.
5. Υπολογισμός της πραγματικής απόστασης μεταξύ της ακίδας και της επιφάνειας σε κάθε σημείο της καμπύλης μέσω αλγεβρικής πρόσθεσης της κάμψης του προβόλου στη σχετική μετακίνηση.
6. Μετατροπή της καμπύλης κάμψης-απόστασης σε καμπύλη δύναμης-απόστασης ύστερα από πολλαπλασιασμό των τιμών κάμψης με τη σταθερά ελατηρίου του προβόλου.
7. Καθορισμός του ύψους του θορύβου στην πρωτογενή καμπύλη μέσω υπολογισμού της τετραγωνικής ρίζας του μέσου τετραγώνου (RMS) των διαφορών της πειραματικής καμπύλης από την ευθεία προσαρμογής για το τελευταίο οριζόντιο τμήμα της.
8. Εντοπισμός όλων των τοπικών ελαχίστων και μεγίστων στην καμπύλη δύναμης-απόστασης και χαρακτηρισμός ως σημαντικών εκείνων, των οποίων η διαφορά από το επόμενο (για τα ελάχιστα) ή το προηγούμενο (για τα μέγιστα) ακρότατο ήταν έξι φορές μεγαλύτερη του θορύβου στην καμπύλη.
9. Εξομάλυνση της καμπύλης δύναμης-απόστασης μέσω συνέλιξης, διατηρώντας τα σημαντικά ελάχιστα και μέγιστα αμετάβλητα. Υπολογισμός εκ νέου των σημαντικών ακρότατων ύστερα από την εξομάλυνση. Επανάληψη αυτή της διαδικασίας μέχρι ο αριθμός των σημαντικών ελαχίστων να πάψει να μειώνεται λόγω της εξομάλυνσης.
10. Προσδιορισμός των σημείων αποκόλλησης του ινωδογόνου από το υπόστρωμα από τα σημαντικά ελάχιστα, τα οποία απέμεναν μετά την απόρριψη της ενδεχόμενης αρχικής, μη ειδικής αποκόλλησης της ακίδας από την επιφάνεια. Συγκέντρωση των στοιχείων δύναμης και απόστασης αποκόλλησης σε δύο πίνακες.

11. Εμφάνιση της επεξεργασμένης καμπύλης με τη μορφή του Σχήματος 4.27, στην οποία έκτος από τα πρωτογενή δεδομένα μετά τη μετατροπή τους σε μεγέθη δύναμης-απόστασης παρουσιαζόταν η εξομάλυνσή τους, η προσαρμογή του τελικού οριζώντιου τμήματός τους και τα σημεία αποκόλλησης.

Σχήμα 4.27. Καμπύλη δύναμης-απόστασης μετά την επεξεργασία της με τον αλγόριθμο `single_force.m`. Με μπλε γραμμή παρουσιάζονται τα πρωτογενή πειραματικά δεδομένα, με κόκκινη γραμμή η εξομάλυνσή τους, με πράσινη γραμμή η προσαρμογή του τελικού οριζώντιου τμήματος της καμπύλης, με μπλε σταυρούς τα σημαντικά τοπικά μέγιστα, με κόκκινους σταυρούς τα σημαντικά τοπικά ελάχιστα και με πράσινους κύκλους τα σημεία αποκόλλησης. Η καμπύλη δεν είναι χαρακτηριστική της αποκόλλησης μεμονωμένου μορίου ινωδογόνου από την επιφάνεια αλλά επιλέχθηκε για να προβάλλει καλύτερα τις δυνατότητες του αλγορίθμου.

Ο κώδικας `distribution.m`, αφού είχε καλέσει τον κώδικα `single_force.m` για κάθε μία καμπύλη της ομάδας, που επεξεργαζόταν, συγκέντρωνε τα στοιχεία δύναμης και θέσης αποκόλλησης, τα οποία αντιστοιχούσαν στο τελευταίο συμβάν αποκόλλησης για κάθε καμπύλη, σε δύο πίνακες ένα για κάθε μετρούμενη παράμετρο. Έτσι, στη συνέχεια σχημάτιζε τα ιστογράμματα

για τα συγκεντρωμένα στοιχεία των δύο αυτών παραμέτρων, έκανε προσαρμογή των πειραματικών κατανομών με την κανονική κατανομή και υπολόγιζε τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση για τη δύναμη και τη θέση αποκόλλησης.

4.4.3 Προσαρμογή της τάνυσης των μορίων ινωδογόνου από θεωρητικές εξισώσεις

Η αντοχή και η απόσταση των δεσμών, τους οποίους σχηματίζει το ινωδογόνο με την επιφάνεια του γυαλιού, δεν είναι τα μοναδικά ενδιαφέροντα στοιχεία, που μπορούν να εξαχθούν από τις πειραματικές καμπύλες του AFM. Εξίσου σημαντικές είναι οι πληροφορίες, οι οποίες μπορούν να αντληθούν από το τμήμα της καμπύλης πριν από την αποκόλληση του πρωτεϊνικού μορίου από την επιφάνεια. Το τμήμα αυτό της καμπύλης περιγράφει τη μεταβολή του μήκους του μορίου, το οποίο τεντώνεται υπό την επίδραση της δύναμης, που του ασκεί ο καμπτόμενος πρόβος, καθώς η ακίδα απομακρύνεται από την επιφάνεια. Συνεπώς, το ακριβές σχήμα του τμήματος αυτού προσδιορίζεται από τις ιξωδοελαστικές ιδιότητες του φορτιζόμενου μορίου και η προσαρμογή του με μια κατάλληλη θεωρητική εξίσωση μπορεί να συνεισφέρει στην εκτίμηση της δυσκαμψίας του εξεταζόμενου βιομορίου.

Για την προσαρμογή της καμπύλης τάνυσης πολυμερικών αλυσίδων έχουν προταθεί διάφορες εξισώσεις, όπως η Markovian (Oesterhelt et al. 1999), η Vologodskii ή η προσέγγιση των Moroz και Nelson (Bouchiat et al. 1999), έχουν επικρατήσει όμως, δύο μοντέλα με τα χαρακτηριστικά ονόματα Freely Jointed Chain (FJC model) και Worm-Like Chain (WLC model) (Kienberger et al. 2000). Το πρώτο από αυτά (FJC μοντέλο) υποθέτει ότι η πολυμερική αλυσίδα αποτελείται από N δύσκαμπτα στοιχεία μήκους L_k (μήκος Kuhn), τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς πλήρους περιστροφικής ελευθερίας^{xiii} (Σχήμα 4.28α). Όταν στις άκρες της τυχαία διατεταγμένης αλυσίδας του πολυμερούς ασκηθεί μία δύναμη F το μήκος της αλυσίδας x αυξάνει σύμφωνα με την εξίσωση:

$$x(F) = L \left(\coth \left(\frac{FL_k}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{FL_k} \right) \quad (4.2)$$

όπου L είναι το συνολικό μήκος της αλυσίδας ($L = N \cdot L_k$).

Το WLC μοντέλο, από την άλλη μεριά, περιγράφει το πολυμερές ως μια ομογενή και συνεχή αλυσίδα, η οποία παρουσιάζει αντίσταση στη δύναμη, η οποία τείνει να το ευθυγραμμίσει (Σχήμα

^{xiii} JPG Instruments, Application Report, App 01/05-Structural Investigation of single bio-molecules

4.28β). Μέτρο αυτής της αντίστασης είναι το μήκος δυσκαμψίας L_p (persistence length), το οποίο εκφράζει το ελάχιστο μήκος του πολυμερούς, στο οποίο διατηρείται η διεύθυνση της αλυσίδας και για το οποίο το πολυμερές μπορεί να θεωρηθεί ευθύγραμμο (Janshoff et al. 2000). Το πλεονέκτημα της χρήσης του μήκους L_p για την περιγραφή της δυσκαμψίας της αλυσίδας έγκειται στο ότι είναι μια εγγενής ιδιότητα του πολυμερούς, δεν εξαρτάται δηλαδή από το μήκος του παρά μόνο από τη δομή του, και η τιμή του παραμένει σταθερή ανεξάρτητα από το μέγεθος της δύναμης τάνυσης του πολυμερούς.

Σχήμα 4.28. Σχηματική αναπαράσταση προσαρμογής πολυμερικών αλυσίδων (α) από το μοντέλο **Freely Jointed Chain (FJC model)** και (β) από το μοντέλο **Worm-Like Chain (WLC model)**. Με x συμβολίζεται η απόσταση μεταξύ των ελεύθερων άκρων της αλυσίδας.

Καθώς η αλυσίδα του πολυμερούς ξεδιπλώνεται από την τυχαία διάταξή της υπό την επίδραση της ασκούμενης δύναμης, ολοένα και περισσότερα τμήματά της ευθυγραμμίζονται, με συνέπεια η αντίστασή της να αυξάνει και να απαιτείται συνεχώς μεγαλύτερη δύναμη για την περαιτέρω επιμήκυνσή της. Πρέπει να τονιστεί ότι η αντίσταση του πολυμερούς είναι εντροπικού χαρακτήρα, προέρχεται δηλαδή από την προτίμηση των τμημάτων του σε μία τυχαία διάταξη (Fritz et al. 1997, Hertadi & Ikai 2002). Ως συνέπεια αυτού, η ενέργεια ευθυγράμμισης του πολυμερούς δίνεται από την ολοκλήρωση δύο όρων, εκ των οποίων ο πρώτος περιγράφει την αντίσταση του πολυμερούς και ο δεύτερος τη συνεισφορά της δύναμης τάνυσης F (Bouchiat et al. 1999):

$$U_{WLC} = \int_{L_0} ds \left(\frac{L_p k_B T}{2} \left| \frac{dt(s)}{ds} \right|^2 - F \cos \vartheta(s) \right) \quad (4.3).$$

Στην παραπάνω εξίσωση με s συμβολίζεται το μήκος τόξου του μοναδιαίου διανύσματος $\mathbf{t}(s)$, το οποίο φανερώνει τη διεύθυνση της αλυσίδας, και με θ η διεύθυνση άσκησης της δύναμης F .

Η Εξίσωση 4.3 μπορεί να λυθεί αριθμητικά για τον υπολογισμό της απαιτούμενης δύναμης για την επιμήκυνση της αλυσίδας κατά x . Από την άλλη μεριά, ο Bustamante και οι συνεργάτες του

(Bustamante et al. 1994) καθώς και οι Marko και Siggia (Marko & Siggia 1995) πρότειναν τον αναλυτικό υπολογισμό της ίδιας δύναμης μέσω της εξίσωσης:

$$F(x) = \frac{k_B T}{L_p} \left(\frac{1}{4 \left(1 - \frac{x}{L_o} \right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_o} \right) \quad (4.4)$$

όπου με L_o συμβολίζεται το συνολικό μήκος της πολυμερικής αλυσίδας. Σύμφωνα με την εξίσωση αυτή η δύναμη αυξάνει γραμμικά με την επιμήκυνση της αλυσίδας για μικρές επιμηκύνσεις, ενώ σε μεγαλύτερες ακολουθεί την παραβολή $(k_B T / L_p) [4(1-x/L_o)^2]^{-1}$. Προκύπτει επομένως, ότι η δυσκαμψία της αλυσίδας ή αλλιώς η σταθερά ελατηρίου της είναι συνάρτηση του μήκους παραμόρφωσής της.

Η Εξίσωση 4.4 έχει χρησιμοποιηθεί με ιδιαίτερα καλά αποτελέσματα για την περιγραφή των καμπύλων ξεδιπλώματος αλυσίδων PEG (Oesterhelt et al. 1999), DNA (Storm & Nelson 2003) και πρωτεϊνών, όπως η ινονεκτίνη (Oberdorfer et al. 2000) και η τιτίνη (Fisher et al. 1999) και για το λόγο αυτό επιλέχθηκε για την προσαρμογή των καμπύλων τάνυσης του ινωδογόνου πριν από την αποκόλλησή του από το υπόστρωμα. Η εφαρμογή της εντούτοις για την περιγραφή των πειραματικών καμπύλων προϋποθέτει το σαφή ορισμό του μεγέθους του τελικού μήκους για τα φορτιζόμενα μόρια. Καταρχάς πρέπει να επισημανθεί, ότι το μήκος αυτό διαφέρει από μέτρηση σε μέτρηση λόγω της τυχαίας θέσης πρόσδεσης του ινωδογόνου πάνω στην ακίδα, της δυνατότητας αγκίστρωσης του στην ακίδα μέσω διαφορετικών αμινοξέων αλλά και της προσκόλλησης στην επιφάνεια όχι απαραίτητα μέσω του ίδιου τμήματός του ακόμα και για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις με το ίδιο μόριο ίδιας ακίδας. Επιπλέον, η παρατήρηση φαινομένων αποκόλλησης σε αποστάσεις μεγαλύτερες των 77nm (άθροισμα ονομαστικών μηκών PEG και ινωδογόνου), οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα φορτιζόμενα βιομόρια έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν σε μήκος μεγαλύτερο από αυτό, το οποίο αντιστοιχεί στη φυσική τους διάταξη.

Για την περιγραφή του ξεδιπλώματος των πολυμερικών αλυσίδων ύστερα από διάσπαση ενδομοριακών δεσμών έχει προταθεί μια επέκταση του μοντέλου WLC, η οποία περιγράφεται από την εξίσωση:

$$F(x) = \frac{k_B T}{L_p} \left(\frac{1}{4 \left(1 - \frac{x}{L_o} + \frac{F}{\Phi} \right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_o} - \frac{F}{\Phi} \right) \quad (4.5)$$

όπου Φ είναι η ενθαλπική δυσκαμψία της αλυσίδας λόγω της ύπαρξης ενδομοριακών δεσμών (Janshoff et al. 2000). Το πρόβλημα στην εφαρμογή της Εξίσωσης 4.5 είναι, πέρα από την παρουσία της άγνωστης μεταβλητής Φ , η δυσκολία προσδιορισμού για κάθε μόριο ινωδογόνου χωριστά του μήκους, πέρα από το οποίο παύει η εντροπική αντίσταση και αρχίζει η ενθαλπική παραμόρφωση, δεδομένου ότι το τμήμα της πρωτεΐνης, το οποίο φορτιζόταν κάθε φορά δεν ήταν το ίδιο. Για το λόγο αυτό στη θέση της Εξίσωσης 4.5 χρησιμοποιήθηκε τελικά η 4.4, με την παραδοχή όμως ότι το μήκος στο οποίο μπορεί να επεκταθεί η πολυπεπτιδική αλυσίδα, απλά ευθυγραμμίζοντας τυχαία διατεταγμένα τμήματά της λόγω εντροπίας, μπορεί να είναι μεγαλύτερο από το μήκος της τριτοταγούς δομής του μορίου (50nm). Έτσι κατά την εφαρμογή της Εξίσωσης 4.4 το τελικό μήκος L_o οριζόταν ίσο με την εκάστοτε απόσταση ακίδας-επιφάνειας, πριν ακριβώς από την αποκόλληση, συν 20nm.

Η Εξίσωση 4.4 ενσωματώθηκε στον κώδικα `single_force.m` (βλ. Παράρτημα Γ) για την προσαρμογή των παραβολικών τμημάτων των πειραματικών καμπύλων πριν από τα συμβάντα αποκόλλησης μέσω μιας μεθόδου μη γραμμικών ελαχίστων τετραγώνων (Levenberg-Marquardt) (Ratto et al. 2006). Το τελικό μήκος L_o οριζόταν για κάθε καμπύλη σύμφωνα με τα παραπάνω, ενώ το μήκος L_p είχε το ρόλο της μεταβλητής προσαρμογής. Αξίζει να σημειωθεί, ότι επειδή η προσαρμογή αφορούσε τη σύνθετη αλυσίδα, η οποία σχηματιζόταν από την εν σειρά σύνδεση του PEG με το μόριο του ινωδογόνου, το μήκος δυσκαμψίας L_p , το οποίο υπολογιζόταν μέσω της προσαρμογής αντιστοιχούσε στην ελαστικότητα αυτού του συζευγμένου συστήματος.

Μετά τον υπολογισμό του μήκους L_p για το σύμπλεγμα PEG-ινωδογόνου, ήταν εύκολος ο υπολογισμός της δυσκαμψίας του φορτιζόμενου μορίου λίγο πριν το σημείο αποκόλλησης μέσω της εξίσωσης:

$$k_{\text{μορίου}}(x) = \frac{dF(x)}{dx} = \frac{k_B T}{L_o L_p} \left(\frac{1}{2 \left(1 - \frac{x}{L_o} \right)^3} + 1 \right) \quad (4.6)$$

η οποία προκύπτει από παραγωγή της Εξίσωσης 4.4 (Chhtcheglova et al. 2004). Η συνολική δυσκαμψία του συστήματος πρόβλος-PEG-ινωδογόνο υπολογιζόταν στη συνέχεια μέσω της σχέσης:

$$k_{\text{συνολ}} = \frac{k_{\text{προβ}} \cdot k_{\text{μορίου}}}{k_{\text{προβ}} + k_{\text{μορίου}}} \quad (4.7)$$

όπου με $k_{\text{προβ}}$ συμβολίζεται η σταθερά ελατηρίου του προβόλου, ο οποίος ουσιαστικά αντιπροσωπεύει ένα ελατήριο συνδεδεμένο σε σειρά με τα μόρια του PEG και του ινωδογόνου. Τελικά, ο ρυθμός φόρτισης κάθε δεσμού ινωδογόνου με την επιφάνεια ακριβώς τη στιγμή της διάσπασής του υπολογιζόταν με πολλαπλασιασμό της δυσκαμψίας $k_{\text{συνολ}}$ με την ταχύτητα μετακίνησης της ακίδας και οι τιμές, οι οποίες προέκυπταν, εξάγονταν με τη βοήθεια του κώδικα σε αντιστοιχία με τα γεγονότα αποκόλλησης, τα οποία περιέγραφαν.

Ο κώδικας `distribution.m` είχε τη δυνατότητα έπειτα, να διαχωρίζει τις δυνάμεις αποκόλλησης, τις οποίες είχε συγκεντρώσει για το σύνολο των επεξεργαζόμενων καμπύλων, σε πέντε ομάδες ανάλογα με το ρυθμό φόρτισης του δεσμού τους, με κεντρικές τιμές ρυθμού φόρτισης για κάθε ομάδα 10, 50, 100, 200 και 1100 nN/nm αντίστοιχα. Με τον τρόπο αυτό, ήταν εφικτός ο σχηματισμός των κατανομών των δυνάμεων αποκόλλησης και ο υπολογισμός της αντίστοιχης μέση τιμής και τυπικής απόκλισης για κάθε έναν από τους παραπάνω μέσους ρυθμούς φόρτισης.

4.5 Αποτελέσματα

4.5.1 Ανάλυση μετρήσεων δύναμης και θέσης αποκόλλησης

Σκοπός των πραγματοποιηθέντων πειραμάτων ήταν η μέτρηση της δύναμης αποκόλλησης ανεξάρτητων μορίων ινωδογόνου από την επιφάνεια γυαλιού με τη βοήθεια του AFM. Η αρχή λειτουργίας του AFM επιτρέπει αυτό να γίνει με δύο διαφορετικούς τρόπους, μέσω της δέσμησης των πρωτεϊνικών μορίων στην ακίδα και της καταγραφής της αποκόλλησής τους από καθαρές επιφάνειες, στις οποίες προσκολλούνται, ή μέσω της δέσμησης της πρωτεΐνης στην επιφάνεια δειγμάτων και της μέτρησης της αποκόλλησης καθαρών ακίδων από αυτά. Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης εργασίας εξετάστηκαν και οι δύο τεχνικές και οι καμπύλες, οι οποίες καταγράφηκαν ύστερα από εφαρμογή της ίδιας διαδικασίας για την τροποποίηση των ακίδων νιτριδίου του πυριτίου ή της επιφάνειας καλυπτρίδων γυαλιού, έδειξαν παρόμοια συμβάντα αποκόλλησης και στις δύο περιπτώσεις (Σχήμα 4.29).

Σχήμα 4.29. Ενδεικτικές καμπύλες αποκόλλησης μεμονωμένων μορίων ινωδογόνου κατά την απομάκρυνση της ακίδας από την επιφάνεια (κόκκινες γραμμές), όταν η πρωτεΐνη έχει προσδεθεί (α) στην επιφάνεια και (β) στην ακίδα.

Η δέσμευση ωστόσο, των πρωτεϊνικών μορίων στην επιφάνεια παρουσιάζει τα ακόλουθα μειονεκτήματα σε σύγκριση με την τροποποίηση των ακίδων. Τα συνδεόμενα μόρια έχουν τη δυνατότητα να σχηματίσουν πολλαπλούς δεσμούς με τις διαθέσιμες δραστικές ομάδες του PEG στην επιφάνεια και ενδεχομένως αποδιατάσσονται πάνω σε αυτή, ενώ κάτι τέτοιο συμβαίνει σπάνια στην ακίδα λόγω της μικρής της επιφάνειας. Αυτό έχει ως συνέπεια, τα συνδεδεμένα στην επιφάνεια μόρια να είναι σαφώς πιο περιορισμένα κατά την αλληλεπίδρασή τους με την ακίδα και τα αποτελέσματα των μετρήσεων να μην αντιπροσωπεύουν την πραγματική συμπεριφορά του ινωδογόνου στο διάλυμα. Η δέσμευση ακόμα, του ινωδογόνου με τη μορφή ανεξάρτητων μορίων επέβαλε τη χαμηλή επιφανειακή του συγκέντρωση στα δείγματα του γυαλιού, λόγω της οποίας η συχνότητα παρατήρησης αποκολλήσεων πρωτεϊνικών μορίων στο σύνολο των καταγραφόμενων καμπύλων ήταν μικρή. Η τροποποίηση τέλος, της επιφάνειας αντί της ακίδας έκρυβε το μόνιμο κίνδυνο της μόλυνσης της ακίδας από τα αποκολλούμενα μόρια, καθώς αυτή ερχόταν σε επαφή διαδοχικά με διαφορετικά σημεία της επιφάνειας, ενώ ο αντίστοιχος κίνδυνος για την τροποποιημένη ακίδα ήταν απλά να αποκολληθούν τα δεσμευμένα μόρια, γεγονός το οποίο μπορούσε να γίνει αντιληπτό από την εξάλειψη των συμβάντων αποκόλλησης, οπότε η ακίδα απορριπτόταν. Για όλους τους παραπάνω λόγους ο κύριος όγκος των πειραματικών δεδομένων συλλέχθηκε με τροποποιημένες ακίδες, ενώ λίγες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν πάνω σε τροποποιημένες επιφάνειες και θα παρουσιαστούν μόνο για χάρη σύγκρισης.

Μια αρχική εκτίμηση της ποιότητας των μετρούμενων συμβάντων αποκόλλησης μπορεί να προέλθει από τον έλεγχο των αποστάσεων, στις οποίες εμφανίζονται αυτά. Εφόσον ο οριζόντιος

άξονας των καταγεγραμμένων καμπύλων έχει μετασχηματιστεί έτσι ώστε να δηλώνει την πραγματική απόσταση ανάμεσα στην ακίδα και την επιφάνεια, η οριζόντια απόσταση του σημείου αποκόλλησης από την αρχή των αξόνων, μετά την αφαίρεση του μήκους του PEG, δίνει ένα μέτρο του μήκους της πρωτεΐνης, η οποία έχει δεσμευτεί ανάμεσα στην επιφάνεια και την ακίδα.

Στο Σχήμα 4.30α φαίνεται η κατανομή της απόστασης των σημείων αποκόλλησης από το σημείο επαφής ακίδας-επιφάνειας για το σύνολο των αποκολλήσεων μεμονωμένων μορίων, οι οποίες καταγράφηκαν με 8 διαφορετικές ακίδες και στις πέντε διαφορετικές ταχύτητες απομάκρυνσης (συνολικά 239 συμβάντα αποκόλλησης). Η διασπορά των μετρήσεων οφείλεται, όπως αναφέρθηκε ήδη, στο ότι το τμήμα της πρωτεΐνης, το οποίο τεντώνεται ανάμεσα στην επιφάνεια και την ακίδα, διαφέρει από πείραμα σε πείραμα, επειδή τα μόρια του ινωδογόνου έχουν τη δυνατότητα να συνδεθούν σε τυχαία σημεία της ακίδας μέσω μίας από τις πολλές διαφορετικές λυσίνες, τις οποίες διαθέτουν. Εντούτοις, η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της κατανομής, η οποία υπολογίστηκε ίση με $95 \pm 44 \text{ nm}$, μπορεί να οδηγήσει σε δύο χρήσιμα συμπεράσματα. Πρώτον, επιβεβαιώνεται ότι τα καταγεγραμμένα συμβάντα αφορούν αποκολλήσεις μορίων ινωδογόνου από την επιφάνεια και όχι αλυσίδων PEG, καθώς οι τελευταίες έχουν πολύ μικρότερο μήκος. Δεύτερον, τα μόρια του ινωδογόνου φαίνεται να δεσμεύονται ανάμεσα στην ακίδα και την επιφάνεια μέσω των άκρων τους ή διαφορετικά το τμήμα τους, το οποίο φορτίζεται ανάμεσα στην ακίδα και την επιφάνεια, επιμηκύνεται αρκετά πέρα από το φυσικό του μήκος (Boukari et al. 2006). Εξάλλου, ύστερα από σύγκριση της παραπάνω μέσης τιμής με την αντίστοιχη, η οποία υπολογίστηκε από τα πειράματα με τις τροποποιημένες επιφάνειες ($70 \pm 20 \text{ nm}$ για 44 συμβάντα αποκόλλησης σε 2 διαφορετικά δείγματα) προκύπτει ότι τα τμήματα της πρωτεΐνης, τα οποία τεντώνονται πριν την αποκόλληση είναι κατά μέσο όρο μικρότερου μήκους με τη δεύτερη τεχνική. Αν και η διαφορά των δύο μέσων όρων δεν είναι στατιστικά σημαντική (έλεγχος με την κατανομή t-Student με θεώρηση ίσων διακυμάνσεων), η παρατήρηση αυτή αποτελεί μια ένδειξη, ότι τα μόρια του ινωδογόνου σχηματίζουν πολλαπλούς δεσμούς με το υπόστρωμα, όταν επιχειρείται η σύνδεσή τους σε τροποποιημένες επιφάνειες.

Για την περαιτέρω διερεύνηση των τμημάτων με τα οποία το ινωδογόνο προσκολλάται στην επιφάνεια του γυαλιού, είναι απαραίτητο να εξεταστούν μετρήσεις ληφθείσες με μία μοναδική ακίδα. Σε αυτή την περίπτωση η εμφανιζόμενη διακύμανση στις μετρήσεις της απόστασης αποκόλλησης οφείλεται αποκλειστικά στην προσκόλληση του ινωδογόνου στην επιφάνεια μέσω διαφορετικών τμημάτων του κάθε φορά, καθώς η θέση αγκίστρωσης του πρωτεϊνικού μορίου στην ακίδα παραμένει ίδια για όλες τις μετρήσεις (με σπάνια εξαίρεση το ενδεχόμενο οι μετρήσεις να

αφορούν περισσότερα του ενός δεσμευμένα μόρια). Στο Σχήμα 4.30β παρουσιάζεται η κατανομή των αποστάσεων των σημείων αποκόλλησης από το σημείο επαφής ακίδας-επιφάνειας, όπως μετρήθηκαν με μία μόνο ακίδα. Η διασπορά των πειραματικών μετρήσεων (υπολογιζόμενη τυπική απόκλιση=27nm) φανερώνει ότι η προσκόλληση του ινωδογόνου στην επιφάνεια του γυαλιού έχει χαρακτήρα μη ειδικό, κάτι το οποίο ήταν αναμενόμενο, αφού οι δυνάμεις αλληλεπίδρασης είναι φυσικές, δηλαδή ηλεκτροστατικές, van der Waals, υδροφοβικότητας ή προερχόμενες από δεσμούς υδρογόνου.

Σχήμα 4.30. Κατανομή των αποστάσεων των σημείων αποκόλλησης από το σημείο επαφής ακίδας-επιφάνειας (α) για το σύνολο των συμβάντων αποκόλλησης μεμονωμένων μορίων ινωδογόνου από την επιφάνεια και (β) για τα συμβάντα, τα οποία καταγράφηκαν με μία συγκεκριμένη ακίδα. Η γραμμή αναπαριστά την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων από την κανονική κατανομή.

Η μη ειδικότητα της αλληλεπίδρασης του ινωδογόνου με την επιφάνεια αντανακλάται και στη διασπορά των μετρήσεων αντοχής του δεσμού πρωτεΐνης-υποστρώματος. Υπογραμμίζεται ότι για τον υπολογισμό της μέσης τιμής της δύναμης αποκόλλησης, σε αντίθεση με τον υπολογισμό της απόστασης αποκόλλησης, μπορούν να συνεκτιμηθούν πειραματικά αποτελέσματα από περισσότερες της μίας ακίδες, αφού η μόνη παράμετρος διαφορετικότητας, η σταθερά ελατηρίου του προβόλου, λαμβάνεται υπόψη στην επεξεργασία των σχετικών μετρήσεων. Ιδιαίτερη σημασία παρόλα αυτά, πρέπει να δοθεί στην ταχύτητα φόρτισης του δεσμού κατά τη στιγμή της αποκόλλησης, για λόγους, οι οποίοι θα περιγραφούν αναλυτικά στην επόμενη ενότητα. Προς το παρόν περιοριζόμαστε στην παρουσίαση της κατανομής της δύναμης αποκόλλησης, όταν η ακίδα

απομακρύνεται με ταχύτητα 100nm/s (Σχήμα 4.31α). Η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση, η οποία υπολογίζεται από αυτή την κατανομή, είναι 545 ± 475 pN και αφορά συνολικά 90 συμβάντα αποκόλλησης, τα οποία καταγράφηκαν με 8 διαφορετικές ακίδες. Η μέση τιμή και τυπική απόκλιση, η οποία υπολογίστηκε από τα πειράματα με το ινωδογόνο δεσμευμένο στην επιφάνεια των καλυπτρίδων γυαλιού, ήταν αντίστοιχα 406 ± 330 pN (Σχήμα 4.31β). Η διαφορά μεταξύ των δύο μέσων τιμών δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική, γεγονός το οποίο αποδεικνύει τελικά ότι οι δύο μέθοδοι δέσμευσης του ινωδογόνου είναι εξίσου αποτελεσματικές για τη μέτρηση της αντοχής των δεσμών, τους οποίους σχηματίζει με την επιφάνεια.

Σχήμα 4.31. Κατανομή των δυνάμεων αποκόλλησης μεμονωμένων μορίων ινωδογόνου, όταν η πρωτεΐνη έχει προσδεθεί (α) στην ακίδα ή (β) στην επιφάνεια των δειγμάτων γυαλιού. Η κατανομή του σχήματος (α) προήλθε από συνολικά 90 συμβάντα αποκόλλησης, τα οποία καταγράφηκαν με 8 διαφορετικές ακίδες, ενώ του (β) από 44 συμβάντα αποκόλλησης, τα οποία καταγράφηκαν σε δύο διαφορετικά δείγματα.

Αναφορές στη βιβλιογραφία σχετικές με την αντοχή των μη ειδικών δεσμών του ινωδογόνου με τεχνητές επιφάνειες υπάρχουν λίγες. Δύο από αυτές (Gergely et al. 2000, Hemmerle et al. 1999) παρουσιάζουν πειραματικά στοιχεία για διάφορες ταχύτητες απομάκρυνσης της ακίδας από την επιφάνεια ή διάφορους χρόνους παραμονής της ακίδας σε επαφή με την επιφάνεια, τα οποία υποστηρίζουν ότι η δύναμη αποκόλλησης του ινωδογόνου από την επιφάνεια καθαρού πυριτίου βρίσκεται στο διάστημα 300-1200 pN. Σύμφωνα με μία άλλη εργασία (Boukari et al. 2006) η αντοχή των δεσμών του ινωδογόνου με υποστρώματα τιτανίου ή φωσφορικού ασβεστίου κυμαίνεται στο διάστημα 150-800 pN και 150-200 pN αντίστοιχα για χρόνους αλληλεπίδρασης μεταξύ 0.1-10 s. Η σύγκριση ωστόσο, αυτών των μεγεθών με τα δικά μας αποτελέσματα δεν έχει

ουσιαστική αξία, καθώς για τα εν λόγω πειράματα το ινωδογόνο είχε ακινητοποιηθεί στις ακίδες μέσω προσρόφησης με φυσικές δυνάμεις και συνεπώς, η αλληλεπίδραση ανεξάρτητων μορίων με την επιφάνεια αμφισβητείται έντονα.

Πρέπει εντούτοις να τονιστεί, ότι οι μετρηθείσες στα πειράματά μας δυνάμεις, αν και αντιστοιχούν σε ανεξάρτητα συμβάντα αποκόλλησης, εκφράζουν την αθροιστική αντοχή των δεσμών, τους οποίους σχηματίζουν ομάδες αμινοξέων με το υπόστρωμα και οποίοι πρέπει να είναι αρκετοί στον αριθμό, ακόμα και όταν η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα μέσω συγκεκριμένων τμημάτων της (Boukari et al. 2006). Η εκτίμηση της αντοχής καθενός από αυτούς τους παράλληλους δεσμούς θα μπορούσε να στηριχτεί στην απλή υπόθεση ότι όλοι οι δεσμοί έχουν την ίδια αντοχή και η ασκούμενη δύναμη ισοκατανέμεται σε αυτούς με συνέπεια, μόλις ένας από αυτούς τους δεσμούς διαρρηχτεί, το αυξημένο φορτίο στους εναπομείναντες δεσμούς να προκαλέσει την άμεση ρήξη τους (Ratto et al. 2006). Σε αυτή την περίπτωση η αντοχή κάθε δεσμού προκύπτει από τη διαίρεση της μετρηθείσας δύναμης αποκόλλησης με το θεωρούμενο πλήθος των πρωτεϊνικών ομάδων αλληλεπίδρασης με την επιφάνεια. Σύμφωνα με το Morrissey και τους συνεργάτες του (Morrissey & Stromberg 1974) το πλήθος αυτό εκτιμάται κατά μέσο όρο 440 ομάδες ανά μόριο ινωδογόνου, οπότε η δύναμη αποκόλλησης κάθε τέτοιας ομάδας από την επιφάνεια των καλυπτρίδων γυαλιού υπολογίζεται σε $545\text{pN}/440=1.2\text{pN}$.

Η εγκυρότητα όμως, του προαναφερθέντος τρόπου υπολογισμού της δύναμης αποκόλλησης μιας ανεξάρτητης χημικής ομάδας από το υπόστρωμα αμφισβητείται για δύο λόγους, επειδή αφ'ενός ο αριθμός των ομάδων, οι οποίες αλληλεπιδρούν με την επιφάνεια είναι μέγεθος στοχαστικό και αφ'ετέρου η αντοχή των δεσμών εξαρτάται από το ρυθμό φόρτισής τους, όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια. Για το λόγο αυτό ο Williams (Williams 2003) πρότεινε δύο πιο σύνθετα μοντέλα για τη φόρτιση πολλαπλών δεσμών, οι οποίοι είναι σταθερά συνδεδεμένοι μεταξύ τους, δηλαδή δεν προκαλούν τη σταδιακή ανάπτυξη κάποιας ελαστικής αλυσίδας κατά τη διάσπασή τους. Αυτά είναι το μοντέλο των παράλληλων δεσμών, στο οποίο η δύναμη φόρτισης κατανέμεται ταυτόχρονα ανάμεσα σε N δεσμούς, και το μοντέλο του φερμουάρ, στο οποίο κάθε δεσμός φορτίζεται αφού διασπαστεί ο προηγούμενός του.

Για το μοντέλο των παράλληλων δεσμών η συνολική δύναμη ρήξης, F_n , N δεσμών υπολογίζεται από τη σχέση:

$$F_n = NF_1 + NF_\theta \ln\left(\frac{F_\theta}{F_n}\right) \quad (4.8)$$

αν F_1 είναι η αντοχή ενός μόνο δεσμού και $F_b = k_B T / x_b$, όπου x_b είναι το μήκος μετάβασης του δεσμού, ενώ για το μοντέλο του φερμουάρ η αντίστοιχη συνολική δύναμη F_ϕ δίνεται από τη σχέση:

$$F_\phi = F_1 + F_b \ln(N) \quad (4.9).$$

Η πρακτική δυσκολία στην εφαρμογή των δύο παραπάνω μοντέλων είναι ο προσδιορισμός του μήκους μετάβασης του δεσμού, x_b . Όπως θα φανεί και στο επόμενο κεφάλαιο, οι προσπάθειες εκτίμησης του μήκους x_b μέσω μετρήσεων, σαν αυτές των πειραμάτων μας, καταλήγουν σε αποτελέσματα, τα οποία περιγράφουν αθροιστικά το σύνολο των σχηματισμένων δεσμών μεταξύ της πρωτεΐνης και του υποστρώματος.

4.5.2 Έλεγχος της δυναμικής των δεσμών ινωδογόνου-επιφάνειας με τη θεωρία των Bell-Evans

Ο Bell (Bell 1978) και λίγο αργότερα οι Evans και Ritchie (Evans & Ritchie 1997, Evans 1999) ήταν οι πρώτοι, οι οποίοι υποστήριξαν την υπόθεση ότι η αντοχή των αντιστρεπτών δεσμών εξαρτάται όχι μόνο από την ενθαλπία τους αλλά και από την ταχύτητα διάσπασής τους, την ταχύτητα δηλαδή με την οποία, τα συνδεδεμένα μόρια τείνουν να αποκολληθούν. Η πρακτική αξία της θεωρίας αυτής είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έμμεσο υπολογισμό της μέσης διάρκειας ζωής ενός τύπου δεσμού μέσω της μέτρησης της δύναμης διάσπασής του σε διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισής του. Έτσι, έχοντας μετρήσει τη δύναμη αποκόλλησης ανεξάρτητων μορίων ινωδογόνου από την επιφάνεια γυαλιού σε διάφορες ταχύτητες απομάκρυνσης της ακίδας από την επιφάνεια, επιχειρήσαμε να εξετάσουμε αν η θεωρία των Bell και Evans ισχύει και στην περίπτωση των διεπιφανειακών δεσμών πρωτεΐνης-υποστρώματος.

Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή δύο συνδεδεμένα μόρια θα αποκολληθούν από μόνα τους λόγω της θερμικής τους ενέργειας, χωρίς την εφαρμογή οποιασδήποτε δύναμης στο δεσμό τους, μετά την πάροδο χρόνου τ_o ^{xiv}. Ο χρόνος τ_o προσδιορίζεται από τη σχέση:

$$\tau_o = \tau_{\text{θερμ}} \exp\left(\frac{E_b}{k_B T}\right) \quad (4.9)$$

όπου $\tau_{\text{θερμ}}$ είναι ο αντίστροφος της φυσικής συχνότητας ταλάντωσης του δεσμού λόγω θερμικής ενέργειας και E_b το ενεργειακό φράγμα για την αποδέσμευση των μορίων ή αλλιώς η ενεργειακή

^{xiv} Πιο σωστό θα ήταν να μιλούσαμε για υψηλή πιθανότητα αποκόλλησης μετά από χρόνο τ_o , αφού το σχετικό φαινόμενο είναι θερμικά ελεγχόμενο.

διαφορά μεταξύ της ελεύθερης κατάστασης και της κατάστασης σύνδεσης (Bhushan 2004). Σημειώνεται ότι τα φαινόμενα αποκόλλησης, τα οποία περιγράφονται εδώ, αφορούν αντιστρεπτούς μοριακούς δεσμούς και όχι το σύνολο των συνδέσεων, οι οποίες για παράδειγμα συγκρατούν ένα κύτταρο προσδεμένο σε μία επιφάνεια. Η αποκόλληση ενός κυττάρου, χωρίς την άσκηση δύναμης, είναι πρακτικά αδύνατη, επειδή οι δεσμοί, οι οποίοι διαρρηγνύονται σε τυχαίες χρονικές στιγμές, έχουν τη δυνατότητα να αποκατασταθούν ενώ η ταυτόχρονη ρήξη όλων των δεσμών με το υπόστρωμα είναι πιθανολογικά δύσκολη.

Για να αποκολληθούν δύο συνδεδεμένα μόρια σε χρόνο μικρότερο από τ_o χρειάζεται να ασκηθεί κάποια δύναμη F στο δεσμό τους. Η δύναμη αυτή θα μειώσει το ενεργειακό φράγμα σε $E_b - x_\beta F$, όπου x_β είναι η απόσταση του ενεργειακού φράγματος από το ενεργειακό ελάχιστο κατά τη διεύθυνση της ασκούμενης δύναμης, και το χρόνο ζωής του δεσμού, τ_F , σε:

$$\tau_F = \tau_{\theta\epsilon\rho\mu} \exp\left(\frac{E_b - x_\beta F}{k_B T}\right) = \tau_o \exp\left(-\frac{x_\beta F}{k_B T}\right) \quad (4.10).$$

Η απόσταση x_β εκφράζει τη διαφορά της απόστασης των δύο μορίων στην ελεύθερη κατάσταση από την απόστασή τους στην κατάσταση δέσμευσης (Bonanni et al. 2005) και περιγράφει το μήκος μετάβασης του δεσμού (transition distance) (Σχήμα 4.32). Όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος x_β , τόσο πιο ομαλή είναι η διαδικασία ρήξης του δεσμού και τόσο μικρότερη είναι η αναγκαία για αυτό δύναμη (Janshoff et al. 2000).

Σχήμα 4.32. Σχηματική αναπαράσταση ενεργειακού πεδίου μοριακού δεσμού. Με E_b συμβολίζεται η ενέργεια του δεσμού, με x_β το μήκος μετάβασης και με F η δύναμη, η οποία τείνει να σπάσει το δεσμό μειώνοντας το ενεργειακό φράγμα E_b . Με τη διακεκομμένη γραμμή υπό κλίση παρουσιάζεται η διεύθυνση εφαρμογής της δύναμης F .

Αν ο αναγκαίος για την αποκόλληση χρόνος τ_F αντιστραφεί, ο ρυθμός διάσπασης των δεσμών, $k_{\delta\iota\alpha\sigma\pi}$ υπολογίζεται μέσω της σχέσης:

$$k_{\delta\iota\alpha\sigma\pi} = k_{\delta\iota\alpha\sigma\pi(o)} \exp\left(\frac{x_\beta F}{k_B T}\right) \quad (4.11)$$

όπου $k_{\delta\alpha\sigma\pi(0)}$ είναι ο φυσικός ρυθμός διάσπασης των δεσμών, όταν ασκείται μηδενική δύναμη, ο οποίος ισούται με τον αντίστροφο του τ_0 . Τότε, η πιθανότητα p διάσπασης ενός δεσμού μετά από χρόνο t μπορεί να υπολογιστεί με τη βοήθεια της εξίσωσης Arrhenius (Hanke & Kreuzer 2006):

$$p_{\delta\alpha\sigma\pi} = 1 - \exp\left(-\int_0^t k_{\delta\alpha\sigma\pi}(t') dt'\right) = 1 - \exp\left(-\int_0^t k_{\delta\alpha\sigma\pi(0)} \exp\left(\frac{x_\theta F(t')}{k_B T}\right) dt'\right) \quad (4.12).$$

Όταν η ρήξη των δεσμών εξετάζεται με το AFM, η ασκούμενη δύναμη F δεν είναι σταθερή, αλλά αυξάνεται μη γραμμικά με το χρόνο σύμφωνα με την εξίσωση:

$$F(t) = r_F(t) \cdot t = v \cdot k_{\text{συνολ}}(t) \cdot t \quad (4.13)$$

όπου r_F είναι ο ρυθμός μεταβολής της ασκούμενης δύναμης συναρτήσει του χρόνου (ρυθμός φόρτισης του δεσμού), v η ταχύτητα απομάκρυνσης της ακίδας και $k_{\text{συνολ}}$ η συνολική δυσκαμψία του συστήματος πρόβολος-φορτιζόμενο βιομόριο. Η τελευταία, όπως αναφέρθηκε ήδη (βλ. περιγραφή μοντέλου WLC) εξαρτάται από την επιμήκυνση του φορτιζόμενου μορίου και συνεπώς από το χρόνο. Για λόγους απλότητας όμως, εδώ θα θεωρηθεί σταθερή και ίση με τη δυσκαμψία του συστήματος λίγο πριν τη ρήξη του δεσμού (Εξισώσεις 4.6 και 4.7), οπότε η Εξίσωση 4.13 γράφεται:

$$F(t) = r_F \cdot t = v \cdot k_{\text{συνολ}} \cdot t \quad (4.14)$$

Αντικαθιστώντας στην Εξίσωση 4.12 τη δύναμη με το γινόμενο $r_F \cdot t$ και ολοκληρώνοντας ως προς το χρόνο προκύπτει ότι η πιθανότητα διάσπασης του δεσμού εξαρτάται από την εφαρμοζόμενη τελική δύναμη F σύμφωνα με τη σχέση:

$$p_{\delta\alpha\sigma\pi} = 1 - \exp\left(\frac{k_{\delta\alpha\sigma\pi(0)} k_B T}{r_F x_\theta} \left(1 - \exp\left(\frac{F x_\theta}{k_B T}\right)\right)\right) \quad (4.15)$$

Παραγωγή της Εξίσωσης 4.15 ως προς τη δύναμη F , οδηγεί στην μαθηματική έκφραση της συνάρτησης πυκνότητας πιθανότητας για τη ρήξη ενός δεσμού συναρτήσει της δύναμης φόρτισής του (Li et al. 2003):

$$\begin{aligned} w(F) &= \frac{dp_{\delta\alpha\sigma\pi}}{dF} = \frac{d}{dF} \left(1 - \exp\left(\frac{k_{\delta\alpha\sigma\pi(0)} k_B T}{r_F x_\theta} \left(1 - \exp\left(\frac{F x_\theta}{k_B T}\right)\right)\right)\right) = \\ &= \frac{k_{\delta\alpha\sigma\pi(0)}}{r_F} \exp\left(\frac{F x_\theta}{k_B T}\right) \exp\left(\frac{k_{\delta\alpha\sigma\pi(0)} k_B T}{r_F x_\theta} \left(1 - \exp\left(\frac{F x_\theta}{k_B T}\right)\right)\right) \end{aligned} \quad (4.16)$$

Το μέγιστο αυτής της κατανομής φανερώνει τη δύναμη, στην οποία υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα να σπάσει ο δεσμός, όταν ο ρυθμός φόρτισης είναι r_F , και η οποία υπολογίζεται ως εξής:

$$\begin{aligned} \left(\frac{dw(F)}{dF} \right)_{F_m} = 0 &\Rightarrow \frac{d}{dF} \left[\frac{k_{\delta\alpha\sigma\pi(0)}}{r_F} \exp\left(\frac{F x_\beta}{k_B T}\right) \exp\left(\frac{k_{\delta\alpha\sigma\pi(0)} k_B T}{r_F x_\beta} \left(1 - \exp\left(\frac{F x_\beta}{k_B T}\right)\right)\right) \right]_{F_m} = 0 \Rightarrow \\ 1 - \frac{k_{\delta\alpha\sigma\pi(0)} k_B T}{r_F x_\beta} \exp\left(\frac{F_m x_\beta}{k_B T}\right) &= 0 \Rightarrow F_m = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln\left(\frac{r_F x_\beta}{k_{\delta\alpha\sigma\pi(0)} k_B T}\right) \Rightarrow \\ F_m &= \frac{k_B T}{x_\beta} \ln\left(\frac{x_\beta}{k_{\delta\alpha\sigma\pi(0)} k_B T}\right) + \frac{k_B T}{x_\beta} \ln r_F \end{aligned} \quad (4.17)$$

Σύμφωνα με την τελευταία εξίσωση η δύναμη F_m , στην οποία η πιθανότητα να σπάσει ο δεσμός είναι μέγιστη, αυξάνει καθώς αυξάνει ο ρυθμός φόρτισης r_F του δεσμού και μάλιστα είναι γραμμική συνάρτηση του φυσικού του λογάριθμου. Αυτό σημαίνει ότι, αν σε ένα διάγραμμα παρασταθεί η δύναμη F_m συναρτήσει του $\ln r_F$, τότε η ευθεία προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων θα έχει κλίση $k_B T/x_\beta$ και θα τέμνει τον κατακόρυφο άξονα ($\ln r_F=0$) στο σημείο $(k_B T/x_\beta) \ln(x_\beta/k_{\delta\alpha\sigma\pi(0)} k_B T)$. Έτσι, από την κλίση μπορεί να υπολογιστεί το μήκος μετάβασης x_β και στη συνέχεια από το σημείο τομής με τον κατακόρυφο άξονα η φυσική συχνότητα διάσπασης των δεσμών, $k_{\delta\alpha\sigma\pi(0)}$, όταν η ασκούμενη δύναμη είναι μηδενική.

Οι μετρήσεις της αντοχής των δεσμών, τους οποίους σχημάτισαν ανεξάρτητα μόρια ινωδογόνου με την επιφάνεια του γυαλιού, έδωσαν τα αποτελέσματα που φαίνονται στον Πίνακα 4.4 για κάθε μία από τις επιλεγμένες μέσες τιμές ρυθμού φόρτισης. Πρέπει να τονιστεί ότι αν και η ταχύτητα μετακίνησης της ακίδας μεταβαλλόταν μεταξύ συγκεκριμένων τιμών, οι μετρηθέντες ρυθμοί φόρτισης των δεσμών παρουσίαζαν μεγαλύτερη διακύμανση, επειδή εξαρτιόνταν από την εκάστοτε δυσκαμψία του φορτιζόμενου συμπλέγματος προβόλου-PEG-ινωδογόνου, με συνέπεια να είναι απαραίτητη η ομαδοποίηση των μετρήσεων γύρω από πέντε κεντρικές τιμές. Σημειώνεται επίσης, ότι η χρήση των μέσων τιμών, οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.4, για την επαλήθευση της σχέσης 4.17 αποφεύγεται καθώς η συσχέτισή τους με το ρυθμό φόρτισης ακολουθεί μια μη λογαριθμική έκφραση (Gergely et al. 2000) και η αντικατάστασή τους στην Εξίσωση 4.17 θα οδηγούσε σε υπερεκτίμηση της φυσικής συχνότητας διάσπασης κατά 1.7 (Williams 2003).

Πίνακας 4.4. Αποτελέσματα μετρήσεων αντοχής δεσμών ινωδογόνου-επιφάνειας γυαλιού ομαδοποιημένα ανάλογα με το ρυθμό φόρτισής τους.

ρυθμός φόρτισης (nN/s)	Πλήθος συμβάντων αποκόλλησης	Δύναμη αποκόλλησης με μέγιστη συχνότητα εμφάνισης (nN)	Μέση δύναμη αποκόλλησης (nN)	Τυπική απόκλιση μετρήσεων (nN)
10	52	0.254	0.319	0.237
50	114	0.305	0.477	0.374
100	32	0.679	0.936	0.879
200	13	0.390	1.711	1.490
1100	28	0.324	1.188	1.380

Αντίθετα, οι δυνάμεις με τη μέγιστη συχνότητα εμφάνισης σε κάθε ρυθμό φόρτισης μπορούν να παρασταθούν γραφικά συναρτήσει του φυσικού λογάριθμου αυτού του ρυθμού και τα σημεία, τα οποία προκύπτουν, να προσαρμοστούν με μία ευθεία της μορφής της Εξίσωσης 4.17. Έτσι, από τα χαρακτηριστικά της ευθείας, η οποία προσαρμόζεται στις πειραματικές μετρήσεις στο Σχήμα 4.33, υπολογίζονται οι τιμές 232nm και $0.0017s^{-1}$ για το μήκος μετάβασης και τη φυσική συχνότητα διάσπασης του δεσμού ινωδογόνου-επιφάνειας. Συγκρίνοντας τις τιμές αυτές με εκείνες, οι οποίες έχουν προσδιοριστεί για άλλα αλληλεπιδρώντα βιομόρια (Πίνακας 4.5), παρατηρούμε ότι ο φυσικός ρυθμός διάσπασης είναι σχετικά μικρός, ενώ το μήκος μετάβασης αρκετά μεγάλο. Αν και οι τιμές του Πίνακα 4.5 αφορούν ειδικές αλληλεπιδράσεις προσδετών-υποδοχέων και η σύγκριση με το σύστημα ινωδογόνου-γυαλιού είναι παρακινδυνευμένη, οι υπολογισθείσες από τα πειράματά μας τιμές, ειδικά για το x_b , εξακολουθούν να φαίνονται μη ρεαλιστικές. Η αιτία υπολογισμού της ακραίας τιμής για το x_b εντοπίζεται στην πολύ μικρή κλίση της ευθείας προσαρμογής των δεδομένων δύναμης στο Σχήμα 4.33. Ενώ η πιθανότερη δύναμη ρήξης του δεσμού φαίνεται να αυξάνει σημαντικά μεταξύ των 50 και 100nN/s, για τους υψηλότερους ρυθμούς φόρτισης, 200 και 1100nN/s, επανέρχεται στα ίδια περίπου επίπεδα με αυτά, τα οποία μετρήθηκαν για ρυθμούς φόρτισης 10 και 50nN/s.

Σχήμα 4.33. Οι πιθανότερες δυνάμεις αποκόλλησης μορίων ινωδογόνου συναρτήσει του φυσικού λογαρίθμου του ρυθμού φόρτισης r_f του δεσμού τους με την επιφάνεια (σε nN/s). Από την κλίση της ευθείας προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων εκτιμάται το μήκος μετάβασης του δεσμού ινωδογόνου-επιφάνειας ενώ από το σημείο τομής με τον κατακόρυφο άξονα ($\ln r_f=0$) η φυσική συχνότητα διάσπασής του.

Πίνακας 4.5. Μήκος μετάβασης και φυσική συχνότητα διάσπασής δεσμού για διάφορα βιομόρια, τα οποία αλληλεπιδρούν με ειδικό τρόπο.

Μελετώμενο σύστημα	Φυσικός ρυθμός διάσπασης δεσμού $k_{\text{dισπ(σ)}}$ (s^{-1})	Μήκος μετάβασης x_β (nm)	Αναφορά
Αζουρίνη-κυτόχρωμα C551	14	0.14	(Bonanni et al. 2005)
P-σελεκτίνη-συνδετική της γλυκοπρωτεΐνη	0.022	0.25	(Fritz et al. 1998)
Αλβουμίνη-αντι-αλβουμίνη	$6.7 \cdot 10^{-4}$	0.23	(Hinterdorfer et al. 1996)
Αβιδίνη-βιοτίνη	0.1	0.3	(De Paris et al. 2000)
Ινωδογόνο-ιντεγρίνη $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$	$0.2/10^{-8}$	0.8/2	(Lee & Marchant 2001)

Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα ότι η ικανότητα της θεωρίας των Bell και Evans να περιγράψει την προσκόλληση του ινωδογόνου στο γυαλί είναι περιορισμένη. Ο Gergely και

οι συνεργάτες του (Gergely et al. 2000) κατέληξαν στο ακριβώς αντίθετο συμπέρασμα καταφέροντας να υπολογίσουν τη φυσική συχνότητα διάσπασης του δεσμού ινωδογόνου-SiO₂ μεταξύ 0.02 και 0.66s⁻¹ και το μήκος μετάβασης του σχετικού δεσμού ίσο με 0.02nm. Η αξιοπιστία όμως, της μελέτης τους για την περιγραφή της αλληλεπίδρασης ανεξάρτητων πρωτεϊνικών μορίων με το υπόστρωμα αμφισβητείται, καθώς οι μετρήσεις τους αφορούσαν συμβάντα ταυτόχρονης αποκόλλησης περισσότερων του ενός μορίων από την επιφάνεια.

Εξάλλου δεν είναι η πρώτη φορά, που η θεωρία των Bell και Evans αδυνατεί να περιγράψει τη δυναμική συμπεριφορά των δεσμών, στους οποίους εμπλέκεται το ινωδογόνο. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν ο Litvinov και οι συνεργάτες του (Litvinov et al. 2005), ύστερα από μελέτη των δεσμών του ινωδογόνου με την ιντεγκρίνη α_{IIb}β₃ λόγω της μεταβλητής κατάστασής τους, σε αντίθεση βέβαια με το Lee και τους συνεργάτες του (Lee & Marchant 2001), οι οποίοι κατάφεραν να περιγράψουν δύο διαφορετικές καταστάσεις του ίδιου δεσμού με τις σταθερές $x_\beta=0.8\text{nm}$, $k_{\text{διασπ(ο)}}=0.2\text{s}^{-1}$ και $x_\beta=2\text{nm}$, $k_{\text{διασπ(ο)}}=10^{-8}\text{s}^{-1}$ αντίστοιχα.

Πιθανός λόγος για την αδυναμία περιγραφής των πειραματικών μας αποτελεσμάτων από τη θεωρία των Bell και Evans είναι ο τρόπος φόρτισης του δεσμού ινωδογόνου-υποστρώματος, ο οποίος πραγματοποιείται μέσω της ίδιας της αλυσίδας του πρωτεϊνικού μορίου. Δεν μπορεί δηλαδή, να αποκλειστεί το ενδεχόμενο, στις υψηλές ταχύτητες απομάκρυνσης της ακίδας από το υπόστρωμα η αλυσίδα του ινωδογόνου να μην προλαβαίνει να αναπτυχθεί αυξάνοντας το μήκος της με αποτέλεσμα να εμφανίζονται ενδομοριακές ρήξεις, οι οποίες παρερμηνεύονται ως διάσπαση δεσμών με την επιφάνεια.

Σε μεγάλο βαθμό όμως, η δυσκολία προσαρμογής των πειραματικών μετρήσεων από τη θεωρία των Bell και Evans πρέπει να οφείλεται στο ότι οι μετρηθείσες δυνάμεις δεν αντιστοιχούν σε μοναδικούς αλλά σε πολλαπλούς μοριακούς δεσμούς, οι οποίοι σχηματίζονται ανάμεσα στα αμινοξέα του ινωδογόνου και το υπόστρωμα. Η κατανομή του ασκούμενου από την ακίδα του AFM φορτίου μεταξύ αυτών των πολλαπλών δεσμών, οι οποίοι διαρρηγνύονται στοχαστικά, επιδρά με μη προσδιορισμένο τρόπο στο ρυθμό φόρτισής τους, ακόμα και για σταθερή ταχύτητα απομάκρυνσης της ακίδας (Hemmerle et al. 2003, Williams 2003). Συνεπώς, ο υπολογισμός των χαρακτηριστικών μεγεθών μήκους μετάβασης και φυσικής συχνότητας διάσπασης του καθενός από αυτούς τους δεσμούς καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολη.

Αν η αντοχή ενός μοναδικού δεσμού αμινοξέος-επιφάνειας, F_1 , ήταν γνωστή και υποθέταμε ότι N ακριβώς τέτοιοι δεσμοί δημιουργούνται κάθε φορά, που ένα μόριο ινωδογόνου αλληλεπιδρά με την επιφάνεια, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μία από τις Εξισώσεις 4.8 ή 4.9 για τον

υπολογισμό του μήκους του δεσμού x_B . Η πειραματική μέτρηση ωστόσο, της αντοχής του μοναδικού δεσμού F_1 με τη χρήση ακέραιων μορίων και του AFM είναι αδύνατη, γιατί κάθε φορά, που ένα μόριο πρωτεΐνης έρχεται σε επαφή με το υπόστρωμα, σχηματίζονται πολλοί δεσμοί ταυτόχρονα, οι οποίοι δεν διακρίνονται ο ένας από τον άλλο κατά την αποκόλληση του μορίου, επειδή ανάμεσα τους σπάνια εμφανίζεται ανάπτυξη της πρωτεϊνικής αλυσίδας. Έτσι, η μέτρηση της μη ειδικής δύναμης αποκόλλησης από το υπόστρωμα απομονωμένων ομάδων του ινωδογόνου προβάλλει ως πρόκληση για την συγκέντρωση πληροφοριών, οι οποίες θα οδηγήσουν στην πληρέστερη περιγραφή της αλληλεπίδρασης ολόκληρων μορίων της πρωτεΐνης με τεχνητές επιφάνειες.

4.6 Φυσική ερμηνεία συμβάντων αποκόλλησης

Για τη μέτρηση της δύναμης αποκόλλησης μεμονωμένων μορίων ινωδογόνου από την επιφάνεια του γυαλιού, τα πρωτεϊνικά μόρια χρειάστηκε να προσδεθούν στις ακίδες του AFM, ύστερα από κατάλληλη χημική τροποποίηση των τελευταίων, μέσω ενός συνδέτη PEG. Η τεχνική αυτή ωστόσο, δεν στάθηκε ικανή να αποκλείσει την καταγραφή πολλαπλών συμβάντων αποκόλλησης της πρωτεΐνης κατά την απομάκρυνση των ακίδων από το υπόστρωμα (Σχήμα 4.26δ). Τέτοιου είδους πολλαπλά συμβάντα μπορεί να αποδοθούν στην αποκόλληση περισσότερων του ενός μορίων ινωδογόνου, τα οποία είχαν προσκολληθεί παράλληλα στην επιφάνεια μέσω ενός μόνο τμήματός τους, ή στην αποκόλληση ενός μόνο μορίου, το οποίο συνδεόταν με το υπόστρωμα μέσω περισσότερων του ενός τμημάτων του, ή ακόμα και σε συνδυασμό των παραπάνω δύο ενδεχομένων.

Στο κεφάλαιο αυτό θα παρουσιαστεί μια προσπάθεια ερμηνείας των πολλαπλών γεγονότων αποκόλλησης, με στόχο την εύκολη αξιολόγηση των μετρούμενων δυνάμεων μέσω της αναγνώρισης του τρόπου, με τον οποίο τα μόρια της πρωτεΐνης συνδέονται με την επιφάνεια σε κάθε μία από τις καταγραφόμενες καμπύλες. Η μοντελοποίηση αυτή είναι εφικτή, επειδή το μόριο του ινωδογόνου έχει διακριτό μήκος και συνεπώς η αποκόλληση διαφορετικών τμημάτων ενός μορίου ή διαφορετικών μορίων μπορεί να εντοπιστεί στις καμπύλες απομάκρυνσης λόγω της τάνυσης της μοριακής αλυσίδας. Εκτός από την απόσταση ανάμεσα στα συμβάντα αποκόλλησης, ως κριτήρια για το χαρακτηρισμό τους χρησιμοποιήθηκαν το σχετικό μέγεθος της μετρούμενης δύναμης για κάθε συμβάν καθώς και η δυσκαμψία της πρωτεϊνικής αλυσίδας, όπως υπολογίζεται μέσω της προσαρμογής των πειραματικών καμπύλων τάνυσης από το μοντέλο WLC (βλ. Κεφ. 4.4.3).

Η ερμηνεία των πειραματικών καμπύλων, οι οποίες παρουσίαζαν πολλαπλές αποκολλήσεις, βασίστηκε σε δύο κύριες υποθέσεις-θεωρήσεις: i) τη θεώρηση της διαδοχικής διάσπασης δεσμών της ίδιας πρωτεϊνικής αλυσίδας με την επιφάνεια και ii) τη θεώρηση των παράλληλων πρωτεϊνικών μορίων. Προτού παρουσιαστούν αναλυτικά τα δύο μοντέλα, τα οποία προκύπτουν από αυτές τις θεωρήσεις, κρίνεται απαραίτητη η περιγραφή ενός ακόμα φαινομένου, το οποίο επιδρά στην μορφή των καμπύλων αποκόλλησης. Αυτό σχετίζεται με την ανάπτυξη της πολυπεπτιδικής αλυσίδας ύστερα από αποδιάταξη εσωτερικών δομών της, ανώτερης τάξης.

4.6.1 Αποδιάταξη δομών ανώτερης τάξης στην πρωτεϊνική αλυσίδα

Η παρουσίαση των πειραματικών δεδομένων του AFM με τη μορφή καμπύλων δύναμης-απόστασης συνεπάγεται ότι καμπύλες εκτεινόμενες κατά τον αρνητικό ημιάξονα των δυνάμεων αντιπροσωπεύουν κάμψη του προβόλου προς την επιφάνεια, καθώς η ακίδα απομακρύνεται από αυτή. Η κάμψη του προβόλου $z_{\text{προβ}}$ συνοδεύεται από τάνυση του μορίου, $x_{\text{μορίου}}$, το οποίο βρίσκεται δεσμευμένο ανάμεσα στην ακίδα και την επιφάνεια και μάλιστα ο λόγος της κάμψης του προβόλου προς την επιμήκυνση της μοριακής αλυσίδας είναι αντιστρόφως ανάλογος του πηλίκου των δυσκαμψιών τους:

$$\frac{z_{\text{προβ}}}{x_{\text{μορίου}}} = \frac{k_{\text{μορίου}}}{k_{\text{προβ}}} \quad (4.18)$$

εφόσον ο πρόβολος και το μόριο θεωρηθούν δύο ιδανικά ελατήρια συνδεδεμένα σε σειρά. Αυτό σημαίνει ότι όσο πιο εκτατό είναι το μόριο τόσο μικρότερη είναι η κάμψη του προβόλου. Η δύναμη ωστόσο, η οποία κάμπτε τον πρόβολο, είναι ίση με τη δύναμη, η οποία τεντώνει το μόριο:

$$F = k_{\text{προβ}} \cdot z_{\text{προβ}} = k_{\text{μορίου}} \cdot x_{\text{μορίου}} \quad (4.19)$$

και είναι αυτή, η οποία καταγράφεται στην καμπύλη του AFM για κάθε θέση της ακίδας ως προς την επιφάνεια.

Ειδικά για την περίπτωση του ινωδογόνου, το οποίο έχει δεσμευτεί στην ακίδα με τη σύνθετη τεταρτοταγή δομή του, η φόρτιση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, καθώς αυτή τεντώνεται ανάμεσα στην ακίδα και το υπόστρωμα, είναι δυνατό να προκαλέσει την ανάπτυξη των εσωτερικών δομών της, οι οποίες συγκρατούνται με ασθενείς δεσμούς, όπως για παράδειγμα δεσμούς υδρογόνου. Η αποδιάταξη αυτή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας προκαλεί χαλάρωση της φόρτισης, η οποία γίνεται αντιληπτή στα πειραματικά δεδομένα δύναμης-απόστασης ως μετακίνηση της καμπύλης σε μικρότερες δυνάμεις κάμψης (Rief et al. 1998)(Σχήμα 4.34).

Σχήμα 4.34. (α) Σχηματική αναπαράσταση αποδιάταξης εσωτερικής δομής της πρωτεϊνικής αλυσίδας καθώς η τελευταία τεντώνεται κατά την απομάκρυνση της ακίδας του AFM από την επιφάνεια. Η κάμψη του προβόλου $z_{\text{προβ}}$, όταν πολλαπλασιαστεί με τη σταθερά ελατηρίου του, δίνει το μέτρο της δύναμης, ενώ η επιμήκυνση της πρωτεΐνης την απόσταση ακίδας-επιφάνειας. (β) Μορφή καμπύλης δύναμης-απόστασης, η οποία απεικονίζει τα συμβάντα του σχήματος (α).

Στην πράξη είναι δυνατό να παρατηρηθούν διαδοχικά τέτοια ξεδιπλώματα της πρωτεϊνικής αλυσίδας, λόγω των οποίων η δύναμη φόρτισης μειώνεται διαδοχικά, καθώς η απόσταση της ακίδας από την επιφάνεια αυξάνει (Σχήμα 4.35). Χρειάζεται επομένως προσοχή, οι αποδιατάξεις να μην παρερμηνευτούν ως συμβάντα αποκόλλησης από την επιφάνεια και οι αντίστοιχες δυνάμεις να μην ληφθούν υπόψη στην ανάλυση της αντοχής των δεσμών πρωτεΐνης-επιφάνειας. Συνήθως, οι αποδιατάξεις συνοδεύονται από πολύ μικρότερη χαλάρωση της κάμψης του προβόλου σε σχέση με αυτή, η οποία παρατηρείται κατά την αποκόλληση της πρωτεΐνης από την επιφάνεια. Επιπλέον, οι δυνάμεις αποδιάταξης των εσωτερικών δομών της πολυπεπτιδικής αλυσίδας είναι θεωρητικά μικρότερες από τη δύναμη αποκόλλησης, αφού σε αντίθετη περίπτωση η ακίδα θα αποδεσμευόταν από την επιφάνεια πριν ξεδιπλωθεί η πρωτεΐνη. Ένας ασφαλής τρόπος απομόνωσης των συμβάντων αποκόλλησης από τα συμβάντα αποδιάταξης είναι να εξετάζεται μόνο η τελική χαλάρωση του προβόλου, η οποία υποδηλώνει την αποδέσμευση του ινωδογόνου από το υπόστρωμα και άρα δίνει τη δύναμη αποκόλλησης της πρωτεΐνης από την επιφάνεια. Αυτό ακριβώς εφαρμόστηκε και κατά τη συγκέντρωση των μετρήσεων τούτης της εργασίας μέσω του αλγόριθμο `distribution.m`, ο οποίος, όπως αναφέρθηκε ήδη, κατέγραφε για κάθε μία από τις επεξεργαζόμενες καμπύλες τη δύναμη μόνο πριν την τελική αναπήδηση της ακίδας.

Αν ξεδιπλώνονται περισσότερα του ενός συμπλέγματα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, οι δυνάμεις αποδιάταξης είναι λογικό, να αυξάνουν διαδοχικά σε μέγεθος, αφού υποτίθεται ότι όλοι οι ενδομοριακοί δεσμοί φορτίζονται σε σειρά και οι πιο ασταθείς δομές πρέπει να αποδιατάσσονται πρώτες. Βέβαια, σταδιακά μειούμενες δυνάμεις ξεδιπλώματος είναι επίσης δυνατό να

παρατηρηθούν, όπως όταν αναγκάζονται να αναπτυχθούν δομές, οι οποίες αποκαλύφθηκαν μετά από την αποδιάταξη συμπλεγμάτων ανώτερης τάξης και υψηλότερης αντοχής (βλ. Σχήμα 4.35).

Σχήμα 4.35. Πειραματική καμπύλη, στην οποία φαίνονται τρία συμβάντα αποδιάταξης της αλυσίδας του ινωδογόνου, προτού αυτό τελικά αποκολληθεί από την επιφάνεια του γυαλιού. Η μικρή χαλάρωση του προβόλου, στο σημείο που δείχνει το βέλος, πιθανόν οφείλεται στην αποδιάταξη συμπλέγματος, το οποίο συγκρατιόταν με σχετικά ασθενείς δεσμούς και αποκαλύφθηκε μετά την αποδιάταξη στη θέση iii.

Τα φαινόμενα αποδιάταξης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, εκτός από το ότι περιπλέκουν τη διαδικασία μέτρησης της δύναμης αποκόλλησης από την επιφάνεια, επιδρούν και στο μετρούμενο μήκος της πρωτεϊνικής αλυσίδας. Λόγω των αποδιατάξεων αυτών, το μήκος του ινωδογόνου αυξάνει με αποτέλεσμα η απόσταση ακίδας-επιφάνειας για το σημείο της τελικής αποκόλλησης να μετριέται σε αρκετές περιπτώσεις μεγαλύτερη από 77nm, το άθροισμα δηλαδή των ονομαστικών μηκών του PEG και του ινωδογόνου, και σε κάποιες να φτάνει τα 150nm. Υπό την προϋπόθεση ότι οι συνθήκες προετοιμασίας των ακίδων και μέτρησης στο AFM, δεν επιτρέπουν τον πολυμερισμό των μορίων ινωδογόνου, μετρήσεις αποστάσεων αυτής της κλίμακας δεν συνιστούν πρόβλημα και οι πειραματικές καμπύλες, οι οποίες εμφάνιζαν τέτοια μήκη, συνυπολογίστηκαν στην επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων.

4.6.2 Θεώρηση διαδοχικής διάσπασης δεσμών της ίδιας πρωτεϊνικής αλυσίδας με την επιφάνεια

Ο εύκολος εντοπισμός στις καμπύλες δύναμης-απόστασης του AFM των συμβάντων ανάπτυξης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, βάσει των προσδιορισμένων χαρακτηριστικών τους, επιτρέπει τον αποκλεισμό τους από την εξέταση της αποκόλλησης της πρωτεΐνης από την επιφάνεια. Το ενδιαφέρον συγκεντρώνεται πλέον στα συμβάντα χαλάρωσης του προβόλου, τα

οποία υποδηλώνουν αποκολλήσεις από την επιφάνεια. Τέτοια συμβάντα είναι δυνατό να εμφανίζονται πολλά σε μία καμπύλη δύναμης-απόστασης και ο πιο απλός τρόπος ερμηνείας τους είναι μέσω της θεώρησης της διαδοχικής διάσπασης δεσμών, τους οποίους είχε σχηματίσει ένα μόνο πρωτεϊνικό μόριο με την επιφάνεια.

Στο Σχήμα 4.36α αναπαριστάται γραφικά ένα μόριο ινωδογόνου, το οποίο έχει προσκολληθεί στην επιφάνεια μέσω δύο διαφορετικών τμημάτων του. Καθώς η ακίδα, στην οποία είναι προσδεμένο, απομακρύνεται από την επιφάνεια, το μόριο τεντώνεται και μόλις η δύναμη, η οποία κάμπτε τον πρόβολο, γίνει ίση με την αντοχή του δεσμού πρωτεΐνης-επιφάνειας, η πρωτεΐνη αποκολλάται από το πρώτο σημείο πρόσδεσής της χαλαρώνοντας εν μέρει την κάμψη του προβόλου. Το γεγονός αυτό υποδηλώνεται στην καμπύλη δύναμης-απόστασης με μια απότομη μεταβολή προς λιγότερο αρνητικές δυνάμεις ταυτόχρονα με μια αύξηση της απόστασης ανάμεσα στην ακίδα και την επιφάνεια λόγω της αποδέσμευσης ενός τμήματος της πρωτεϊνικής αλυσίδας από την επιφάνεια (σημεία iii-iv, Σχήμα 4.36β). Η συνεχιζόμενη απομάκρυνση της ακίδας από την επιφάνεια αναγκάζει την πρωτεΐνη να τεντωθεί και πάλι και μόλις η δύναμη κάμψης του προβόλου εξισωθεί με την αντοχή του δεύτερου δεσμού διασπάται και αυτός απελευθερώνοντας οριστικά την πρωτεΐνη από την επιφάνεια (σημεία v-vi).

Σχήμα 4.36. (α) Σχηματική αναπαράσταση διαδοχικής διάσπασης δύο δεσμών της ίδιας πρωτεϊνικής αλυσίδας με την επιφάνεια κατά την απομάκρυνση της ακίδας του AFM από την επιφάνεια. (β) Η αντίστοιχη καμπύλη δύναμης-απόστασης, στην οποία οι διαδοχικές αποκολλήσεις και η χαλάρωση της κάμψης του προβόλου απεικονίζονται ως μεταπηδήσεις της καμπύλης προς θετικότερες δυνάμεις.

Αν υποθέσουμε ότι όλοι οι δεσμοί πρωτεΐνης-επιφάνειας έχουν την ίδια αντοχή, τότε οι δυνάμεις στα σημεία iii και iv του Σχήματος 3.46 θα πρέπει να είναι ίδιες. Αν και υπάρχουν περιπτώσεις, όπου κάτι τέτοιο επιβεβαιώθηκε πειραματικά (Σχήμα 4.37α), είναι ορθότερο να θεωρηθεί ότι η αντοχή των δεσμών, τους οποίους σχηματίζει το ινωδογόνο με την επιφάνεια, διαφέρει ανάλογα με τις φυσικές ιδιότητες (ηλεκτροστατικό φορτίο, υδροφοβικότητα ή δυνατότητα

σχηματισμού δεσμών υδρογόνου) των ομάδων του, οι οποίες εμπλέκονται σε αυτούς. Εξάλλου, η αντοχή των δεσμών σύμφωνα με τη θεωρία των Bell και Evans είναι ένα θερμοδυναμικά καθοριζόμενο μέγεθος, το οποίο ακολουθεί μια κατανομή πιθανοτήτων και δεν μπορεί να προσδιοριστεί με βεβαιότητα. Συνεπώς δεν προκαλεί έκπληξη, ότι στις περισσότερες από τις καμπύλες, στις οποίες καταγράφηκαν πολλαπλές αποκολλήσεις, οι δυνάμεις διάσπασης των επιφανειακών δεσμών ήταν διαφορετικές (Σχήμα 4.37β).

Σχήμα 4.37. (α) Καμπύλη αποκόλλησης ινωδογόνου από επιφάνεια γυαλιού, η οποία εμφανίζει δύο διαδοχικά συμβάντα αποκόλλησης σε παρόμοιες δυνάμεις (-0.68 και -0.58nN αντίστοιχα). (β) Παρόμοια καμπύλη, η οποία εμφανίζει δύο αποκολλήσεις σε διαφορετικές δυνάμεις (-3.65 και -0.55nN αντίστοιχα).

Καθώς η σύγκριση των δυνάμεων αποκόλλησης δεν αποτελεί ασφαλές κριτήριο για την αναγνώριση της διαδοχικής διάσπασης δεσμών ενός πρωτεϊνικού μορίου με την επιφάνεια, το επόμενο μέγεθος, το οποίο εξετάζεται, είναι η κλίση της καμπύλης λίγο πριν την αποκόλληση. Η κλίση αυτή υποδηλώνει τη δυσκαμψία του φορτιζόμενου μορίου και προσφέρει μια ένδειξη για τις μεταβολές, οι οποίες συμβαίνουν σε αυτό μεταξύ των συμβάντων αποκόλλησης. Η διαδοχική αποδέσμευση τμημάτων της πρωτεϊνικής αλυσίδας ισοδυναμεί με προσθήκη ελατηρίων σε σειρά, η οποία συνεπάγεται μείωση της συνολικής δυσκαμψίας του φορτιζόμενου μορίου σύμφωνα με την ισότητα:^{xv}

^{xv} Αν η δύναμη παριστάνεται συναρτήσει της μετακίνησης της ακίδας και όχι συναρτήσει της απόστασης ακίδας-επιφάνειας, τότε στη $k_{\text{συνολ}}$ πρέπει να συμπεριληφθεί και η σταθερά ελατηρίου της ακίδας.

$$k_{\text{συνολ}} = \frac{k_1 \cdot k_2 \cdot \dots \cdot k_n}{k_1 + k_2 + \dots + k_n} \quad (4.20).$$

Παρόλα αυτά, η Εξίσωση 4.20 αποδεικνύεται δύσχρηστη για την περιγραφή των πειραματικών καμπύλων, γιατί, όπως αναφέρθηκε κατά την περιγραφή του μοντέλου WLC (Κεφ. 4.4.3) η δυσκαμψία της πρωτεΐνης δεν είναι ένα σταθερό μέγεθος, αλλά εξαρτάται από το μήκος πλήρους έκτασης του φορτιζόμενου τμήματός της και το βαθμό τάνυσής του κάθε στιγμή. Στη θέση της σχέσης 4.20 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο δυσκαμψίας το μήκος L_p , το οποίο αποτελεί εγγενές χαρακτηριστικό της μοριακής αλυσίδας. Αν δηλαδή τα τμήματα της καμπύλης πριν από κάθε αποκόλληση προσαρμοστούν με την Εξίσωση 4.4 του μοντέλου WLC, και η υπολογιζόμενη τιμή για τη μεταβλητή προσαρμογής L_p βρεθεί ίδια για όλα τα επιμέρους τμήματα, τότε αποδεικνύεται ότι τα συμβάντα αποκόλλησης αντιστοιχούν σε ένα μοναδικό μόριο, το οποίο αποδεσμεύεται σταδιακά από την επιφάνεια.

Σχήμα 4.38. Καμπύλη αποκόλλησης μορίου ινωδογόνου από επιφάνεια. Με το σύμβολο x παρουσιάζεται η προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων από το μοντέλο WLC, για την οποία το μήκος αντίστασης L_p θεωρήθηκε σταθερό, ίσο με 0.15nm, και για τις δύο επιμέρους καμπύλες. Η ικανοποιητική προσαρμογή αποδεικνύει ότι τα δύο συμβάντα αποκόλλησης προήλθαν από τη διάσπαση δεσμών της ίδιας πρωτεϊνικής αλυσίδας με το υπόστρωμα.

Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε για την καμπύλη του Σχήματος 4.38. Αρχικά οι επιμέρους καμπύλες τάνυσης του μορίου ινωδογόνου προσαρμόστηκαν από δύο εξισώσεις της μορφής 4.4. και από τη βελτιστοποίηση της προσαρμογής προέκυψαν για τη μεταβλητή L_p οι τιμές 0.08 και 0.21 nm αντίστοιχα. Στη συνέχεια η προσαρμογή επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας την ίδια τιμή $L_p=0.15\text{nm}$ και για τις δύο καμπύλες τάνυσης. Η ικανοποιητική προσαρμογή αποδεικνύει ότι η καμπύλη, στο σύνολο της, περιγράφει ένα μοναδικό μόριο

Σημειώνεται ακόμα, ότι ένα από τα k_i εκφράζει τη σταθερά ελατηρίου του PEG, το οποίο χρησιμοποιείται για την πρόσδεση της πρωτεΐνης στην ακίδα.

ινωδογόνου, το οποίο αποκολλάται από την επιφάνεια ύστερα από τη διαδοχική διάσπαση των δεσμών, που είχαν σχηματίσει δύο διαφορετικά τμήματά του με το υπόστρωμα.

4.6.3 Θεώρηση παράλληλων πρωτεϊνικών μορίων

Μια άλλη ερμηνεία των πολλαπλών συμβάντων αποκόλλησης μπορεί να στηριχθεί στη θεώρηση πρωτεϊνικών μορίων, τα οποία είναι δεσμευμένα παράλληλα ανάμεσα στην ακίδα και την επιφάνεια. Σε αυτή τη θεώρηση τα μόρια της πρωτεΐνης προσομοιάζονται με ελατήρια συνδεδεμένα παράλληλα και η δύναμη κάμψης του προβόλου κατανέμεται μεταξύ τους ανάλογα με τη δυσκαμψία του καθενός. Συνεπώς, για την περίπτωση των δύο μορίων, τα οποία φαίνονται στο Σχήμα 4.39α, η δύναμη φόρτισης καθενός από αυτά υπολογίζεται από τις σχέσεις:

$$F_1 = F \frac{k_1(x)}{k_1(x) + k_2(x)} \quad (4.21\alpha)$$

$$F_2 = F \frac{k_2(x)}{k_1(x) + k_2(x)} \quad (4.21\beta)$$

όπου F είναι η δύναμη κάμψης του προβόλου και k_1 , k_2 οι δυσκαμψίες των δύο αλυσίδων αντίστοιχα. Στις παραπάνω σχέσεις οι δυσκαμψίες εμφανίζονται ως συναρτήσεις της επιμήκυνσης x για να τονιστεί το γεγονός ότι εξαρτώνται από το βαθμό τάνυσης κάθε μορίου, ο οποίος καθορίζεται τόσο από την απόσταση ακίδας-επιφάνειας όσο και από το τελικό μήκος της αλυσίδας, που φορτίζεται. Έτσι, ανάλογα με το σχετικό μήκος των δύο φορτιζόμενων αλυσίδων διακρίνονται δύο ενδεχόμενα για την αποκόλληση των πρωτεϊνών.

Στο πρώτο από αυτά, τα τμήματα των πρωτεϊνών, τα οποία έχουν δεσμευτεί ανάμεσα στην ακίδα και την επιφάνεια θεωρούνται ισομήκη. Δεδομένου ότι το μήκος δυσκαμψίας L_p θεωρείται σταθερό για όλες τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, η δυσκαμψία των δύο πρωτεϊνών μεταβάλλεται με τον ίδιο τρόπο, καθώς η ακίδα απομακρύνεται από την επιφάνεια (βλ. Εξίσωση 4.6). Συνεπώς, η δύναμη του προβόλου ισοκατανέμεται μεταξύ των δύο αλυσίδων και μόλις η κατανεμημένη δύναμη φτάσει την αντοχή ενός από τους δύο δεσμούς με το υπόστρωμα, το αντίστοιχο μόριο αποκολλάται. Το τι θα συμβεί στο άλλο μόριο εξαρτάται από την παραδοχή, η οποία θα υιοθετηθεί για την αντοχή του δεσμού του με το υπόστρωμα. Αν υποθέσουμε, καθ' υπέρβαση όσων αναφέρθηκαν παραπάνω,

ότι όλοι οι δεσμοί του ινωδογόνου με την επιφάνεια έχουν την ίδια αντοχή^{xvi}, τότε μετά την αποκόλληση του πρώτου μορίου η δύναμη, η οποία ανακατανέμεται αυτόματα στο δεύτερο μόριο, είναι η συνολική δύναμη του προβόλου. Καθώς η δύναμη αυτή είναι μεγαλύτερη της αντοχής του δεσμού με την επιφάνεια, ο δεύτερος δεσμός σπάει ταυτόχρονα με τον πρώτο. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, την εμφάνιση ενός μόνο συμβάντος αποκόλλησης στην καμπύλη δύναμης-απόστασης αλλά με χαρακτηριστική δύναμη διπλάσια της αναμενόμενης (Σχήμα 4.39β).

Σχήμα 4.39. (α) Σχηματική αναπαράσταση αποκόλλησης από το υπόστρωμα μορίων πρωτεΐνης, παράλληλα δεσμευμένων μεταξύ της ακίδας και της επιφάνειας και ίσου μήκους. (β) Η αποκόλληση των δύο μορίων, η οποία συμβαίνει ταυτόχρονα, υποδηλώνεται στην καμπύλη δύναμης-απόστασης με μία μοναδική αναπήδηση της ακίδας (σημεία iii-iv).

Η παραπάνω θεωρητική ανάλυση επιβεβαιώνεται πειραματικά από την εμφάνιση στην κατανομή των δυνάμεων αποκόλλησης κορυφών σε τιμές πολλαπλάσιες μιας βασικής (Janshoff et al. 2000). Αν για παράδειγμα εξεταστεί με προσοχή η κατανομή του Σχήματος 4.31, μπορεί να εντοπιστεί μια δευτερεύουσα κορυφή στα 2nN, σε τιμή δηλαδή σχεδόν τετραπλάσια της κύριας κορυφής στα 0.5nN. Η παρουσία της κορυφής στα 2nN υποδηλώνει ότι κάποια από τα συμβάντα αποκόλλησης, τα οποία συμπεριληφθήκαν στην ανάλυση, ίσως να προήλθαν από την ταυτόχρονη αποδέσμευση τεσσάρων μορίων ινωδογόνου. Αν οι σχετικές μετρήσεις δεν συμπεριληφθούν στη στατιστική ανάλυση της κατανομής του εν λόγω Σχήματος, τότε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της δύναμης αποκόλλησης του ινωδογόνου από την επιφάνεια του γυαλιού υπολογίζεται ίση με 422 ± 223 pN (αντί 545 ± 475 nN) αντίστοιχα.

^{xvi} Η παραδοχή αυτή έχει και πρακτικό νόημα, καθώς πρωταρχικός στόχος της συνολικής πειραματικής μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της δύναμης αποκόλλησης μεμονωμένων μορίων ινωδογόνου από την επιφάνεια του γυαλιού, η οποία θεωρήθηκε ίδια για όλα τα μόρια.

Επιστρέφοντας στη θεώρηση των δύο μορίων, αν τα μήκη των φορτιζόμενων αλυσίδων δεν είναι ίσα, τότε οι σταθερές ελατηρίου των δύο μορίων διαφέρουν κάθε χρονική στιγμή και η δύναμη του προβόλου κατανέμεται άνισα μεταξύ τους σύμφωνα με τις σχέσεις 4.21α και β. Μόλις η μεγαλύτερη από αυτές τις δυνάμεις φτάσει την αντοχή του δεσμού ινωδογόνου-υποστρώματος το μόριο, στο οποίο αντιστοιχεί και το οποίο είναι το περισσότερο τεντωμένο, αποκολλάται. Ακαριαία η κάμψη του προβόλου χαλαρώνει στην έκταση, που του επιτρέπει το μεγαλύτερο μήκος της δεύτερης δεσμευμένης αλυσίδας (Σχήμα 4.40, σημεία iii-iv), αλλά στη συνέχεια αρχίζει και πάλι να μεγαλώνει, καθώς η ακίδα απομακρύνεται από την επιφάνεια. Το μόριο, το οποίο έχει απομείνει συνδεδεμένο, τεντώνονται μέχρι το σημείο v, οπότε η δύναμη του προβόλου γίνεται πάλι ίση με την αντοχή του δεσμού πρωτεΐνης-επιφάνειας και αποκολλάται και αυτό.

Σχήμα 4.40. (α) Σχηματική αναπαράσταση αποκόλλησης από το υπόστρωμα μορίων πρωτεΐνης, όταν τα μήκη των τμημάτων τους, τα οποία τεντώνονται ανάμεσα στην ακίδα και την επιφάνεια είναι άνισα. (β) Μορφή καμπύλης δύναμης-απόστασης, η οποία αντιστοιχεί στα συμβάντα του σχήματος (α).

Για να διαπιστωθεί αν τα πολλαπλά συμβάντα αποκόλλησης μιας συγκεκριμένης πειραματικής καμπύλης μπορούν να ερμηνευθούν με βάση τη θεώρηση, η οποία μόλις περιγράφηκε, η καμπύλη τάνυσης κάθε μορίου προσαρμόζεται και πάλι μέσω της Εξίσωσης 4.4. Η διαδικασία προσαρμογής όμως, ξεκινά από το τελευταίο συμβάν αποκόλλησης και για κάθε ένα συμβάν προς την αρχή προστίθεται στην Εξίσωση 4.4 ένας επιπλέον όρος, έτσι ώστε η εξίσωση με την οποία περιγράφεται το n-οστό συμβάν από το τέλος να είναι:

$$F(x) = \frac{k_B T}{L_{p(N-n+1)}} \left(\frac{1}{4 \left(1 - \frac{x}{L_{N-n+1}} \right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_{N-n}} \right) + \dots + \frac{k_B T}{L_{p(N)}} \left(\frac{1}{4 \left(1 - \frac{x}{L_N} \right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_N} \right) \quad (4.22)$$

όπου N είναι το πλήθος των καταγεγραμμένων αποκολλήσεων, L_i η απόσταση του i -στού σημείου αποκόλλησης από την αρχή των αξόνων (ίσο με το μήκος της i -οστής αλυσίδας) και $L_{p(i)}$ το μήκος δυσκαμψίας της i -οστής αλυσίδας. Η ικανοποιητική προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων από εξισώσεις σαν την 4.22 φανερώνει ότι η δύναμη του προβόλου κατανέμεται σε N αλυσίδες, οι οποίες φορτίζονται παράλληλα, και επομένως επιβεβαιώνει τη θεώρηση των παράλληλων πρωτεϊνικών μορίων.

Στο Σχήμα 4.41 παρουσιάζεται η προσαρμογή μιας πειραματικής καμπύλης με δύο συμβάντα αποκόλλησης μέσω δύο εξισώσεων της μορφής 4.22, η πρώτη από τις οποίες έχει δύο όρους ενώ η δεύτερη μόνο ένα:

$$F_1(x) = \frac{k_B T}{L_{p(1)}} \left(\frac{1}{4 \left(1 - \frac{x}{L_1} \right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_1} \right) + \frac{k_B T}{L_{p(2)}} \left(\frac{1}{4 \left(1 - \frac{x}{L_2} \right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_2} \right) \quad (4.23\alpha)$$

$$F_2(z) = \frac{k_B T}{L_{p(2)}} \left(\frac{1}{4 \left(1 - \frac{x}{L_2} \right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_2} \right) \quad (4.23\beta)$$

Στις παραπάνω εξισώσεις τα L_1 και L_2 τέθηκαν ίσα με 56 και 130nm αντίστοιχα και ειδικά για την Εξίσωση 4.23α τα μήκη δυσκαμψίας $L_{p(1)}$ και $L_{p(2)}$ θεωρήθηκαν ίσα. Η επίδραση αυτής της παραδοχής στο υπολογιζόμενο μήκος δεν αναμένεται να είναι σημαντική, γιατί αφ' ενός το μήκος L_p είναι παρόμοιο για όλες τα μόρια του ινωδογόνου και αφ' ετέρου η συμβολή της δεύτερης, μακρύτερης αλυσίδας στη συνολική δυσκαμψία είναι αρκετά μικρότερη από τη συμβολή της πρώτης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η τιμή του L_p , η οποία υπολογίζεται για την πρώτη καμπύλη αποκόλλησης να αντανakλά κυρίως τη δυσκαμψία της μία μόνο αλυσίδας, αυτής με το μικρότερο μήκος.

Σχήμα 4.41. Πειραματική καμπύλη αποκόλλησης ινωδογόνου από επιφάνεια γυαλιού. Η ικανοποιητική προσαρμογή της από τις Εξισώσεις 4.23α και β υποδηλώνει ότι οι καταγεγραμμένες δυνάμεις προήλθαν από την αποκόλληση δύο παράλληλα συνδεδεμένων μορίων.

Η ποιότητα της προσαρμογής των πειραματικών μετρήσεων από τις δύο εξισώσεις αποδεικνύει ότι η συγκεκριμένη καμπύλη απεικονίζει την αποκόλληση δύο παράλληλα συνδεδεμένων μορίων, το πρώτο από τα οποία υπολογίστηκε ότι έχει μήκος αντίστασης 0.07nm, ενώ το δεύτερο 1.43nm. Οι τιμές αυτές αντιστοιχούν στο σύμπλοκο, το οποίο σχηματίζεται από τα μόρια του ινωδογόνου και του PEG, και είναι λίγο μεγαλύτερες από το πραγματικό μήκος δυσκαμψίας της πρωτεΐνης, αφού τα δύο μόρια συνδέονται σε σειρά. Οι εκτιμήσεις του μήκους L_p κρίνονται αποδεκτές, δεδομένου ότι μια ενδεικτική τιμή για το μήκος δυσκαμψίας μπορεί να είναι το θεωρητικό μήκος ενός αμινοξέος σε κρυσταλλική δομή, το οποίο προσδιορίζεται 0.37nm (Hertadi & Ikaï 2002). Εξάλλου, σύμφωνα με τον Brown και τους συνεργάτες του (Brown et al. 2007) το μήκος δυσκαμψίας ολιγομερών ινωδογόνου είναι ίσο με 0.8nm, ενώ σύμφωνα με τον Oberdorfer και τους συνεργάτες τους (Oberdorfer et al. 2000) το ίδιο μέγεθος για την ινονεκτίνη είναι 0.3 nm.

Συμπερασματικά από την περιγραφή του μοντέλου των παράλληλων πρωτεϊνικών μορίων προκύπτει ότι από τα πολλαπλά συμβάντα αποκόλλησης μόνο το τελευταίο πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην εκτίμηση της αντοχής του δεσμού πρωτεΐνης-επιφάνειας. Οι μετρούμενες δυνάμεις σε κάθε ένα από τα προηγούμενα συμβάντα αποκόλλησης αποτελούν το άθροισμα των φορτίων, τα οποία κατανέμονται στις πρωτεϊνικές αλυσίδες, τόσο σε αυτή, η οποία αποκολλάται όσο και στις υπόλοιπες, οι οποίες απλά τεντώνονται. Με σημείο αναφοράς τη θέση iii στο Σχήμα 4.40 το επιχείρημα αυτό εκφράζεται μαθηματικά από τη σχέση:

$$F_{iii} = k_1(x_{iii})x_{iii} + k_2(x_{iii})x_{iii} = F_{\text{δεσμού}} + k_2(x_{iii})x_{iii} \quad (4.24)$$

όπου $F_{\text{δεσμού}}$ είναι η αντοχή του δεσμού πρωτεΐνης-επιφάνειας, η οποία ζητείται να προσδιοριστεί. Σύμφωνα με τη σχέση 4.24 οι δυνάμεις για διαδοχικά συμβάντα αποκόλλησης πρέπει να εμφανίζονται μειούμενες, αν και κάτι τέτοιο δεν επιβεβαιώθηκε από το σύνολο των σχετικών πειραματικών καμπύλων. Πιθανή αιτία για αυτό είναι διακύμανση, την οποία εύλογα παρουσιάζει η αντοχή των δεσμών ως θερμοδυναμική μεταβλητή.

Τέλος, πρέπει να τονιστεί ότι οι δύο ερμηνείες, οι οποίες παρουσιάστηκαν, δεν αποτελούν παρά δύο απλές θεωρήσεις για τον τρόπο με τον οποίο τα δεσμευμένα στην ακίδα μόρια του ινωδογόνου μπορούν να αλληλεπιδρούν με την επιφάνεια. Οι πειραματικές καμπύλες είναι δυνατό στην πράξη να αναπαριστούν πιο σύνθετα συμβάντα, τα οποία προκύπτουν από το συνδυασμό των δύο μοντέλων, και για το λόγο αυτό χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή στην ερμηνεία των μετρήσεων του AFM.

Κεφάλαιο 5

Συμπεράσματα

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης ενός έντονα βιοδραστικού μορίου, όπως είναι το ινωδογόνο, με τεχνητές επιφάνειες αποτελεί ένα σύνθετο πρόβλημα, το οποίο συσχετίζεται με ένα πλήθος παραμέτρων, όπως η μοριακή διάταξη, η δύναμη προσκόλλησης ή η διατήρηση της δραστικότητας. Σε μια προσπάθεια αποσαφήνισης ορισμένων από τις παραμέτρους αυτές, στη συγκεκριμένη εργασία διερευνήθηκε με τη βοήθεια του AFM η επίδραση των συνθηκών του διαλύματος στην έκταση της προσρόφησης του ινωδογόνου πάνω σε μίκα καθώς και στις δυνάμεις αλληλεπίδρασης και αποκόλλησης ενός στρώματος της πρωτεΐνης αυτής από την ίδια επιφάνεια. Επιπλέον, μετρήθηκε η δύναμη αποκόλλησης ανεξάρτητων μορίων της πρωτεΐνης από επιφάνεια γυαλιού και επιχειρήθηκε μια θεωρητική ερμηνεία των συμβάντων αποκόλλησης.

Οι εικόνες, οι οποίες ελήφθησαν μέσα σε διάλυμα από προσροφημένα μόρια πάνω σε μίκα, έδειξαν κατ' αρχάς ότι το ινωδογόνο διατηρεί τη φυσιολογική, επιμήκη διάταξή του κατά την αλληλεπίδραση με την επιφάνεια. Η παρατήρηση αυτή έχει ιδιαίτερη σημασία επειδή αποκλείει, τουλάχιστον για υδρόφιλα υποστρώματα, όπως η μίκα, το ενδεχόμενο το ινωδογόνο να σχηματίζει συσσωματώματα ύστερα από την αποδιάταξή του πάνω στην επιφάνεια. Συνεπώς, η δυνατότητα του ινωδογόνου να μετασχηματίζεται σε ινώδες και στη συνέχεια σε θρόμβους φαίνεται να διατηρείται ακόμα και όταν αυτό προσροφάται σε επιφάνειες. Περισσότερες πληροφορίες βέβαια, για τη δραστικότητα των χημικών ομάδων του, οι οποίες αποτελούν στόχο για τους υποδοχείς των αιμοπεταλίων, είναι δυνατό να συλλεχθούν αν οι συγκεκριμένες ομάδες σημανθούν με νανοσφαιρίδια, έτσι ώστε οι εικόνες του AFM να μπορέσουν να αποκαλύψουν τη σχετική τους θέση μετά την προσρόφηση.

Αναφορικά με την επίδραση του pH και της ιοντικής ισχύος, πρέπει να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη εργασία προχώρησε πέρα από τα γνωστά συμπεράσματα για τον τρόπο, με τον οποίο οι δύο αυτοί παράγοντες επιδρούν στη μαζική προσρόφηση πρωτεϊνικών μορίων και εξέτασε το ρόλο τους στη αλληλεπίδραση μεμονωμένων μορίων ινωδογόνου με το υπόστρωμα. Αποδείχτηκε έτσι, ότι η ισορροπία μεταξύ των απωστικών ηλεκτροστατικών δυνάμεων και των ελκτικών δυνάμεων van der Waals καθορίζει την έκταση της προσρόφησης από τα πρώτα στάδιά της, όταν

δηλαδή την επιφάνεια προσεγγίζουν ανεξάρτητα πρωτεϊνικά μόρια. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε ο ρόλος του διπλού στρώματος διάχυσης ως καθοριστικού παράγοντα για τη ρύθμιση του εύρους και της έντασης των ηλεκτροστατικών δυνάμεων ακόμα και στο επίπεδο των μεμονωμένων μορίων, ενώ παράλληλα αποκαλύφθηκε η σημασία των δυνάμεων ενυδάτωσης σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων.

Πιο εντυπωσιακές όμως, ήταν οι παρατηρήσεις, οι οποίες προέκυψαν από τη μέτρηση των δυνάμεων αλληλεπίδρασης του στρώματος του ινωδογόνου με την επιφάνεια στις διάφορες τιμές pH. Οι ενδείξεις για την αποδέσμευση των στελεχών aC από το κεντρικό σώμα του ινωδογόνου σε pH 3.5 αποκτούν σημασία, αν αναλογιστεί κανείς ότι στην περιοχή των πληγών, όπου η μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες είναι αναγκαία, το pH είναι δυνατό να πέφτει αρκετά πιο κάτω από τη φυσιολογική τιμή του. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα στελέχη aC, μέσω της μεταβολής της θέσης τους ως προς το σώμα του μορίου, πρέπει να συμβάλλουν στον πολυμερισμό του ινωδογόνου και συνεπώς η ρόλος τους στη συμπεριφορά της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στις διεπιφάνειες χρήζει περαιτέρω έρευνας.

Η σύγκριση των μετρήσεων της επιφανειακής κάλυψης στις διάφορες τιμές pH και ιοντικής ισχύος με τις μετρήσεις των δυνάμεων αλληλεπίδρασης των κολλοειδών αισθητήρων με την επιφάνεια της μίκας στις αντίστοιχες συνθήκες οδήγησε και σε ένα ακόμα ενδιαφέρον συμπέρασμα. Η συμφωνία των αποτελεσμάτων των δύο ομάδων πειραμάτων έδειξε ότι υπάρχει ουσιαστική συσχέτιση ανάμεσα στις δυνάμεις, οι οποίες δρουν μεταξύ του υποστρώματος και των προσεγγιζόμενων μορίων, και στο βαθμό προσρόφησης. Αν μάλιστα, ληφθεί υπόψη ότι οι δυνάμεις, οι οποίες καταγράφηκαν κατά την απομάκρυνση των κολλοειδών αισθητήρων από την επιφάνεια, εκφράζουν ένα μέτρο των αναδιατάξεων της πρωτεΐνης πάνω στην επιφάνεια, προκύπτει το συμπέρασμα ότι μέσω της μέτρησης των δυνάμεων αλληλεπίδρασης και αποκόλλησης μπορεί να προβλεφθεί η προσρόφηση ή μη της πρωτεΐνης στο υπόστρωμα.

Η παραπάνω παρατήρηση προσδίδει ιδιαίτερη βαρύτητα στη μέτρηση της δύναμης αποκόλλησης ανεξάρτητων μορίων ινωδογόνου από την επιφάνεια γυαλιού, η οποία εκτιμήθηκε ίση με 422pN (μέσος όρος 83 μετρήσεων). Πρέπει να υπογραμμιστεί, ότι είναι η πρώτη φορά, που μετράται η μη ειδική δύναμη αλληλεπίδρασης μεμονωμένων μορίων μιας πρωτεΐνης με τεχνητή επιφάνεια. Αν και το AFM έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τη μέτρηση της αντοχής δεσμών μεταξύ αντιγόνων-αντισωμάτων ή προσδεμάτων-υποδοχέων, η αξιοποίηση της σχετικής τεχνικής για τη μέτρηση των δυνάμεων αποκόλλησης ολόκληρων μορίων από επιφάνειες δεν έχει αναφερθεί μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία. Απόπειρες άλλων ερευνητικών ομάδων, οι οποίες χρησιμοποίησαν

ινωδογόνο φυσικά προσροφημένο στην ακίδα για αυτό το σκοπό, κατέληξαν σε καταγραφή πολλαπλών αποκόλλησεων από την επιφάνεια. Στην παρούσα εργασία όμως, χάρη στην ομοιοπολική πρόσδεση των μορίων του ινωδογόνου πάνω στην ακίδα μέσω του συνδέτη PEG, επιτεύχθηκε η καταγραφή της δύναμης αποκόλλησης ανεξάρτητων μορίων ινωδογόνου από το υπόστρωμα. Σε αυτό συνέβαλε το γεγονός, ότι το ινωδογόνο είναι μια σχετικά μεγάλη πρωτεΐνη και η αποκόλληση μεμονωμένων μορίων από το υπόστρωμα ήταν δυνατό να εντοπιστεί μέσω των παραβολικών καμπύλων τάνυσης των ξεχωριστών πρωτεϊνικών αλυσίδων.

Η προσαρμογή αυτών των καμπύλων τάνυσης επιτεύχθηκε σε ικανοποιητικό βαθμό από το μοντέλο WLC, παρόλο που σε ορισμένες περιπτώσεις το τελικό μήκος των φορτιζόμενων αλυσίδων φανέρωνε αποδιατάξεις εσωτερικών δομών τους. Το γεγονός, ότι δεν χρειάστηκε ο συνυπολογισμός ενθαλπικών συνεισφορών στη μαθηματική έκφραση του μοντέλου WLC, απέδειξε ότι οι εμπλεκόμενοι ενδομοριακοί δεσμοί έχουν μικρή συνεισφορά στη δυσκαμψία του μορίου του ινωδογόνου.

Βασιζόμενοι στην προσαρμογή των καμπύλων τάνυσης από το μοντέλο WLC προτείνουμε δύο θεωρήσεις για τη φυσική ερμηνεία των πειραματικών καμπύλων με πολλαπλά συμβάντα αποκόλλησης, τη θεώρηση της διαδοχικής διάσπασης δεσμών μιας μοναδικής πρωτεϊνικής αλυσίδας με το υπόστρωμα και τη θεώρηση των παράλληλων μορίων. Η επαλήθευση των δύο αυτών ερμηνειών από συγκεκριμένες πειραματικές καμπύλες, έδειξε ότι μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμα θεωρητικά εργαλεία για το χαρακτηρισμό των καταγραφόμενων με το AFM καμπύλων και την αξιολόγηση των συμβάντων, τα οποία πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στη διερεύνηση της αντοχής των δεσμών πρωτεΐνης-υποστρώματος. Έτσι, από το σύνολο των συμβάντων αποκόλλησης, τα οποία καταγράφονται σε μία καμπύλη AFM και αντιστοιχούν σε παράλληλα μόρια, μόνο το τελευταίο αντανάκλα την πραγματική δύναμη αποκόλλησης της πρωτεΐνης από την επιφάνεια. Αντίθετα, όταν η πειραματική καμπύλη ερμηνεύεται βάσει της θεώρησης των διαδοχικών διασπάσεων δεσμών της ίδιας αλυσίδας, όλα τα καταγεγραμμένα συμβάντα αποκόλλησης μπορεί να θεωρηθούν ισοδύναμα για τη μέτρηση της αντοχής του δεσμού πρωτεΐνης-επιφάνειας.

Για να είμαστε σίγουροι ωστόσο, ότι οι μετρούμενες δυνάμεις ανταποκρίνονται στην αντοχή του δεσμού ενός μόνο μορίου ινωδογόνου με την επιφάνεια του γυαλιού στα συγκεκριμένα πειράματα εξετάστηκαν μόνο τα τελικά συμβάντα αποκόλλησης κάθε πειραματικής καμπύλης. Βέβαια, οι μετρούμενες με αυτό τον τρόπο, δυνάμεις αντιπροσωπεύουν την αθροιστική αντοχή όλων των μοριακών δεσμών, τους οποίους σχηματίζει ένα τμήμα του ινωδογόνου με το υπόστρωμα, δεν πρέπει δηλαδή, να συγχέονται με τη δύναμη αποκόλλησης μιας μοναδικής

πρωτεϊνικής ομάδας από την επιφάνεια. Αυτό αποδείχθηκε από την αδυναμία της θεωρίας των Bell και Evans να περιγράψει τα πειραματικά δεδομένα, τα οποία συλλέχθηκαν σε διάφορους ρυθμούς φόρτισης, καθώς η θεωρία αυτή αναφέρεται σε ανεξάρτητους μοριακούς δεσμούς ενώ οι μετρήσεις μας σε ομάδες τέτοιων δεσμών.

Ολοκληρώνοντας την επισκόπηση των αποτελεσμάτων αυτής της διατριβής, αξίζει να αναφερθούν οι λόγοι για τους οποίους επιλέχθηκαν η μίκα και το γυαλί ως υλικά για τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης ινωδογόνου-επιφανειών, καθώς και τα μειονεκτήματα αυτής της επιλογής. Τόσο η μίκα όσο και το γυαλί είναι υλικά με σαφώς προσδιορισμένες ιδιότητες, η γνώση των οποίων επέτρεψε την άμεση εξαγωγή συμπερασμάτων από τα πειραματικά αποτελέσματα. Επιπλέον, και τα δύο αυτά υλικά έχουν ατομικά λεία επιφάνεια, ιδιότητα η οποία είναι απαραίτητη για τη λήψη αξιόπιστων μετρήσεων με το AFM. Από την άλλη μεριά, η μίκα και το γυαλί δεν θεωρούνται βιοϋλικά, με συνέπεια τα πειραματικά αποτελέσματα αυτής της εργασίας να φαίνεται ότι στερούνται πρακτικής χρησιμότητας. Σκοπός όμως, αυτής της διατριβής δεν ήταν ο ποσοτικός προσδιορισμός της προσρόφησης του ινωδογόνου ούτε η μέτρηση της προσκόλλησής του σε χρησιμοποιούμενα από τη βιοϊατρική υλικά, αλλά η κατανόηση των μηχανισμών, οι οποίοι επηρεάζουν τη συμπεριφορά της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στις διεπιφάνειες καθώς και ο προσδιορισμός των θεωρητικών εργαλείων, βάσει των οποίων οι μετρήσεις του AFM μπορούν να μετατραπούν σε χρήσιμα συμπεράσματα.

Η επίτευξη αυτών των στόχων ανοίγει ένα νέο πεδίο πειραματικής δραστηριότητας, όπου η δύναμη αποκόλλησης ανεξάρτητων πρωτεϊνικών μορίων από επιφάνειες συγκεκριμένων ιδιοτήτων θα μπορεί να μετρηθεί άμεσα. Το πρώτο βήμα προς αυτή την κατεύθυνση μπορεί να αποτελέσει η χρήση ως υποστρωμάτων επιφανειών γυαλιού τροποποιημένων με πλάσμα ή με μονομοριακά στρώματα δραστικών χημικών ομάδων.

Παραρτήματα

Α. Υπολογισμός πλάτους ταλάντωσης στην τεχνική της ταλαντούμενης ακίδας

Το ελεύθερο πλάτος ταλάντωσης της ακίδας υπολογίζεται με τη βοήθεια της καμπύλης πλάτους-απόστασης (amplitude-distance curve), η οποία εμφανίζεται με την επιλογή capture calibration στον κατάλογο calibration του προγράμματος Nanoscope 5.31r1. Στην καμπύλη αυτή το σημείο, στο οποίο η ακίδα αρχίζει να ακουμπά την επιφάνεια, φαίνεται ως το σημείο καμπής προς τα κάτω της οριζόντιας γραμμής (Σχήμα Α.1, σημείο Ι). Η κατακόρυφη απόσταση αυτού του σημείου από το σημείο στο οποίο η ακίδα δεν ταλαντώνεται πλέον, οπότε η καμπύλη γίνεται πάλι οριζόντια (σημείο ΙΙ), δίνει το ελεύθερο πλάτος. Δηλαδή, αυτό που χρειάζεται είναι να μετρηθεί η κατακόρυφη μετακίνηση του σαρωτή για να μηδενιστεί το πλάτος ταλάντωσης από τη μέγιστη τιμή του.

Σχήμα Α.1. Μεταβολή του πλάτους ταλάντωσης της ακίδας συναρτήσει της κατακόρυφης απόστασής της από το δείγμα. Το ελεύθερο πλάτος υπολογίζεται από την κατακόρυφη απόσταση μεταξύ των σημείων Ι και ΙΙ.

Για να γίνει αυτό πρέπει πρώτα, να μετατραπούν οι μετρήσεις του κατακόρυφου άξονα της καμπύλης πλάτους-απόστασης από RMS τάσης σήματος του φωτοαισθητήρα σε πλάτος ταλάντωσης. Η διαδικασία για αυτό είναι εξής:

1. Αποθήκευση καμπύλης πλάτους-απόστασης από την επιλογή force calibration, ενώ η ακίδα βρίσκεται σε εμπλοκή με την επιφάνεια (engaged).
2. Εξαγωγή μετρήσεων και δεδομένων επικεφαλίδας με τη μορφή αρχείου ASCII από το πρόγραμμα Nanoscope.
3. Μετατροπή μετρήσεων σε τάση RMS:
$$RMS = \frac{(data)(In1max)}{32768}$$
4. Μετατροπή του RMS σε πλάτος ταλάντωσης σε nm:

$$amplitude(nm) = \frac{(RMS)(InSensitivity)(InAttenMode)}{(DetectSens)}$$

Τα απαιτούμενα για το μετασχηματισμό μεγέθη, περιέχονται στην επικεφαλίδα του αρχείου ASCII. Το μέγεθος DetectDens δηλώνει τη σχέση μετασχηματισμού της τάσης του φωτοαισθητήρα σε πραγματική κάμψη. Καταγράφεται και αποθηκεύεται από το πρόγραμμα αυτόματα, όταν στην καμπύλη κάμψης-μετατόπισης (deflection-distance) για την τεχνική της επαφής “χαραχθεί” με το ποντίκι μια γραμμή παράλληλη στο ευθύγραμμο τμήμα, το οποίο υποδηλώνει την επαφή ακίδας-επιφάνειας.

Β. Ποιοτική και ποσοτική χημική ανάλυση επιφανειών γυαλιού τροποποιημένων με αιθανολαμίνη/PEG με φασματοσκοπία ακτίνων Χ (XPS).

Η ανάλυση με φασματοσκοπία από ακτίνες-Χ έγινε στο σύστημα LHS-10 της εταιρείας SPECS, το οποίο διαθέτει το Εργαστήριο Χαρακτηρισμού Επιφανειών με XPS του Ερευνητικού Ινστιτούτου Χημικής Μηχανικής και Χημικών Διεργασιών Υψηλής Θερμοκρασίας (ΕΙΧΗΜΥΘ) στην Πάτρα. Χρησιμοποιήθηκε άνοδος Al με γραμμή ακτίνων-Χ την AlKα (μη μονοχρωματοποιημένη) με χαρακτηριστική ενέργεια 1486.6 eV. Στον ημισφαιρικό αναλύτη χρησιμοποιήθηκε ενέργεια διέλευσης 97 eV, που δίνει πλάτος γραμμής 3d 5/2 του Ag 0.9 eV. Η βαθμονόμηση της κλίμακας των κινητικών ενεργειών του αναλυτή έγινε σύμφωνα με το πρότυπο ASTM-E 902-88.

Σχήμα Β.1. Φάσματα ευρείας σάρωσης (wide scans) από (α) δείγμα γυαλιού καθαρισμένο με διάλυμα πιράνχα για 10 λεπτά (δείγμα αναφοράς), (β) δείγμα τροποποιημένο με αιθανολαμίνη 50% και (γ) δείγμα τροποποιημένο με αιθανολαμίνη και διπλό-NHS-PEG (1mg/ml).

Σχήμα Β.2. Λεπτομέρειες φασμάτων και ανάλυση κορυφών άνθρακα, πυριτίου, αζώτου και οξυγόνου για το δείγμα αναφοράς γυαλιού καθαρισμένου σε διάλυμα πιράνχα.

Σχήμα Β.3. Λεπτομέρειες φασμάτων και ανάλυση κορυφών άνθρακα, αζώτου και οξυγόνου για τα δείγματα γυαλιού, τα οποία τροποποιήθηκαν με αιθανολαμίνη (δείγμα 1) και αιθανολαμίνη/διπλό-NHS-PEG (δείγμα 2).

Από τις εντάσεις των κορυφών XPS και χρησιμοποιώντας τους συντελεστές ευαισθησίας στο φωτοϊονισμό υπολογίστηκε η παρακάτω επιφανειακή σύσταση για καθένα από τα δείγματα.

Πίνακας Β.1. Στοιχειομετρική ανάλυση δειγμάτων γυαλιού πριν και μετά την τροποποίησή τους με αιθανολαμίνη και διπλό-NHS-PEG.

	C(%)	N(%)	O(%)	Si(%)
Καθαρό γυαλί	10.6	1.6	62.8	25.0
γυαλί-αιθανολαμίνη	11.9	3.2	58.0	26.9
γυαλί-αιθανολαμίνη- PEG	17	2.7	54.9	25.4

Γ. Αλγόριθμοι Matlab αυτόματης επεξεργασίας πειραματικών καμπύλων και μετρήσεων

```
function [rupture_forces,rupture_separations,loading_rate]=single_force(t)
% t is the number in the filename fbg_force.#
```

```
file=fopen(sprintf('fbg_force.%d.txt', t));
if file==-1
    error('File not found or permission denied');
end
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%Finding and reading information from header
```

```
Sensitivity=parameter_finder('"@Sens. Zsens: V',18,5,file);
k=parameter_finder('"Spring Constant:',18,5,file);
velocity=parameter_finder('"Reverse vel.:',16,7,file);
velocity=Sensitivity*velocity;
samplline=parameter_finder('"Samps/line, retrace:',23,4,file);
```

```
%%%%%%%%%%%%
%reading data
%retrieve Zpiezo position and deflection data
```

```
fseek(file,0,-1); %rewind the file
j=1;
data=[];
```

```
while j<729 %the length of the header is 726 lines+ 1 break line+ 1
    %additional column header=728
    line=fgets(file); % select one after the other the lines of the main
    %header
    if j==728
        data= fscanf(file, '%f %f',[2,samplline]); % read the data in a [2,
        %samplline] matrix
    end
    j=j+1;
end
data=data';
Zposition=-data(:,1); %the piezo movement was expressed in negative values
%and here is being reversed
deflection=data(:,2);

force=[];

g=cos(11*pi)/180; % substrate mounting angle in radians
force=deflection*k/cos(g) ; %calculate interaction force from its
% component which deflects the cantilever
force=force-force(end); %shift the force curve so that the final value far
```

```

                                %from the surface is zero

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%Calculation of tip-surface separation

%Fit the force curve far away from the surface by taking into account the
%last 500 points or the n last points until a snap-off is reached

fitlength=3; %initial value for fitlength is 3 to avoid zeroing of
              %denominator of (a)factor in the regression formula(see
              % fitting function below)

while fitlength<700 & abs(mean(force(samplline-fitlength:end))-
force(samplline-fitlength))<0.2 |diff(force(samplline-fitlength)-
mean(force(samplline-fitlength:end)))>0
    fitlength=fitlength+1;
end
fitlength=fitlength-2;
force_fitted=fitting(samplline-fitlength,samplline,Zposition,force);

% The number of points fitted is N=fitlength+1

%find the point m where the cantilever is not deflected and in contact with
%the surface. m is the point where the line fitting the deflection away
%from the surface, intercepts the curve when tip is in contact with the
%surface

for m=1:samplline
    if force(m)-force_fitted(m)<0;
        break
    end
end

%offset the retracting curve so that the origin of the graph is at the end
%of the tip-surface contact region
deflection=deflection-deflection(m);
Zposition=Zposition-Zposition(m);

separation=deflection+Zposition; %calculate separation between tip and
                                %surface

%%%%%
%noise

%Fit again the horizontal part of the force curve vs. the separation (not
%the Zposition)

force_fitted=fitting(samplline-fitlength,samplline,separation,force);

```

```

%calculate the rms of noise as the square root of the squared differences
%between the measured and the fitting data at the horizontal part of the
%curve from the fitlength point to the end
rms=sqrt(sum((force(samplline:fitlength:end)-force_fitted(samplline-
fitlength:end)).^2)/(fitlength+1));

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%Find the rupture points in the curve

%find the significant minima in the initial force curve obtained, calling
%the function "minima"
[initial_sig_min,local_min]=minima(force,force,separation,rms,force_fitted)
;
%find the significant maxima in the initial force curve obtained, calling
%the function "maxima"
[sig_max]=maxima(force,separation,rms,force_fitted);

%smoothen the force curve
filtr=[1 1 1]/3; %filtr is the vector used for the smoothening of the
                %experimental data through convolution

conv_force=force;      %definition of starting values
count=0;
sig_min=initial_sig_min;

while count<100
    c=conv(filtr,conv_force);    %convolution-smoothening of the force curve
                                % (here named "convoluted" because used in a
                                %loop-process)
    conv_force=c(2:samplline+1); %the conv_force vector has length
                                % (samplline+2)...keep the middle(samplline)
                                %data
%the force values at the points of the initial significant minima are kept
%the same as in the initial force curve
conv_force(initial_sig_min)=force(initial_sig_min);
%the same is done for the significant maxima
conv_force(sig_max)=force(sig_max);
%the same is done for the first and the last point
conv_force(1)=force(1);
conv_force(samplline)=force(samplline);

[new_sig_min,local_min]=minima(conv_force,force,separation,rms,force_fitted
); %new significant minima are estimated for the convoluted curve

%the smoothening loop is repeated until an uninterrupted sequence of 100
%loops gives the same number of minima

if length(new_sig_min)==length(sig_min)
    count=count+1;
else
    count=0;
end
sig_min=new_sig_min;
end

```

```
%Remove the first minimum if it represents non-specific adhesion: i.e. if
%the rupture distance is less than 25nm from the contact point. Peg-length
%is ~25nm therefore ruptures at smaller distances cannot represent protein
%unbinding. Pay attention if the local_min vector is void or contains only
%one (non-specific) minimum.
```

```
red_local_min=[];
```

```
if ~isempty(local_min)
    for f=1:length(local_min)
        if separation(local_min(f))<25
            red_local_min=[]; %red_local_min is the reduced local_min matrix
                               %after the removal of the non-specific rupture
                               %points
        else
            red_local_min=local_min(f:end);
            break
        end
    end
end
```

```
% Stop the function if there is no specific rupture points
if isempty(red_local_min) % test that there are minima at the curve
    rupture_forces=[]; % If no specific detachment has occurred an
                       %empty matrix is returned for the rupture
    rupture_separations=[]; %forces/separations
    return %stop the function execution
end
```

```
rupture_forces=force(red_local_min); %"local_min" instead of "sig_min"
                                     %are assigned as rupture points
                                     % to include successive pull-off events
                                     %that are far away but happen at
                                     %similar force values
rupture_separations=separation(red_local_min);
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%Fitting with worm-like-chain model
```

```
%Find the value of persistence length (lp) for which the difference between
%the wlc fitted curve and the original...force values is minimized.Use the
%lsqnonlin function to minimize the sum of squares of F vector
%elements(fun.m)
```

```
if length(red_local_min)<length(local_min)
    fit_start=local_min(1)+1; %if there is a non-specific adhesion,
                              %the fitting starts after it
else
    fit_start=m; %otherwise it starts from the point of contact
end
lp=[];
Lcontour=[];
for i=1:length(red_local_min) % i counts the significant specific
                              %rupture events
```

```

sep_fit=separation(fit_start:red_local_min(i)); %fit distance/separation
force_fit=force(fit_start:red_local_min(i)); %original force data to be
                                         %fitted, from the (i-1) up
                                         %to the i st rupture point
Lcontour(i)=rupture_separations(i)+10; %contour length is assumed the
                                         %distance at the rupture point
                                         % plus 10nm to avoid zeroing the
                                         %denominator.

x0=0.1;
[x,resnorm]=lsqnonlin('fun',x0,0,10,[],sep_fit,force_fit, Lcontour(i));
%non-linear least square fitting with wlc model...
%call function fun, lower bound for lp=0, upperbound=10, use large scale
%Levenberg-Marquardt method

lp(i)=x; %compile fitting persistence lengths in the vector lp
fit_start=red_local_min(i)+1;
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%calculation of loading rate

%calculate the loading rate from the velocity of the tip and the effective
%spring constant of the tip-peg-protein system. The stiffness of the peg-
%protein depends on its extension and therefore it is calculated just
%before each rupture.

for i=1:length(red_local_min)
    k_peg(i)=0.00414/lp(i)/Lcontour(i)*[0.5*(1-
rupture_separations(i)/Lcontour(i))^(3)+1];
end
k_eff=k*k_peg/(k+k_peg);
loading_rate=velocity*k_eff; %loading rate in nN/sec

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%plotting data

% Plot the force (calculated by the unprocessed deflection multiplied by k)
%versus the separation between the tip and the surface

figure(1)
plot(separation,force,'-');
xlabel('separation (nm)');
ylabel('force (nN)');
title(sprintf('fbg%d', t));
hold on
plot(separation(m:samplline), force_fitted(m:samplline),'g-')
hold on

for u=1:length(red_local_min)
    sep_fit=separation(m:red_local_min(u)); %m is the contact point
                                         % calculated at line 88
    force_wlc=-0.00414/lp(u)*[0.25./(1-sep_fit./ Lcontour(u)).^2-
1/4+sep_fit./ Lcontour(u)];
    plot(sep_fit, force_wlc,'y-')

```

```

        hold on
end

% plot the point up to which the horizontal part of the curve has been
%fitted
plot(separation(samplline-fitlength), force(samplline-fitlength), 'bo')
hold on

%plot the initial significant minima using red "+"
plot(separation(initial_sig_min), force(initial_sig_min), 'r+') hold on

%plot the initial significant maxima using blue "+"
plot(separation(sig_max), force(sig_max), 'b+') hold on

%plot the final smoothened force curve
plot(separation,conv_force,'-r');

%plot the rupture points (minima instead of the significant minima
%because some of the former may be excluded from the latter due to similar
%rupture forces although far apart)keeping reference to the initial force
%data
plot(rupture_separations,rupture_forces, 'go')
hold off

%rupture forces are measured relatively to the fitted horizontal
rupture_forces=force(red_local_min)-force_fitted(red_local_min);

fclose(file); %close the file
clear file data ABvoltage deflection force force_fitted separation
Zposition; %clear the memory

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%parameter_finder function
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% parameter_reader function finds in the header of each file
% the value of the parameters needed for the processing of data
% value is the returning value of the parameter(number)
% parameter is the name of the needed information as it appears in the
%header in brackets e.g.'"Reverse vel.:". prefix_length is the number of
%characters before the desired value in the specific line. value length is
%the number of digits of the needed value.file is the name of the file
%previously opened in binary mode with the fopen command

function
parameter_num=parameter_finder(parameter,prefix_length,value_length,file)
fseek(file,0,-1); %rewind the file
i=0;
while i<726
    line=fgets(file); % select one after the other the lines of
the %header and return a string
    i=i+1; %count each line of the header
    y=findstr(line, parameter); % search for the string:parameter in each
line

```

```

if y>0                                % if find, return the number of the starting
                                      %position keeping file position indicator in
                                      %the end of the previous line

break
end
p=ftell(file);                        %get file position indicator in the end of the
line
end
p=p+prefix_length; %get file position indicator just before the needed
value
parameter_num=data_reader(p,value_length,file); %see subfunction
                                                %data_reader below

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%data_reader function
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%data_reader function reads the needed data, already located in the file in
%binary form and transforms them into numbers start point is the point in
%the file (in binary mode) from where reading is started datalength is the
%the number of elements to be read

function data=data_reader(start_point,datalength,file);
fseek(file,start_point,-1); %move to start_point position in the binary
                             %file
s=fread(file,datalength); %read the needed data in binary mode,
data_char=char(s'); %create character array from binary mode
data=str2num(data_char); %convert data to number

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%fitting function
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%This function fits the experimental data with a line using the formulas of
%linear regression start_point is the first point of the experimental data
%used for the fitting and end_point is the final x is the independent
%variable (here is separation) while y is the data to be fitted (force or
%deflection)

function force_fitted=fitting(start_point,end_point,x,y);
Sx=sum(x(start_point:end_point));
Sxx=sum(x(start_point:end_point).^2);
Sxy=sum(x(start_point:end_point).*y(start_point:end_point));
Sy=sum(y(start_point:end_point));

b=((end_point-start_point+1)*Sxy-Sx*Sy)/((end_point-start_point+1)*Sxx-
Sx*Sx); %b is the estimate of the slope in the linear regression model
        %y=a+bx
a=(Sy-b*Sx)/(end_point-start_point+1) ; %a is the estimate of the intercept
force_fitted=b*x+a;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% minima function
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

```

```
%This function estimates the position of the minima (local_min) and the
%significant minima (sig_min) in the array representing a force curve
%called current_force. It firstly finds the points of all the local minima
%as the points where the signal is falling and then is rising. Then, from
%all these minima only those that differ more than 6*rms are assigned as
%significant.
%initial_force is the initial force data calculated from the deflection.
%separation is the tip-surface separation at each point of force
%measurement and rms is the root mean square of the noise at the
%horizontal part of the curve horiz_line is the line, yielded from fitting
%the horizontal part of the curve (far from surface) drawn along the whole
%range of separations

function
[sig_min, local_min]=minima(current_force, initial_force, separation, rms, horiz
_line)

difference=diff(current_force); %the vector with elements [f(2)-f(1), f(3)-
% f(2), f(4)-f(3), ..., f(n)-f(n-1)] is formed
% its length is n-1

upordown=sign(difference); %identify whether signal is rising or falling.
% Assign 1 if it is rising, -1 if it is falling,
% 0 if it is constant

minflags1=[upordown(1)>0; diff(upordown)>0; upordown(end)<0];
%creates a vector with ones wherever there is a minimum
%(the signal is falling(upordown=-1) and then it is rising (upordown=1)→
%diff(upordown)>0). Two elements (one at the beginning and one at the end)
%are added so that the vector length will be equal to the length of the
%current_force vector and each element will refer to one element in the
%current_force vector

minflags2=[current_force-horiz_line<-6*rms];
% ones are assigned to forces which differ more than 6*rms from the
% the fitting line of the horizontal part and are lower than it
% abs(current_force-horiz_line)>6*rms and current_force<horiz_line-->
% current_force-horiz_line<0

minflags=minflags1+minflags2; %combine the two above requirements

local_min=find(minflags==2); %find the positions of local minima which are
%less than -6*rms

if isempty(local_min)
    sig_min=[];
else
    min_force=initial_force(local_min); % find the minima according to the
% initial force curve not the current-
% convoluted

    threshold_min=diff(min_force); %calculate the difference between two
% successive local minima using
% the initial force values

    sig_minflags=[threshold_min>6*rms; local_min(end)];
```



```

%assign ones to those minima which differ from the following more than
%6*rms and are lower than it(threshold_min(i)=fmin(i+1)-fmin(i) and refers
%to the %ith minimum).The last minimum is assigned significant just if the
%force<6*rms
sig_min=[local_min(find(sig_minflags))];    %find the positions of the
                                           %significant minima in the
                                           %vector of force(either current
                                           %or initial)

end

```

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% maxima function
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

```

```

%This function estimates the position of the maxima (initial_max) and the
%significant maxima (sig_max) in the vector of force.It firstly finds the
%points of all the local maxima as the points where the signal is rising
%and then is falling.Then, from all these maxima only those that are higher
%than 6*rms from the previous and are followed by another one are assigned
%as significant. separation is the tip-surface separation at each point of
%force measurement and rms is the root mean square of the noise at the
%horizontal part of the curve horiz_line is the line, yielded from fitting
%the horizontal part of the curve (far from surface) drawn along the whole
%range of separations

```

```

function [sig_max]=maxima(force,separation,rms,horiz_line)

```

```

difference=diff(force); %the vector with elements [f(2)-f(1), f(3)-f(2),
               %f(4)-f(3),...,f(n)-f(n-1)] is formed
               %its length is n-1

```

```

upordown=sign(difference); %identifies whether signal is rising or falling.
               %Assign 1 if it is rising , -1 if it is falling,
               %0 if it is stable

```

```

maxflags1=[upordown(1)<0; diff(upordown)<0; upordown(end)>0];
%creates a vector with ones wherever there is a maximum(the signal is
%rising(upordown=1) and then it is falling(upordown=-1)→diff (upordown)
%<0).Two elements(one at the beginning and one at the end) are added so
%that the vector length will be equal to the length of the current_force
%vector and each element will refer to one element of the current_force
%vector

```

```

maxflags2=[force-horiz_line<-6*rms];
% ones are assigned to forces which differ more than 6*rms from the
% the fitting line of the horizontal part and are lower than it
% abs(current_force-horiz_line)>6*rms and current_force<horiz_line-->
% current_force-horiz_line<0

```

```

maxflags=maxflags1+maxflags2;    %both above requirements should be %
                                %satisfied

```

```

local_max=find(maxflags==2); %finds the positions (indices) of local maxima
               %which differ more than 6*rms from the
               %horizontal line

```

```

max_force=force(local_max); % find the maxima according to the initial
                             % force curve not the currently-convoluted

if length(local_max)<3
    sig_max=[];
else
    if max_force(1)-min(force)>6*rms & abs(max_force(3)-max_force(1))<6*rms
        sig_max=[local_max(1)]; % the 1st local max is assigned significant if
                                % it is 6*rms higher than the minimum of the
                                % curve and is is closely followed by two more
                                %local maxima
    else
        sig_max=[];
    end
end

for i=2:length(local_max)-2
    if max_force(i)-max_force(i-1)>3*rms & abs(max_force(i+2)-
max_force(i))<6*rms; %the ith local max should be 6*rms higher than the
                    %previous one and be followed closely by two others
        sig_max=[sig_max;local_max(i)];
    end
end

%the last two local maxima cannot be significant because even if they were
%more than 4*rms higher than %the previous one, they will not represent
%extended unfolding (not followed by other maxima)

function F=fun(x,sep_fit,force_fit, Lcontour)
F=force_fit+0.00414/x*[0.25./(1-sep_fit./ Lcontour).^2-1/4+sep_fit./
Lcontour];

```

```

function distribution(file_numbers)
%This function calculates the distribution of the rupture forces or rupture
%separations collected from the files whose namenumbers appear in the
%vector file_numbers. Although the processed curves are expected to display
%only one rupture event,the final rupture event from each curve is
%processed in order to exclude effects from previous ruptures. The final
%rupture forces are also distributed in separate histograms according to
%the loading rate

```

```

all_forces=[]; %vector containg all the rupture forces at the processed
               %curves
all_separations=[]; %vector containg all the rupture distances at the
                   %processed curves
all_final_forces=[]; %only the final rupture forces are included (at
                    %maximum one for each force curve)
all_final_distances=[]; % only final rupture distances
all_final_loading_rates=[]; % the loading rates for the final rupture
%forces
c=0;

for i=1:length(file_numbers)
    if exist(sprintf('fbg_force.%d.txt', file_numbers(i)));
%check for file fbg_force.# on matlab's search path and return 2

[rupture_forces,rupture_separations,loading_rate]=single_force(file_numbers
(i));
%Call the function "force_fbg" and return the rupture forces/separations
%/loading rates for the file bearing in its name "fbg_force.#" the number
%of the ith element of the vector "file_numbers"
    all_forces=[all_forces; -1*rupture_forces]; %Collect all the
                                               % rupture forces in one vector
    all_separations=[all_separations; rupture_separations];
    %Collect all the rupture separations in one vector
    if ~isempty(rupture_forces)
        all_final_forces=[all_final_forces; -1*rupture_forces(end)];
        all_final_distances=[all_final_distances;
rupture_separations(end)];
    end
    all_final_loading_rates=[all_final_loading_rates;loading_rate(end)];
    end
    c=c+1; %count the processed curves
end
end
%calculate the number of curves which contain specific detachment events
%and compare with the overall number of curves
l=length(all_final_forces);
specific_rupt_freq=l/c;

%Initialize vectors containg final rupture forces. The final ruprure forces
%are distributed in five vectors according to the loading rate just before
%rupture
all_final_forces1=[];
all_final_forces2=[];
all_final_forces3=[];
all_final_forces4=[];
all_final_forces5=[];

%distribute the final rupture forces in 5 groups according to the loading
%rate
% 1st group=[0,20] ...central value 10nN/nm
% 2nd group=[20,80] ...central value 50nN/nm
% 3rd group=[80,120] ...central value 100nN/nm
% 4th group=[120,280] ...central value 200nN/nm
% 5th group=[280,...] ...central value 1100nN/nm

```

```

loading_rate1=10;
loading_rate2=50;
loading_rate3=100;
loading_rate4=200;
loading_rate5=1100;

for j=1:1
    if all_final_loading_rates(j)>0 & all_final_loading_rates(j)<20
        all_final_forces1=[all_final_forces1;all_final_forces(j)];
    elseif all_final_loading_rates(j)>=9 & all_final_loading_rates(j)<80
        all_final_forces2=[all_final_forces2;all_final_forces(j)];
    elseif all_final_loading_rates(j)>=18 & all_final_loading_rates(j)<120
        all_final_forces3=[all_final_forces3;all_final_forces(j)];
    elseif all_final_loading_rates(j)>=18 & all_final_loading_rates(j)<280
        all_final_forces4=[all_final_forces4;all_final_forces(j)];
    else
        all_final_forces5=[all_final_forces5;all_final_forces(j)];
    end
end

figure(1)
% call the function histogram for the final rupture forces
histogram(all_final_forces,0.02, 'rupture force (nN)'); hold off

figure (2)
% call the function histogram for the final rupture distances
histogram(all_final_distances, 2, 'rupture distance (nm)'); hold off

loading_rate1
figure (3)
max_prob_final_force1=histogram(all_final_forces1,0.02, 'final rupture
force (nN) at 1st loading rate');
hold off

loading_rate2
figure (4)
max_prob_final_force2=histogram(all_final_forces2,0.02, 'final rupture
force (nN)at 2nd loading rate');
hold off

loading_rate3
figure (5)
max_prob_final_force3=histogram(all_final_forces3,0.02, 'final rupture
force (nN)at 3rd loading rate');
hold off

loading_rate4
figure (6)
max_prob_final_force4=histogram(all_final_forces4,0.02, 'final rupture
force (nN)at 4th loading rate');
hold off

loading_rate5
figure (7)
max_prob_final_force5=histogram(all_final_forces5,0.02, 'final rupture
force (nN)at 5th loading rate');

```

```
hold off
```

```
%%%%%%%%%%%%%%
%histogram function
%%%%%%%%%%%%%%
```

```
% This function creates the histogram of the rupture forces or the rupture
%distances. The relative number of ruptures recorded in the force or
%distance intervals defined by the bin width is displayed. Cum_var is the
%vector of either the cumulated rupture forces or rupture separations. Bin
%is the bin width used to calculate the number of bins for the hist
%function. If the histogram function is applied on the rupture forces the
%bin width is set equal to the estimated thermal noise=20pN, otherwise (if
%applied on rupture distances) bin width=5nm
```

```
function max_prob=histogram(variable,bin,parameter)
% variable is either the all_force or the all_separation vector
%bin=0.02(noise) or 5nm
n = length(variable) %total number of rupture forces or rupture
separations
m = sum(variable)/n %mean value of rupture forces or rupture separations
s2 = (variable-m)'*(variable-m)/n; %variation=(standard deviation)^2
s=sqrt(s2)
%calculate the number of bins used in the histogram by dividing the range
% of forces/separations by the desired bin size
Num_bins=(max(variable)-min(variable))/bin;
Num_bins=ceil(Num_bins); % Round to the nearest integer towards plus
%infinity
%Bin the elements of cum_var in equally spaced containers (as many as the
%Num_bins) and return the number of elements (N) in each container (X is
%the position of the bin center)
[N,x] = hist(variable,Num_bins);

bin=x(2)-x(1); % the width of the bin is recalculated to make up for the
%rounding-up correction of the Num_bins

N = N / sum(N); %relative probability of counts in each bin

max_prob=x(find(N-max(N)==0))

%fit the distribution with the normal distribution (gaussian)curve.
%Multiply with bin so that the area under the curve equals ?(N*bin)=bin
y =bin* sqrt(1/2/pi/s2)*exp(-(x-m).^2)/(2*s2));

RMS = sqrt( (y-N)*((y-N)') / (bin)^2 / (length(x)-1) ); %find the rms of
%the fitting

%plot the normalized probability for each force range drawing a rectangular
%defined by the bin width (x-bin/2, x+bin/2) and the corresponding
%normalized counts N
for j=1:Num_bins
    fill([x(j)-bin/2 x(j)-bin/2 x(j)+bin/2 x(j)+bin/2 x(j)-bin/2 ], [0 N(j)
N(j) 0 0], 'b')
    hold on
end
```

```

%plot the fitting curve
plot(x,y,'r')
xlabel(parameter)
ylabel('relative probability');
hold on

%fit the force distribution with the probability function derived from
%Bell's model
if findstr('force', parameter)
k0=0.00000000000012; %the off-rate at f=0 (s-1)
xu=232; %position of the transition state (nm)
r=100; %loading rate (nN/s)
for i=1:Num_bins
    bell(i)=bin*k0/r*exp(xu*x(i)/0.00414)*exp(k0/xu*0.00414/r*(1-
exp(xu*x(i)/0.00414))); %Multiply with bin so that the area under the
curve
                                %equals sum(N*bin)=bin
    end
E=sum(bell*bin); %the area between the fitted distribution according to the
                %BELL model and the horizontal axis
Y=sum(y*bin); %the area under the fitting curve using the normal
              %distribution
EN=sum(N*bin); %the area derived by the normalized distribution of
              %experimental data

plot(x,bell,'b')
end

hold off

```

Βιβλιογραφία

- Abdelhady H.G., Allen S., Ebbens S.J., Madden C., Patel N., Roberts C.J. and Zhang J. 2005. Towards nanoscale metrology for biomolecular imaging by Atomic Force Microscopy. *Nanotechnology*. 16: 966-973.
- Agnihotri A. and Siedlecki C.A. 2004. Time-dependent conformational changes in fibrinogen measured by Atomic Force Microscopy. *Langmuir*. 20: 8846-8852.
- Albrecht C.H., Clausen-Schaumann H. and Gaub H.E. 2006. Differential analysis of biomolecular rupture forces. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 18: S581-S599.
- Allen S., Rigby-Singleton S.M., Harris H., Davies M.C. and O'Shea P. 2003. Measuring and visualizing single molecular interactions in biology. *Biochemical Society Transactions*. 31: 1052-1057.
- Ando T., Uchihashi T., Kodera N., Yamamoto D., Taniguchi M., Miyagi A. and Yamashita H. 2007. High-speed atomic force microscopy for observing dynamic biomolecular processes. *Journal of Molecular Recognition*. 20: 448-458.
- Anselmetti D., Luthi R., Meyer E., Richmond T., Dreier M., Frommer J.E. and Guntherodt H.-. 1994. Attractive-mode imaging of biological materials with dynamic force microscopy. *Nanotechnology*. 5: 87-94.
- Arkles B., Steinmetz J.R., Zazyczny J. and Mehta P. Factors contributing to the stability of alkoxysilanes in aqueous solution in *Silanes and other coupling agents* (ed. K.L. Mittal). 1992. Utrecht, VSP.
- Arwin H. 1998. Spectroscopic ellipsometry and biology: recent developments and challenges. *Thin Solid Films*. 313-314: 764-774.
- Asthagiri D. and Lenhoff A.M. 1997. Influence of structural details in modeling electrostatically driven protein adsorption. *Langmuir*. 13: 6761-6768.
- Backer M.V., Gaynutdinov T.I., Patel V., Jehning B.T., Myshkin E. and Backer J.M. 2004. Adapter protein for site specific conjugation of payloads for targeted drug delivery. *Bioconjugate Chem*. 15: 1021-1029.

- Bajpai A.K. 2005. Blood protein adsorption onto a polymeric biomaterial of polyethylene glycol and poly[(2-hydroxyethyl methacrylate)-co-acrylonitrile] and evaluation of in vitro blood compatibility. *Polymer International*. 54: 304-315.
- Bajpai A.K. and Mishra D.D. 2008. Dynamics of blood proteins adsorption onto poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-silica nanocomposites: Correlation with biocompatibility. *Journal of Applied Polymer Science*. 107: 541-553.
- Balcells M., Klee D., Fabry M. and Hocker H. 1999. Quantitative assessment of protein adsorption by combination of the enzyme-linked immunosorbent assay with radioisotope-based studies. *Journal of Colloid and Interface Science*. 220: 198-204.
- Ball V. and Ramsden J.J. 2000. Analysis of hen egg white lysozyme adsorption on Si(Ti)O₂ vertical bar aqueous solution interfaces at low ionic strength: a biphasic reaction related to solution self-association. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 17: 81-94.
- Baumgartner W., Hinterdorfer P. and Schindler H. 2000. Data analysis of interaction forces measured with the atomic force microscope. *Ultramicroscopy*. 82: 85-95.
- Bell G.I. 1978. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*. 200: 618-627.
- Bergkvist M., Carlsson J. and Oscarsson S. 2001. A method for studying protein orientation with atomic force microscopy using relative protein volumes. *Journal of Physical Chemistry B*. 105: 2062-2069.
- Bhushan B. ed. in *Handbook of Nanotechnology*. 2004. Berlin, Springer Verlag.
- Binnig G., Quate C.F. and Gerber C. 1986. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*. 56: 930-933.
- Bonanni B., Kamruzzahan A.S.M., Bizzarri A.R., Rankl C., Gruber H.J., Hinterdorfer P. and Cannistraro S. 2005. Single molecule recognition between Cytochrome C551 and gold immobilized Azurin by Force Spectroscopy. *Biophysical Journal*. 89: 2783-2791.
- Bouchiat C., Wang M.D., Allemand J.-., Strick T., Block S.M. and Croquette V. 1999. Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements. *Biophysical Journal*. 76: 409-413.
- Boukari A., Francius G. and Hemmerle J. 2006. AFM force spectroscopy of the fibrinogen adsorption process onto dental implants. *J Biomed Mater Res*. 78A: 466-472.

- Britland S., Perridge C., Denyer M., Morgan H., Curtis A. and Wilkinson C. 1996. Morphogenetic guidance cues can interact synergistically and hierachically in steering nerve cell growth. *Experimental Biology Online*. 1:2.
- Brown A.E.X., Litvinov R.I., Discher D.E. and Weisel J.W. 2007. Forced unfolding of coiled-coils in fibrinogen by single-molecule AFM. *Biophysical Journal-Biophysical Letters*. 92: L39-L41.
- Bustamante C., Marko J.F., Siggia E.D. and Smith S. 1994. Entropic elasticity of λ -phage DNA. *Science*. 265: 1599-1600.
- Cacciafesta P., Hallam K.R., Watkinson A.C., Allen G.C., Miles M.J. and Jandt K.D. 2001. Visualisation of human plasma fibrinogen adsorbed on titanium implant surfaces with different roughness. *Surface Science*. 491: 405-420.
- Cacciafesta P., Humphris A.D.L., Jandt K.D. and Miles M.J. 2000. Human plasma fibrinogen adsorption on ultraflat titanium oxide surfaces studied with atomic force microscopy. *Langmuir*. 16: 8167-8175.
- Canavan H.E., Graham D.J., Cheng X., Ratner B.D. and Castner D.G. 2007. Comparison of native extracellular matrix with adsorbed protein films using Secondary Ion Mass Spectrometry. *Langmuir*. 23: 50-56.
- Candan S., Beck A.J., O'Toole L. and Short R.D. 1998. Effects of "processing parameters" in plasma deposition: Acrylic acid revisited. *J.Vac.Sci.Technol. A*. 16: 1702-1709.
- Capadona J.R., Collard D.M. and Garcia A.J. 2003. Fibronectin adsorption and cell adhesion to mixed monolayers of tri(ethylene glycol)- and methyl-terminated alkanethiols. *Langmuir*. 19: 1847-1852.
- Cassimeris L., Gard D., Tran P.T. and Erickson H.P. 2001. XMAP215 is a long thin molecule that does not increase microtubule stiffness. *Journal of Cell Science*. 114: 3025-3033.
- Chen X., Davies M.C., Roberts C.J., Tendler S.J.B. and Williams P.M. 1997. Recognition of protein adsorption onto polymer surfaces by Scanning Force Microscopy and probe-surface adhesion measurements with protein-coated probes. *Langmuir*. 13: 4106-4111.
- Chen X., Davies M.C., Roberts C.J., Tendler S.J.B., Williams P.M. and Burnham N.A. 2000. Optimizing phase imaging via dynamic force curves. *Surface Science*. 460: 292-300.
- Chen X., Roberts C.J., Zhang J., Davies M.C. and Tendler S.J.B. 2002. Phase contrast and attraction-repulsion transition in tapping mode Atomic Force Microscopy. *Surface Science*. 519: L593-L598.

- Chen Z., Jiang J., Shen G. and Yu R. 2005. Impedance immunosensor based on receptor protein adsorbed directly on porous gold film. *Analytica Chimica Acta*. 553: 190-195.
- Chittur K.K. 1998. FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces. *Biomaterials*. 19: 357-369.
- Chtcheglova L.A., Shubeita G.T., Sekatskii S.K. and Dietler G. 2004. Force spectroscopy with a small dithering of AFM tip: A method of direct and continuous measurement of the spring constant of single molecules and molecular complexes. *Biophysical Journal*. 86: 1177-1184.
- Claesson P.M., Blomberg E., Froberg J.C., Nylander T. and Arnebrant T. 1995. Protein interactions at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*. 57: 161-227.
- Cleveland J.P., Manne S., Bocek D. and Hansma P.K. 1993. A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy. *Review of Scientific Instruments*. 64: 403-405.
- Cullen D.C. and Lowe C.R. 1994. AFM studies of protein adsorption 1. Time-resolved protein adsorption to highly oriented pyrolytic graphite. *Journal of Colloid and Interface Science*. 166: 102-108.
- Curtis A., Aitchison G. and Tsapikouni T. 2006. Orthogonal (transverse) arrangements of actin in endothelia and fibroblasts. *Journal of the Royal Society Interface*. 3: 753-756.
- Curtis A.S.G. 2004. Small is beautiful but smaller is the aim: Review of a life of research. *European Cells and Materials*. 8: 27-36.
- Czajkowsky D.M. and Shao Z. 2003. Inhibition of protein adsorption to muscovite mica by monovalent cations. *Journal of Microscopy*. 211: 1-7.
- Daly S.M., Przybycien T.M. and Tilton R.D. 2003. Coverage-dependent orientation of lysozyme adsorbed on silica. *Langmuir*. 19: 3848-3857.
- De Paris R., Strunz T., Oroszlan K., Guntherodt H. and Hegner M. 2000. Force spectroscopy and dynamics of the biotin-avidin bond studied by scanning force microscopy. *Single Molecules*. 1: 285-290.
- Denis F.A., Hanarp P., Sutherland D.S., Gold J., Mustin C., Rouxhet P.G. and Dufrene Y.F. 2002. Protein adsorption on model surfaces with controlled nanotopography and chemistry. *Langmuir*. 18: 819-828.

- Derjaguin B.V. and Landau L. 1941. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physicochem. URSS*. 14: 633-662.
- Dietz H., Berkemeier F., Bertz M. and Rief M. 2006. Anisotropic deformation response of single protein molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 12726-12728.
- Doering W.E. and Nie S. 2002. Single-molecule and single-nanoparticle SERS: Examining the role of surface active sites and chemical enhancement. *J. Phys. Chem. B*. 106: 311-317.
- Doolittle R.F. 1992. A detailed consideration of a principal domain of vertebrate fibrinogen and its relatives. *Protein Science*. 1: 1563-1577.
- Drake B., Prater C.B., Weisenhorn A.L., Gould S.A.C., Albrecht T.R., Quate C.F., Cannell D.S., Hansma H.G. and Hansma P.K. 1989. Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope. *Science*. 243: 1586-1589.
- Dreier M., Anselmetti D., Richmond T., Dammer U. and Guntherodt H.-. 1994. Dynamic force microscopy in liquids. *J. Appl. Phys.* 76: 5095-5098.
- Ducharme D., Tessier A. and Russev S.C. 2001. Simultaneous thickness and refractive index determination of monolayers deposited on an aqueous subphase by Null Ellipsometry. *Langmuir*. 17: 7529-7534.
- Elwing H. 1998. Protein adsorption and ellipsometry in biomaterial research. *Biomaterials*. 19: 397-406.
- Erickson H.P. and Carrell N.A. 1983. Fibronectin in extended and compact conformations. *The Journal of Biological Chemistry*. 258: 14539-14544.
- Erickson H.P., Carrell N. and McDonagh J. 1981. Fibronectin molecule visualized in electron microscopy: A long, thin, flexible strand. *The Journal of Cell Biology*. 91: 673-678.
- Evans E. 1999. Looking inside molecular bonds at biological interfaces with dynamic force spectroscopy. *Biophysical Chemistry*. 82: 83-97.
- Evans E. and Ritchie K. 1997. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophysical Journal*. 72: 1541-1555.

- Evans E., Ritchie K. and Merkel R. 1995. Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces. *Biophysical Journal*. 68: 2580-2587.
- Facci P., Alliata D., Andolfi L., Schnyder B. and Kotz R. 2002. Formation and characterization of protein monolayers on oxygen-exposing surfaces by multiple-step self-chemisorption. *Surface Science*. 504: 282-292.
- Fang F. and Szleifer I. 2001. Kinetics and thermodynamics of protein adsorption: A generalized molecular theoretical approach. *Biophysical Journal*. 80: 2568-2589.
- Faucheux N., Schweiss R., Lutzow K., Werner C. and Groth T. 2004. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials*. 25: 2730.
- Favia P., Creatore M., Palumbo F., Colaprico V. and d'Agostino R. 2001. Process control for plasma processing of polymers. *Surface and Coatings Technology*. 142-144: 1-6.
- Favia P., Sardella E., Gristina R., Milella A. and d'Agostino R. 2002. Functionalization of biomedical polymers by means of plasma processes: Plasma treated polymers with limited hydrophobic recovery and PE-CVD of -COOH functional coatings. *Journal of Photopolymer Science and Technology*. 15: 341-350.
- Fisher T.E., Oberhauser A.F., Carrion-Vazquez M. and Fernandez J.M. 1999. The study of protein mechanics with the atomic force microscope. *Trends in Biochemical Sciences*. 24: 379-384.
- Fixe F., Dufva M., Telleman P. and Christensen C.B.V. 2004. Functionalization of poly(methyl methacrylate) (PMMA) as a substrate for DNA microarrays. *Nucleic Acids Research*. 32: e9.
- Florin E.-., Rief M., Lehmann H., Ludwig M., Dornmair C., Moy V.T. and Gaub H.E. 1995. Sensing specific molecular interactions with the atomic force microscope. *Biosensors & Bioelectronics*. 10: 895-901.
- Frank B.P. and Belfort G. 2003. Polysaccharides and sticky membranes surfaces: Critical ionic effects. *Journal of Membrane Science*. 212: 205-212.
- Fritz J., Anselmetti D., Jarchow J. and Fernandez-Busquets X. 1997. Probing single biomolecules with Atomic Force Microscopy. *Journal of Structural Biology*. 119: 165-171.
- Fritz J., Katopodis A.G., Kolbinger F. and Anselmetti D. 1998. Force-mediated kinetics of single P-selectin/ligand complexes observed by Atomic Force Microscopy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95: 12283-12288.

- Fritz M., Radmacher M., Cleveland J.P., Allersma M.W., Stewart R.J., Gieselmann R., Janmey P., Schmidt C.F. and Hansma P.K. 1995. Imaging globular and filamentous proteins in physiological buffer solutions with tapping mode Atomic Force Microscopy. *Langmuir*. 11: 3529-3535.
- Fuss C., Palmaz J.C. and Sprague E.A. 2001. Fibrinogen: structure, function, and surface interactions. *J Vasc Interv Radiol*. 12: 677-682.
- Garcia R. and Paolo A.S. 1999. Attractive and repulsive tip-sample interaction regimes in tapping-mode atomic force microscopy. *Physical Review B*. 60: 4961-4967.
- Garcia R., Magerle R. and Perez R. 2007. Nanoscale compositional mapping with gentle forces. *Nature Materials*. 6: 405-411.
- Gergely C., Senger B., Voegel J.C., Horber J.K.H., Schaaf P. and Hemmerle J. 2001. Semi-automatized processing of AFM force-spectroscopy data. *Ultramicroscopy*. 87: 67-78.
- Gergely C., Voegel J.C., Schaaf P., Senger B., Maaloum M., Horber J.K.H. and Hemmerle J. 2000. Unbinding process of adsorbed proteins under external stress studied by atomic force microscopy spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 10802-10807.
- Gessner C., Bartels V., Betker T., Matucha U., Penache C. and Klages C. 2004. Surface modification for biomedical purposes utilising dielectric barrier discharges at atmospheric pressure. *Thin Solid Films*. 459: 118-121.
- Gibson C.T., Johnson D.J., Anderson C., Abell C. and Rayment T. 2004. Method to determine the spring constant of atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments*. 75: 565-567.
- Green R.J., Davies M.C., Roberts C.J. and Tendler S.J.B. 1999. Competitive protein adsorption as observed by surface plasmon resonance. *Biomaterials*. 20: 385-391.
- Gregory J. 1975. Interaction of unequal double layers at constant charge. *Journal of Colloid and Interface Science*. 51: 44-51.
- Griesser H.J. and Chatelier R.C. 1990. Surface characterization of plasma polymers from amine, amide and alcohol monomers. *Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium*. 46: 361-384.
- Hammarstrom P., Owenius R., Martensson L., Carlsson U. and Lindgren M. 2001. High-resolution probing of local conformational changes in proteins by the use of multiple labeling: Unfolding and

self-assembly of human carbonic anhydrase II monitored by spin, fluorescent, and chemical reactivity probes. *Biophysical Journal*. 80: 2867-2885.

Han W., Lindsay S.M. and Jing T. 1996. A magnetically driven oscillating probe microscope for operation in liquids. *Applied Physics Letters*. 69: 4111-4113.

Hanke F. and Kreuzer H.J. 2006. Breaking bonds in the atomic force microscope: Extracting information. *Biointerphases*. 1: 11-17.

Hansma P.K., Schitter G.E., Fantner G., E. and Prater C. 2006. High-speed atomic force microscopy. *Science*. 314: 601-602.

Haselgrubler T., Amerstorfer A., Schindler H. and Gruber H.J. 1995. Synthesis and applications of a new poly(ethylene glycol) derivative for the crosslinking of amines with thiols. *Bioconjugate Chemistry*. 6: 242-248.

Haynes C.A. and Norde W. 1994. Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloids and Surfaces B-Biointerphases*. 2: 517-566.

Haynes C.L., McFarland A.D. and Van Duyne, Richard P. 2005. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry*. 77: 338A-346A.

Heinz W.F. and Hoh J.H. 1999a. Relative surface charge density mapping with the Atomic Force Microscope. *Biophysical Journal*. 76: 528-538.

Heinz W.F. and Hoh J.H. 1999b. Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscopy. *Nanotechnology*. 17: 143-150.

Hemmerle J., Altmann S.M., Maaloum M., Horber J.K.H., Heinrich L., Voegel J.C. and Schaaf P. 1999. Direct observation of the anchoring process during the adsorption of fibrinogen on a solid surface by force-spectroscopy mode atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 6705-6710.

Hemmerle J., Picart C., Gergely C., Schaaf P., Stoltz J.-, Voegel J.-. and Senger B. 2003. Modeling of the detachment of a molecule from a surface: Illustration of the "Bell-Evans effect". *Biorheology*. 40: 149-160.

Hermanson G.T. *Bioconjugate Techniques*. 1996. San Diego, Academic Press.

Hertadi R. and Ikai A. 2002. Unfolding mechanics of holo- and apocalmodulin studied by Atomic Force Microscopy. *Protein Science*. 11: 1532-1538.

- Hinterdorfer P. and Dufrene Y.F. 2006. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nature Methods*. 3: 347-355.
- Hinterdorfer P., Baumgartner W., Gruber H.J., Schilcher K. and Schindler H. 1996. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by Atomic Force Microscopy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93: 3477-3481.
- Hinterdorfer P., Kienberger F., Raab A., Gruber H.J., Baumgartner W., Kada G., Riener C., Wielert-Badt S., Borken C. and Schindler H. 2000. Poly(ethylene glycol): An ideal spacer for molecular recognition force microscopy/spectroscopy. *Single Molecules*. 1: 99-103.
- Hinterdorfer P., Schilcher K., Baumgartner W., Gruber H.J. and Schindler H. 1998. A mechanistic study of the dissociation of individual antibody-antigen pairs by atomic force microscopy. *Nanobiology*. 4: 177-188.
- Holland N.B. and Marchant R.E. 2000. Individual plasma proteins detected on rough biomaterials by phase imaging AFM. *Journal of Biomedical Material Research*. 51: 307-315.
- Hook F., Rodahl M., Kasemo B. and Brzezinski P. 1998. Structural changes in hemoglobin during adsorption to solid surfaces: Effects of pH, ionic strength, and ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 12271-12276.
- Hull J.R., Shannon J.J., Tamura G.S. and Castner D.G. 2007. Atomic force microscopy and surface plasmon resonance investigation of fibronectin interactions with group B streptococci. *Biointerphases*. 2: 64-72.
- Hull J.R., Shannon J.J., Tamura G.S. and Castner D.G. 2007. Atomic force microscopy and surface plasmon resonance investigation of fibronectin interactions with group B streptococci. *Biointerphases*. 2: 64-72.
- Hunter R.J. *Foundations of Colloid Science*. 1987. New York, Oxford University Press.
- Hyonchol K., Arakawa H., Osada T. and Ikai A. 2002. Quantification of fibronectin and cell surface interactions by AFM. *Colloids and Surfaces B-Biointerphases*. 25: 33-43.
- Israelachvili J.N. *Intermolecular and Surface forces*. 2nd edition. 1992. London, Academic press.
- Janshoff A., Neitzert M., Oberdorfer Y. and Fuchs H. 2000. Force spectroscopy of molecular systems-Single molecule spectroscopy of polymers and biomolecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39: 3212-3237.

- Jung S., Lim S., Albertorio F., Kim G., Gurau M.C., Yang R.D., Holden M.A. and Cremer P.S. 2003. The Vroman effect: A molecular level description of fibrinogen displacement. *J.Am.Chem.Soc.* 125: 12782-12786.
- Kapanen A., Danilov A., Lehenkari P., Ryhanen J., Jamsa T. and Tuukkanen J. 2002. Effect of metal alloy surface stresses on the viability of ROS-17/2.8 osteoblastic cells. *Biomaterials.* 23: 3733-3740.
- Karlsson L.M., Tengvall P., Lundstrom I. and Arwin H. 2003. Adsorption of human serum albumin in porous silicon gradients. *Physica Status Solidi A-Applied Research.* 197: 326-330.
- Karrasch S., Dolder M., Schabert F., Ramsden J. and Engel A. 1993. Covalent binding of biological samples to solid supports for scanning probe microscopy in buffer solution. *Biophysical Journal.* 65: 2437-2446.
- Karrasch S., Hegerl R., Hoh J.H., Baumeister W. and Engel A. 1994. Atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces in an aqueous environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 836-838.
- Kellermayer M.S.Z., Smith S.B., Bustamante C. and Granzier H.L. 1998. Complete unfolding of the titin molecule under external force. *Journal of Structural Biology.* 122: 197-205.
- Kidoaki S. and Matsuda T. 1999. Adhesion forces of the blood plasma proteins on self-assembled monolayer surfaces of alkanethiolates with different functional groups measured by an Atomic Force Microscope. *Langmuir.* 15: 7639-7646.
- Kidoaki S., Nakayama Y. and Matsuda T. 2001. Measurement of the interaction forces between proteins and iniferter-based graft-polymerized surfaces with an Atomic Force Microscope in aqueous media. *Langmuir.* 17: 1080-1087.
- Kienberger F., Pastushenko V.P., Kada G., Gruber H.J., Riener C., Schindler H. and Hinterdorfer P. 2000. Static and dynamic properties of single poly(ethylene glycol) molecules investigated by Force Spectroscopy. *Single Molecules.* 1: 123-128.
- Kiriy A., Gorodyska G., Minko S., Stamm M. and Tsitsilianis C. 2003. Single molecules and associates of heteroarm star copolymer visualized by atomic force microscopy. *Macromolecules.* 36: 8704-8711.
- Klein D.C.G., Stroh C.M., Jensenius H., van Es M., Kamruzzahan A.S.M., Stamouli A., Gruber H.J., Oosterkamp T.H. and Hinterdorfer P. 2003. Covalent immobilization of single proteins on mica for molecular recognition force microscopy. *Chem. Phys.Chem.* 4: 1367-1371.

- Ko T. and Cooper S.L. 1993. Surface properties and platelet adhesion characteristics of acrylic acid and allylamine plasma-treated polyethylene. *Journal of Applied Polymer Science*. 47: 1601-1619.
- Koehler J.A., Ulbricht M. and Belfort G. 2000. Intermolecular forces between a protein and a hydrophilic modified polysulfone film with relevance to filtration. *Langmuir*. 16: 10419-10427.
- Kokkoli E. and Zukoski C.F. 2000. Surface forces between hydrophilic self-assembled monolayers in aqueous electrolytes. *Langmuir*. 16: 6029-6036.
- Koutsoukos P.G., Mumme-Young C.A., Norde W. and Lyklema J. 1982. Effect of the nature of the substrate on the adsorption of human plasma albumin. *Colloids and Surfaces*. 5: 93-104.
- Koutsoukos P.G., Norde W. and Lyklema J. 1983. Protein adsorption on hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. 95: 385-397.
- Kurrat R., Textor, M. Ramsden, J. J., Boni P. and Spencer N.D. 1997. Instrumental improvements in optical waveguide light mode spectroscopy for the study of biomolecule adsorption. *Review of Scientific Instruments*. 68: 2172-2176.
- Lantz M., Liu Y.Z., Cui X.D., Tokumoto H. and Lindsay S.M. 1999. Dynamic force microscopy in fluid. *Surface and Interface Analysis*. 27: 354-360.
- Laurens N., Koolwijk P. and De Maat, M. P. M. 2006. Fibrin structure and wound healing. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 4: 932-939.
- Lea A.S., Pungor A., Hlady V., Andrade J.D., Herron J.N. and Voss E.W.J. 1992. Manipulation of protein on mica by atomic force microscopy. *Langmuir*. 8: 68-73.
- Lee D.H., Park C.H., Yeo J.M. and Kim S.W. 2006. Lipase immobilization on silica gel using a cross-linking method. *J. Ind. Eng. Chem*. 12: 777-782.
- Lee I. and Marchant R.E. 2001. Force measurements on the molecular interactions between ligand (RGD) and human platelet $\alpha_{IIb}\beta_3$ receptor system. *Surface Science*. 491: 433-443.
- Lee M., Park S.K., Chung C. and Kim H. 2004. QCM study of beta-casein adsorption on the hydrophobic surface: Effect of ionic strength and cations. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 25: 1031-1035.
- Lee S. and Park K. 1994. Protein interaction with surfaces: Separation distance-dependent interaction energies. *J. Vac. Sci. Technol. A*. 12: 2949-2955.

- Lee W., McGuire J. and Bothwell M.K. 2004. Competitive adsorption of bacteriophage T4 lysozyme stability variants at hydrophilic glass surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. 269: 251-254.
- Lehenkari P.P. and Horton M.A. 1999. Single integrin molecule adhesion forces in intact cells measured by atomic force microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 259: 645-650.
- Li F., Redick S.D., Erickson H.P. and Moy V.T. 2003. Force Measurements of the $\alpha_5\beta_1$ integrin-fibronectin interaction. *Biophysical Journal*. 84: 1252-1262.
- Lin S., Chen J., Huang L. and Lin H. 2005. Measurements of the forces in protein interactions with atomic force microscopy. *Current Proteomics*. 2: 55-81.
- Litvinov R.I., Bennett J.S., Weisel J.W. and Shuman H. 2005. Multi-step fibrinogen binding to the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ detected using force spectroscopy. *Biophysical Journal*. 89: 2824-2834.
- Litvinov R.I., Shuman H., Bennett J.S. and Weisel J.W. 2004. Multi-step fibrinogen-alpha IIb beta 3 binding/unbinding revealed at the single molecule level using laser tweezers. *Blood*. 104: 180A-180A.
- Lousinian S. and Logothetidis S. 2007. Optical properties of proteins and protein adsorption study. *Microelectronic Engineering*. 84: 479-485.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- Lyubchenko Y., Shlyakhtenko L., Harrington R., Oden P. and Lindsay S. 1993. Atomic force microscopy of long DNA: Imaging in air and under water. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 2137-2140.
- Marchant R.E., Kang I., Sit P.S., Zhou Y., Todd B., Eppell S.J. and Lee I. 2002. Molecular views and measurements of hemostatic processes using Atomic Force Microscopy. *Current Protein and Peptide Science*. 3: 249-274.
- Marchin K.L. and Berrie C.L. 2003. Conformation changes in the plasma protein fibrinogen upon adsorption to graphite and mica investigated by Atomic Force Microscopy. *Langmuir*. 19: 9883-9888.
- Marko J.F. and Siggia E.D. 1995. Stretching DNA. *Macromolecules*. 28: 8759-8770.
- Massa T.M., Yang M.L., Ho J.Y.C., Brash J.L. and Santerre J.P. 2005. Fibrinogen surface distribution correlates to platelet adhesion pattern on fluorinated surface-modified polyetherurethane. *Biomaterials*. 26: 7367-7376.

- Matsumoto H., Koyama Y. and Tanioka A. 2003. Interaction of proteins with weak amphoteric charged membrane surfaces: effect of PH. *Journal of colloid and interface science*. 264: 82-88.
- McArthur S.L. 2006. Applications of XPS in bioengineering. *Surface and Interface Analysis*. 38: 1380-1385.
- McCormack D., Carnie S.L. and Chan D.Y.C. 1995. Calculations of electric double-layer force and interaction free energy between dissimilar surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. 169: 177-196.
- McGurk S.L., Green R.J., Sanders G.H.W., Davies M.C., Roberts C.J., Tendler S.J.B. and Williams P.M. 1999. Molecular interactions of biomolecules with surface-engineered interfaces using Atomic Force Microscopy and Surface Plasmon Resonance. *Langmuir*. 15: 5136-5140.
- Meagher L. and Griesser H.J. 2002. Interactions between adsorbed lactoferrin layers measured directly with the atomic force microscope. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 23: 125-140.
- Meyer G. and Amer N.M. 1988. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Applied Physics Letters*. 53: 1045-1047.
- Michael K.E., Vernekar V.N., Keselowsky B.G., Meredith J.C., Latour R.A. and Garcia A.J. 2003. Adsorption-induced conformational changes in fibronectin due to interactions with well-defined surface chemistries. *Langmuir*. 19: 8033-8040.
- Midwood K.S., Williams L.V. and Schwarzbauer J.E. 2004. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 36: 1031-1037.
- Minton A.P. 1999. Adsorption of globular proteins on locally planar surfaces. II. Models for the effect of multiple adsorbate conformations on adsorption equilibria and kinetics. *Biophysical Journal*. 76: 176-187.
- Missirlis Y.F. and Lemm W. eds. in *Modern aspects of protein adsorption on biomaterials*. 1991. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Miyazaki H. and Hayashi K. 1999. Atomic force microscopic measurement of the mechanical properties of intact endothelial cells in fresh arteries. *Medical & Biological Engineering & Computing*. 37: 530-536.
- Model M.A. and Healy K.E. 2000. Quantification of the surface density of a fluorescent label with the optical microscope. *J Biomed Mater Res*. 50: 90-96.

- Moller C., Allen M., Elings V., Engel A. and Muller D.J. 1999. Tapping-mode atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces. *Biophysical Journal*. 77: 1150-1158.
- Morris C.A., Underwood P.A., Bean P.A., Sheehan M. and Charlesworth J.A. 1994. Relative topography of biologically active domains of human vitronectin. *The Journal of Biological Chemistry*. 269: 23845-23852.
- Morrissey B.W. and Stromberg R.R. 1974. The conformation of adsorbed blood proteins by infrared bound fraction measurements. *Journal of Colloid and Interface Science*. 46: 152-164.
- Muller D.J., Amrein M. and Engel A. 1997a. Adoption of biological molecules to a solid support for scanning probe microscopy. *Journal of Structural Biology*. 119: 172-188.
- Muller D.J. and Engel A. 1997b. The height of biomolecules measured with atomic force microscope depends on electrostatic interactions. *Biophysical Journal*. 73: 1633-1644.
- Muller D.J., Fotiadis D., Scheuring S., Muller S.A. and Engel A. 1999. Electrostatically balanced subnanometer imaging of biological specimens by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal*. 76: 1101-1111.
- Neuman K.C. and Block S.M. 2004. Optical trapping. *Review of Scientific Instruments*. 75: 2787-2809.
- Nguyen T.H. and Elimelech M. 2007. Adsorption of plasmid DNA to a natural organic matter-coated silica surface: Kinetics, conformation, and reversibility. *Langmuir*. 23: 3273-3279.
- Noinville V., Vidal-Madjar C. and Sebille B. 1995. Modeling of protein adsorption on polymer surfaces. Computation of adsorption potential. *J. Phys. Chem*. 99: 1516-1522.
- Norde W. 1992. Energy and entropy of protein adsorption. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 13: 363-377.
- Oberdorfer Y., Fuchs H. and Janshoff A. 2000. Conformational analysis of native fibronectin by means of force spectroscopy. *Langmuir*. 16: 9955-9958.
- Oesterhelt F., Rief M. and Gaub H.E. 1999. Single molecule force spectroscopy by AFM indicates helical structure of poly(ethylene-glycol) in water. *New Journal of Physics*. 1: 6.1-6.11.
- Ohta R., Saito N., Ishizaki T. and Takai O. 2006. Visualization of human plasma fibrinogen adsorbed on highly oriented pyrolytic graphite by scanning probe microscopy. *Surface Science*. 600: 1674-1678.

- Ortega-Vinuesa J.L., Tengvall P. and Lundstrom I. 1998a. Molecular packing of HSA, IgG and fibrinogen adsorbed on silicon by AFM imaging. *Thin Solid Films*. 324: 257-273.
- Ortega-Vinuesa J.L., Tengvall P. and Lundstrom I. 1998b. Aggregation of HSA, IgG and fibrinogen on methylated silicon surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. 207: 228-239.
- Osman M.A., Moor C., Caseri W.R. and Suter U.W. 1999. Alkali metals ion exchange on muscovite mica. *Journal of Colloid and Interface Science*. 209: 232-239.
- Paolo A. and Garcia R. 2000. High-resolution imaging of antibodies by tapping-mode atomic force microscopy: Attractive and repulsive tip-sample interaction regimes. *Biophysical Journal*. 78: 1599-1605.
- Pasche S., Voros J., Griesser H.J., Spencer N.D. and Textor M. 2005. Effects of ionic strength and surface charge on protein adsorption at PEGylated surfaces. *J.Phys.Chem.B*. 109: 17545-17552.
- Pashley R.M. 1981. DLVO and hydration forces between mica surfaces in Li^+ , Na^+ , K^+ and Cs^+ electrolyte solutions: A correlation of double-layer and hydration forces with surface cation exchange properties. *Journal of Colloid and Interface Science*. 83: 531-546.
- Patel A.R. and Frank C.W. 2006. Quantitative analysis of tethered vesicle assemblies by Quartz Crystal Microbalance with dissipation monitoring: Binding dynamics and bound water content. *Langmuir*. 22: 7587-7599.
- Patel N., Davies M.C., Hartshorne M., Heaton R.J., Roberts C.J., Tendler S.J.B. and Williams P.M. 1997. Immobilization of protein molecules onto homogeneous and mixed carboxylate-terminated self-assembled monolayers. *Langmuir*. 13: 6485-6490.
- Perez-Luna V.H., Horbett T.A. and Ratner B.D. 1994. Developing correlations between fibrinogen adsorption and surface properties using multivariate statistics. *Journal of Biomedical Material Research*. 28: 1111-1126.
- Petsev D.N. and Vekilov P., G. 2000. Evidence for non-DLVO hydration interactions in solutions of protein apoferritin. *Physical Review Letters*. 84: 1339-1342.
- Pianigiani E., Andreassi A., Taddeucci P., Alessandrini C., Fimiani M. and Andreassi L. 1999. A new model for studying differentiation and growth of epidermal cultures on hyaluronan-based carrier. *Biomaterials*. 20: 1689-1694.

- Pignataro B., Chi L., Gao S., Anczykowski B., Niemeyer C., Adler M. and Fuchs H. 2002. Dynamic scanning force microscopy study of self-assembled DNA-protein nanostructures. *Applied Physics A Materials Science & Processing*. 74: 447-452.
- Prime K.L. and Whitesides G.M. 1991. Self-assembled organic monolayers: Model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science*. 252: 1164-1167.
- Putman, Constant A. J., Van der Werf, Kees O., De Grooth, Bart G. and Van Hulst, Niek F. 1994. Tapping mode atomic force microscopy in liquid. *Appl. Phys. Lett.* 64: 2454-2456.
- Quirk R.A., Davies M.C., Tendler S.J.B., Chan W.C. and Shakesheff K.M. 2001. Controlling biological interactions with poly(lactic acid) by surface entrapment modification. *Langmuir*. 17: 2817-2820.
- Ramsden J.J. 1993. Review of new experimental techniques for investigating random sequential adsorption. *Journal of Statistical Physics*. 73: 853-877.
- Ratner B.D., Castner D.G., Horbett T.A., Lenk T.J., Lewis K.B. and Rapoza R.J. 1990. Biomolecules and surfaces. *J.Vac.Sci.Technol.A*. 8: 2306-2317.
- Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J. and Lemons J.E. *Biomaterials Science*. 1st edition. 1996. New York, Academic Press.
- Ratto T.V., Langry K.C., Rudd R.E., Balhorn R.L., Allen M.J. and McElfresh M.W. 2004. Force spectroscopy of the double-tethered concanavalin-A mannose bond. *Biophysical Journal*. 86: 2430-2437.
- Ratto T.V., Rudd R.E., Langry K.C., Balhorn R.L. and McElfresh M.W. 2006. Nonlinearly additive forces in multivalent ligand binding to a single protein revealed with force spectroscopy. *Langmuir*. 22: 1749-1757.
- Ravichandran S., Madura J.D. and Talbot J. 2001. A Brownian dynamics study of the initial stages of hen egg-white lysozyme adsorption at a solid interface. *J. Phys. Chem. B*. 105: 3610-3613.
- Raviv U., Frey J., Sak R., Laurat P., Tadmor R. and Klein J. 2002. Properties and interactions of physigrafted end-functionalized poly(ethylene glycol) layers. *Langmuir*. 18: 7482-7495.
- Ren Y., Wong S.M. and Lim L. 2007. Folic acid-conjugated protein cages of a plant virus: A novel delivery platform for Doxorubicin. *Bioconjugate Chem*. 18: 836-843.

- Rief M., Fernandez J.M. and Gaub H.E. 1998. Elastically coupled two-level systems as a model for biopolymer extensibility. *Physical Review Letters*. 81: 4764-4767.
- Riener C.K., Stroh C.M., Ebner A., Klampf C., Gall A.A., Romanin C., Lyubchenko Y.L., Hinterdorfer P. and Gruber H.J. 2003. Simple test system for single molecule recognition force microscopy. *Analytica Chimica Acta*. 479: 59-75.
- Roach P., Eglin D., Rohde K. and Perry C.C. 2007. Modern biomaterials: a review-bulk properties and implications of surface modifications. *J Mater Sci: Mater Med*. 18: 1263-1277.
- Roiter Y., Jaeger W. and Minko S. 2006. Conformation of single polyelectrolyte chains vs. salt concentration: Effects of sample history and solid substrate. *Polymer*. 47: 2493-2498.
- Rossell J.P., Allen S., Davies M.C., Roberts C.J., Tendler S.J.B. and Williams P.M. 2003. Electrostatic interactions observed when imaging proteins with the Atomic Force Microscope. *Ultramicroscopy*. 96: 37-46.
- Roth C.M. and Lenhoff A.M. 1993. Electrostatic and van der Waals contributions to protein adsorption: Computation of equilibrium constants. *Langmuir*. 9: 962-972.
- Sader J.E. 1998. Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope. *Journal of Applied Physics*. 84: 64-76.
- Sader J.E., Chon J.W.M. and Mulvaney P. 1999. Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments*. 70: 3967-3969.
- Sagvolden G., Giaever I. and Feder J. 1998. Characteristic protein adhesion forces on glass and polystyrene substrates by atomic force microscopy. *Langmuir*. 14: 5984-5987.
- Sagvolden G., Giaever I., Pettersen E.O. and Feder J. 1999. Cell adhesion force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 471-476.
- Sanders A. and Jennissen H.P. 1996. Monitoring fibrinogen adsorption kinetics by interfacial TIRF rheometry. *Journal of Molecular Recognition*. 9: 503-508.
- Scheuring S., Fotiadis D., Moller C., Muller S.A., Engel A. and Muller D.J. 2001. Single proteins observed by atomic force microscopy. *Single Molecules*. 2: 59-67.
- Schroder K., Mayer-Plath A., Keller D. and Ohl A. 2002. On the applicability of plasma assisted chemical micropatterning to different polymeric biomaterials. *Plasmas and Polymers*. 7: 103-125.

- Sethuraman A., Han M., Kane R.S. and Belfort G. 2004. Effect of surface wettability on the adhesion of proteins. *Langmuir*. 20: 7779-7788.
- Shafer-Peltier K.E., Haynes C.L., Glucksberg M.R. and Van Duyne, Richard P. 2003. Toward a glucose biosensor based on Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 588-593.
- Siedlecki C.A., Eppell S.J. and Marchant R.E. 1994. Interaction of human von Willebrand factor with a hydrophobic self-assembled monolayer studied by atomic force microscopy. *Journal of Biomedical Materials Research*. 28: 971-980.
- Sit P.S. and Marchant R.E. 1999. Surface-dependent conformations of human fibrinogen observed by Atomic Force Microscopy under aqueous conditions. *Thromb Haemost.* 82: 1053-1060.
- Sit P.S. and Marchant R.E. 2001. Surface-dependent differences in fibrin assembly visualized by atomic force microscopy. *Surface Science*. 491: 421-432.
- Siuzdak G. 1994. The emergence of mass spectrometry in biochemical research. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 11290-11297.
- Snopok B.A., Kostyukevych K.V., Rengevych O.V., Shirshov Y.M., Venger E.F., Kolesnikova I.N. and Lugovskoi E.V. 1998. A biosensor approach to probe the structure and function of adsorbed proteins: fibrinogen at the gold surface. *Semiconductor Physics, Quantum Electronics & Optoelectronics*. 1: 121-134.
- Sokolov I.Y., Henderson G.S., Wicks F.J. and Ozin G.A. 1997. Improved atomic force microscopy resolution using an electric double layer. *Applied Physics Letters*. 70: 844-846.
- Speijer H., Laterveer-Vreeswijk R.H., Glatz J.F.C., Nieuwenhuizen W. and Hermens W.T. 2004. One-step immunoassay for measuring protein concentrations in plasma, based on precipitate-enhanced ellipsometry. *Analytical Biochemistry*. 326: 257-261.
- Stahlberg J., Jonsson B. and Horvath C. 1992. Combined effect of coulombic and van der Waals interactions in the chromatography of proteins. *Anal. Chem.* 64: 3118-3124.
- Stark R.W., Schitter G. and Stemmer A. 2003. Tuning the interaction forces in tapping mode Atomic Force Microscopy. *Physical Review B*. 68: 085401.
- Steiner G., Tunc S., Maitz M. and Salzer R. 2007. Conformational changes during protein adsorption. FT-IR spectroscopic imaging of adsorbed fibrinogen layers. *Anal. Chem.* 79: 1311-1316.

- Storm C. and Nelson P.C. 2003. Theory of high-force DNA stretching and overstretching. *Physical Review E*. 67: 051906-12.
- Stoscheck C.M. 1990. [6] Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*. 182: 50-68.
- Su T.J., Lu J.R., Thomas R.K., Cui Z.F. and Penfold J. 1998. The adsorption of Lysozyme at the silica-water interface: a Neutron Reflection study. *Journal of Colloid and Interface Science*. 203: 419-429.
- Sun L., Berndt C.C., Gross K.A. and Kucuk A. 2001. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: A review. *Journal of Biomedical Materials Research-Applied Biomaterials*. 58: 570-592.
- Ta T.C. and McDermott M.T. 2000. Mapping interfacial chemistry induced variations in protein adsorption with scanning force microscopy. *Analytical Chemistry*. 72: 2627-2634.
- Ta T.C., Sykes M.T. and McDermott M.T. 1998. Real-time observation of plasma protein film formation on well-defined surfaces with Scanning Force Microscopy. *Langmuir*. 14: 2435-2443.
- Taatjes D.J., Quinn A.S., Jenny R.J., Hale P., Bovill E.G. and McDonagh J. 1997. Tertiary structure of the hepatic cell protein fibrinogen in fluid revealed by Atomic Force Microscopy. *Cell Biology International*. 21: 715-726.
- Taboada-Serrano P., Vithayaveroj V., Yiacoumi S. and Tsouris C. 2005. Surface charge heterogeneities measured by Atomic Force Microscopy. *Environmental Science and Technology*. 39: 6352-6360.
- Taylor I. and Howard A.G. 1993. Measurement of primary amine groups on surface-modified silica and their role in metal binding. *Analytica Chimica Acta*. 271: 77-82.
- Thomas C.H., McFarland C.D., Jenkins M.L., Rezaia A., Steele J.G. and Healy K.E. 1997. The role of vitronectin in the attachment and spatial distribution of bone-derived cells on materials with patterned surface chemistry. *Journal of Biomedical Material Research*. 37: 81-93.
- Tirelli N., Lutolf M.P., Napoli A. and Hubbell J.A. 2002. Poly(ethylene glycol) block copolymers. *Reviews in Molecular Biotechnology*. 90: 3-15.
- Toprakcioglu C., Klein J. and Luckham P.F. 1987. *Journal of Chemical Society Faraday Transactions*. 83: 1703-1709.
- Toscano A. and Santore M.M. 2006. Fibrinogen adsorption on three silica-based surfaces: Conformation and kinetics. *Langmuir*. 22: 2588-2597.

- Tskhovrebova L., Trinick J., Sleep J.A. and Simmons R.M. 1997. Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin. *Nature Biotechnology*. 387: 308-312.
- Tunc S., Maitz M.F., Steiner G., Vazquez L., Pham M.T. and Salzer R. 2005. In situ conformational analysis of fibrinogen adsorbed on Si surfaces. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 42: 219-225.
- Valle-Delgado J.J., Molina-Bolivar J.A., Galisteo-Gonzalez F., Galvez-Ruiz M.J., Feiler A. and Rutland M.W. 2004a. Interaction forces between BSA layers adsorbed on silica surfaces measured with an Atomic Force Microscope. *J.Phys.Chem.B*. 108: 5365-5371.
- Valle-Delgado J.J., Molina-Bolivar J.A., Galisteo-Gonzalez F., Galvez-Ruiz M.J., Feiler A. and Rutland M.W. 2004b. Measurement of the interactions between protein layers adsorbed on silica by atomic force microscopy. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 16: S2383-S2392.
- Vanden Eynde X. and Bertrand P. 1997. ToF-SIMS quantification of polystyrene spectra based on Principal Component Analysis (PCA). *Surface and Interface Analysis*. 25: 878-888.
- Vansteenkiste S.O., Corneillie S.I., Schacht E.H., Chen X., Davies M.C., Moens M. and Van Vaeck L. 2000. Direct measurement of protein adhesion at biomaterial surfaces by Scanning Force Microscopy. *Langmuir*. 16: 3330-3336.
- Verklich Y.I., Gorkun O.V., Medved L.V., Nieuwenhuizen W. and Weisel J.W. 1993. Carboxyl-terminal portions of the α chains of fibrinogen and fibrin. *The Journal of Biological Chemistry*. 268: 13577-13585.
- Verma A., Simard J.M. and Rotello V.M. 2004. Effect of ionic strength on the binding of alpha-chymotrypsin to nanoparticle receptors. *Langmuir*. 20: 4178-4181.
- Vermette P., Meagher L., Gagnon E., Griesser H.J. and Doillon C.J. 2002. Immobilized liposome layers for drug delivery applications: Inhibition of angiogenesis. *Journal of Controlled Release*. 80: 179-195.
- Verwey, E. J. W. and Overbeek, J. Th. G. *Theory of stability of lyophobic colloids*. 1948. Amsterdam, Elsevier.
- Villarrubia J.S. 1996. Scanned probe microscope tip characterization without calibrated tip characterizers. *J. Vac. Sci. Technol. B*. 14: 1518-1521.
- Vinckier A., Heyvaert I., D'Hoore A., McKittrick T., Van Haesendonck C., Engelborghs Y. and Hellemans L. 1995. Immobilizing and imaging microtubules by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*. 57: 337-343.

- Vitte J., Benoliel A.M., Pierres A. and Bongrand P. 2004. Is there a predictable relationship between surface physical-chemical properties and cell behaviour at the interface? *European Cells and Materials*. 7: 52-63.
- Vorobyov I., Yappert C.M. and Dupre D.B. 2002. Hydrogen bonding in monomers and dimers of 2-aminoethanol. *Journal of Physical Chemistry A*. 106: 668-679.
- Vroman L. and Adams A.L. 1969. Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces. *Surface Science*. 16: 438-446.
- Wagner M.S. and Castner D.G. 2004. Analysis of adsorbed proteins by static time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Applied Surface Science*. 231-232: 366-376.
- Wagner M.S., McArthur S.L., Shen M.C., Horbett T.A. and Castner D.G. 2002. Limits of detection for Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS) and X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS): Detection of low amounts of adsorbed protein. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 13: 407-428.
- Wagner P. 1998. Immobilization strategies for biological scanning probe microscopy. *FEBS Letters*. 430: 112-115.
- Wang H., Bash R., Yodh J.G., Hager G.L., Lohr D. and Lindsay S.M. 2002. Glutaraldehyde modified mica: A new surface for atomic force microscopy of chromatin. *Biophysical Journal*. 83: 3619-3625.
- Wang M.S., Palmer L.B., Schwarz J.D. and Razatos A. 2004. Evaluating protein attraction and adhesion to biomaterials with the Atomic Force Microscope. *Langmuir*. 20: 7753-7759.
- Weiner S.J., Kollman P.A., Case D.A., Singh U.C., Ghio C., Alagona G., Profeta S. and Weiner P. 1984. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J.Am.Chem.Soc.* 106: 765-784.
- Weisenhorn A.L., Khorsandi M., Kasas S., Gotzos V. and Butt H. 1993. Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with an AFM. *Nanotechnology*. 4: 106-113.
- Welzel P.B. 2002. Investigation of adsorption-induced structural changes of proteins at solid/liquid interfaces by differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta*. 382: 175-188.
- Wertz C.F. and Santore M.M. 2002. Fibrinogen adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces: Geometrical and energetic aspects of interfacial relaxations. *Langmuir*. 18: 706-715.

- Willemsen O.H., Snel M.M.E., Kuipers L., Figdor C.G., Greve J. and Grooth B.G.D. 1999. A physical approach to reduce nonspecific adhesion in molecular recognition Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal*. 76: 716-724.
- Williams P.M. 2003. Analytical descriptions of dynamic force spectroscopy: behaviour of multiple connections. *Analytica Chimica Acta*. 479: 107-115.
- Wnek G.E. and Bowlin G.L. eds. in *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. 2005. New York, Marcel Dekker Ltd.
- Woo K.M., Seo J., Zhang R. and Ma P.X. 2007. Suppression of apoptosis by enhanced protein adsorption on polymer/hydroxyapatite composite scaffolds. *Biomaterials*. 28: 2622-2630.
- Xu H., Bjerneld E.J., Kall M. and Borjesson L. 1999. Spectroscopy of single hemoglobin molecules by Surface Enhanced Raman Scattering. *Physical Review Letters*. 83: 4357-4360.
- Xu L. and Siedlecki C.A. 2007. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterials. *Biomaterials*. 28: 3273-3283.
- Yang Z., Mochalkin I., Veerapandian L., Riley M. and Doolittle R.F. 2000. Crystal structure of native chicken fibrinogen at 5.5-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 3907-3912.
- You H.X. and Lowe C.R. 1996. AFM studies of protein adsorption 2. Characterization of Immunoglobulin G adsorption by detergent washing. *Journal of Colloid and Interface Science*. 182: 586-601.
- Zdyrko B., Varshney S.K. and Luzinov I. 2004. Effect of molecular weight on synthesis and surface morphology of high-density poly(ethylene glycol) grafted layers. *Langmuir*. 20: 6727-6735.
- Zhang H., Bremmell K.E. and Smart R.S.C. 2005. Direct measurement of interactions between adsorbed vitronectin layers: The influence of ionic strength and pH. *J.Biomed.Mater.Res.* 74A: 59-68.
- Zhang S.P. and Sun Y. 2002. Ionic strength dependence of protein adsorption to dye-ligand adsorbents. *AIChE Journal*. 48: 178-186.

Δημοσιεύσεις

1. Protein-Material Interactions: from Micro-to-Nano scale, Theodora S. Tsapikouni and Yannis F. Missirlis, *Materials Science and Engineering: B* (υπό δημοσίευση).
2. Measurement of interaction forces between fibrinogen coated probes and mica surface with the Atomic Force Microscope: The pH and ionic strength effect, Theodora S. Tsapikouni, Stephanie Allen and Yannis F. Missirlis, *Biointerphases*, 2008, 3(1): 1-8.
3. pH and ionic strength effect on single fibrinogen molecule adsorption on mica studied with AFM, Theodora S. Tsapikouni and Yannis F. Missirlis, *Colloids and Surfaces B: Bionterfaces*, 2007, 57: 89-96.
4. Orthogonal (transverse) arrangements of actin in endothelia and fibroblasts, Adam Curtis, Gregor Aitchison, Theodora Tsapikouni, *Journal of Royal Society Interface*, Vol.3, iss.11, 2006, 753-756.
5. Effects of Longitudinal Stretch on VSM Tone and Distensibility of Muscular Conduit Arteries, Martin A.Zulliger, Naomi T.M.R.Kwak, Theodora Tsapikouni, Nikolaos Stergiopoulos, *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, H 283, 2002, 2599 - 2605.
6. Dynamic mechanical properties of arterial and venous grafts used in coronary bypass surgery, D.Mavrilas, T.Tsapikouni, D.Mikroulis, G.Bitzikas, V.Didilis, K.Tsakiridis, F.Konstantikou and G.Bougioukas, *Journal of Mechanics in Medicine and Biology*, Vol. 2, No. 3-4, 2002, 329-337.

Άμεσα αναφερομένες στο αντικείμενο της διατριβής είναι οι δημοσιεύσεις υπ' αριθμόν 1-3.

Παρουσιάσεις σε συνέδρια

1. Protein-Material Interactions: from Micro-to-Nano scale, T.S.Tsapikouni and Y.F.Missirlis Nanosciences & Nanotechnologies 07, Θεσσαλονίκη, 16-18 Ιουλίου 2007 (προφορική παρουσίαση).
2. Measurement of single fibrinogen molecule unbinding force using the AFM, Theodora Tsapikouni and Yannis Missirlis, AFM BioMed Conference, Βαρκελώνη, 19-21 Απριλίου 2007 (παρουσίαση με αφίσα).

3. Single Fibrinogen Molecule Interactions with Mica Surface studied with AFM, T.S.Tsapikouni and Y.F.Missirlis, 20th European Conference on Biomaterials, Νάντη, 27 Σεπτεμβρίου-1 Οκτωβρίου 2006 (προφορική παρουσίαση).
4. pH and ionic strength effect on single fibrinogen molecule interaction with mica surface studied with AFM, Theodora Tsapikouni and Yannis Missirlis, 5th World Congress of Biomechanics, Μόναχο, 29 Ιουλίου- 4 Αυγούστου 2006, (προφορική παρουσίαση).
5. pH and ionic strength effect on single fibrinogen molecule adsorption on mica studied with AFM, T.Tsapikouni and Y.Missirlis, ICCES 2005, Chennai, Ινδία, 1-6 Δεκεμβρίου 2005 (προφορική παρουσίαση, conference proceedings).
6. Understanding protein-material interaction through the 'eyes' of AFM, T. Tsapikouni and Y.Missirlis, Biological surfaces and Interfaces, San Feliu de Guixols, Ισπανία, 18-23 Ιουνίου 2005 (παρουσίαση με αφίσα).

Τα έξοδα ταξιδιού/εγγραφής για τις ανακοινώσεις υπ' αριθμόν 2-6 καλύφθηκαν από το πρόγραμμα ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ.