

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**FTIR και Time Resolved Step-Scan FTIR Μελέτη
της Κυτοχρωμικής Οξειδάσης *ba3* από τον
οργανισμό *Thermus Thermophilus*.**

ΓΙΑΛΟΥ ΕΙΡΗΝΗ

**Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα (ΕΠΕΑΕΚ)
Εφαρμοσμένης Μοριακής Φασματοσκοπίας
Εργαστήριο Βιοφυσικής Χημείας
Τμήμα Χημείας
Πανεπιστήμιο Κρήτης**

Ηράκλειο, 2004

Κλείνοντας αυτό τον κύκλο στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα τα οποία συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας:

Τον επιβλέποντα Καθηγητή Κωνσταντίνο Βαρώτση για την καθοδήγηση του και την προσπάθεια που κατέβαλε κατά την διάρκεια αυτών των ετών. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη τα μέλη της επιστημονικής επιτροπής, τον Αναπληρωτή καθηγητή Απόστολο Ρίζο και τον επίκουρο καθηγητή Γεώργιο Φρουδάκη.

Τα μέλη του εργαστηρίου μου dr. Πινακουλάκη Ευτυχία και dr. Κουτσοπάκη Κωνσταντίνο για την πολύτιμη συνεργασία τους, τον υποψήφιο dr. Δασκαλάκη Βαγγέλη και ιδιαίτερα τον dr. Σταυράκη Σταύρο για την συνεισφορά του στην πραγματοποίηση των πειραμάτων, την πολύτιμη τεχνική βοήθεια και την υποστήριξη του.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένεια μου για την ψυχολογική και οικονομική υποστήριξη.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΓΙΑΛΟΥ ΕΙΡΗΝΗ

Ημερομηνία γέννησης : 26 Μαΐου 1978

Διεύθυνση : Βικέλα 3, Ηράκλειο, Κρήτη, 71201

Διεύθυνση μονίμου κατοικίας : Ι. Κ. Λιάπη 37, Οινόφυτα, Βοιωτία, 32011.

e-mail : irene@chemistry.uoc.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ :

- 1997-2002: -Πτυχίο Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης (Βαθμός πτυχίου 6.57)
-Εκπόνηση Διπλωματικής Εργασίας, Υπεύθυνος καθηγητής κ. Κ.Βαρώτσης
Τίτλος : «Φασματοσκοπικές μελέτες Αιματίνης »
- 2002-2004: -Εισαγωγή στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα (ΕΠΕΑΕΚ)
Εφηρμοσμένης Μοριακής Φασματοσκοπίας του Τμήματος Χημείας του πανεπιστημίου Κρήτης.
Εκπόνηση Διατριβής Διπλώματος Ειδίκευσης στο εργαστήριο Βιοφυσικής Χημείας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Κ. Βαρώτση.
Τίτλος : « FTIR και Step-Scan FTIR μελέτη της κυτοχρωμικής οξειδάσης *ba₃* από τον οργανισμό *Thermus Thermophilus* »

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

‘Antimalarial endoperoxides : Synthesis and implications for the mode of action.’

Constantinos Koutsoupakis, Irene Gialou, Eleni Pavlidou, Sofia Kapetanaki and Constantinos Varotsis, ARKIVOC, vol **2002**, part (xiii), 69.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ

- Ανθελονοσιακή FTIR μελέτη της δράσης του 2,3-διοξάκυκλο(2.2.3)εννεα-5-ενίου με αιμικό και μη αιμικό σιδηρο. Γιαλού Ε., Κουτσοπάκης Κ. και Βαρώτσης Κ. Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας, Ηράκλειο, 6-10 Νοεμβρίου 2002.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά : Καλή (First Certificate, Cambridge, grade A)

Περιεχόμενα

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	2
<i>Περιεχόμενα</i>	4
<i>Περίληψη</i>	6
Κεφάλαιο I: Κυτοχρωμική Οξειδάση ba_3 από το βακτήριο <i>Thermus Thermophilus</i>.	10
1.1 Αναπνοή και κυτοχρωμικές οξειδάσες	11
1.2 Δομή και λειτουργία των κυτοχρωμικών οξειδασών	13
1.2.1 Δομικά χαρακτηριστικά των κυτοχρωμικών οξειδασών.....	13
1.2.2 Ενεργοποίηση μοριακού οξυγόνου από τις κυτοχρωμικές οξειδάσες.....	15
1.3 Η κυτοχρωμική οξειδάση ba_3	17
1.3.1 Ανάλυση δομής στο κυτόχρωμα ba_3	17
1.3.2 Κανάλια μεταφοράς ηλεκτρονίων	20
1.3.3 Εισαγωγή μοριακού οξυγόνου	22
1.3.4 Κανάλια μεταφοράς πρωτονίων	23
1.3.5 Ιδιαίτερα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά της κυτοχρωμικής Οξειδάσης ba_3	26
Βιβλιογραφία	29
Κεφάλαιο II : Δονητική Φασματοσκοπία Fourier Transform Infrared και Time Resolved Step Scan Fourier Transform Infrared.	31
2.1 Δονητική φασματοσκοπία υπερόθρου: βασικές αρχές και λειτουργία	32
2.1.1 Εισαγωγή.....	32
2.1.2 Το μοντέλο του αρμονικού και μη αρμονικού ταλαντωτή (Δυναμικό Morse).	33
2.1.3 Κανονικοί τρόποι δόνησης	35
2.1.4 Πιθανότητα μετάπτωσης και κανόνες επιλογής.	36
2.1.5 Διαδικασία λήψης υπέρυθρου φάσματος - συμβολόμετρο Michelson.....	37
2.2 Time-Resolved Step-Scan FTIR φασματοσκοπία.	40
2.2.1 Αρχή λειτουργίας	40
2.2.2 Πειραματική διάταξη	42
Περιγραφή	42
Nd : YAG laser	43
Ανιχνευτής Mercury Cadmium Telluride (HgCdTe).....	45
2.2.3 Πηγές θορύβου.....	46
2.3 Μελέτη πρωτεϊνικών συστημάτων με την φασματοσκοπία υπερόθρου	47
Βιβλιογραφία	51
Κεφάλαιο III: FTIR και Time Resolved Step-Scan FTIR μελέτη της κυτοχρωμικής οξειδάσης ba_3 από τον οργανισμό <i>Thermus Thermophilus</i>.	52
3.1 Εισαγωγή	53
3.2 Πειραματικό μέρος.	57
3.3 Αποτελέσματα	59

3.4	<i>Ανάλυση – Συζήτηση Αποτελεσμάτων</i>	74
	Βιβλιογραφία	82

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η φασματοσκοπική μελέτη της κυτοχρωμικής οξειδάσης ba_3 από το βακτήριο *Thermus Thermophilus*. Η οξειδάση ba_3 ανήκει στην οικογένεια των χαλκοξειδασών και εμφανίζει αρκετές ομοιότητες με τα άλλα μέλη της ομάδας αλλά και ορισμένες ιδιαιτερότητες. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου απαρτίζεται από μια αίμη τύπου a_3 και ένα άτομο Cu_B , ενώ περιέχει και επιπλέον δύο ακόμη οξειδοαναγωγικά κέντρα: μια αίμη τύπου b και ένα διπυρηνικό κέντρο ατόμων Cu_A . Εκτός της ικανότητας αναγωγής του οξυγόνου προς νερό και της άντλησης πρωτονίων δια μέσου της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, έχει πρόσφατα διαπιστωθεί ότι κατέχει επιπλέον την ικανότητα αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου προς οξείδιο του διαζώτου, υπό αναγωγικές αναερόβιες συνθήκες.

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε κυρίως με την χρήση των τεχνικών FTIR και Time Resolved Step-Scan FTIR, με σκοπό την ταυτοποίηση τόσο των δομικών όσο και των δυναμικών χαρακτηριστικών του ενζύμου. Η φασματοσκοπία υπερύθρου αποδεικνύεται ιδιαίτερα αποτελεσματική σε αυτούς του τομείς, καθώς η υψηλή της ευαισθησία, η μεγάλη φασματική διακριτική ικανότητα αλλά και η μεγάλη χρονική ανάλυση των χρονοεξαρτώμενων πειραμάτων επιτρέπουν την ανίχνευση μεταβατικών δομικών αλλαγών ακόμη και ενός μεμονωμένου πρωτεϊνικού καταλοίπου.

Η διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με την χρήση του σταθερού συμπλόκου του ανηγμένου ενζύμου με το μονοξείδιο του άνθρακα. Στο σύμπλοκο ισορροπίας βρέθηκε πως το 30% περίπου του δεσμευμένου CO παραμένει στον Cu_B , του οποίου το πρωτεϊνικό περιβάλλον εμφανίζει μεγάλη σταθερότητα στις αλλαγές pH και pD, παρατηρήσεις οι οποίες έρχονται σε συμφωνία με δημοσιευμένες μελέτες. Φωτολύοντας το σύμπλοκο ο υποκαταστάτης που αρχικά είναι δεσμευμένος στην σίδηρο της αίμης a_3 μεταναστεύει μεταβατικά στον Cu_B , όπου παραμένει για λίγα ms.

Η ανίχνευση του προϊόντος της φωτόλυσης του συμπλόκου ba_3 -CO σε φάσματα συνεχούς φωτόλυσης προσφέρει πληροφορίες για την δευτεροταγή δομή του ενζύμου και επιτρέπει την ταυτοποίηση δονήσεων πρωτεϊνικών ομάδων οι οποίες επηρεάζονται από την διαδικασία της φωτόλυσης. Η μελέτη της δυναμικής του

ενζύμου επιτυγχάνεται μέσω των Time Resolved Step-Scan FTIR φασμάτων, τα οποία επιβεβαίωσαν την αργή κινητική του συμπεριφορά σε σχέση με άλλες οξειδάσες. Ανιχνεύοντας τις αντιδράσεις της πρωτεΐνης μετά την φωτόλυση του CO από τον αιμικό σίδηρο, προέκυψε ότι η μεταβατική δέσμευση του CO στον Cu_B είναι δυναμικά συζευγμένη με αλλαγές στην προπιονική ομάδα του πυρρολικού δακτυλίου A της αίμης α_3 και με αλλαγές στο τοπικό περιβάλλον των ασπαρτικών καταλοίπων D372. Σύμφωνα με την χρονική εξέλιξη των δονήσεων αυτών των ομάδων, οι οποίες συμμετέχουν σε μια από τις προτεινόμενες διαδρομές πρωτονίων διαμέσου της μεμβράνης, προκύπτει το συμπέρασμα πως η συμμετοχή των πρωτονιομένων ασπαρτικών καταλοίπων στην παρατηρούμενη αλλαγή τερματίζεται νωρίτερα από την συμμετοχή των αποπροτονιωμένων μορφών τους και των προπιονικών ομάδων. Η διαταραχή του ασπαρτικού καταλοίπου συνδέεται με τον σχηματισμό του μεταβατικού συμπλόκου και όχι με την επαναφορά του υποκαταστάτη στον σίδηρο της αίμης α_3 .

Οι κινήσεις της πρωτεΐνης στην περιοχή των προπιονικών ομάδων και του γειτονικού Asp372 πραγματοποιούνται με τέτοιο τρόπο ώστε να μεταβάλλεται το δίκτυο των δεσμών υδρογόνου των παραπάνω ομάδων. Με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα και την συμμετοχή αυτών των ομάδων σε ένα από τα κανάλια μεταφοράς πρωτονίων, το οποίο καταλήγει σε μια περιοχή συσσώρευσης μορίων νερού, προτείνεται ένα μοντέλο για τον ρόλο του Asp372 και των προπιονικών ομάδων της αίμης α_3 στην μετακίνηση πρωτονίων, στο οποίο δρουν ως ένας μοριακός διακόπτης ο οποίος ενεργοποιείται με την κοινή κατοχή ενός πρωτονίου.

Abstract

The aim of the present study was the spectroscopic investigation of cytochrome *ba*₃ from *Thermus Thermophilus*. Cytochrome *ba*₃ is a member of the large family of heme-copper oxidases, which appears to have many similarities with other members of the group but reveals a number of unusual features as well. The active site of the enzyme consists of a high spin heme *a*₃ and a Cu_B atom. Based on the crystal structure, *ba*₃ contains two more redox centers: a low spin heme *b* and homobinuclear Cu_A center. Besides its ability to catalyze the four electron reduction of O₂ to H₂O and to pump protons through the inner mitochondrial membrane, it has been recently reported that *ba*₃ is also capable of reducing nitric oxide (NO) to nitrous oxide (N₂O), under reducing anaerobic conditions.

In the present study we have applied FTIR and Time Resolved Step-Scan FTIR spectroscopy to investigate the structural and dynamic characteristics of cytochrome oxidase *ba*₃. Due to its high sensitivity, spectral and time resolution FTIR spectroscopy allows the detection of transient structural changes even of an individual protein residue and is proven to be a very powerful tool in the study of biological systems.

Experiments were carried out using the stable complex of the reduced enzyme with CO. The study of the equilibrium complex suggests that almost 30% of bound CO remains bound to Cu_B. The protein environment of Cu_B shows great stability to pH or pD changes, results that come in agreement with published studies. By photolysing the heme-Fe-CO complex, CO migrates to Cu_B, where it remains for a few milliseconds. Detection of the photolysis product in continuous photolysis spectra reveals information for the secondary structure of the protein and allows the identification of vibrational modes of protein groups that are influenced by the photolysis process..

The study of the protein dynamics and the dynamics of the active center was achieved by the Time Resolved Step-Scan FTIR spectrums that confirmed the slow kinetic behavior of cytochrome *ba*₃ compared to other members of the oxidase family. By detecting the protein reactions to CO photolysis from the heme iron, it was

concluded that the transient binding of CO to Cu_B is dynamically linked to structural changes at the ring A propionate of heme *a*₃ and the to changes in the local environment of Asp372. These groups belong to the proposed Q proton channel and the time evolution of the vibrational modes that are attributed to them, indicates that the participation of the protonated form of the aspartic residue terminates sooner than the participation of it's deprotonated form and of the propionic groups. The perturbation of Asp372 is related to the formation of the transient complex and not to the ligand recombination to the iron of heme *a*₃.

The protein motions in the region of the propionic groups and the nearby Asp372 are performed in a way that alters the hydrogen bond network of these groups. Based on the spectroscopic data and the participation of these groups in a proton pathway which, terminates at an accumulation of water molecules, a model is proposed for their role in proton movement.

Κεφάλαιο I : Κυτοχρωμική Οξειδάση ba_3 από το βακτήριο *Thermus Thermophilus*.

**Κεφάλαιο I: Κυτοχρωμική Οξειδάση ba_3 από το βακτήριο
Thermus Thermophilus.**

1.1 Αναπνοή και κυτοχρωμικές οξειδάσες

Ο όρος κυτοχρωμικές οξειδάσες αναφέρεται σε μια κατηγορία ενζύμων τα οποία ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια των χαλκοξειδασών και συμμετέχουν στην μεταφορά ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα. Γενικά η διαδικασία της αναπνοής αναφέρεται σε μια διεργασία παραγωγής ATP^a, όπου ηλεκτρόνια τα οποία προέρχονται από οργανικούς ή ανόργανους δότες καταλήγουν σε μια ανόργανη ένωση. Στους αερόβιους οργανισμούς αυτός ο τελικός δέκτης των ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο ενώ τα ηλεκτρόνια προέρχονται από το NADH^b ή το FADH₂^c. Οι ενώσεις αυτές προκύπτουν μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος, της γλυκόλυσης και της οξείδωσης των λιπαρών οξέων, ενώ τα ηλεκτρόνια τους μεταφέρονται στο O₂ μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Σε αυτή την διαδικασία καταναλώνεται η μεγαλύτερη ποσότητα βιολογικού οξυγόνου (O₂).

Τα αναπνευστικά συγκροτήματα, όπως οι κυτοχρωμικές οξειδάσες, βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων στην περίπτωση των ευκαρυωτικών κυττάρων και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη στα προκαρυωτικά κύτταρα. Η σταδιακή μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω αυτών των συστημάτων συνοδεύεται από άντληση ηλεκτρονίων από την μήτρα, με αποτέλεσμα την δημιουργία βαθμίδωσης πρωτονίων κατά μήκος της μεμβράνης και ενός διαμεμβρανικού δυναμικού, τα οποία αποτελούν μια πρωτονιοκίνητη δύναμη που χρησιμοποιείται για την παραγωγή ATP. Η σύνθεση του ATP, το οποίο αποτελεί και το κύριο βραχυπρόθεσμο μέσο αποθήκευσης ενέργειας, πραγματοποιείται όταν πρωτόνια εισρέουν πίσω στην μήτρα μέσω της ATP-συνθάσης.

Στην μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων συμμετέχουν τέσσερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα :

- 1) η NADH αφυδρογονάση
- 2) η ηλεκτρική αφυδρογονάση,
- 3) η κυτοχρωμική αναγωγή και
- 4) η κυτοχρωμική οξειδάση,

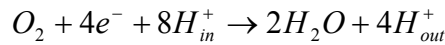
Οι ομάδες που μεταφέρουν ηλεκτρόνια μεταξύ αυτών των ενζύμων είναι φλαβίνες, σύμπλοκα σιδήρου-θείου, αιμικές ομάδες και ιόντα χαλκού. Πιο συγκεκριμένα, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADH στην NADH αφυδρογονάση, και στην

^a ATP : τριφωσφορική αδενοσύνη

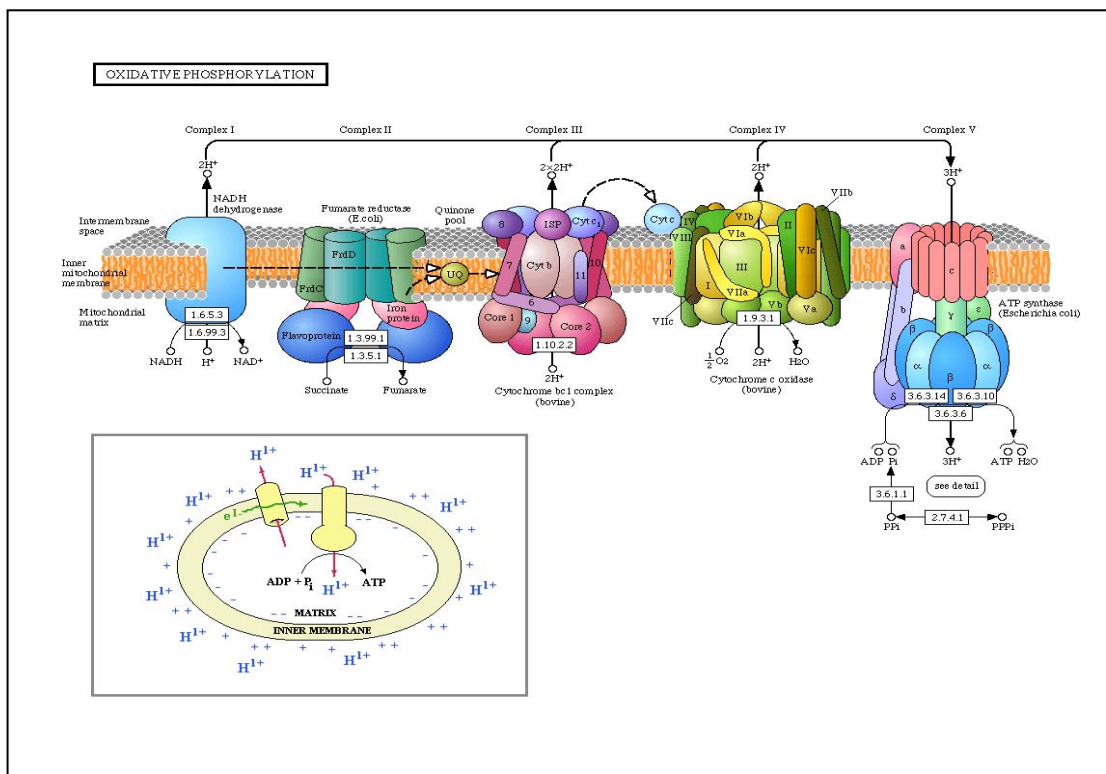
^b NADH : ανηγμένη μορφή του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου

^c FADH₂ : ανηγμένη μορφή του φλάβινο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου

συνέχεια μεταφέρονται στην ουβικινόνη. Επίσης ηλεκτρόνια μεταφέρονται στην ουβικινόνη από το ηλεκτρικό οξύ, μέσω του οξειδοαναγωγικού ζεύγους $FADH_2/FAD$, από την ηλεκτρική αφυδρογονάση. Μέσω της ουβικινόνης τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στην κυτοχρωμική αναγωγή, η οποία ανάγει το κυτόχρωμα c. Στο τελευταίο στάδιο της μεταφοράς οι κυτοχρωμικές οξειδάσες καταλύουν την μεταφορά ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα c στο O_2^1 , το οποίο ανάγουν προς νερό, σύμφωνα με την αντίδραση:



Για την πραγματοποίηση αυτής της αναγωγής απαιτούνται τέσσερα ηλεκτρόνια και τέσσερα πρωτόνια (*scalar protons*), ενώ αντλούνται και τέσσερα επιπλέον πρωτόνια (*vertical protons*) από την μιτοχονδριακή μήτρα, τα οποία συμβάλλουν στην δημιουργία της πρωτονιακής διαβάθμισης. Επομένως στις κυτοχρωμικές οξειδάσες παρατηρείται στενή σύζευξη μεταξύ της άντλησης πρωτονίων και της μεταφοράς ηλεκτρονίων που την ωθεί, καθώς δρουν σαν οξειδοαναγωγικές αντλίες πρωτονίων συνεισφέροντας άμεσα στην διαμεμβρανική διαβάθμιση ελεύθερης ενέργειας.



Σχήμα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Στο ένθετο αναπαριστάται η δημιουργία της πρωτονιακής διαβάθμισης κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Η σύνθεση του ATP πραγματοποιείται όταν πρωτόνια επιστρέφουν στην μήτρα μέσω της ATP-συνθάσης. Η ροή δύο ηλεκτρονίων σε καθένα από τα συστήματα άντλησης πρωτονίων είναι αρκετή για την σύνθεση δύο μορίων ATP. Με την οξείδωση ενός μορίου NADH στην μήτρα παράγονται τρία μόρια ATP, ενώ με την οξείδωση κάθε μορίου $FADH_2$ προκύπτουν δύο μόρια ATP.

1.2 Δομή και λειτουργία των κυτοχρωμικών οξειδασών

1.2.1 Δομικά χαρακτηριστικά των κυτοχρωμικών οξειδασών

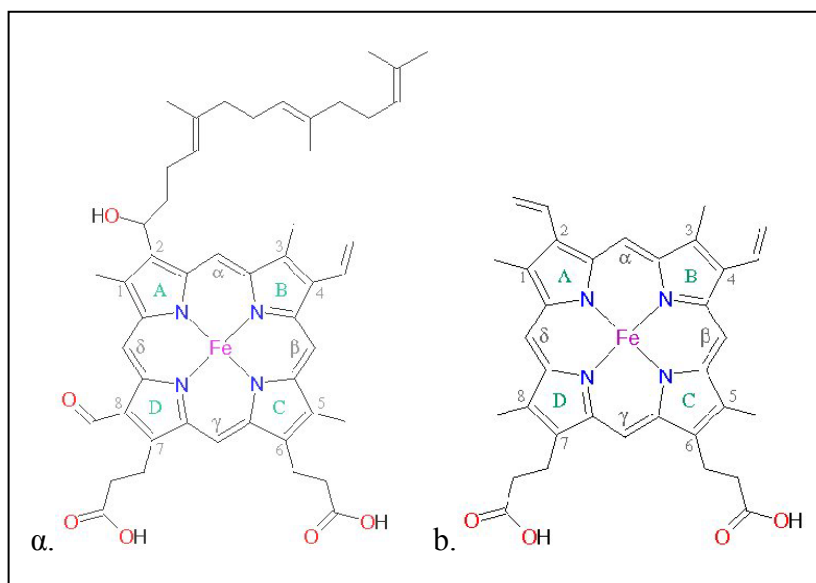
Τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί οι κρυσταλλικές δομές αρκετών ενζύμων της οικογένειας των κυτοχρωμικών οξειδασών. Ανάμεσα σε αυτά συμπεριλαμβάνεται το ένζυμο aa_3 από μοσχαρίσια καρδιά (*bovine*)^{2,3,16}, η οξειδάση aa_3 από τον οργανισμό *Parraccocus Denitrificans*^{4,17} καθώς και η κυτοχρωμική οξειδάση ba_3 από τον θερμοφιλο οργανισμό *Thermus Thermophilus*⁵, η οποία παρουσιάζει αρκετές δομικές ομοιότητες με τα αλλά μέλη της ομάδας αλλά και ορισμένες ιδιαιτερότητες.

Οι οξειδάσες των ευκαρυωτικών οργανισμών αποτελούνται από πολλές υπομονάδες, από τις οποίες οι περισσότερες έχουν βοηθητικό ρόλο ενώ μόνο οι υπομονάδες I, II και III, οι οποίες κωδικοποιούνται στο μιτοχονδριακό DNA, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενζυμική λειτουργία. Αντίθετα οι οξειδάσες των προκαρυωτικών κυττάρων αποτελούνται συνήθως από τις τρεις βασικές υπομονάδες⁶. Οι αλληλουχίες των αμινοξέων των κύριων υπομονάδων I και II των προαναφερθέντων aa_3 κυτοχρωμικών οξειδασών παρουσιάζουν μια ομολογία μεγαλύτερη του 50 %, ενώ η ομολογία τους με το ba_3 δεν ξεπερνά το 20 %⁷.

Η υπομονάδα II συνδέεται με τον δότη των ηλεκτρονίων, το κυτόχρωμα c^8 , και περιέχει ένα ομοπυρηνικό διμεταλλικό κέντρο Cu_A , το οποίο αποτελεί και τον πρώτο δέκτη των ηλεκτρονίων. Αυτή η χρωμοφόρα ομάδα μπορεί να βρίσκεται σε δύο καταστάσεις: σε οξειδωτική κατάσταση μικτού σθένους $Cu^{1,5+} \cdots Cu^{1,5+}$, η οποία συναντάται στην οξειδωμένη κατάσταση των ενζύμων ή στην κατάσταση $Cu^{1+} \cdots Cu^{1+}$ στα ανηγμένα ένζυμα. Μερικές χαλκοξειδάσες δεν περιέχουν στο μόριο τους Cu_A , όπως για παράδειγμα η οξειδάση bo_3 από το βακτήριο *E. Coli*. Στην περίπτωση αυτή τα ηλεκτρόνια δεν προέρχονται από το κυτόχρωμα c αλλά από την ουβικινόνη και το γεγονός της

έλλειψης Cu_A γεννά ερωτήματα για τον ρόλο αυτού του μεταλλικού κέντρου στην άντληση πρωτονίων.

Το ενεργό κέντρο των χαλκοξειδασών βρίσκεται στην υπομονάδα I, η οποία φαίνεται να είναι απαραίτητη για την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου και την άντληση των πρωτονίων. Το ενεργό κέντρο απαρτίζεται από μια αίμη υψηλού σπιν και ένα άτομο Cu_B , ενώ συνήθως η υπομονάδα I περιέχει και ένα επιπλέον οξειδοαναγωγικό κέντρο. Στην περίπτωση της κυτοχρωμικής οξειδάσης ba_3 εκτός από τον Cu_B περιέχεται και μια αίμη a_3 υψηλού σπιν, η οποία αποτελεί και την θέση αναγωγής του οξυγόνου, και μια αίμη b χαμηλού σπιν, σε αντίθεση με το *bovine* ένζυμο και την οξειδάση του *Parraccocus Denitrificans* που περιέχουν μια χαμηλού σπιν αίμη a και μια υψηλού σπιν αίμη a_3 .

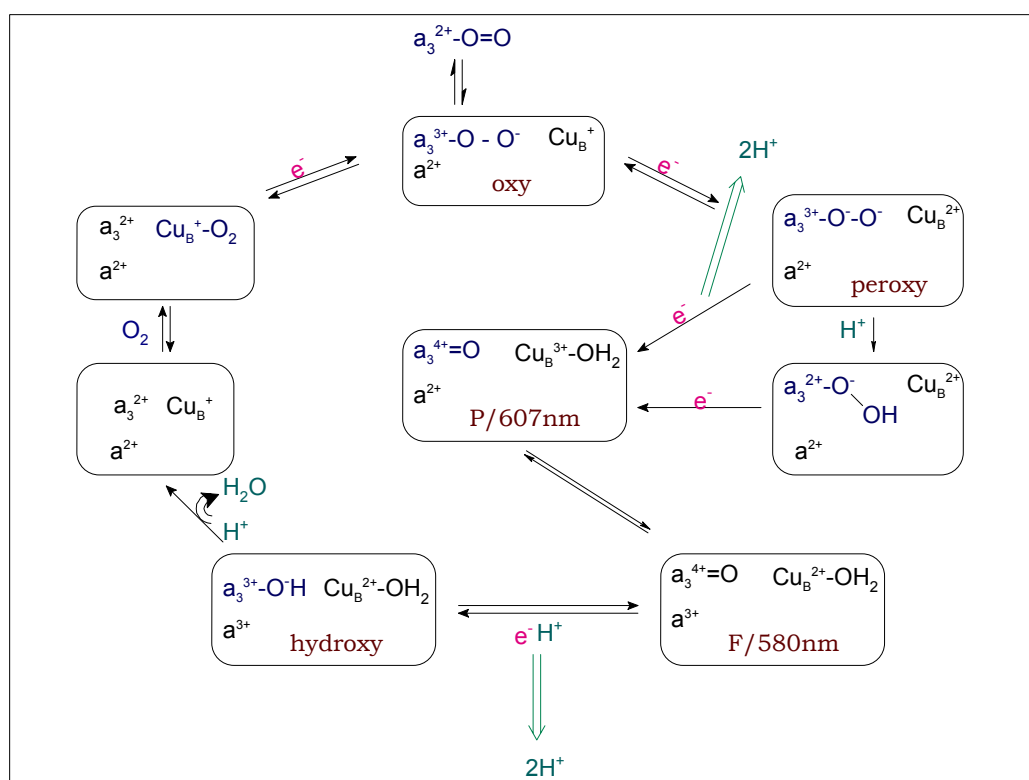


Σχήμα 1.2: α) Δομή της αίμης α και β) Δομή της αίμης β.

Οι ευκαρυωτικές οξειδάσες εκτός των δύο οξειδοαναγωγικών διμεταλλικών κέντρων συνήθως περιέχουν επιπλέον και ένα μεταλλικό κέντρο Mg^{2+} , το οποίο δεν εμφανίζει οξειδοαναγωγική δραστηριότητα. Σύμφωνα με τις κρυσταλλικές δομές οξειδασών που έχουν ως σήμερα διαλευκανθεί, αυτό το κατιόν Mg^{2+} τοποθετείται σε μια περιοχή όπου εντοπίζονται μόρια νερού^{9,17}, συνδεδεμένα με ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνων. Στις βακτηριακές οξειδάσες η ύπαρξη ενός τέτοιου πρόσθετου μεταλλικού κέντρου δεν έχει παρατηρηθεί, ενώ οι περιοχή συσσώρευσης μορίων ύδατος φαίνεται να διατηρείται.

1.2.2 Ενεργοποίηση μοριακού οξυγόνου από τις κυτοχρωμικές οξειδάσες

Ο μηχανισμός αναγωγής μοριακού οξυγόνου από τις κυτοχρωμικές οξειδάσες έχει μελετηθεί κυρίως με τεχνικές flow flash, στις οποίες η έναρξη της αντίδρασης του ανηγμένου ενζύμου με το O_2 πραγματοποιείται με την φωτοδιάσπαση του μονοξειδίου του άνθρακα από το σύμπλοκο CcO^d-CO . Από τις μελέτες αυτής της αντίδρασης με Transient Optical Absorption Flow-Flash και Time Resolved Resonance Raman τεχνικές έχουν προκύψει σημαντικές πληροφορίες για την κινητική της μεταφοράς ηλεκτρονίων και για τις δομές κάποιων ενδιάμεσων του καταλυτικού κύκλου. Παρόλα αυτά ορισμένες λεπτομέρειες του μηχανισμού μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την εξέλιξη της αντίδρασης παραμένουν αδιευκρίνιστες. Επίσης προβληματισμό γεννά το αν η αντίδραση που μελετάται με τις παραπάνω τεχνικές, μετά την αποδέσμευση του CO αντικατοπτρίζει την πραγματική αντίδραση του ενζύμου ή επηρεάζεται και από την τύχη του CO.



Σχήμα 1.3: Προτεινόμενος μηχανισμός αναγωγής του μοριακού οξυγόνου από το ενεργό κέντρο των κυτοχρωμικών οξειδάσων. Εμφανίζονται τα ενδιάμεσα του καταλυτικού κύκλου καθώς και τα σημεία σύζευξης με την άντληση πρωτονίων.

^d CcO : Κυτοχρωμική οξειδάση

Ο προτεινόμενος μηχανισμός της αναγωγής του μοριακού οξυγόνου^{10,11,12,13} από την κυτοχρωμική οξειδάση περιγράφεται στο σχήμα 1.3. Σύμφωνα με αυτόν, το οξυγόνο δεσμεύεται μεταβατικά στον Cu_B^+ και ακολουθεί γρήγορος σχηματισμός του όξυ ενδιάμεσου ($Fe_{a_3}^{2+} - O = O \leftrightarrow Fe_{a_3}^{3+} - O - O^-$). Στην περίπτωση που δεν είναι εφικτή η διάθεση ηλεκτρονίων από τα κέντρα χαμηλού δυναμικού Cu_A/a (όπως στην μικτού σθένους μορφή του ενζύμου), με την προσφορά ενός δεύτερου ηλεκτρονίου από τον Cu_B^+ σχηματίζονται τα πέροξυ ενδιάμεσα ($Fe_{a_3}^{3+} - O^- - O^-$, $Fe_{a_3}^{3+} - O^- - OH$). Με την συμμετοχή ενός τρίτου ηλεκτρονίου σχάζεται ο δεσμός O-O, ενώ σχηματίζονται δύο νέοι δεσμοί ($Fe_{a_3}^{4+} = O$, $Cu_B^{3+} - O^- - H$). Έτσι προκύπτει το φερρύλ P ενδιάμεσο ($Fe_{a_3}^{4+} = O$, $Cu_B^{3+} - OH_2, a^{2+}$), το οποίο βρίσκεται σε ταχεία μη οξειδοαναγωγική ισορροπία με την φερρύλ F δομή ($Fe_{a_3}^{4+} = O$, $Cu_B^{2+} - OH_2, a^{3+}$).

Στην περίπτωση που η μεταφορά ηλεκτρονίων από την αίμη a είναι δυνατή, πραγματοποιείται γρήγορος σχηματισμός του φερρύλ ενδιάμεσου F με μεταφορά του δεύτερου ηλεκτρονίου από το κέντρο Cu_A/a και του τρίτου από τον Cu_B . Ένα τέταρτο ηλεκτρόνιο που μεταφέρεται από το κέντρο Cu_A/a στο διπυρηνικό κέντρο Cu_B/a_3 οδηγεί στον σχηματισμό της ύδροξυ μορφής ($Fe_{a_3}^{3+} - O^- - H$, $Cu_B^{2+} - OH_2, a^{3+}$) και με την μεταφορά πρωτονίων ο κύκλος ολοκληρώνεται και το ένζυμο επιστρέφει στην ανηγμένη του μορφή.

Το όξυ, τα φερρύλ αλλά και το ύδροξυ ενδιάμεσο έχουν ανιχνευθεί φασματοσκοπικά, ενώ αιτία προβληματισμού έχει αποτελέσει η εισαγωγή του τρίτου ηλεκτρονίου στο καταλυτικό κύκλο. Τα όξυ ενδιάμεσο εμφανίζεται σε 40 μ s^{10,11,12,13} περίπου μετά την έναρξη της αντίδρασης ενώ, ενώ μετά την εξαφάνιση του προκύπτει το P ενδιάμεσο¹⁴ με χαρακτηριστική απορρόφηση ορατού στα 607nm. Το P ενδιάμεσο μετατρέπεται στο F (απορρόφηση στα 580nm) σε μια γρήγορη ισορροπία. Το τελευταίο ύδροξυ ενδιάμεσο εμφανίζεται μέσα σε 100 μ s και φθίνει μέσα σε λίγα ms^{11,12,13}.

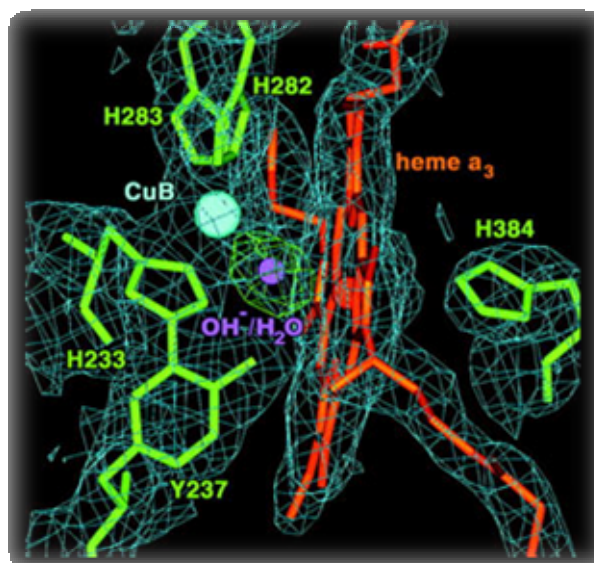
1.3 Η κυτοχρωμική οξειδάση ba_3

1.3.1 Ανάλυση δομής στο κυτόχρωμα ba_3

Το μεγαλύτερο μέρος της οξειδάσης ba_3 αποτελείται από την υπομονάδα I, η οποία σχηματίζει δεκατρείς διαμεμβρανικές έλικες, σε αντίθεση με τις δώδεκα που σχηματίζονται στις περισσότερες οξειδάσες, με το άμινο-τελικό άκρο να βρίσκεται στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης και το κάρβοξυ-τελικό άκρο στην περιπλασματική της πλευρά. Ο Cu_B του ba_3 απέχει από την αίμη a_3 4.4 \AA , ενώ τα δυο αιμικά κέντρα απέχουν περίπου 15 \AA από την περιπλασματική μεμβρανική πλευρά. Ο σίδηρος της αίμης b έχει αριθμό συναρμογής έξι και συναρμόζεται με δύο κατάλοιπα ιστιδίνης (His72, His386), ενώ ο σίδηρος της αίμης a_3 συναρμόζεται με μια ιστιδίνη (His384) και η έκτη θέση συναρμογής προσφέρεται για την δέσμευση του υποστρώματος. Ο δεσμός μεταξύ του Fe_{a_3} και της His384 έχει μήκος μεγαλύτερο περίπου κατά 1 \AA από ότι στις aa_3 κυτοχρωμικές οξειδάσες που προαναφέρθηκαν. Η αίμη a_3 περιλαμβάνει προπιονικές και φορμυλικές ομάδες και μια υδροξυγεραυλογεραυλική¹⁵ πλευρική αλυσίδα που φτάνει ως την κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης, στην θέση της υδροξυφαρνεσυλικής που συναντάται σε άλλες οξειδάσες. Ο Cu_B συναρμόζεται με τρεις ιστιδίνες (His383, His382, His233), με μια από αυτές (His233) να σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με ένα κατάλοιπο Τυροσίνης (Tyr237), ένα δομικό μοτίβο υψηλά διατηρούμενο στην οικογένεια των κυτοχρωμικών οξειδάσων.

Η κατανομή της ηλεκτρονικής πυκνότητας στην περιοχή του ενεργού κέντρου, ανάμεσα στον Fe της αίμης a_3 και του Cu_B είναι συμμετρική δίνοντας, ένα σχεδόν σφαιρικό σχήμα. Η ύπαρξη μιας τέτοιας συνεχόμενης ηλεκτρονικής πυκνότητας μεταξύ των δύο μεταλλικών κέντρων είναι ενδεικτική της ύπαρξης ενός υποκαταστάτη που γεφυρώνει τα δύο άτομα (*bridging ligand*). Η ύπαρξη ενός τέτοιου *bridging ligand* έχει διαπιστωθεί και στην *bovine* κυτοχρωμική οξειδάση¹⁶ καθώς και στο ένζυμο από το *Parraccocus Denitrificans*¹⁷. Στην πρώτη περίπτωση ερμηνεύτηκε ως ύπαρξη μιας υπεροξειδικής ομάδας O-O, ενώ στην δεύτερη πιθανότερη είναι η ύπαρξη ενός μορίου νερού συνδεδεμένου στον σίδηρο και ενός ιόντος υδροξυλίου στον χαλκό, σε απόσταση που επιτρέπει τον σχηματισμό δεσμού υδρογόνου. Η ύπαρξη ενός τέτοιου μοντέλου δεν συμφωνεί με την κατανομή της ηλεκτρονικής πυκνότητας στην περίπτωση του ba_3 , όπου

φαίνεται πιθανή η ύπαρξη ενός ατόμου οξυγόνου, είτε με την μορφή μορίου νερού ή υδροξυλικής ομάδας.

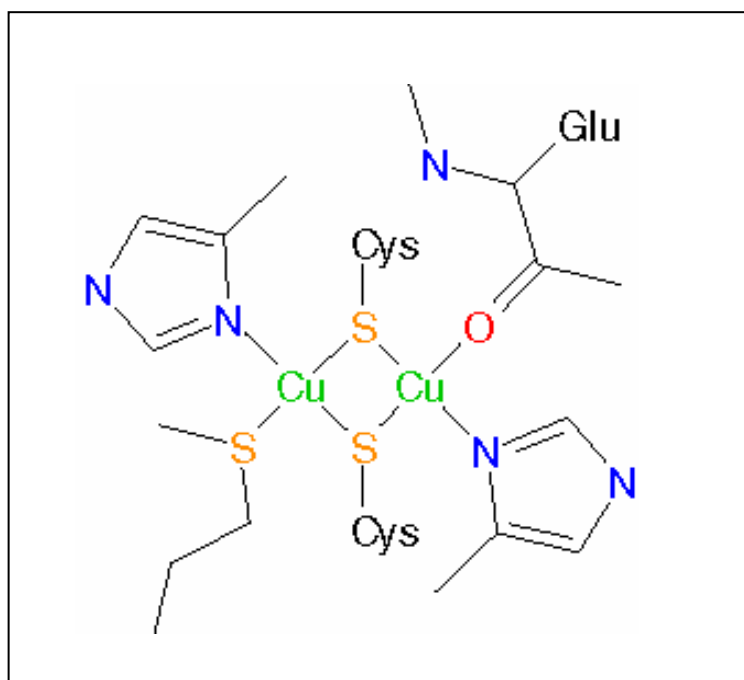


Σχήμα 1.4: Αναπαράσταση του διπυρηνικού κέντρου a_3 -Cu_B, όπου διακρίνονται οι ιστοινικοί υποκαταστάτες και η Tyr237. Επίσης παρουσιάζεται η σφαιρική ηλεκτρονική πυκνότητα μεταξύ των δύο μεταλλικών κέντρων, η οποία αποδίδεται σε ένα άτομο οξυγόνου

Η υπομονάδα II αποτελείται από μια μόνο διαμεμβρανική έλικα και περιέχει μια πολική περιοχή λίγων αμινοξέων προς την περιπλασματική πλευρά της μεμβράνης. Τα δύο άτομα Cu_A δεν είναι ισοδύναμα αν και το καθένα συναρμόζεται με μια ιστοιδίνη (His114 ,His157) και δύο κυστεϊνικά κατάλοιπα (Cys149, Cys153), λόγω της διαφορετικότητας του τέταρτου υποκαταστάτη. Το ένα άτομο χαλκού συναρμόζεται επιπλέον με μεθειονίνη (Met 160) και το άλλο με γλουταμίνη (Gln151).

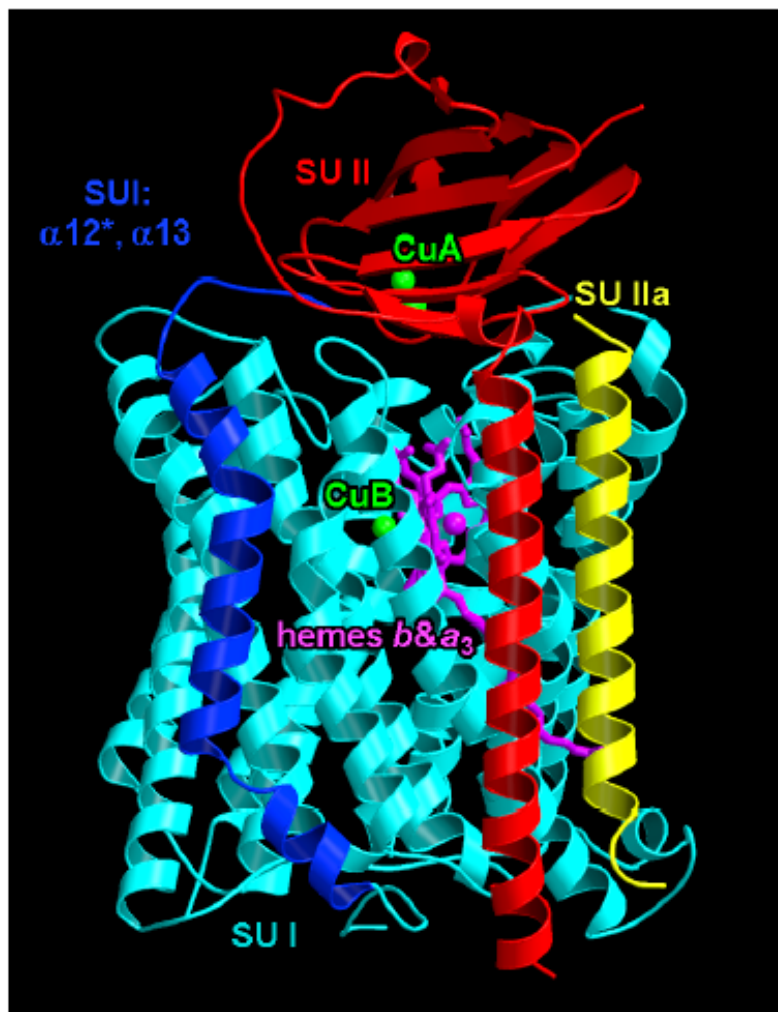
Οι δύο κυστεϊνικοί υποκαταστάτες σχηματίζουν μια θειολική γέφυρα ενώνοντας τα δύο άτομα Cu_A. Το ρομβικό δομικό μοτίβο που σχηματίζεται από την ένωση των χαλκών, μέσω των συναρμοσμένων σε αυτούς κυστεϊνών, φαίνεται να είναι αρκετά σταθερό χωρίς να παρουσιάζει σημαντικές δομικές αλλαγές ανάμεσα στη οξειδωμένη και ανηγμένη μορφή του ενζύμου¹⁸. Αυτή η σταθερότητα υποδεικνύει πως για τη ηλεκτρονική μεταφορά απαιτείται ελάχιστη αναδιοργάνωση αυτού του διπυρηνικού κέντρου, γεγονός που συμφωνεί με τον γρήγορο ρυθμό μεταφοράς

ηλεκτρονίων. Η μεταξύ τους απόσταση υπολογίζεται στα 2.4 \AA , ενώ η απόσταση του σιδήρου της αίμης b από το πλησιέστερο άτομο Cu_A είναι 19 \AA , από τον σιδήρο της αίμης a_3 21.8 \AA και από τον Cu_B 21.6 \AA . Η αλληλεπίδραση της υπομονάδας II με το κυτόχρωμα c στηρίζεται κυρίως σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις σε αντίθεση με τις οξειδάσες από μοσχαρίσια καρδιά και από το *P. denitrificans*, όπου παρατηρούνται κυρίως ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.



Σχήμα 1.5: Αναπαράσταση του ρομβικού δομικού μοντέλου συναρμογής του Cu_A

Η τελευταία υπομονάδα του ενζύμου ονομάζεται IIa και δεν περιέχει κανένα οξειδοαναγωγικό κέντρο. Σχηματίζει επίσης μια μόνο διαμεμβρανική έλικα και η αμινοξική της ακολουθία μοιάζει με μια από τις έλικες των ενζύμων aa_3 από μοσχαρίσια καρδιά και από το *Parraccocus denitrificans*, αν και εμφανίζει διαφορετική πολικότητα.



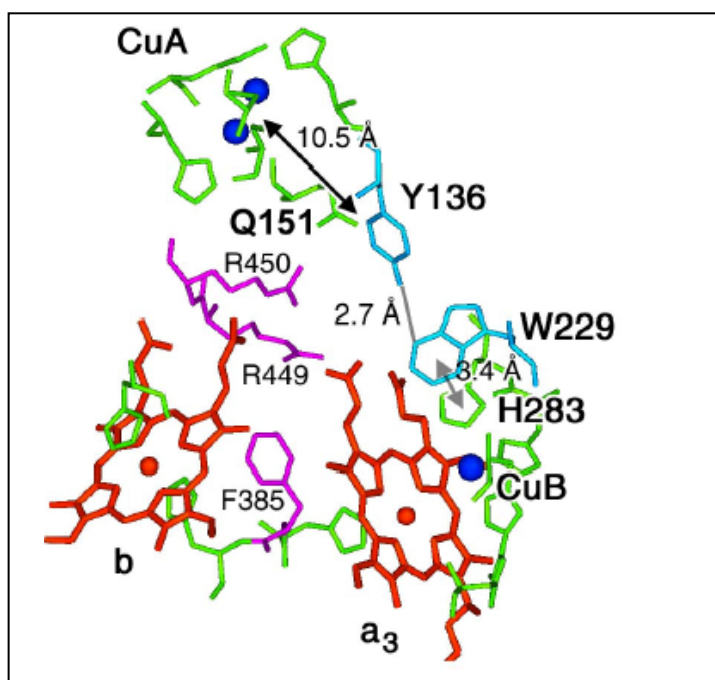
Σχήμα 1.6: Δομικό διάγραμμα της κυτοχρωμικής οξειδάσης ba_3 . Διακρίνονται οι 12 διαμεμβρανικές έλικες της υπομονάδας I, οι οποίες εμφανίζονται και στις άλλες οξειδάσες (κυανές) και οι δύο επιπλέον (μπλε). Με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται, η έλικα της υπομονάδας II και με κίτρινο η μοναδική έλικα της υπομονάδας II_α.

1.3.2 Κανάλια μεταφοράς ηλεκτρονίων

Ο ρόλος των κυτοχρωμικών οξειδασών συνίσταται τόσο στην αναγωγή μοριακού οξυγόνου όσο και στην συμμετοχή τους στην δημιουργία του διαμεμβρανικού δυναμικού. Για την επίτευξη αυτών των λειτουργιών είναι απαραίτητη τόσο η μεταφορά ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα c στο ενεργό κέντρο των ενζύμων όσο και η ύπαρξη καναλιών για την είσοδο του O_2 και την απομάκρυνση μορίων νερού και πρωτονίων, διαδικασίες οι οποίες συνοδεύονται από κινήσεις της πρωτεΐνης.

Ο πρώτος δέκτης ηλεκτρονίων στο ένζυμο είναι το διπυρηνικό κέντρο ατόμων Cu_A και έπειτα ακολουθεί μια ενδομοριακή μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω πολικών αμινοξέων και π συστημάτων. Έχει προταθεί ότι τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο ενεργό κέντρο μέσω της αίμης χαμηλού σπιν¹⁹, και η κρυσταλλική δομή της κυτοχρωμικής οξειδάσης ba_3 αποκαλύπτει πως τα αμινοξέα τα οποία έχουν προταθεί να συμμετέχουν σε αυτή την διαδικασία διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό και περιλαμβάνουν κατάλοιπα όπως η Arg450, η Arg449 και η Phe358.

Η διευθέτηση των αμινοξέων στην οξειδάση ba_3 παραπέμπει στην πιθανή ύπαρξη μιας επιπλέον διαδρομής για την μεταφορά ηλεκτρονίων από τον Cu_A στον Cu_B , χωρίς την συμμετοχή της αίμης b^5 , μέσω των π συστημάτων των καταλοίπων Tyr136, Trp229 και ενός υποκαταστάτη του Cu_B , την His283. Αυτή η εναλλακτική πορεία των ηλεκτρονίων θα μπορούσε να χρησιμοποιείται για την προσφορά ενός ηλεκτρονίου από τον Cu_B στα ενδιάμεσα του καταλυτικού κύκλου αναγωγής του οξυγόνου, όπως αναφέρεται στους προτεινόμενους μηχανισμούς^{19,20}.

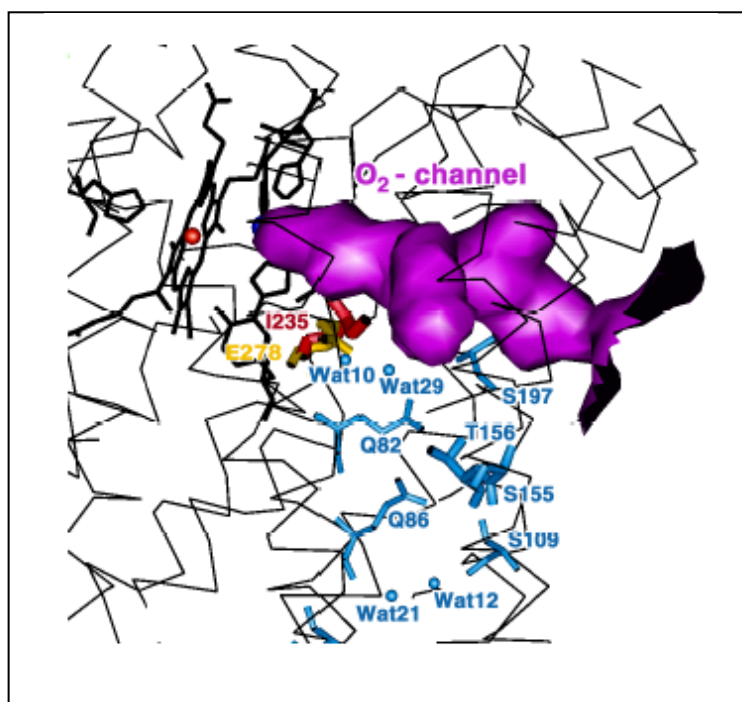


Σχήμα 1.7 : Αναπαράσταση των καναλιών μεταφοράς ηλεκτρονίων στην κυτοχρωμική οξειδάση ba_3 . Οι δύο αίμες εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα, τα άτομα χαλκού με μπλε ενώ τα συναρμοσμένα αμινοξέα με πράσινο. Τα δύο προτεινόμενα κανάλια από τον Cu_A στον Cu_B παρουσιάζονται με μωβ και κίτρινο χρώμα.

1.3.3 Εισαγωγή μοριακού οξυγόνου

Για την είσοδο του O_2 έχουν προταθεί συγκεκριμένα κανάλια εισαγωγής του, μέσω των οποίων οδηγείται στο διπυρηνικό κέντρο των κυτοχρωμικών aa_3 οξειδασών από την περιοχή του Cu_B . Ένα από αυτά τα κανάλια σχετίζεται με την ύπαρξη ενός υδροφοβικού πόρου²¹ που ξεκινά από το μέσο της μεμβράνης φτάνοντας ως το διπυρηνικό κέντρο και περιέχει το αμινοξύ Glu278, κατάλοιπο πλησίον του Cu_B .

Στο αντίστοιχο προτεινόμενο κανάλι για την εισαγωγή O_2 στο ba_3 το Glu278 έχει αντικατασταθεί από την Ile235, με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός μεγαλύτερου και αποτελεσματικότερου πόρου. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η έκφραση του ενζύμου πραγματοποιείται υπό συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου και υψηλών θερμοκρασιών⁷ η ύπαρξη ενός τέτοιου βελτιστοποιημένου καναλιού, που διευκολύνει την είσοδο του οξυγόνου, ίσως είναι απαραίτητη για την λειτουργικότητα του.



Σχήμα 1.8: Αναπαράσταση του καναλιού εισαγωγής οξυγόνου (μωβ), το οποίο εκτείνεται προς το ενεργό κέντρο. Τα αμινοξέα που παρουσιάζονται με μπλε χρώμα ανήκουν στο κανάλι εισαγωγής πρωτονίων D.

1.3.4. Κανάλια μεταφοράς πρωτονίων

Η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου προς νερό και η μεταφορά ηλεκτρονίων είναι διαδικασίες συζευγμένες με την μετακίνηση πρωτονίων δια μέσου της μεμβράνης. Όπως έχει ήδη αναφερθεί πρωτόνια εισέρχονται στο ενεργό κέντρο και έπειτα απομακρύνονται τόσο τα παραγόμενα μόρια νερού όσο και πρωτόνια προς την περιπλασματική πλευρά της μεμβράνης. Για την μετακίνηση των πρωτονίων από την κυτοχρωμική οξειδάση ba_3 έχουν προταθεί τρία κανάλια μεταφοράς, δύο από τα οποία έχουν χωρική διεύθυνση όμοια με προτεινόμενων καναλιών άλλων οξειδασών. Η πρωτονιακή μεταφορά πραγματοποιείται με την συμμετοχή πολλών πολικών αμινοξέων και μορίων ύδατος, τα οποία σχετίζονται με ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου.

Το πρώτο κανάλι μπορεί να συγκριθεί με το καλούμενο *K* κανάλι που έχει αναγνωριστεί σε άλλες οξειδάσες, όπως του *bovine*¹⁶ ενζύμου και της οξειδάσης από το *P. denitrificans*. Η ονομασία του καναλιού προέρχεται από την συμμετοχή σε αυτό του καταλοίπου Lys354 (η αρίθμηση αναφέρεται στην οξειδάση του *P. denitrificans*). Η έναρξη του καναλιού εντοπίζεται στο κατάλοιπο Glu15 της υπομονάδας II, ενώ πολλά από τα αμινοξέα που συμμετέχουν στην δημιουργία του και διατηρούνται στις άλλες οξειδάσες, στο ba_3 αντικαθίστανται από άλλα αμινοξέα. Για παράδειγμα η Thr351 και η Lys354 αντικαθίστανται από Ser309 και Thr312. Μεταξύ των καταλοίπων που συμμετέχουν σε αυτό κανάλι της ba_3 οξειδάσης συγκαταλέγονται και τα αμινοξέα Tyr244, Tyr248, Asp517, His8, και Glu516.

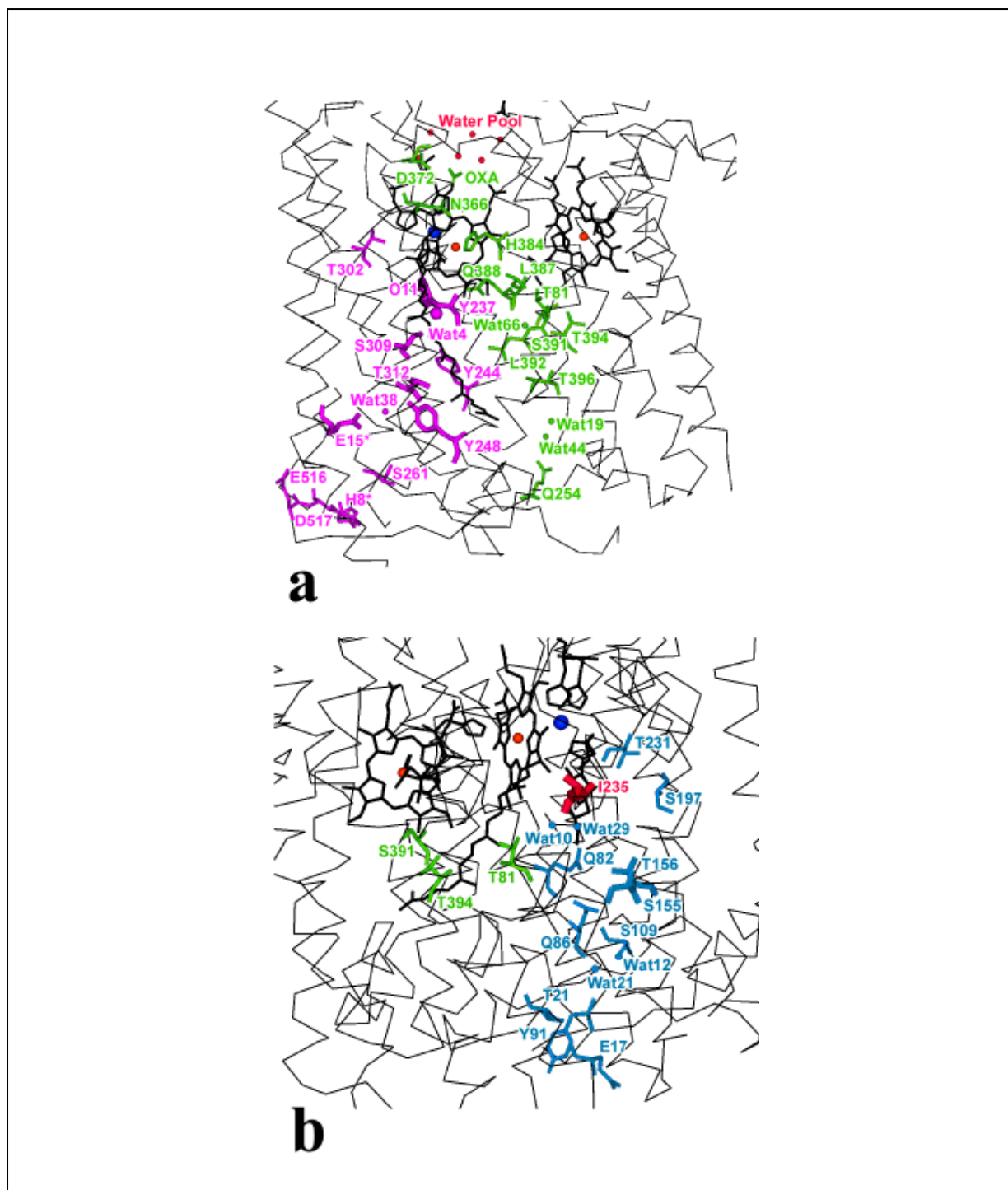
Η διεύθυνση του δεύτερου προτεινόμενου καναλιού μεταφοράς πρωτονίων της ba_3 οξειδάσης αντιστοιχεί με το κανάλι *D* που έχει βρεθεί σε άλλα μέλη της οικογένειας, αλλά η παρατηρούμενη διατήρηση των αμινοξικών καταλοίπων που συμμετέχουν σ' αυτό είναι ακόμη μικρότερη από ότι στην περίπτωση του καναλιού *K*. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αντικατάσταση του αμινοξέος Glu278 (η αρίθμηση αναφέρεται στην οξειδάση του *P. denitrificans*) από την Ile235, κατάλοιπα τα οποία όπως αναφέρθηκε εκτός από την μεταφορά των πρωτονίων συμμετέχουν και στην δημιουργία του πόρου για την εισαγωγή του οξυγόνου. Η αντικατάσταση ενός πολικού αμινοξέος όπως το γλουταμινικό από ένα μη πολικό κατάλοιπο όπως η ισολευκίνη μπορεί να συνεπάγεται μειωμένη ικανότητα άντλησης πρωτονίων αλλά ταυτόχρονα διευκολύνει την εισαγωγή του οξυγόνου. Για ένα ένζυμο όπως το ba_3 το οποίο εκφράζεται σε συνθήκες στις οποίες η διαθεσιμότητα του οξυγόνου είναι σχετικά μικρότερη, αυτή η

αλλαγή που ευνοεί την είσοδο του υποστρώματος ίσως είναι απαραίτητη ακόμη και αν το κόστος είναι η μείωση της ικανότητας πρωτονιακής άντλησης.

Η αρχή αυτού του καναλιού εντοπίζεται στο κατάλοιπο Glu17, ενώ μέσω πολικών καταλοίπων όπως η Ser109, η Gln86, η Thr156 και η Gln82 καταλήγει σε μια εσωτερική κοιλότητα κοντά στο ενεργό κέντρο, η οποία συμπληρώνεται από δυο μόρια νερού (Wat10 και Wat29).

Το τρίτο κανάλι Q του ba_3 δεν έχει παρατηρηθεί σε κανένα άλλο μέλος της οικογένειας των κυτοχρωμικών οξειδασών. Ξεκινά από την κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης και περιέχει τα αμινοξέα Thr396, Leu392, Ser391, Gln388, Leu387, His384, Asn366 και Asp372 καθώς και τα μόρια νερού Wat44, Wat19 και Wat66. Σύμφωνα με την χωρική του διεύθυνση μπορεί είτε να αντλεί πρωτόνια ανεξάρτητα είτε να μεταφέρει πρωτόνια που ξεκινούν από το κανάλι D .

Σημαντικά χαρακτηριστικά αυτού του καναλιού είναι ότι περιλαμβάνει τον αξονικό υποκαταστάτη του σιδήρου της αίμης a_3 , την His384, τις προπιονικές ομάδες του πυρρολικού δακτυλίου A της αίμης a_3 και το πολικό αμινοξύ Asp372. Αυτά τα αμινοξέα εμφανίζουν υψηλό ποσοστό διατήρησης στις κυτοχρωμικές οξειδάσες και αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης και για την παρούσα εργασία. Η κατάληξη αυτού του καναλιού είναι μια περιοχή συγκέντρωσης μορίων νερού πάνω από τις προπιονικές ομάδες της αίμης, η οποία διατηρείται σε όλους του γνωστούς εκπροσώπους των οξειδασών, με τα αμινοξέα που την περιβάλλουν να διατηρούνται ή να ανταλλάσσονται με άλλα παρομοίων χημικών ιδιοτήτων. Τα μόρια νερού που συσσωρεύονται σε αυτή την περιοχή συνδέονται μέσω άλλων υδατικών μορίων και πολικών αμινοξέων με τον διαλύτη στην περιπλασματική πλευρά της μεμβράνης. Πειράματα μεταλλάξεων αποδεικνύουν ότι αυτή η αποθεματοποίηση μορίων νερού συνδέεται με την απομάκρυνση πρωτονίων και νερού από το ενεργό κέντρο των οξειδασών²².



Σχήμα 1.9 : Αναπαράσταση των καναλιών μεταφοράς πρωτονίων στην κυτοχρωμική οξειδάση *ba*₃. Τα άτομα σιδήρου παριστάνονται με κόκκινο χρώμα ενώ τα άτομα χαλκού με μπλε.

α) Το νέο κανάλι Q εμφανίζεται με πράσινο χρώμα και οδηγεί από την κυτοπλασματική πλευρά της μεμβράνης, μέσω His384 και της αίμης α_3 στον χώρο συγκέντρωσης μορίων νερού. Με μωβ χρώμα εμφανίζεται το K κανάλι.

β) Παρουσιάζονται τα αμινοξέα που συμμετέχουν στο κανάλι D, χρωματισμένα με μπλε χρώμα.

1.3.5 Ιδιαίτερα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά της κυτοχρωμικής Οξειδάσης ba_3

Η ba_3 κυτοχρωμική οξειδάση από τον οργανισμό *Thermus Thermophilus* αν και παρουσιάζει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τις υπόλοιπες οξειδάσες που έχουν ως σήμερα μελετηθεί, εμφανίζει και αρκετές ιδιαιτερότητες που ελκύνουν το ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς η μελέτη τους μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση του τρόπου καταλυτικής λειτουργίας των κυτοχρωμικών οξειδασών, όσον αφορά όχι μόνο την αναγωγή του οξυγόνου αλλά και την άντληση πρωτονίων και μεταφορά ηλεκτρονίων.

Οι διαφοροποιήσεις αυτού του ενζύμου περιλαμβάνουν τόσο τι δομικές όσο και τις χημικές ιδιότητες του. Στην ανηγμένη του μορφή εμφανίζει πολύ μεγάλη συγγένεια για το CO, 50 με 100 φορές υψηλότερη από αυτή που εμφανίζουν άλλες οξειδάσες. Αυτή η αυξημένη συγγένεια του Cu_B για το μονοξειδίο του άνθρακα μπορεί να σχετίζεται με τον φυσιολογικό ρόλο αυτού του θερμόφιλου ενζύμου, με τον χαλκό να λειτουργεί σαν παγίδα οξυγόνου, καθώς η διαλυτότητα του O₂ είναι μικρή σε μεγάλες θερμοκρασίες.

Έχει βρεθεί ότι εκτός από την ικανότητα του να καταλύει την τεσσάρων ηλεκτρονίων αναγωγή του O₂ σε H₂O έχει επίσης την ικανότητα να καταλύει την δύο ηλεκτρονίων αναγωγή του NO σε N₂O²³ :

$$2NO + 2e^- + 2H^+ \rightarrow N_2O + H_2O.$$

Οι καταλυτικές υπομονάδες των κυτοχρωμικών οξειδασών εμφανίζουν μεγάλη δομική ομοιότητα με αυτές της αναγωγής του NO, ένα ένζυμο που καταλύει την αναγωγή του NO σε N₂O²⁴. Ακόμη τα ενεργά κέντρα και των δύο ομάδων ενζύμων είναι διμεταλλικά με την διαφορά ότι στην θέση του χαλκού των κυτοχρωμικών οξειδασών υπάρχει ένα άτομο σιδήρου στις αναγωγές του μονοξειδίου του αζώτου²⁵. Με βάση αυτές τις ομοιότητες και την παρατήρηση ότι η NOR^e έχει μικρή ικανότητα αναγωγής του οξυγόνου²⁶ η υποψία ότι και οι κυτοχρωμικές οξειδάσες ίσως να ανάγουν το NO αναπτύχθηκε από νωρίς. Παρόλα αυτά οι ως τώρα μελέτες έχουν επιβεβαιώσει αυτή την υποψία μόνο για τις θερμόφιλες οξειδάσες ba_3 και caa_3 που εκφράζει ο οργανισμός *Thermus Thermophilus*. Αυτή η αναγωγική ικανότητα του ba_3 υπολογίζεται περίπου στα 3mol NO ανά μόριο ενζύμου και ανά λεπτό σε συγκέντρωση NO 45μM²³ και είναι αρκετά μειωμένη σε σχέση με αυτή της NOR (300-4,500 mol NO/mol NOR*min)²⁶.

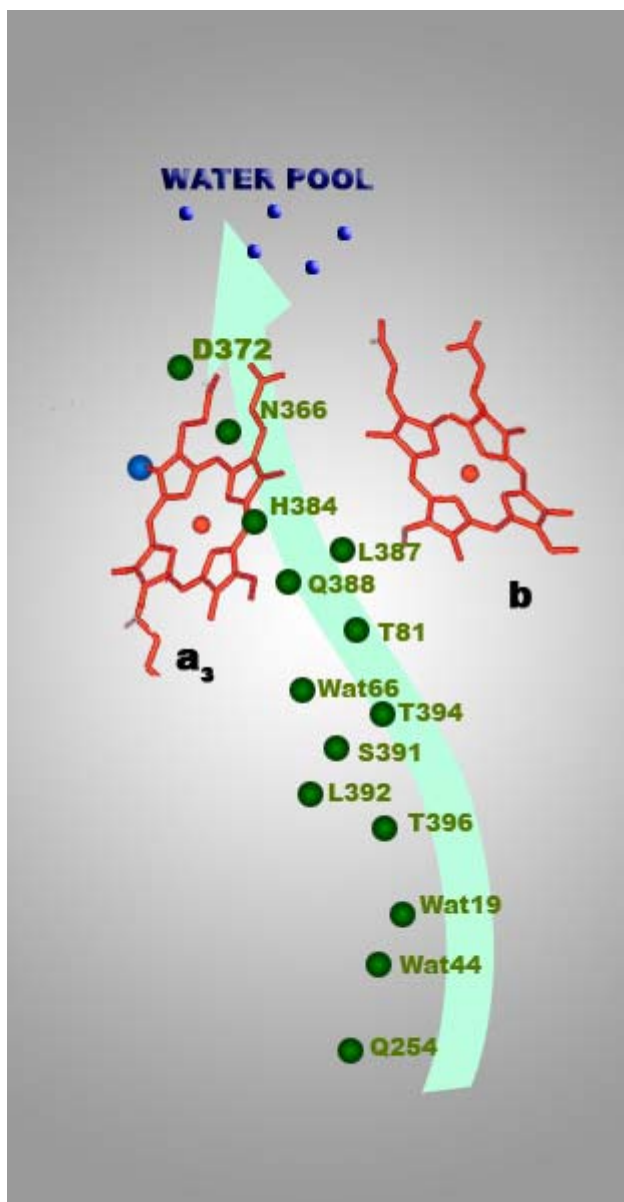
Το ενεργό κέντρο της κυτοχρωμικής οξειδάσης ba_3 παρουσιάζει ασυνήθιστες ιδιότητες²⁷ στην δέσμευση και άλλων εξωγενών υποκαταστατών. Για παράδειγμα το CN⁻

^e NOR : Αναγωγή του NO

^{28,29} δεσμεύεται μόνο όταν ο σίδηρος της αίμης a_3 βρίσκεται σε οξειδωτική κατάσταση Fe^{2+} ενώ H_2O_2 δεν δεσμεύεται στην οξειδωμένη δομή του ενζύμου, σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στις άλλες οξειδάσες³⁰. Με την προσθήκη CN^- στο οξειδωμένο aa_3 bovine ένζυμο σχηματίζεται ένα χαμηλού σπιν σύμπλοκο χωρίς να παρατηρείται αναγωγή του διπυρηνικού κέντρου. Αυτή η ηλεκτρονική διαμόρφωση αποδίδεται στην δέσμευση του κυανίου τόσο στον αιμικό σίδηρο όσο και στο χαλκό με αποτέλεσμα την δημιουργία γέφυρας μεταξύ αυτών των μετάλλων ($Fe^{3+}-CN-Cu^{2+}$)^{31,32}. Η αντίδραση του κυανίου με το οξειδωμένο ba_3 είναι αρκετά διαφορετική, καθώς η παρουσία του φαίνεται να σταθεροποιεί την *ferrous* κατάσταση του σιδήρου της αίμης a_3 ³³. Δηλαδή σίδηρος της αίμης a_3 ανάγεται ενώ όλα τα υπόλοιπα μεταλλικά κέντρα παραμένουν οξειδωμένα. Στο προκύπτον ανηγμένο κατά ένα ηλεκτρόνιο σύμπλοκο ένα κυάνιο συναρμόζεται στον $Fe_{a_3}^{2+}$ και ένα στον Cu ^{33,34}.

Το ba_3 ανάγει το οξυγόνο σε νερό με κατανάλωση $1.0H^+/e^-$ ως συνήθως, αλλά εμφανίζει μειωμένη ικανότητα άντλησης πρωτονίων της τάξης του $0.4-0.5H^+/e^-$ ³⁵, ενώ για παράδειγμα η aa_3 οξειδάση από το *P. denitrificans* εμφανίζει ικανότητα άντλησης πρωτονίων της τάξης του $1.0H^+/e^-$ περίπου. Επιπλέον όπως αναφέρθηκε στην ανάλυση της δομής του ba_3 , το οξυγόνο εισέρχεται στο διπυρηνικό κέντρο μέσω ενός βελτιστοποιημένου καναλιού, στο οποίο ένα πολικό αμινοξύ έχει αντικατασταθεί από ένα υδροφοβικό κατάλοιπο⁵. Επιπλέον για την μεταφορά των ηλεκτρονίων ως το διπυρηνικό κέντρο φαίνεται να υπάρχουν δυο εναλλακτικοί τρόποι, ώστε να πραγματοποιείται από τον Cu_A στον Cu_B ⁵ είτε απευθείας, είτε μέσω της αίμης χαμηλού σπιν.

Τέλος τα κανάλια μεταφοράς πρωτονίων, προς την περιπλασματική πλευρά της μεμβράνης, συναντώνται τροποποιημένα στο ba_3 ⁵, ενώ ανιχνεύτηκε και μια επιπλέον πιθανή διαδρομή που καταλήγει στο σημείο συσσώρευσης μορίων ύδατος. Αν και αυτό το κανάλι δεν έχει διαπιστωθεί στις περισσότερες οξειδάσες η περιοχή αποθεματοποίησης μορίων νερού φαίνεται να διατηρείται^{8,9} σε όλα τα μέλη της οικογένειας, όπως και το κατάλοιπο Asp372^{2,4,5,16,17} που βρίσκεται κοντά στις προπιονικές ομάδες της αίμης.



Σχήμα 1.10 : Σχηματική αναπαράσταση της διαδρομής που ακολουθείται από τα πρωτόνια κατά την μεταφορά τους μέσω του Q καναλιού. Οι δύο αίμες παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα, ενώ ο Cu_B με μπλε. Τα αμινοξέα που συμμετέχουν στο κανάλι αναπαρίστανται με πράσινες σφαίρες, ενώ η κατάληξη του καναλιού εντοπίζεται στην περιοχή αποθεματοποίησης μορίων νερού πάνω από τις προπιονικές ομάδες της αίμης a_3 .

Βιβλιογραφία

- ¹ Ferguson-Miller, S., Babcock, G.T (1996) *Chem. Rev.* **96**, 2889-2907.
- ² Tsykihara, T., Aoyanama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S (1995) *Science* **269**, 1069-10774.
- ³ Tsykihara, T., Aoyanama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S (1996) *Science* **42**, 1136-1144.
- ⁴ Iwata, S., Ostermier, C, Ludwig, B and Michel. H., (1995) *Nature*, **375**, 660-669.
- ⁵ Soulimane, T., Buse, G., Boyrnenkov, G. P., Bartunik, H.D., Huber, R. and Than, M. E. (2000) *EMBO J.* **19**, 1766-1776.
- ⁶ Ludwig, B. (1987) *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 41-56.
- ⁷ Keightley, J. A., Zimmermann, B. H., Mather, M. W., Springer, P., Pastuszyn, A., Lawrence, D. M. and Fee, J. A., (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 2045-20358.
- ⁸ Saraste, M. (1990) *Q. Rev. Biophys* **233**, 31-366..
- ⁹ Paustinen, A. and Wilkstrom, M., (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 35-37.
- ¹⁰ Proshlyakov D. A., Pressler, M. A., Babcock, G. T, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 237-241.
- ¹¹ Varotsis, C. A., Babcock, G. T., (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 11260-11269.
- ¹² Rousseau, D.L., Han, S., Song, S., Ching, Y., (1992) *J. Raman Spec.* **23**, 551-556.
- ¹³ Han, S., Takahashi, S., Rousseau, D.L., (2000), *J. Biol. Chem* **275**, 1910-1919.
- ¹⁴ Ogura, T., Hirota, S., Proshlyakov D.A., Sninzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Applema, E., Kitagawa, T., (1994) *J. Biol. Chem* **269**, 29385-29388.
- ¹⁵ Lybben, M. and Morand, K, (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 21479-21479.
- ¹⁶ Yoshikawa, S., (1998^a) *Science* **280**, 1729-1730
- ¹⁷ Ostermier, C. Harrenga, A., Ermler, U. and Michel. H (1997) *Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10547-10553.
- ¹⁸ Bluckburn, N. J., Ralle M., Gomez E., Hill, M. G., Pastuszyn, A., Sanders, D. and Fee, J. A (1999) *Biochemistry* **38**, 7075-7084.
- ¹⁹ Hill, B. C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 2419-2425.
- ²⁰ Michel, H. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12819-12824.
- ²¹ Riistama, S., Puustinen, A., Garcia- Horseman, A., Iwta, S., Michel, H. and Wiklstrom, M., (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 1-4,

-
- ²² Schmidt, B., McCracken, J. and Ferguson-Miller S., (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 15539-15542.
- ²³ Giuffre, A., Stubauer G., Sarti P., Burnori M., Zumft W. G., Buse. and Soulimane, T. (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14718-14723
- ²⁴ Zumft, W. G. (1997) *Microbiol. Mol. Rev.* **61**, 553-616.
- ²⁵ Cheeseman, M. R, Zumft, W. G.& Thomson, A. J., (1998) *Biochemistry* **37**, 13102-13109.
- ²⁶ Fujiwara, T. & Fukumori, Y. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 1866-1871.
- ²⁷ Giuffre, A., Forte, E., Antonini, G., Ditri, E., Burnori, M., Soulimane, T and Base, G. (1999), *Biochemistry* **38**, 1057-1065
- ²⁸ Surrerus, K. K., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3195-3199
- ²⁹ Kim. Y., Babcock, G. T., Surrerus, K. K., Fee, J. A., Dyer, R. B., Woodruff, W. H. and Oertling, W. A.(1998) *Biospectroscopy* **4**, 1-15.
- ³⁰ Slietzkyyi, S., Soulimane, T., Azarkina, N., Vygodina, T. V., Buse, G., Kaulen, S., and Konstantinov, A., (1999) *FEBS Lett.* **457**, 98-102.
- ³¹ Boelens, R., Wever, R., Van Gelder, B. F.&Rademaker, H. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **724**, 176-183.
- ³² Li, W & Palmer, G. (1993) *Biochemistry* **32**, 1833-1843.
- ³³ Oertling W., A., Surrerus, K. K., Einarsdottir O., Fee, J. A., Dyer, R. B., and Woodruff, W. H., (1994), *Biochemistry* **33**, 3128-3141.
- ³⁴ Surrerus, K. K., Oertling W., A., Fan C., Gurbiel J., R., Woodruff, W. H.& Fee, J. A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3195-3199.
- ³⁵ Kannt, A., Soulimane, T., Buse, G., Bamderg, E. and Michei, M. W., (1998) *FEBS Lett.* **434**, 17-22.

**Κεφάλαιο II : Δονητική Φασματοσκοπία Fourier Transform
Infrared και Time Resolved Step Scan Fourier Transform Infrared.**

2.1 Δονητική φασματοσκοπία υπερύθρου: βασικές αρχές και λειτουργία

2.1.1 Εισαγωγή

Η δονητική φασματοσκοπία υπερύθρου αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την μελέτη της δομής των μορίων αλλά και της δυναμικής τους. Όπως και κάθε άλλη φασματοσκοπική μέθοδος αναφέρεται στην μελέτη της αλληλεπίδρασης του φωτός με την ύλη, χρησιμοποιώντας ακτινοβολία ενέργειας ικανής να προκαλέσει δονητικές και περιστροφικές μεταβάσεις, χωρίς ηλεκτρονική διέγερση του δείγματος. Η περιοχή του υπερύθρου στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα κυμαίνεται κατά προσέγγιση από τους 200 cm^{-1} έως τους 14.000 cm^{-1} και διαχωρίζεται σε τρεις επιμέρους περιοχές:

- Την *far infrared* περιοχή ως τους 400 cm^{-1}
- Την *mid infrared* από 400 cm^{-1} ως 4000 cm^{-1}
- Την *near infrared* από 4000 cm^{-1} ως $14,000\text{ cm}^{-1}$

Τα περισσότερα φασματοφωτόμετρα υπερύθρου καλύπτουν την ενδιάμεση περιοχή (400 cm^{-1} - 4000 cm^{-1}) και σε αυτή συνήθως αναφέρονται οι περισσότερες μελέτες.

Για να πραγματοποιηθεί απορρόφηση της ενέργειας της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, πρέπει αυτή να αντιστοιχεί στην ενέργεια μιας δονητικής μετάβασης, με την προϋπόθεση της ύπαρξης ενός δίπολου, το οποίο πάλλεται με συχνότητα ίση με αυτή του παλλόμενου ηλεκτρικού φορτίου του προσπίπτοντος φωτός. Ο ευκολότερος τρόπος για την περιγραφή της δονητικής συμπεριφοράς των μορίων αποτελεί η μελέτη των διατομικών μορίων με το μοντέλο του αρμονικού ταλαντωτή.

2.1.2 Το μοντέλο του αρμονικού και μη αρμονικού ταλαντωτή (Δυναμικό Morse).

Η κλασσική προσέγγιση για την μελέτη ενός διατομικού συστήματος θεωρεί τους πυρήνες του μορίου σαν δύο σφαίρες συνδεδεμένες μέσω ελατηρίου, το οποίο αναπαριστά τις δυνάμεις που δρουν μεταξύ τους. Σε μια τέτοια περίπτωση, σύμφωνα με τον νόμο του *Hooke*, για μικρές παραμορφώσεις ισχύει:

$$F = -\frac{dV_{(x)}}{dx} = -kx \Rightarrow V_{(x)} = \frac{1}{2}kx^2 \quad (1)$$

όπου V είναι η δυναμική ενέργεια, k η σταθερά δύναμης που αντιστοιχεί στην ισχύ του δεσμού και x η μετατόπιση από το μήκος ισορροπίας του δεσμού.

Η χαμιλτωνιανή για τον αρμονικό ταλαντωτή μίας διάστασης δίνεται από την εξίσωση :

$$H = -\frac{\hbar^2}{2\mu} \frac{d^2}{dx^2} + \frac{1}{2}kx^2 \quad (2)$$

όπου μ η ανηγμένη μάζα των πυρήνων.

Έτσι εξίσωση του *Schrodinger* είναι :

$$\frac{d^2\Psi_v}{dx^2} + \left(\frac{2\mu E_v}{\hbar^2} - \frac{\mu kx^2}{\hbar^2} \right) \Psi_v = 0 \quad (3)$$

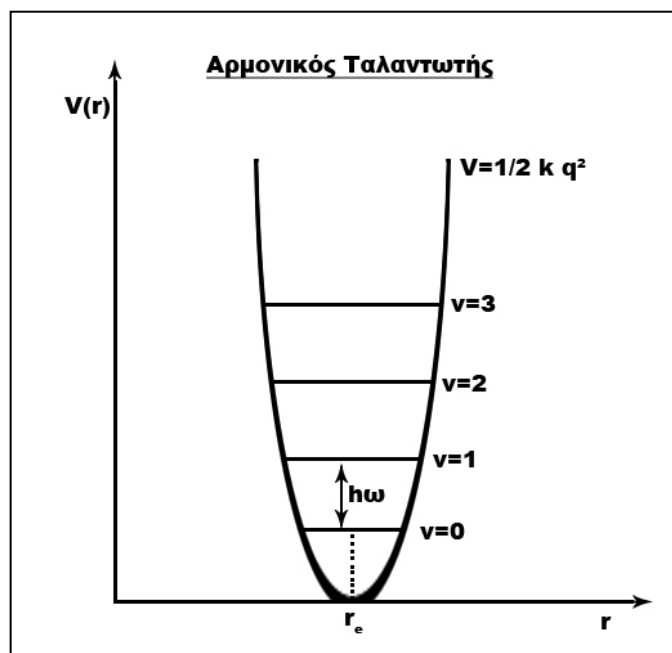
Και η λύση της δίνει :

$$E_v = h\omega_e \left(v + \frac{1}{2} \right) \quad (4)$$

Όπου $\omega_e = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$ η κλασσική συχνότητα δόνησης και v ο δονητικός κβαντικός αριθμός.

Η εξίσωση (4) δείχνει ότι τα δονητικά επίπεδα ισαπέχουν κατά $h\nu$ και ότι το επίπεδο με $v = 0$ έχει ενέργεια $1/2h\nu$, γνωστή σαν *ενέργεια μηδενικού σημείου*. Αυτή είναι η μικρότερη δυνατή τιμή ενέργειας, ακόμη και σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες.

Παριστάνοντας το δυναμικό $V_{(x)}$ σε συνάρτηση με την μετατόπιση x προκύπτει η γνωστή παραβολή του σχήματος 2.1. Η σταθερά δύναμης k μπορεί να θεωρηθεί σαν μέτρο της δύναμης του ελατηρίου στο μοντέλο της μοριακής δόνησης. Όσο αυξάνεται η τάξη του δεσμού, τόσο αυξάνεται και το k . Φυσικά η δύναμη του ελατηρίου που αντιπροσωπεύει τον δεσμό οφείλεται στην λεπτή ισορροπία των πυρηνικών απωθήσεων, ηλεκτρονιακών απωθήσεων και ηλεκτρονιακών - πυρηνικών έλξεων. Καμία από αυτές δεν επηρεάζεται από την πυρηνική μετατόπιση και επομένως το k δεν αλλάζει κατά την ισοτοπική αντικατάσταση.



Σχήμα 2.1: Γραφική παράσταση του δυναμικού σε σχέση με την απόσταση από το σημείο ισορροπίας, για ένα διατομικό μόριο, σύμφωνα με το μοντέλο του αρμονικού ταλαντωτή

Το μοντέλο του αρμονικού ταλαντωτή αποτελεί μια πρώτη προσέγγιση για την περιγραφή της δόνησης ενός διατομικού μορίου αλλά απέχει σημαντικά από την πραγματική δομή των μορίων. Μπορεί να θεωρηθεί ικανοποιητικό μόνο για μικρές τιμές της διαπυρηνικής απόστασης αφού σε μεγαλύτερες πραγματοποιείται διάσπαση του μορίου και τα προκύπτοντα άτομα δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Μετά από το σημείο της διάσπασης περαιτέρω αύξηση της απόστασης των δύο πυρήνων δεν επιφέρει καμία μεταβολή στην τιμή της δυναμικής ενέργειας.

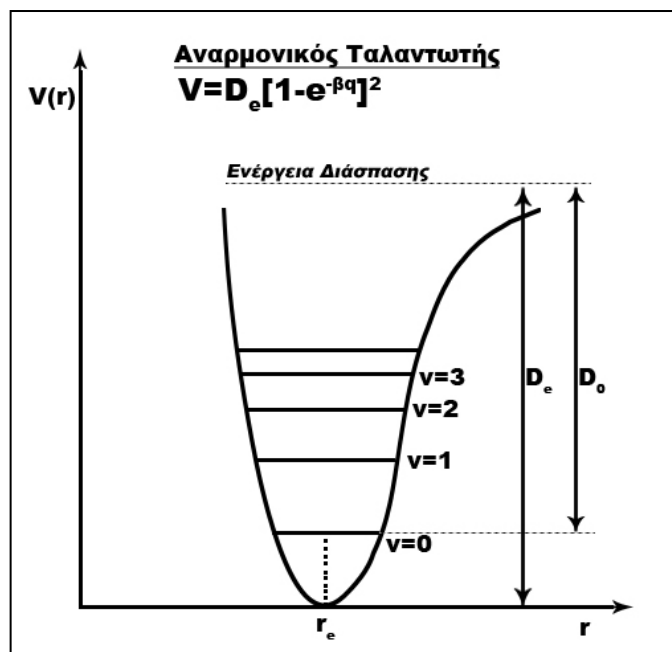
Ένα περισσότερο ρεαλιστικό μοντέλο για την περιγραφή της δόνησης ενός διατομικού μορίου είναι το δυναμικό Morse:

$$V_{(x)} = D_e [1 - \exp(-\beta x^2)] \quad (4)$$

Όπου το D_e αντιστοιχεί στο βάθος του πηγαδιού και ο όρος β αντικατοπτρίζει την καμπυλότητα του. Τα ενεργειακά επίπεδα που προκύπτουν από το δυναμικό Morse περιγράφονται από την εξίσωση :

$$E_v = \omega_e \left(v + \frac{1}{2} \right) - \omega_e x_e \left(v + \frac{1}{2} \right)^2 - \dots, \quad (5)$$

με ω_e την συχνότητα του αρμονικού ταλαντωτή. Ο όρος x_e ονομάζεται *αναρμονικότητα* και έχει ως αποτέλεσμα την σύγκλιση των ενεργειακών επιπέδων με την αύξηση του v , ώστε μετά το όριο διάσπασης να παρατηρείται μια συνέχεια επιπέδων. Το σχήμα ενός τέτοιου δυναμικού φαίνεται στο σχήμα 2.2.



Σχήμα 2.2 : Δυναμικό Morse.

2.1.3 Κανονικοί τρόποι δόνησης

Τα πολυατομικά μόρια έχουν πολύπλοκους τρόπους δόνησης αλλά όλες οι κινήσεις τους μπορούν να αναλυθούν σε ένα σύνολο πεπερασμένου αριθμού κινήσεων κατά τις οποίες οι παραμορφώσεις των μηκών δεσμών ή γωνιών φτάνουν στο μέγιστο ή στο ελάχιστο ταυτόχρονα. Αυτές οι δονήσεις ονομάζονται κανονικοί τρόποι δόνησης. Από τους $3N$ βαθμούς ελευθερίας ενός πολυατομικού μορίου N ατόμων, τρεις περιγράφουν την θέση του κέντρου μάζας (*μεταφορικοί*), τρεις την περιστροφή του μορίου (*περιστροφικοί* - δύο στην περίπτωση των διατομικών) και οι εναπομείναντες $3N-6$ (ή $3N-5$ για τα διατομικά) περιγράφουν τις δονήσεις (*δονητικοί*) και αντιστοιχούν στους κανονικούς τρόπους δόνησης. Αυτές οι δονήσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες :

- Δονήσεις έκτασης όπου μεταβάλλονται μήκη δεσμών.
- Δονήσεις τάσης εντός επιπέδου, όπου μεταβάλλονται μήκη γωνιών ενώ τα μήκη δεσμών παραμένουν σταθερά
- Δονήσεις τάσεις εκτός επιπέδου όπου πραγματοποιείται ταλάντωση ενός ατόμου σε ένα επίπεδο ορισμένο από τρία τουλάχιστον γειτονικά άτομα
- Δονήσεις στρέψης όπου μεταβάλλεται μια διεδρη γωνία.

Επιπρόσθετα, υπάρχει η πιθανότητα παρατήρησης συνδυαστικών κινήσεων που περιλαμβάνουν μεταβάσεις σε δονητικά διεγερμένες καταστάσεις, όπου περισσότερες των μία δονήσεων διεγείρονται.

2.1.4 Πιθανότητα μετάπτωσης και κανόνες επιλογής.

Ποιες από τις μοριακές δονήσεις αναμένεται κάθε φορά να ανιχνευθούν σε ένα φάσμα υπερύθρου προκύπτει από τους λεγόμενους κανόνες επιλογής. Η πιθανότητα κάθε δονητικής μετάβασης εξαρτάται από την διπολική ροπή που την συνοδεύει και είναι ανάλογη του τετραγώνου της ροπής της μετάβασης. Για μια μετάβαση μεταξύ δύο επιπέδων με δονητικές κυματοσυναρτήσεις Ψ_i και Ψ_f η ροπή της μετάβασης δίνεται από την σχέση :

$$R = \int \Psi_f \mu \Psi_i = \langle f | \mu | i \rangle \quad (6)$$

Και για την διπολική ροπή ισχύει:

$$\mu = \mu_0 + \left. \frac{d\mu}{dq} \right|_0 + \frac{1}{2!} \left. \frac{d^2\mu}{dq^2} \right|_0 + \dots \quad (7)$$

Επομένως

$$R = \mu_0 \langle f | i \rangle + \left. \frac{d\mu}{dq} \right|_0 \langle f | q | i \rangle + \dots \quad (8)$$

Σύμφωνα με τα παραπάνω μια δόνηση για να συνοδεύεται από μη μηδενική ροπή μετάβασης και να είναι IR ενεργή θα πρέπει να έχει μόνιμη διπολική ροπή. Όμως η τιμή της ροπής μετάβασης εξαρτάται και από την τιμή των ολοκληρώματος του δεύτερου αλλά και των ακόλουθων όρων και άρα από τις συμμετρίες των δονητικών κυματοσυναρτήσεων. Έτσι υπεισέρχονται επιπρόσθετοι κανόνες επιλογής πέραν της απαίτησης για ύπαρξη μόνιμης διπολικής ροπής, οι οποίοι εξαρτώνται από την συμμετρία του μορίου. Για μόρια χαμηλής συμμετρίας οι κανόνες αυτοί δεν είναι περιοριστικοί.

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί πως οι κανόνες επιλογής δεν μπορούν να οδηγήσουν σε όλες τις περιπτώσεις σε ακριβή πρόβλεψη καθώς λένε ποιές μεταβάσεις μπορεί να συμβούν χωρίς να αναφέρονται στην ένταση αυτών των μεταβάσεων, η οποία μπορεί να είναι πολύ μικρή. Όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της διπολικής ροπής που συνοδεύει μια δόνηση τόσο εντονότερη θα είναι και η απορρόφηση και επομένως και το παραγόμενο σήμα σε ένα φάσμα υπέρυθρου. Οι δονητικές μεταβάσεις με $\Delta\nu = \pm 1$ ονομάζονται θεμελιώδεις και συνήθως έχουν μεγαλύτερη ένταση από τις αρμονικές μεταβάσεις για τις οποίες $\Delta\nu = \pm 2, \pm 3 \dots$

2.1.5 Διαδικασία λήψης υπέρυθρου φάσματος - συμβολόμετρο Michelson

Για την λήψη ενός φάσματος υπέρυθρου προσδιορίζεται το ποσοστό της απορρόφησης της υπέρυθρης ακτινοβολίας σε κάθε κυματάριθμο και επομένως ισχύει ο νόμος των Beer-Lambert σύμφωνα με τον οποίο είναι:

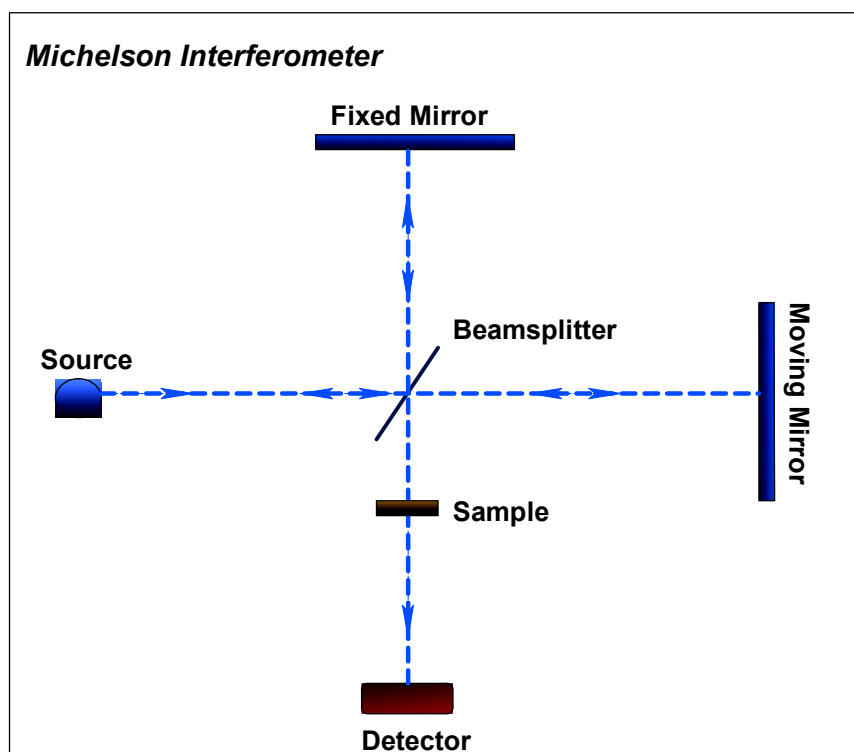
$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon cl \quad (9)$$

Όπου A είναι η απορρόφηση, I_0 η ένταση του προσπίπτοντος στο δείγμα φωτός και I η ένταση του φωτός που διαπερνά το δείγμα. Με c συμβολίζεται η συγκέντρωση του δείγματος ενώ με l η οπτική διαδρομή. Το ϵ είναι μια χαρακτηριστική σταθερά για κάθε ουσία η οποία ονομάζεται μοριακός συντελεστής απορρόφησης.

Η αρχή λειτουργίας των φασματοφωτομέτρων υπέρυθρου βασίζεται στο συμβολόμετρο του Michelson. Πρόκειται για μια διάταξη στην οποία η εκπεμπόμενη από την πηγή ακτινοβολία διαιρείται σε δύο μέρη και επανασυνδιάζεται μετά από την εισαγωγή μιας διαφοράς διαδρομής. Με τον τρόπο αυτό η ένταση της τελικής εξερχόμενης δέσμης μεταβάλλεται συναρτήσει αυτής της διαφοράς.

Τα βασικά μέρη του συμβολόμετρου φαίνονται στο σχήμα 2.3. Εκτός της πηγής και του ανιχνευτή περιλαμβάνει δύο κάθετα τοποθετημένους καθρέπτες, από τους οποίους ο ένας βρίσκεται σε σταθερό σημείο (σταθερός καθρέπτης) και ο δεύτερος έχει την δυνατότητα κίνησης σε μια απόσταση d , κατά μήκος ενός άξονα κάθετου στο επίπεδο του (κινητός καθρέπτης). Μεταξύ των δύο καθρεπτών παρεμβάλλεται ένας διαχωριστής δέσμης, ο οποίος σε ιδανική λειτουργία επιτρέπει στο 50% του προσπίπτοντος φωτός να τον διαπεράσει και ανακλά το υπόλοιπο μέρος του. Το μέρος της ακτινοβολίας που ανακλάται από τον διαχωριστή δέσμης φτάνει

στον σταθερό καθρέπτη ενώ αυτό που τον διαπερνά φτάνει στον κινητό καθρέπτη. Όταν οι δύο προκύπτοντες δέσμες φτάσουν σε έναν από τους δύο καθρέπτες ανακλώνται ξανά προς τα πίσω και επανασυνδιάζονται. Η προκύπτουσα δέσμη επαναδιαχωρίζεται από τον beamsplitter. Έτσι το ένα μέρος της δέσμης επιστρέφει στην πηγή και το άλλο, αφού διέλθει από το δείγμα, οδηγείται στον ανιχνευτή.



Σχήμα 2.3 : Συμβολόμετρο του Michelson. Διακρίνεται ο κινητός και σταθερός καθρέπτης και ο διαχωριστής δέσμης.

Ο τρόπος συμβολής των δύο δεσμών εξαρτάται από την διαφορά των διαδρομών που διένυσαν και επομένως από την θέση του κινητού καθρέπτη την στιγμή της ανάκλασης. Οι μεταβολές της έντασης της δέσμης που φτάνει στον ανιχνευτή ή επιστρέφει στην πηγή περιέχουν την φασματική πληροφορία. Η διαφορά της οπτικής διαδρομής των δύο δεσμών ονομάζεται καθυστέρηση και συμβολίζεται με το γράμμα δ . Την ίδια διαδρομή ακολουθεί και μια δέσμη εκπεμπόμενη από laser He-Ne. Αυτή η δέσμη είναι μονοχρωματική και χρησιμοποιείται για την βαθμονόμηση του συμβολόμετρου.

Στην λήψη στατικών φασμάτων ο κινητός καθρέπτης εκτελεί μια συνεχή κίνηση με σταθερή ταχύτητα και η ένταση της δέσμης που φτάνει στον ανιχνευτή είναι συνημιτονοειδής συνάρτηση της καθυστέρησης:

$$I(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} 0.5I(\lambda) \cos(1 + \frac{2\pi\delta}{\lambda})d\lambda \Rightarrow I(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} (0.5I(\lambda) + 0.5I(\lambda) \cos(\frac{2\pi\delta}{\lambda}))d\lambda \Rightarrow$$

$$I(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} 0.5I(\lambda)d\lambda + \int_{-\infty}^{+\infty} 0.5I(\lambda) \cos(\frac{2\pi\delta}{\lambda})d\lambda \quad (10)$$

Στην εξίσωση (10) μόνο ο δεύτερος όρος μεταβάλλεται και είναι σημαντικός για τις φασματοσκοπικές μετρήσεις. :

$$I(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} 0.5I(\lambda) \cos(\frac{2\pi\delta}{\lambda})d\lambda . \quad (11)$$

Αυτός όρος αυτός αναφέρεται ως συμβολογράφημα και παίρνει την μορφή φάσματος μετά από μαθηματική επεξεργασία με την χρήση του μετασχηματισμού Fourier. Η ανάλυση του καταγραφόμενου φάσματος εξαρτάται από την μέγιστη διαφορά διαδρομής. Αν αυτή είναι ίση με Δ_{\max} τότε η μέγιστη ανάλυση θα είναι :

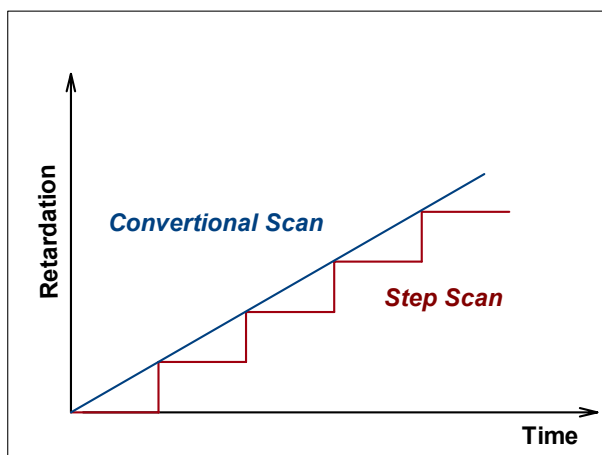
$$\Delta\lambda = \frac{1}{\Delta_{\max}} \quad (12)$$

2.2 Time-Resolved Step-Scan FTIR φασματοσκοπία.

2.2.1 Αρχή λειτουργίας

Σκοπός της τεχνικής Time-Resolved Step-Scan FTIR είναι η μελέτη φαινομένων που πραγματοποιούνται σε πολύ μικρούς χρόνους, ακόμα και της τάξης των nanoseconds και εμφανίζουν επαναληψιμότητα. Η κύρια διαφορά της τεχνικής Step-Scan είναι ο τρόπος κίνησης του καθρέπτη, ο οποίος δεν εκτελεί συνεχή κίνηση αλλά σταθεροποιείται σε καθορισμένα ισαπέχουσα σημεία. Το συμβολογράφημα παράγεται με την ολοκλήρωση του σήματος του ανιχνευτή κατά τη διάρκεια του χρόνου στον οποίο ο καθρέπτης παραμένει ακίνητος. Ο καθρέπτης μετακινείται στο επόμενο σημείο όπου καταγράφεται ξανά το σήμα. Τα συνολικά συμβολογραφήματα προκύπτουν από τα δεδομένα στις διάφορες θέσεις του καθρέπτη που αντιστοιχούν σε διαφορετικές συχνότητες αλλά στον ίδιο χρόνο. Ο χρόνος που απαιτείται για να μετακινηθεί ο καθρέπτης ανάμεσα στα σημεία που σταθεροποιείται δε συνεισφέρει στην καταγραφή του φάσματος, και κατά συνέπεια επιδιώκεται η ελαχιστοποίηση του.

Η απόσταση των διαδοχικών θέσεων του καθρέπτη είναι συνήθως της τάξης των μικρομέτρων, ώστε να επιτυγχάνεται μια ικανοποιητική φασματική ανάλυση ενώ για την για την βελτιστοποίηση του λόγου σήματος προς θόρυβο συνήθως απαιτούνται πολλές επαναλήψεις. Βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου αποτελεί η δυνατότητα μελέτης μη χρωμοφόρων ομάδων, η μη διατάραξη του υπό μελέτη συστήματος από την υπέρυθη ακτινοβολία καθώς και η ικανότητα ανίχνευσης όλων των IR ενεργών δονήσεων.



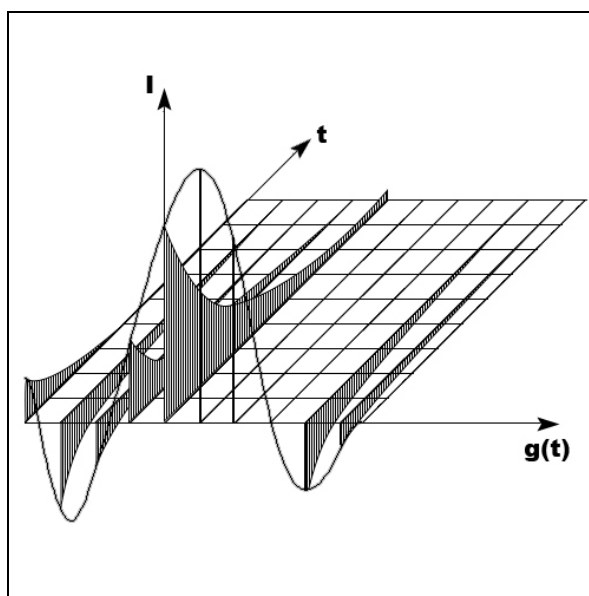
Σχήμα 2.4 : Διάγραμμα όπου φαίνεται η διαφορά της κανονικής απλής σάρωσης από αυτής κατά την διάρκεια μιας Time Resolved Step-Scan FTIR μέτρησης.

Τα χρονοεξαρτώμενα φάσματα λαμβάνονται σε σχέση με ένα φάσμα αναφοράς που αντιστοιχεί στο σύστημα πριν την έναρξη της παρατηρούμενης μεταβολής. Επομένως πρόκειται για φάσματα διαφοράς, τα οποία σύμφωνα με τον

νόμο του Beer υπολογίζονται από την σχέση :

$$\Delta A = -\log \frac{I_s}{I_R}, \quad (13)$$

όπου I_s είναι η ένταση του υπό μελέτη δείγματος και I_R η ένταση του αναφορικού δείγματος.



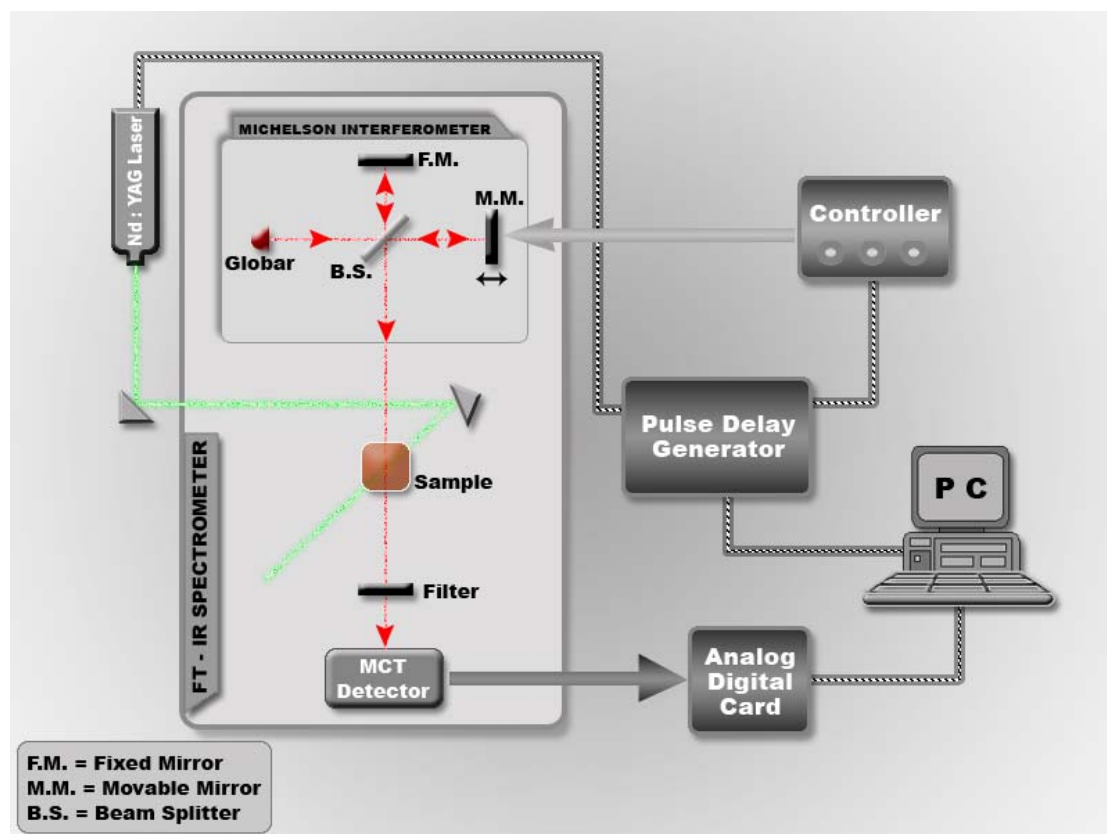
Σχήμα 2.5 : Αρχή της Time Resolved Step-Scan FTIR φασματοσκοπίας. Ο άξονας g αναπαριστά την οπτική διαδρομή του καθρέπτη, ο άξονας t τον χρόνο και ο I την ένταση του συμβολογραφήματος.

2.2.2 Πειραματική διάταξη

Περιγραφή

Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των χρονοεξαρτημένων πειραμάτων περιλαμβάνει ένα Brucker Equinox IFS55 φασματοφωτόμετρο, και μια globar πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας, τοποθετημένα σε τραπέζι δονητικής απομόνωσης (Newport, RS 4000). Η έναρξη της αντίδρασης πυροδοτείται με ένα παλμικό *laser* Nd :YAG, ενώ η ανίχνευση του σήματος, μετά την ενίσχυση του, πραγματοποιείται με έναν MCT (HgCdTe, Mercury Cadmium Telluride, Graseby Infrared, D316, Newmarket, U.K.) ανιχνευτή. Ανάμεσα στο δείγμα και στον ανιχνευτή τοποθετήθηκε ένα φίλτρο παρεμβολής (Optical Coating Laboratory Inc. Santa Rosa, CA) με ανώτατο όριο απόκρισης τα 2.67 μm , για να μειώσει την ελεύθερη φασματική περιοχή από τα 2.67 ως 8 μm και να προστατέψει τον ανιχνευτή από την είσοδο της παλμικής ακτινοβολίας. Αυτό οδηγεί σε ένα φασματικό εύρος της τάξης των 3949.5 cm^{-1} , το οποίο ισοδυναμεί με έναν παράγοντα μείωσης της τάξης του 4 από την συνολική περιοχή των 15.798 cm^{-1} , η οποία προκύπτει από το μήκος κύματος εκπομπής του He-Ne *laser* αναφοράς (632.8nm).

Ο χρησιμοποιούμενος προενισχυτής διαθέτει δύο εξόδους: μια AC που παρέχει την επαγόμενη από το *laser* αλλαγή και μια DC που παρέχει το στατικό συμβολογράφημα. Μετά την ενίσχυση των δύο σημάτων αυτά ψηφοποιούνται από έναν 16-bit, 200kHz ADC (analog to digital) μετατροπέα. Ο συντονισμός των οργάνων πραγματοποιείται με την βοήθεια μιας ψηφιακής γεννήτριας παλμών (Quantum Composers, 9314T) που δίνει έναρξη κατά σειρά στα flashlamps, Q switch και στο φασματοφωτόμετρο. Η καταγραφή του σήματος αρχίζει πριν την εκπυρσοκρότηση του *laser*, ώστε τα πρώτα λαμβανόμενα σημεία να χρησιμοποιηθούν ως δείγμα αναφοράς. Ο controller συνδέεται με τον υπολογιστή, ο οποίος παρέχει τις εντολές για την θέση του καθρέπτη κατά την διάρκεια της μέτρησης.



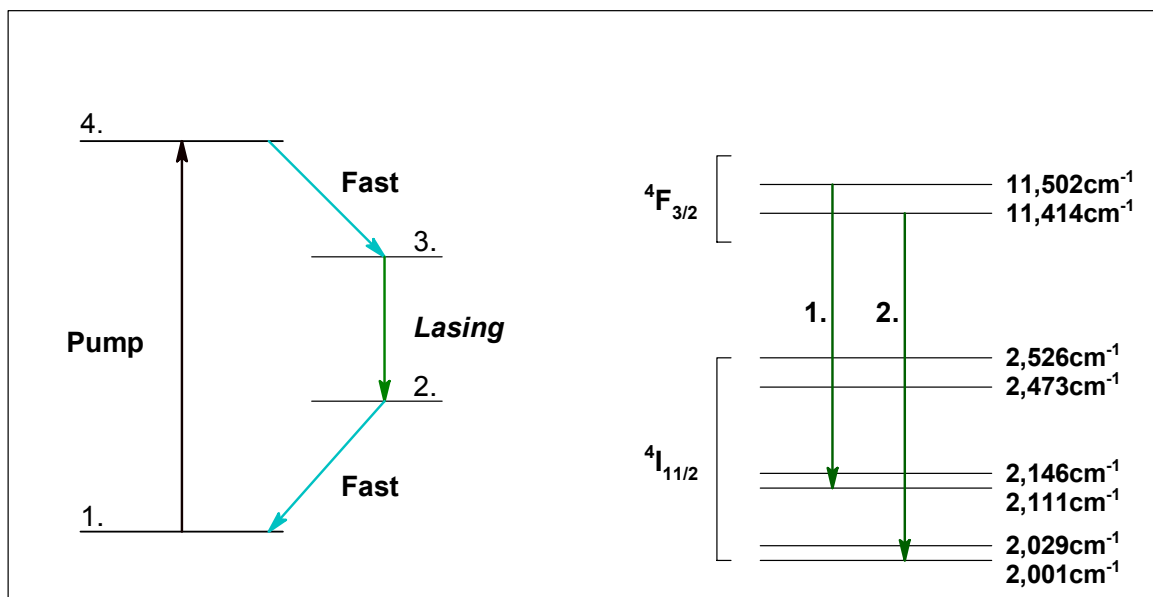
Σχήμα 2.6 : Time Resolved Step-Scan FTIR πειραματική διάταξη.

Nd : YAG laser

Για την έναρξη της αντίδρασης χρησιμοποιείται ένα παλμικό Minilite Nd : YAG *laser*. Πρόκειται για ένα *laser* τεσσάρων επιπέδων με την θεμελιώδη του συχνότητα στα 1064 nm. Η δράση του επάγεται σε ιόντα νεοδημίου (Nd^{3+}) σε μήτρα *Yttrium Aluminium Garnet* ($Y_3Al_5O_2$). Τα ιόντα νεοδημίου έχουν ηλεκτρονική διαμόρφωση : $Nd^{3+} : ..4d^{10} 4f^3 ds^2 5p^6$

Οι σημαντικοί για την δράση του *laser* προκύπτοντες φασματοσκοπικοί όροι είναι οι 4I ($J = 1\ 5/2, 1\ 3/2, 11\ /2, 9/2$) και 4F ($J = 9/2, 7/2, 5/2\ 3/2$).

Η δράση του *laser* περιλαμβάνει την μετάπτωση ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$ η οποία είναι διπλά απαγορευμένη. Λόγω της επίδρασης του κρυσταλλικού πεδίου η ${}^4I_{11/2}$ σχάζεται σε έξι καταστάσεις και η ${}^4F_{3/2}$ σε δύο. Έτσι προκύπτουν οκτώ πιθανές μεταβάσεις, από τις οποίες δύο συνεισφέρουν σημαντικά στο *laser*, στα 1.0648μm 1.0612μm.



Σχήμα 2.7 : Γενική περιγραφή των τεσσάρων επιπέδων laser, στα οποία ανήκει το Nd: YAG και ενεργειακή απεικόνιση των βασικών μεταβάσεων που προκαλούν την εκπομπή των 1064nm.

Το Nd : YAG laser χρησιμοποιεί άντληση με flashlamps, ενώ απεσταγμένο νερό κρύνει την λάμπα και το ενεργό μέρος. Τα άτομα νεοδημίου διεγείρονται και παραμένουν στο επίπεδο lasing για χρόνο της τάξης του ms, πριν αρχίσει η αυθόρμητη εκπομπή. Ο προκύπτων παλμός αν και χαρακτηρίζεται από μεγάλη ένταση είναι μικρής ισχύος. Για την παραγωγή συντομότερου και ισχυρότερου παλμού χρησιμοποιείται η τεχνική του *Q switching* που καθυστερεί την αυθόρμητη εκπομπή.

Ο ποιοτικός παράγοντας Q μιας κοιλότητας laser σχετίζεται με την ενέργεια E_c που αποθηκεύεται στην κοιλότητα και την ενέργεια E_t που διαφεύγει από αυτήν μέσω της σχέσης :

$$Q = \frac{2\pi\nu E_c t}{E_t} \quad (14)$$

Το *Q - switching* είναι μία λειτουργία κατά την οποία ο παράγοντας Q της κοιλότητας του laser μειώνεται για μία χρονική περίοδο, εμποδίζοντας την ακτινοβολία από το να αντανακλάται μεταξύ των καθρεπτών της κοιλότητας . Κατά την διάρκεια αυτού του χρόνου ο πληθυσμός του υψηλότερου επιπέδου αυξάνεται πολύ περισσότερο από ότι θα συνέβαινε αν ο Q παρέμενε υψηλός. Μετά ο Q αυξάνεται ραγδαία και ο κύκλος επαναλαμβάνεται με αποτέλεσμα στενούς παλμούς laser. Η διάρκεια του παλμού Δt συνδέεται με την ισχύ του μέσω της σχέσης :

$$P = \frac{E_p}{\Delta t} \quad (15)$$

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε η δεύτερη αρμονική συχνότητα του Nd : YAG *laser* στα 532 nm. Η παραγωγή της γίνεται με την χρήση ενός KTP κρυστάλλου. Κατά την διάρκεια του διπλασιασμού, δύο φωτόνια συχνότητας 1.064 nm εισέρχονται ταυτόχρονα στον κρύσταλλο με την ίδια κυκλική πόλωση. Τα δύο φωτόνια συνδυάζονται ενώ η ενέργεια και η ορμή του συστήματος διατηρούνται. Ως αποτέλεσμα το προκύπτον φωτόνιο έχει διπλάσια συχνότητα, ίδια ταχύτητα και κάθετη πόλωση. Ο διαχωρισμός της προκύπτουσας αρμονικής συχνότητας από τη θεμελιώδη πραγματοποιείται με την βοήθεια ενός ζεύγους διχροϊκών κρυστάλλων.

Η χρήση του Nd : YAG *laser* για την διέγερση του δείγματος στα πειράματα της παρούσας μελέτης έγινε με ρυθμό επανάληψης παλμών 3-7 Hz, με την διάρκεια του κάθε παλμού να φτάνει τα 7-10 ns και την μέση προσπίπτουσα στο δείγμα ισχύ τα 30 mW περίπου.

Ανιχνευτής Mercury Cadmium Telluride (HgCdTe)

Για την ανίχνευση του σήματος χρησιμοποιήθηκε ένας *Mercury Cadmium Telluride (HgCdTe)* ή αλλιώς MCT. Αποτελείται από ένα μείγμα των παραπάνω τριών στοιχείων και είναι ένας ημιαγωγός. Απορροφά τα υπέρυθρα φωτόνια με αποτέλεσμα την διέγερση ηλεκτρονίων σε αντιδεσμικά τροχιακά. Αυτά τα ηλεκτρόνια μπορούν να ανταποκριθούν σε εφαρμοζόμενο δυναμικό, με το παραγόμενο ρεύμα να είναι ανάλογο του αριθμού των απορροφούμενων φωτονίων.

Για την μεταπήδηση των ηλεκτρονίων σε υψηλότερα τροχιακά απαιτείται ένα ελάχιστο ποσό ενέργειας και φωτόνια με μικρότερη ενέργεια δεν μπορούν να ανιχνευθούν. Έτσι το κατώτερο όριο ανίχνευσης ορίζεται στους 600 cm^{-1} .

Για την λειτουργία του ανιχνευτή είναι απαραίτητη η ψύξη του με υγρό άζωτο λόγω της εκπεμπόμενης από τα στοιχεία του θερμότητας, που οδηγεί σε ηλεκτρικό θόρυβο. Ο MCT ανιχνευτής χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία και γρήγορη απόκριση αλλά σε περίπτωση πρόσπτωσης ακτινοβολίας πολύ μεγάλης έντασης κινδυνεύει από φαινόμενα κορεσμού.

2.2.3 Πηγές θορύβου

Σημαντικό πλεονέκτημα της τεχνικής αποτελεί το μεγάλο φασματικό εύρος ενώ η χρονική της διακριτική ικανότητα περιορίζεται μόνο από το όριο απόκρισης του ανιχνευτή και τα χρησιμοποιούμενα ηλεκτρονικά, κυρίως τον AD converter. Η περιγραφή της διαδικασίας πραγματοποίησης ενός Time Resolved Step Scan FTIR πειράματος έγινε θεωρώντας πως η αντίδραση του δείγματος μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές με πανομοιότυπο τρόπο, παράγοντας ακριβώς τις ίδιες φασματικές αλλαγές κάθε φορά. Όμως διακυμάνσεις του παλμού του *laser* μπορούν να δημιουργήσουν διαφορές στις επαναλήψεις της αντίδρασης, ώστε διαφορετικό ποσοστό του δείγματος να αντιδράσει ή να αλλάξει η θερμοκρασία του.

Επιπλέον αν και η θέση του κινητού καθρέπτη ελέγχεται μέσω του *laser* He-Ne, μπορούν να υπάρξουν διακυμάνσεις στην σταθερότητα του οι οποίες ποικίλλουν σε κάθε πειραματική διάταξη. Αποτέλεσμα αυτών των διακυμάνσεων είναι η εισαγωγή λάθους στην απόσταση των σημείων καταγραφής του φάσματος και διακυμάνσεις της υπέρυθρης ακτινοβολίας, και επομένως την δημιουργία θορύβου στα λαμβανόμενα φάσματα.

Πηγή θορύβου μπορεί να αποδειχθεί και η μη γραμμική απόκριση του ανιχνευτή, όπως συμβαίνει και στα στατικά φάσματα. Σε μια τέτοια περίπτωση μπορεί να παρατηρηθεί μετατόπιση της *baseline* και αλλαγές των εντάσεων των κορυφών.

Συνεπώς κατά την εκτέλεση χρονοεξαρτούμενων πειραμάτων όλες οι παραπάνω πηγές θορύβου πρέπει να παρακολουθούνται και να επιδιώκεται η ελαχιστοποίηση τους. Για καλύτερη ποιότητα φασμάτων η εκτέλεση των πειραμάτων θα πρέπει να πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας και ηχητικής απομόνωσης.

2.3 Μελέτη πρωτεϊνικών συστημάτων με την φασματοσκοπία υπερύθρου

Η φασματοσκοπία υπερύθρου βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην μελέτη πρωτεϊνικών συστημάτων. Ειδικά με την ανάπτυξη των χρονοεξαρτούμενων μεθόδων μπορεί να προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες τόσο για τα δομικά όσο και για τα λειτουργικά χαρακτηριστικά τους. Για παράδειγμα μπορούν να μελετηθούν φαινόμενα πρωτεϊνικής αναδίπλωσης και να διερευνηθεί η δευτεροταγής δομή, καθώς είναι δυνατός και ο προσδιορισμός της δομής ενδιάμεσων των καταλυτικών κύκλων και η μελέτη της κινητικής των ενζύμων. Ακόμη είναι εφικτή η μελέτη φαινομένων που σχετίζονται με αλλαγές του pH ή pD ώστε να εκτιμηθεί ο ρόλος τους στην φυσιολογική δράση των ενζύμων και στον μηχανισμό λειτουργίας τους.

Η κύρια δυσκολία στην μελέτη βιολογικών συστημάτων με την φασματοσκοπία υπερύθρου είναι η έντονη απορρόφηση του νερού που συχνά επικαλύπτει τις χαρακτηριστικές απορροφήσεις των πρωτεϊνών. Μερική αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος αποτελεί η μελέτη σε δευτεριομένο νερό.

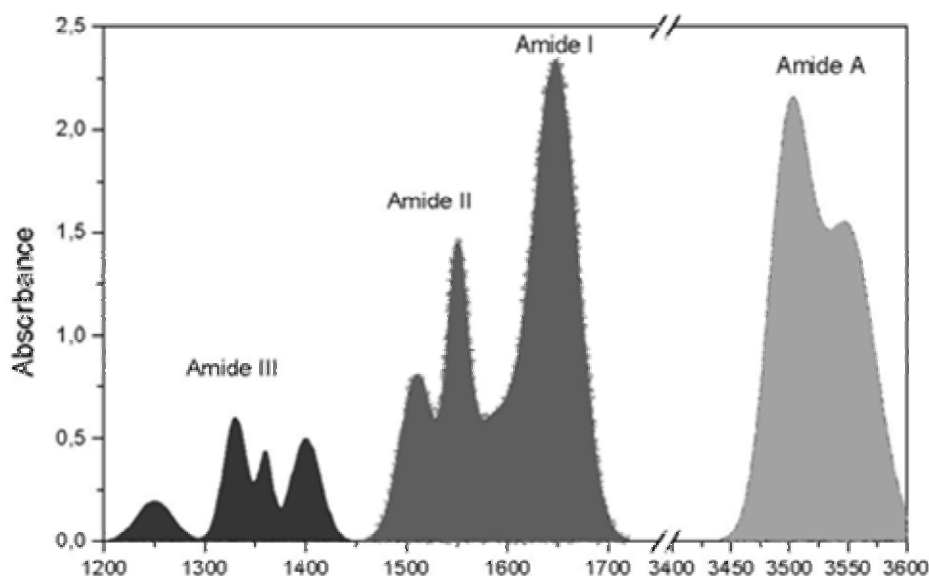
Οι κυριότερες κοινές κορυφές των πρωτεϊνών σε ένα FTIR φάσμα ονομάζονται *amide I*, *I* και *III* και σχετίζονται με δονήσεις των πεπτιδικών δεσμών. Αυτές οι ταινίες απορρόφησης είναι αρκετά ευρείες καθώς η κάθε πρωτεΐνη έχει δευτεροταγή δομή που ποικίλει από περιοχή σε περιοχή. Ο πίνακας I συνοψίζει αυτές της απορροφήσεις

<i>Ταινία</i>	<i>Κυματάρθρωμοι (σε H₂O)</i>	<i>Δονήσεις</i>
<i>Amide A</i>	3520-3300	Έκτασης N-H , (σε συντονισμό με αρμονική της Amide II)
<i>Amide I</i>	1600-1700	Έκτασης C=O (με σύζευξη με τις δονήσεις έκτασης CN, κάμψης NH)
<i>Amide II</i>	1550	Κάμψης N-H (σύζευξη με δόνηση έκτασης CN)
<i>Amide III</i>	1230-1330	Κάμψης N-H και έκτασης CN
<i>Amide IV</i>	625-767	Κάμψης OCN
<i>Amide VI</i>	640-800	Εκτός επιπέδου κάμψης N-H
<i>Amide VIII</i>	~200	Στρέψης σκελετού

Πίνακας 2.1 : Οι κυριότερες απορροφήσεις υπερύθρου των πρωτεϊνών και οι δονήσεις στις οποίες αποδίδονται.

Η ισχυρότερη από αυτές είναι η *amide I* που εμφανίζεται στην περιοχή από 1600 cm^{-1} - 1700 cm^{-1} . Πρόκειται για μια αρκετά ευρεία κορυφή με το μέγιστο της συνήθως να εντοπίζεται ανάμεσα στους 1654 cm^{-1} - 1674 cm^{-1} . Αποδίδεται κυρίως στην δόνηση έκτασης της ομάδας C=O των πεπτιδικών δεσμών, με μικρή σύζευξη με τις δονήσεις των ομάδων CN, NH και CCN. Η *amide I* ταινία περιέχει πολλές κορυφές που αναλογούν σε διαφορετικές πρωτεϊνικές διαμορφώσεις. Οι συχνότητες στις οποίες εμφανίζονται έχουν συσχετιστεί με συγκεκριμένες δευτεροταγείς δομές. Οι δονήσεις στην περιοχή 1620 cm^{-1} - 1635 cm^{-1} παραπέμπουν σε δομή β-πτυχωτής, στην περιοχή 1649 cm^{-1} - 1658 cm^{-1} σε α έλικα ενώ από 1665 cm^{-1} ως 1690 cm^{-1} σε β στροφή. Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτός ο διαχωρισμός αποτελεί μια γενική κατηγοριοποίηση από την οποία συχνά παρατηρούνται αποκλίσεις.

Η *amide II* ταινία προκύπτει από δόνησης κάμψης της ομάδας NH, η οποία εμφανίζει σύζευξη με την δόνηση έκτασης της ομάδας CN. Συναντάται στην περιοχή των 1550 cm^{-1} και μετατοπίζεται κατά δέκα περίπου κυματάριθμους χαμηλότερα όταν χρησιμοποιηθεί D₂O. Η *amide III* ταινία εμφανίζεται σε ακόμη χαμηλότερες συχνότητες (1220 cm^{-1} - 1330 cm^{-1}) και αποδίδεται σε συνδυασμό της δόνησης κάμψης της ομάδας NH και της δόνησης έκτασης της ομάδας CN. Και αυτές οι δονήσεις εμφανίζουν ευαισθησία στις διαφορές της δευτεροταγούς δομής.



Σχήμα 2.8 : Οι κυριότερες απορροφήσεις την πολυπεπτιδικής αλυσίδας

Οι συχνότητες των δονήσεων των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων ποικίλουν και συχνά επικαλύπτονται από τις *amide* ταινίες. Έτσι η ανίχνευση τους καθίσταται δύσκολη, αν και με την λήψη φασμάτων διαφοράς είναι συχνά εφικτή. Για παράδειγμα οι δονήσεις της καρβονυλικών ομάδων των πολικών αμινοξέων Ασπαρτικού και Γλουταμινικού στην πρωτονομένη τους μορφή, εμφανίζονται στην περιοχή των 1760 cm^{-1} . Ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου με γειτονικές ομάδες μετατοπίζει αυτές τις συχνότητες αρκετά χαμηλότερα στους 1690cm^{-1} - 1740cm^{-1} περίπου. Οι καρβοξυλικές ομάδες των αποπρωτονομένων μορφών εμφανίζονται χαμηλότερα στις περιοχές 1546 cm^{-1} - 1620 cm^{-1} (ασύμμετρες δονήσεις) και 1300cm^{-1} - 1450cm^{-1} (συμμετρικές δονήσεις). Η εμφάνιση σημάτων με θετικές και αρνητικές κορυφές στις παραπάνω περιοχές συχνότητων, σε φάσματα που λαμβάνονται μετά από διατάραξη του συστήματος, αποτελεί ισχυρή ένδειξη για αλλαγές στην κατάσταση πρωτονίωσης των αντίστοιχων αμινοξέων και αλλαγές της ισχύος των δεσμών υδρογόνων.

Στα φάσματα υπερύθρου των πρωτεϊνών συνεισφέρουν και οι προσθετικές ομάδες τους. Στην περίπτωση των αιμοπρωτεϊνών, όπως είναι και οι κυτοχρωμικές οξειδάσες, μόνο οι δονήσεις εκτός επιπέδου συμμετρίας A_{2u} και εντός επιπέδου E_u του πορφυρινικού δακτυλίου είναι IR ενεργές. Πολλές από τις δονήσεις των πλευρικών αιμικών ομάδων επικαλύπτονται από τις *amide* ταινίες και όπως και στην περίπτωση των αμινοξέων η ανίχνευση τους γίνεται ευκολότερη με την χρήση φασμάτων διαφοράς. Για παράδειγμα οι δονήσεις της καρβοξυλικής ομάδας των προπιονικών αλυσίδων εντοπίζονται στην περιοχή 1697 cm^{-1} - 1740 cm^{-1} (πρωτονομένη μορφή).

Τέλος χαρακτηριστικές είναι οι δονήσεις μικρών υποκαταστατών που δεσμεύονται στα μεταλλικά κέντρα των πρωτεϊνών (πχ. NO, CO, CN⁻). Η συχνότητα δόνησης του κάθε τέτοιου υποκαταστάτη εξαρτάται κυρίως από την ηλεκτρονική πυκνότητα του δεσμού που σχηματίζει με το μέταλλο. Συνεπώς επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως την φύση των άλλων υποκαταστατών του μετάλλου, την γωνία δέσμευσης, τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου και τις ηλεκτροστατικές επιδράσεις με γειτονικές ομάδες

Η φασματοσκοπία υπερύθρου, ιδίως στην χρονοεξαρτώμενη εφαρμογή της, αποτελεί μια μέθοδο μελέτης συνολικών αλλά τοπικών δομικών αλλαγών των πρωτεϊνών. Η δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης μπορεί να μελετηθεί με βάση την *amide I* ταινία, ενώ οι τοπικές αλλαγές μπορούν να διαπιστωθούν με την ανάλυση

σημάτων που προκύπτουν από τις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων, από τα οποία αυτά που περιέχουν καρβοξυλικές ομάδες παρέχουν συνήθως τις περισσότερες πληροφορίες. Οι δονήσεις μορίων που δεσμεύονται στην αίμη και σε άλλα μεταλλικά κέντρα των πρωτεϊνών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη των ενεργών κέντρων και την δυναμική των ενζύμων. Η φασματοσκοπία υπερύθρου αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο, που σε συνδυασμό με τεχνικές μεταλλάξεων και ισοτοπικής αντικατάστασης μπορεί να έχει μια πολύτιμη συνεισφορά στην μελέτη βιολογικών συστημάτων.

Βιβλιογραφία

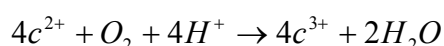
- ¹ Harris, D. C. and Bertolucci, M. D. *Symmetry and Spectroscopy-An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy*; Oxford University Press: New York, **1978**.
- ²Griffiths, P. R. , de Haseth, J. A. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*; Wiley and Sons: New York, **1986**.
- ³Demtroder W. *Laser Spectroscopy*, Springer - Verlag, Berlin, **1996**.
- ⁴ Rödiger, C. and Siebert, F. (1999), *Appl. Spectrosc.* **8**, 893-901.
- ⁵ Uhmann, W., Becker, A., Taran, C. and Siebert, F. (1991), *Appl. Spectrosc.* **45**, 390-397.
- ⁶ Plunkett, S. E., Chao, J. L., Tague, T. J. and Palmer. R. A. (1995), *Appl. Spectrosc.* **49**, 702-708.
- ⁷Manning, C. J. and Griffiths, P. R. (1997), *Appl. Spectrosc.* **51**, 1092-1101.

Κεφάλαιο III: FTIR και Time Resolved Step-Scan FTIR μελέτη της κυτοχρωμικής οξειδάσης ba_3 από τον οργανισμό *Thermus Thermophilus*.

**Κεφάλαιο III: FTIR και Time Resolved Step-Scan FTIR
μελέτη της κυτοχρωμικής οξειδάσης ba_3 από τον οργανισμό *Thermus
Thermophilus*.**

3.1 Εισαγωγή

Οι κυτοχρωμικές οξειδάσες αποτελούν μέλη της αναπνευστικής αλυσίδας των αερόβιων οργανισμών και λειτουργούν σαν μοριακοί μηχανισμοί χρησιμοποιώντας την ενέργεια που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια του καταλυτικού τους κύκλου για την άντληση πρωτονίων διαμέσου της μιτοχονδριακής μεμβράνης, ενάντια στην διαβάθμιση της συγκέντρωσης τους. Η αντίδραση την οποία καταλύουν μπορεί να περιγράψει σύμφωνα με το γενικό σχήμα:

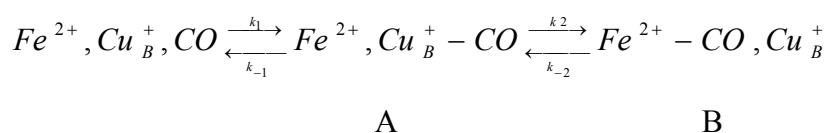


όπου με c^{2+} και c^{3+} παριστάνεται η ανηγμένη και οξειδωμένη μορφή του κυτοχρώματος c αντίστοιχα^{1,2}. Πρόκειται για την τελευταία αντίδραση της αναπνευστικής αλυσίδας, η οποία παρέχει το μεγαλύτερο μέρος της απαιτούμενης ελεύθερης ενέργειας στους αερόβιους οργανισμούς, συζευγνύοντας την μεταφορά ηλεκτρονίων με την βιοσύνθεση της τριφωσφορικής αδενοσύνης (ATP).

Ο θερμόφιλος οργανισμός *Thermus Thermophilus* εκφράζει δύο τύπους κυτοχρωμικών οξειδάσων: τις ba_3 και caa_3 κυτοχρωμικές οξειδάσες. Το κυτόχρωμα ba_3 αποτελείται από τρεις μόνο υπομονάδες. Η κύρια υπομονάδα I περιέχει μια αίμη τύπου b και ένα διπυρηνικό κέντρο αποτελούμενο από ένα άτομο Cu_B και μια αίμη τύπου a_3 , η οποία διαφέρει από τις αίμες τύπου a άλλων οξειδάσων ως προς μια πλευρική της αλυσίδα. Πιο συγκεκριμένα στην θέση της υδροξυ-αιθυλ-φαρνεσουλκικής ομάδας που συναντάται σε άλλες οξειδάσες περιέχει μια υδροξυ-αίθυλ-γερανυλ-γερανυλική ομάδα, η οποία φτάνει ως την κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης, χωρίς να αναμιγνύεται με τις διαδρομές των πρωτονίων^{3,4}. Η υπομονάδα II περιέχει ένα μικτού σθένους ($Cu_A^{1.5+} - Cu_A^{1.5+}$) ομοπυρηνικό κέντρο ατόμων χαλκού^{3,4}, ενώ η τρίτη υπομονάδα δεν περιέχει κανένα οξειδοαναγωγικό κέντρο. Σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή το ενεργό κέντρο του κυτοχρώματος ba_3 είναι παρόμοιο με αυτό της *bovine heart aa_3* οξειδάσης^{5,6,7} και της αντίστοιχης του οργανισμού *P. denitrificans*^{8,9}. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι το κυτόχρωμα ba_3 έχει την ικανότητα να ανάγει το μονοξείδιο του αζώτου (NO) σε οξείδιο του διαζώτου (N_2O)¹⁰, παράλληλα με την ικανότητα αναγωγής του οξυγόνου σε νερό και της άντλησης πρωτονίων, έστω και με την σχετικά μικρή αποτελεσματικότητα των $0.5 H^+/e^-$ ¹¹.

Για την μελέτη της λειτουργίας και δυναμικής των κυτοχρωμικών οξειδασών έχουν χρησιμοποιηθεί πλήθος φασματοσκοπικών μεθόδων όπως UV-Vis, FTIR, και Raman φασματοσκοπία, MCD, CD, EPR, EXAFS, ENDOR και άλλες τεχνικές. Η κοινή δυσκολία για την διεξαγωγή αυτών των μελετών εντοπίζεται στην πολύ γρήγορη αντίδραση του ενζύμου με το φυσιολογικό υπόστρωμα, το μοριακό οξυγόνο, η οποία ολοκληρώνεται σε χρονικό διάστημα λίγων ms. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται συνήθως ένας probe υποκαταστάτης όπως το μονοξείδιο του άνθρακα. Το CO μπορεί να δεσμευτεί στην αίμη υψηλού σπιν αυτών των ενζύμων, η οποία αποτελεί και το σημείο δέσμευσης του O₂, και να φωτολυθεί με υψηλή κβαντική απόδοση. Έτσι το σύμπλοκο ανηγμένου ενζύμου-CO χρησιμοποιείται είτε για την έναρξη της αντίδρασης με το οξυγόνο είτε για την μελέτη της δυναμικής των ενζύμων και της κινητικής των ενεργών τους κέντρων.

Η δέσμευση των εξωγενών υποκαταστατών στις κυτοχρωμικές οξειδάσες πραγματοποιείται στην υπομονάδα I του ενζύμου, η οποία περιέχει τρία τουλάχιστον οξειδοαναγωγικά κέντρα με διαφορετικό περιβάλλον συναρμογής το καθένα^{3,5,9,12,13}. Ο Cu_B της κυτοχρωμικής οξειδάσης ba_3 συναρμόζεται με τρία ιστιδινικά κατάλοιπα και η αίμη χαμηλού σπιν b έχει ως αξονικούς υποκαταστάτες δύο ιστιδίνες. Ο σίδηρος της αίμης a_3 έχει αριθμό συναρμογής πέντε και είναι υψηλού σπιν, τόσο στην οξειδωμένη (S=5/2) όσο και στην ανηγμένη (S=2) μορφή του ενζύμου¹⁴. Επίσης στο οξειδωμένο ένζυμο παρατηρείται μαγνητική σύζευξη αυτού του μεταλλικού κέντρου και του Cu_B, με αποτέλεσμα ο χαλκός να μην ανιχνεύεται με την φασματοσκοπία EPR. Η δέσμευση του CO στον $Fe_{a_3}^{2+}$ οδηγεί σε σύμπλοκο χαμηλού σπιν (S=0) και ακολουθεί μοριακό μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν που έχει βρεθεί και για άλλες οξειδάσες^{15,16,17}:



όπου k_1 και k_{-1} είναι η αντιστρεπτή δέσμευση του CO στον χαλκό και k_2 η πρώτης τάξης μεταφορά του CO από τον χαλκό στον αιμικό σίδηρο^{14,16,18,19}.

Δηλαδή το CO δεσμεύεται αρχικά στον χαλκό και έπειτα μεταφέρεται ενδομοριακά στον σίδηρο της αίμης a_3 . Επομένως η διαδικασία της δέσμευσης του

μονοξειδίου του άνθρακα στο ενεργό κέντρο των κυτοχρωμικών οξειδασών μπορεί να περιγραφεί με την συνύπαρξη δύο χημικών ισοροπιών.

Η δέσμευση στο κυτόχρωμα ba_3 έχει κάποια μοναδικά χαρακτηριστικά λόγω της μεγάλης συγγένειας του Cu_B για το CO ($K > 10^4 M^{-1}$)²⁰ και της αργής μεταφοράς του CO στον αιμικό σίδηρο. Η σταθερά ταχύτητας k_{-2} , για την δεσμευμένη με CO ανηγμένη μορφή του ενζύμου, έχει βρεθεί σημαντικά μεγαλύτερη²¹ ($0.8 s^{-1}$) από αυτή του ανηγμένου *bovine* ενζύμου²². Η συνολική συγγένεια του ενζύμου για το μονοξείδιο του άνθρακα υπολογίζεται σαράντα περίπου φορές μικρότερη από αυτή του *bovine* ενζύμου, καθώς η ενδομοριακή μεταφορά από τον χαλκό στον σίδηρο φαίνεται να είναι θερμοδυναμικά λιγότερο ευνοϊκή²¹.

Για την μελέτη της φωτοδιάσπασης του CO από την αίμη του ενεργού κέντρου των κυτοχρωμικών οξειδασών και την ανίχνευση της προκύπτουσας ενδιάμεσης κατάστασης έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές φασματοσκοπικές μέθοδοι. Το κυτόχρωμα ba_3 αποτελεί ένα ιδανικό σύστημα για την διεξαγωγή τέτοιων μελετών, λόγω της μεγάλης συγγένειας του Cu_B για το CO και της σχετικά αργής κινητικής που εμφανίζει σε θερμοκρασία δωματίου. Ταυτόχρονα η ισχυρή απορρόφηση υπερύθρου που εμφανίζει το μονοξείδιο του άνθρακα και οι δυνατότητες διεξαγωγής χρονοεξαρτώμενων πειραμάτων με την χρήση της τεχνικής Time Resolved Step-Scan FTIR με μεγάλη χρονική ανάλυση και ευαισθησία, καθιστούν την φασματοσκοπία υπερύθρου μια ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδο για την μελέτη του συστήματος. Με τον τρόπο αυτό είναι εφικτή η λεπτομερής μελέτη της φωτοδυναμικής του συμπλόκου ενζύμου-CO, καθώς είναι δυνατή η ανίχνευση ακόμη και της κίνησης ενός μεμονωμένου αμινοξικού καταλοίπου.

Καθώς το ενεργό κέντρο των κυτοχρωμικών οξειδασών εντοπίζεται στο εσωτερικό των πρωτεϊνών, για την δέσμευση του οξυγόνου και την απομάκρυνση των προϊόντων της αναγωγής του αλλά και την άντληση των πρωτονίων απαιτείται η ύπαρξη καναλιών για την μεταφορά τους. Σύμφωνα με τις γνωστές κρυσταλλικές δομές αρκετών ενζύμων της οικογένειας των κυτοχρωμικών οξειδασών έχουν προταθεί πολλές πιθανές διαδρομές πρωτονιακής μεταφοράς. Οι υψηλότερα διατηρούμενες από αυτές αντιστοιχούν στα ονομαζόμενα κανάλια K και D ^{3,5,7,8,9}.

Αυτά τα μονοπάτια, αν και τροποποιημένα συναντώνται και στο κυτόχρωμα ba_3 , για το οποίο έχει παρατηρηθεί και ένα επιπλέον μοναδικό κανάλι³. Αυτό το κανάλι ονομάζεται Q και ξεκινά από την κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης, και μέσω των προπιονικών ομάδων της αίμης α_3 και των καταλοίπων His384, Asn366

και Asp372 καταλήγει σε μια περιοχή συσσώρευσης μορίων νερού. Αν και αυτή η διαδρομή δεν έχει παρατηρηθεί σε άλλο μέλος των κυτοχρωμικών οξειδασών τα παραπάνω κατάλοιπα διατηρούνται, όπως και η περιοχή αποθεματοποίησης μορίων ύδατος, η οποία εντοπίζεται πάνω από τις προπιονικές ομάδες της αίμης a_3 . Η συμμετοχή αυτής της περιοχής στην μετακίνηση των πρωτονίων έχει αποδειχθεί με πειράματα μεταλλάξεων²³.

Οι καρβοξυλικές πλευρικές αλυσίδες των πρωτεϊνικών καταλοίπων είναι οι πιθανότεροι υποψήφιοι για την μεταφορά πρωτονίων. Η κατανόηση των δομικών μεταβολών που σχετίζονται με φαινόμενα πρωτονίωσης/αποπρωτονίωσης ευαίσθητων αμινοξικών καταλοίπων είναι απαραίτητη, καθώς τέτοιες ομάδες με ικανότητα ιονισμού και τιμές pK_a κοντά στις φυσιολογικές τιμές pH συμμετέχουν στην δέσμευση και απελευθέρωση των πρωτονίων. Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί προς αυτή την κατεύθυνση, οι οποίες με την χρήση ηλεκτροχημικών και φασματοσκοπικών τεχνικών έχουν διερευνήσει τον ρόλο τέτοιων πρωτεϊνικών καταλοίπων, όπως για παράδειγμα του Glu278^{24,25,26} (η αρίθμηση αναφέρεται στο *P. dentitrificans*). Αυτό κατάλοιπο το οποίο συμμετέχει στην διαμόρφωση του D καναλιού, στο κυτόχρωμα ba_3 αντικαθίσταται από Ile³.

Σε αυτή την εργασία έχουμε μελετήσει το δεσμευμένο με CO κυτόχρωμα ba_3 και το προϊόν της φωτόλυσης του με την φασματοσκοπία FTIR και Time Resolved Step-Scan FTIR. Τα φάσματα συνεχούς φωτόλυσης δίνουν σημαντικές πληροφορίες για την δομή του προϊόντος φωτόλυσης, ενώ η μελέτη της δυναμικής της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με την βοήθεια των χρονοεξααρτώμενων πειραμάτων, τα οποία αποκαλύπτουν μια σχετικά αργή κινητική συμπεριφορά του ενζύμου, ερχόμενα σε συμφωνία με δημοσιευμένες μελέτες¹⁵. Ταυτόχρονα είναι δυνατή η παρακολούθηση των μεταβατικών δομικών αλλαγών της πρωτεΐνης που αποκαλύπτει την αναδιοργάνωση των προπιονικών ομάδων της αίμης και γειτονικού ασπαρτικού κατάλοιπου D372. Αυτές οι ομάδες συμμετέχουν στην διαμόρφωση του Q καναλιού και η παρατήρηση των κινήσεών τους παρέχει πληροφορίες οι οποίες βοηθούν στην κατανόηση της μεταφοράς των πρωτονίων μέσω αυτών των ομάδων

3.2 Πειραματικό μέρος.

Το κυτόχρωμα ba_3 απομονώθηκε από κύτταρα του βακτηρίου *Thermus Thermophilus* HB8 σύμφωνα με ήδη δημοσιευμένες διαδικασίες²⁷, ενώ ως την εκτέλεση των πειραμάτων διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία υγρού αζώτου. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις FTIR μετρήσεις είχαν μια συγκέντρωση της τάξης του 1mM και ήταν τοποθετημένα σε διάλυμα TRIS 50mM, στο οποίο είχε ρυθμιστεί το pH. Τα pD δείγματα παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα D₂O και μετρήθηκαν με την χρήση ενός πεχάμετρου σύμφωνα με τον τύπο $pD = pH + 0.4$. Η αναγωγή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την χρήση sodium dithionate (Na₂S₂O₄) και για την παραγωγή του συμπλόκου του ενζύμου με το μονοξείδιο του άνθρακα εκτέθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες σε πίεση 1atm CO (1mM). Έπειτα τα δείγματα μεταφέρθηκαν αεροστεγώς σε μια ερμητικά κλειστή κυψελίδα FTIR αποτελούμενη από δύο παράθυρα CaF₂. Το αέριο CO(99%) αποκτήθηκε από την Messer (Γερμανία).

Ως πηγή φωτόλυσης χρησιμοποιήθηκε ένα Continuum Minilite Nd:YAG *laser* (7-10ns πλάτος, 3Hz, 4mJ/παλμός) και ένα *laser* διόδου (416nm) με μέγιστη ισχύ 15mWatt. Το πρώτο *laser* χρησιμοποιήθηκε για την φωτόλυση του δείγματος στην λήψη των χρονοεξαρτώμενων φασμάτων διαφοράς και το δεύτερο στην λήψη των φασμάτων συνεχούς φωτόλυσης. Οι FTIR μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με ένα φασματοφωτόμετρο BRUCKER Equinox IFS55 εξοπλισμένο με την επιλογή για Time Resolved Step-Scan μετρήσεις και εφοδιασμένο με ένα MCT (Mercury Cadmium Tellurium, Graseby Infrared D316) ανιχνευτή με κατώτερο όριο ανίχνευσης στους 600cm⁻¹. Η πειραματική διάταξη και όλη η διαδικασία συγχρονισμού του Nd:YAG *laser* με την υπέρυθρη IR δέσμη ανίχνευσης και για την απόκτηση των Time Resolved Step-Scan φασμάτων καθώς και ο τρόπος πραγματοποίησης μιας τέτοιας μέτρησης περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο II.

Τα πειράματα επαναλήφθηκαν πολλές φορές με την χρήση διαφορετικών δειγμάτων για την διαπίστωση της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Τα απόλυτα φάσματα ελήφθησαν με φασματική ανάλυση 2cm⁻¹ και τα φάσματα συνεχούς φωτόλυσης με φασματική ανάλυση 4cm⁻¹. Κάθε τέτοιο φάσμα αποτελεί τον μέσο όρο τουλάχιστον 40 ανεξάρτητων φασμάτων και συνολικά 4,000 συμβολογραφημάτων. Η φασματική ανάλυση των χρονοεξαρτώμενων φασμάτων ήταν 8cm⁻¹ και η χρονική ανάλυση 5μs ή 100μs. Για κάθε μέτρηση απαιτείται χρόνος συλλογής των δεδομένων 62min και σε κάθε περίπτωση λήφθηκε ο μέσος όρος

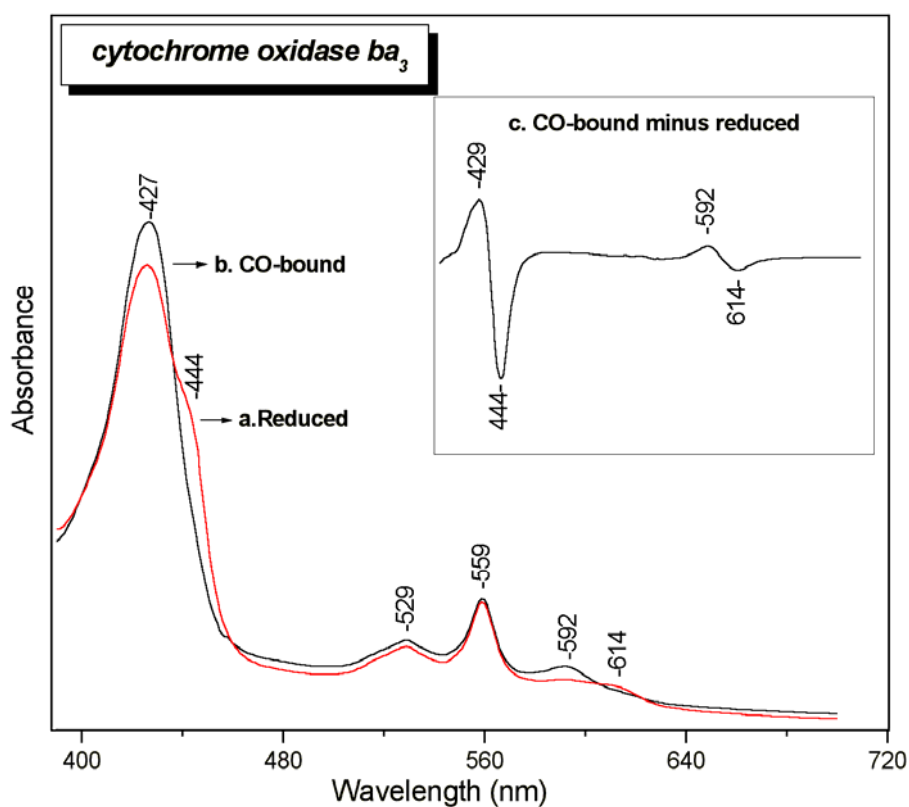
Κεφάλαιο III: FTIR και Time Resolved Step-Scan FTIR μελέτη της κυτοχρωμικής οξειδάσης ba_3 από τον οργανισμό *Thermus Thermophilus*.

τριών τέτοιων μετρήσεων, ώστε το κάθε φάσμα να αποτελεί μέσο όρο 30 ανεξάρτητων φασμάτων.

Τα οπτικά φάσματα ηλεκτρονικής απορρόφησης καταγράφηκαν με ένα φασματοφωτόμετρο ορατού – υπεριώδους Perkin Elmer Lamda 20 πριν και μετά από κάθε FTIR μέτρηση για την επιβεβαίωση του σχηματισμού και της σταθερότητας του συμπλόκου ba_3 -CO.

3.3 Αποτελέσματα

Στο φάσμα ορατού του ανηγμένου κυτοχρώματος ba_3 οι απορροφήσεις των δύο αιμικών κέντρων εμφανίζουν μερική αλληλοεπικάλυψη. Η *soret* απορρόφηση της αίμης b^{2+} εμφανίζεται στα 427 nm, ενώ η αντίστοιχη της α_3^{2+} εμφανίζεται με την μορφή ώμου στα 444 nm. Σε χαμηλότερα μήκη κύματος παρατηρούνται μέγιστα στα 559 nm και στα 614 nm, τα οποία οφείλονται κυρίως σε απορροφήσεις της αίμης b^{2+} και α_3^{2+} αντίστοιχα²⁹. Οι απορροφήσεις του κέντρου $Cu_A - Cu_A$ αναμένονται στα 480, 530 και 834 nm^{28,29} αλλά λόγω της ασθενούς τους έντασης επικαλύπτονται από τις ισχυρές απορροφήσεις των αιμών και δεν διακρίνονται.

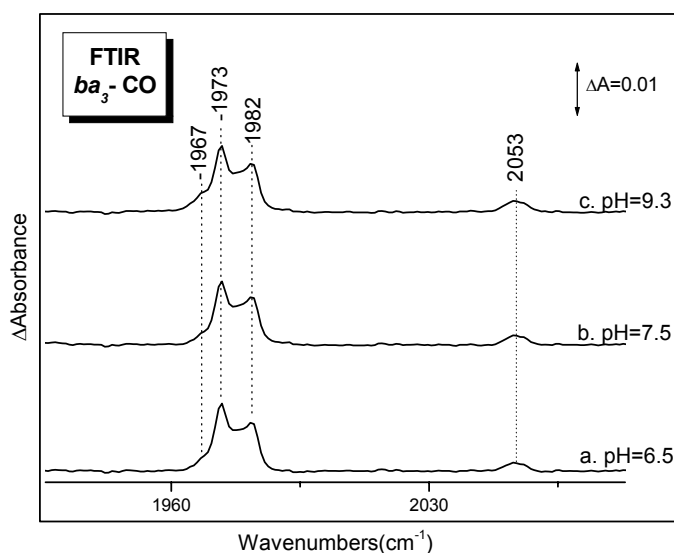


Σχήμα 3.1 : Φασματα οπτικής απορρόφησης του κυτοχρώματος ba_3 σε pH=7.5.

- Η ανηγμένη μορφή του ενζύμου
- Η δεσμευμένη με CO ανηγμένη μορφή του ενζύμου και
- Το φάσμα διαφοράς το οποίο προκύπτει από την αφαίρεση του a από το b και δηλώνει την συναρμογή του υποκαταστάτη στο διπυρηνικό κέντρο του κυτοχρώματος.

Η συναρμογή του CO στο διπυρηνικό κέντρο του ενζύμου μετατοπίζει την solet απορρόφηση της αίμης από τα 444 nm στα 427 nm περίπου και την ταινία των 614 nm στα 592 nm. Όπως είναι αναμενόμενο οι απορροφήσεις που οφείλονται στην αίμη b^{2+} δεν επηρεάζονται από την συναρμογή. Έτσι το οπτικό φάσμα του συμπλόκου εμφανίζει μια μόνο κορυφή στην solet περιοχή, στην οποία συνεισφέρουν και τα δύο αιμικά κέντρα. Το φάσμα διαφοράς του δεσμευμένου με CO μείον το αδέσμευτου ανηγμένου ενζύμου επιβεβαιώνει την συναρμογή του υποκαταστάτη στο διπυρηνικό κέντρο.

Το απόλυτο φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου του ανηγμένου κυτοχρώματος ba_3 με το μονοξείδιο του άνθρακα εμφανίζει χαρακτηριστικές απορροφήσεις στους 1967 cm^{-1} , 1973 cm^{-1} , 1982 cm^{-1} και 2053 cm^{-1} . Οι δονήσεις αυτές έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση με ^{13}C , παρουσιάζοντας μετατόπιση κατά 45 cm^{-1} περίπου¹⁵. Έτσι έχουν αποδοθεί στις δονήσεις τάσης του δεσμευμένου στο ένζυμο μονοξειδίου του άνθρακα. Οι ανιχνευόμενες κορυφές αντιστοιχούν στα δύο διαφορετικά σύμπλοκα A ($\text{Cu}_B^+ - \text{CO}$) και B ($\text{Fe}_{a_3}^{2+} - \text{CO}$), τα οποία βρίσκονται σε ισορροπία με $k_2=0.8\text{ s}^{-1}$. Η δόνηση στους 2053 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση του C=O του συμπλόκου A, δηλαδή του δεσμευμένου στον χαλκό υποκαταστάτη, ενώ οι άλλες τρεις δονήσεις αποδίδονται στο συμπλόκο B, όπου ο υποκαταστάτης είναι δεσμευμένος στον σίδηρο της αίμης a_3 .



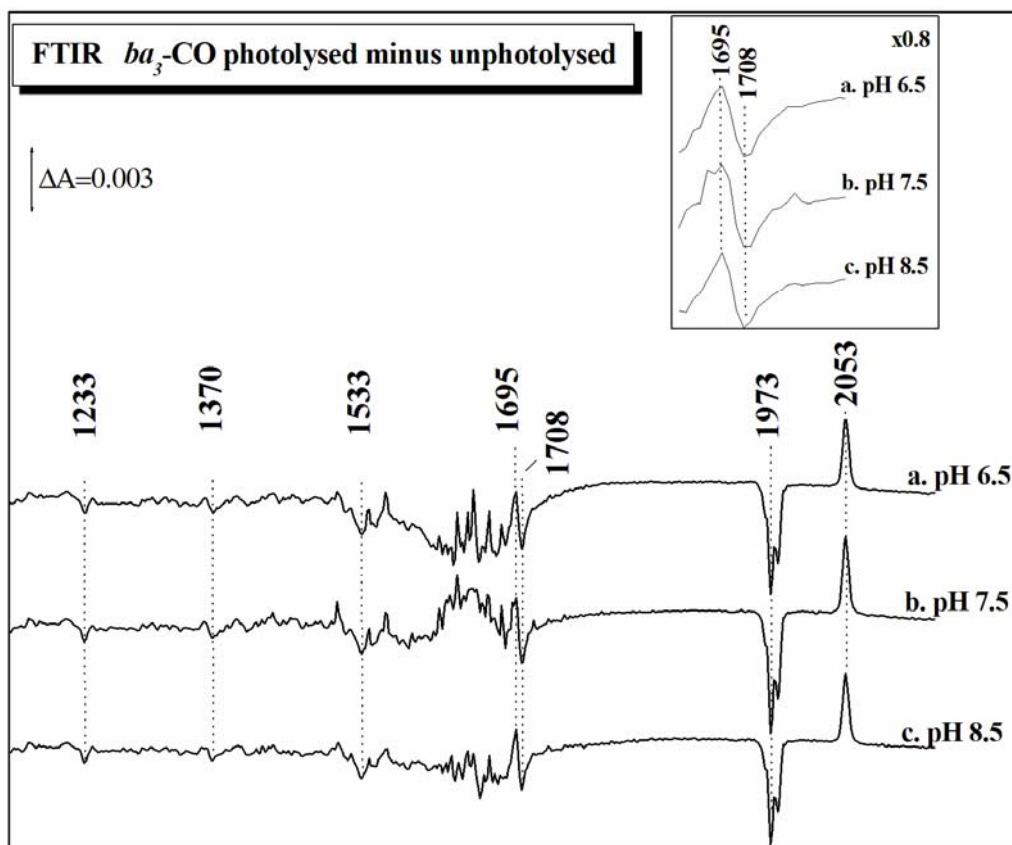
Σχήμα 3.2 : FTIR φάσματα του δεσμευμένου με CO συμπλόκου του ανηγμένου κυτοχρώματος ba_3 σε τιμές pH από 6.5 ως 9.3. Η συγκέντρωση του δείγματος ήταν 1mM, το μήκος της οπτικής διαδρομής 14 μm και η φασματική διακριτική ικανότητα 2 cm^{-1} .

Οι δονήσεις του CO, το οποίο είναι δεσμευμένο στο κυτόχρωμα ba_3 , εμφανίζονται σε μεγαλύτερες συχνότητες από τις αντίστοιχες συμπλόκων άλλων κυτοχρωμικών οξειδασών, ενώ η ύπαρξη τριών διαφορετικών συχνοτήτων που αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης του δεσμευμένου στον αιμικό σίδηρο CO παραπέμπει στην ύπαρξη τουλάχιστον τριών διαμορφώσεων του ένζυμου, που έχουν ως αποτέλεσμα την ενίσχυση ή εξασθένηση του δεσμού C=O. Στην περίπτωση των αιμοπρωτεϊνών έχουν παρατηρηθεί τρεις γενικές διαμορφώσεις των ενζύμων όπου η συσχέτιση των συχνοτήτων των δονήσεων Fe-CO και C-O παρουσιάζει διαφορετικά χαρακτηριστικά. Πιο συγκεκριμένα στην α μορφή κατατάσσονται διαμορφώσεις για τις οποίες οι συχνότητες $\nu(\text{Fe-CO})$ και $\nu(\text{C-O})$ βρίσκονται εκτός της καμπύλης συσχέτισης³⁰, ενώ στην β μορφή διαμορφώσεις στις οποίες οι προαναφερθέντες συχνότητες δόνησης βρίσκονται πάνω στην καμπύλη³⁰. Η γ μορφή αναφέρεται σε διαμορφώσεις στις οποίες ο Cu_B βρίσκεται πιο κοντά στην δεσμευμένη με CO αίμη, με αποτέλεσμα η ομάδα Fe-C-O να απομακρύνεται από την συμμετρία της α μορφής³¹. Η κορυφή του συμπλόκου τους 1967 cm^{-1} ομοιάζει με τις δονήσεις των συμπλόκων των οξειδασών *bovine*, *Rhodobacter Spheroides*, *aa3-600* και *P. denitrificans*^{28,30,31,32}, που έχουν αποδοθεί στην α μορφή, ενώ η κορυφή στους 1973 cm^{-1} εντοπίζεται μόλις δύο κυματάρια χαμηλότερα από την δόνηση β μορφής του *P. denitrificans*³¹. Τέλος η υψηλότερης συχνότητας δόνηση στους 1982 cm^{-1} , έχει αποδοθεί σε μια διαμόρφωση όπου ο χαλκός επιδρά με ισχυρό στερικό φαινόμενο πάνω στην δεσμευμένη με CO αίμη¹⁵. Αντίθετα η συχνότητα του δεσμευμένου στον χαλκό μονοξειδίου του άνθρακα δεν συμβαδίζει με καμία από τις γνωστές μορφές^{33,34} και επομένως μια παρόμοια ταξινόμηση δεν είναι εφικτή.

Η δόνηση του δεσμευμένου στον χαλκό CO εμφανίζει αρκετά μεγάλη ένταση, σε αντίθεση με άλλες οξειδάσες. Αυτή η διαφοροποίηση οφείλεται την μεγαλύτερη σταθερά ταχύτητας k_2 της οξειδάσης ba_3 σε σχέση με άλλα μέλη της ομάδας. Η μεταφορά του μονοξειδίου του άνθρακα από τον αιμικό σίδηρο στον χαλκό φαίνεται να είναι λιγότερο ευνοϊκή στο συγκεκριμένο ένζυμο με αποτέλεσμα ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό της αίμης a_3 , που φτάνει περίπου το 30%, να παραμένει αδέσμευτό. Έτσι το 30% του δεσμευμένου στο ένζυμο CO παραμένει στον Cu_B , γεγονός το οποίο επαληθεύεται και από τις σχετικές εντάσεις των κορυφών που αντιστοιχούν στις δύο

μορφές του δεσμευμένου υποκαταστάτη ($\frac{\Delta A(\text{Fe} - \text{CO})}{\Delta A(\text{Cu} - \text{CO})} \approx 4 : 1$ και $\frac{\epsilon_{\text{Fe-CO}}}{\epsilon_{\text{Cu-CO}}} \approx 1.5 : 1$).

Οι δονήσεις του μονοξειδίου του άνθρακα του συμπλόκου ba_3 -CO δεν παρουσιάζουν ευαισθησία στην αλλαγή του pH σε ένα αρκετά μεγάλο εύρος ή στην αντικατάσταση του νερού από δευτερωμένο διαλύτη. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα πως ο χαλκός βρίσκεται σε ένα σταθερό πρωτεϊνικό περιβάλλον, στο οποίο οι ιστιδινικοί υποκαταστάτες του δεν παρουσιάζουν φαινόμενα πρωτονίωσης/ αποπρωτονίωσης¹⁵.



Σχήμα 3.3 : FTIR φάσματα διαφοράς συνεχούς φωτόλυσης του δεσμευμένου με CO συμπλόκου του κυτοχρώματος ba_3 σε τιμές pH από 6.5 ως 8.5 Η φασματική διακριτική ικανότητα ήταν 4 cm^{-1} και το μήκος της οπτικής διαδρομής $14\mu\text{m}$. Το ποσοστό της φωτόλυσης ήταν περίπου 21%.

Φωτολύοντας το σύμπλοκο το CO αποσπάται από τον αιμικό σίδηρο και μεταφέρεται στον χαλκό. Το προκύπτον σύμπλοκο Cu_B -CO δημιουργείται σε χρονική κλίμακα της τάξης του ενός picosecond¹⁶. Το μονοξείδιο του άνθρακα παραμένει δεσμευμένο στον χαλκό για μερικά milliseconds και έπειτα επιστρέφει στον σίδηρο της αίμης a_3 . Η διαδικασία της επαναδέσμευσης ολοκληρώνεται μετά από 80ms περίπου. Στο σχήμα 3.3 παρουσιάζονται φάσματα διαφοράς ενός τέτοιου

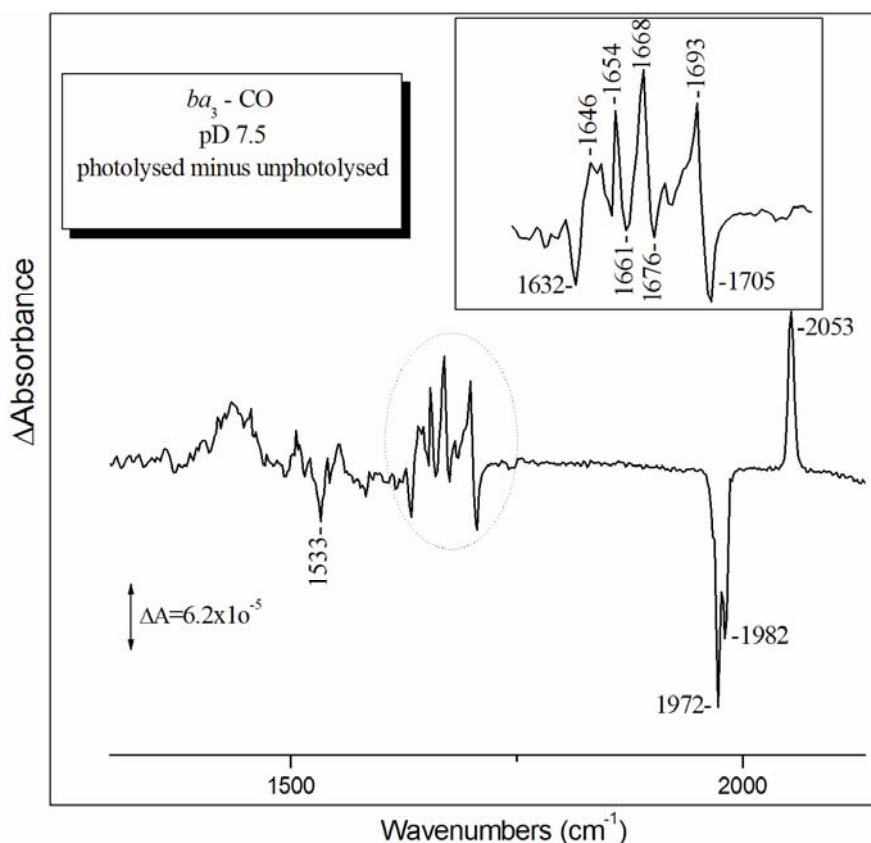
φωτολυόμενου συμπλόκου, μείον το φάσμα του αρχικού δείγματος σε διάφορα pH. Η φωτόλυση πραγματοποιήθηκε με ένα συνεχές *laser* διόδου 416 nm και φασματική διακριτική ικανότητα ήταν 4 cm^{-1} . Η συνεχής φωτόλυση του δείγματος δεν επιτρέπει την επαναδέσμευση του CO στον Fe_{a_3} και επομένως το φάσμα αντιστοιχεί σε μια στάσιμη κατάσταση του ενζύμου, όπου το 20% του υποκαταστάτη έχει φωτολυθεί. Σημειώνεται πως το CO που ήταν αρχικά δεσμευμένο στον χαλκό στο σύμπλοκο ισορροπίας δεν συμμετέχει στα παραπάνω φάσματα διαφοράς, καθώς κάτω από τις πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν δεν είναι φωτοευαίσθητο.

Οι κορυφές που παρουσιάζουν θετική απορρόφηση αντιστοιχούν στο προϊόν της φωτόλυσης, ενώ τα αρνητικά σήματα αντιστοιχούν σε δονήσεις του αρχικού συμπλόκου πριν την φωτόλυση. Στην περιοχή από 1970 cm^{-1} – 2060 cm^{-1} παρατηρείται μια θετική κορυφή στους 2053 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στην δόνηση τάσης του μονοξειδίου του άνθρακα, το οποίο έχει μεταναστεύσει στον χαλκό και μια τριπλή αρνητική κορυφή που εμφανίζει μέγιστα στους 1973 cm^{-1} , 1982 cm^{-1} και 1967 cm^{-1} . Αυτή η κορυφή αντιστοιχεί στο δεσμευμένο στον αιμικό σίδηρο υποκατάστατη του αρχικού συμπλόκου. Η συχνότητα της δόνησης του CO που δεσμεύεται στον χαλκό είναι ίδια με την αντίστοιχη του συμπλόκου ισορροπίας και συμφωνεί με άλλα πειράματα συνεχούς φωτόλυσης²². Επίσης οι παραπάνω δονήσεις δεν παρουσιάζουν ευαισθησία στην ανταλλαγή με δευτερωμένου νερό, παρόμοια με το σύμπλοκο ισορροπίας.

Η μετανάστευση του υποκαταστάτη CO από τον σίδηρο της αίμης a_3 στον Cu_B συνοδεύεται από αλλαγές της πρωτεϊνικής διαμόρφωσης με συνέπεια την αναδιοργάνωση και την μεταβολή των πολλών χαρακτηριστικών συχνοτήτων δόνησης των δομικών συστατικών της. Όμως η απόδοση των παρατηρούμενων κορυφών κάτω από τους 1700 cm^{-1} είναι ιδιαίτερα δύσκολη ένεκα των πολλών αλληλοεπικαλυπτόμενων σημάτων και της πολυπλοκότητας του συστήματος. Μια προσπάθεια για αντιστοίχιση των κορυφών σε συγκεκριμένες δονήσεις πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή και μπορεί να αποδειχθεί πλήρως μόνο με πειράματα ισοτοπικής αντικατάστασης και μεταλλάξεων. Παρόλα αυτά βασιζόμενοι σε ήδη δημοσιευμένες μελέτες μπορούμε να αποδώσουμε ορισμένες από τις προκύπτουσες κορυφές, διατηρώντας βέβαια ορισμένες επιφυλάξεις.

Στην φασματική περιοχή από τους 1610 cm^{-1} ως τους 1690 cm^{-1} αναμένονται δονήσεις της *amide I* ταινίας, οι οποίες προκύπτουν κυρίως από τις δονήσεις έκτασης της καρβονυλικής ομάδας των πεπτιδικών δεσμών της πρωτεΐνης. Οι δονήσεις αυτές

έχουν συνδεθεί με συγκεκριμένες διαμορφώσεις της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών^{35,36}. Στο φάσμα που λήφθηκε με διαλύτη νερό αυτή η περιοχή είναι ιδιαίτερα θορυβώδης, καθώς σε αυτές τις συχνότητες το νερό εμφανίζει ισχυρή απορρόφηση. Η αφαίρεση της συνεισφοράς του νερού στις παρατηρούμενες δονήσεις είναι ιδιαίτερα δύσκολη και μπορεί να οδηγήσει σε σφάλμα. Ένας ασφαλέστερος τρόπος μελέτης του συστήματος, όσον αφορά τις δονήσεις της *amide I* ταινίας αποτελεί το αντίστοιχο φάσμα στο οποίο το νερό έχει αντικατασταθεί με δευτεριωμένο διαλύτη.



Σχήμα 3.4 : FTIR φάσμα διαφοράς συνεχούς φωτόλυσης του δεσμευμένου με CO συμπλόκου του κυτοχρώματος ba_3 σε $pD=7.5$. Στο ένθετο παρουσιάζεται σε μεγέθυνση η περιοχή του φάσματος από τους $1600-1720\text{cm}^{-1}$ περίπου. Η φασματική διακριτική ικανότητα ήταν 4cm^{-1} και το μήκος της οπτικής διαδρομής $14\mu\text{m}$. Το ποσοστό της φωτόλυσης ήταν περίπου 21%.

Στο φάσμα διαφοράς του σχήματος 3.4 παρατηρούνται εμφανή ισχυρά αρνητικά σήματα στις συχνότητες 1632cm^{-1} , 1661cm^{-1} , 1676cm^{-1} και θετικά στους 1646cm^{-1} , 1654cm^{-1} , 1668cm^{-1} . Τα σήματα στους $1654/1661\text{cm}^{-1}$ βρίσκονται σε μια

περιοχή χαρακτηριστική της δευτεροταγούς δομής α -έλικας, ενώ οι δονήσεις στους $1632\text{cm}^{-1}/1646\text{cm}^{-1}$ είναι χαρακτηριστικές της δομής β -πτυχωτής των πρωτεϊνών και έχουν αναφερθεί και σε φάσματα διαφοράς του οξειδωμένου μείον του ανηγμένου ενζύμου²⁹.

Οι δονήσεις της ομάδας C=O των φορμυλικών ομάδων των αιμών αναμένονται στην περιοχή μεταξύ των 1606cm^{-1} και 1680cm^{-1} ανάλογα με τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζουν με γειτονικά αμινοξικά κατάλοιπα. Σε φάσματα συντονισμού Raman της κυτοχρωμικής οξειδάσης ba_3 από το βακτήριο *Thermus Thermophilus* οι δονήσεις $\nu(\text{C}=\text{O})$ των φορμυλικών ομάδων της αίμης a_3 έχουν παρατηρηθεί στους $1675/1676\text{cm}^{-1}$, για την οξειδωμένη μορφή του ενζύμου και στους $1671/1669\text{cm}^{-1}$ για την ανηγμένη μορφή³⁷. Επίσης σε φάσματα υπέρυθρου του οξειδωμένου μείον το ανηγμένου ένζυμου οι δονήσεις αυτές παρατηρήθηκαν στους 1676cm^{-1} (οξειδωμένη μορφή) και στους 1668cm^{-1} (ανηγμένη μορφή)²⁹. Οι συχνότητες αυτές συμπίπτουν με τις παρατηρούμενες στο φάσμα του σχήματος 3.4 και επομένως οι εν λόγω δονήσεις είναι υποψήφιες των δονήσεων έκτασης της καρβονυλικής ομάδας των φορμυλομάδων. Παρόλα αυτά δεν μπορεί να αποκλειστεί και η συνεισφορά δονήσεων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στις συγκεκριμένες δονήσεις.

Οι δονήσεις των πρωτονιωμένων προπιονικών ομάδων της αίμης εμφανίζονται στην περιοχή των $1665\text{cm}^{-1} - 1700\text{cm}^{-1}$ περίπου, ενώ οι συνεισφορές των ασύμμετρων και συμμετρικών δονήσεων της ομάδας C-O-O⁻ της αποπρωτονιομένης μορφής τους εντοπίζονται στους $1540\text{cm}^{-1}-1620\text{cm}^{-1}$ και $1330\text{cm}^{-1}-1420\text{cm}^{-1}$ αντίστοιχα. Για την κυτοχρωμική οξειδάση aa_3 του οργανισμού *P. denitrificans* η συνεισφορά των προπιονικών αιμικών ομάδων έχει εκτιμηθεί με πειράματα εκλεκτικής ισοτοπικής αντικατάστασης με ^{13}C ³⁸. Οι δονήσεις που αποδόθηκαν με τον τρόπο αυτό στην συγκεκριμένη ομάδα εντοπίζονται στους 1676cm^{-1} , όσον αφορά την πρωτονιωμένη μορφή της και στους 1570cm^{-1} και 1538cm^{-1} για την συμμετρική και την ασύμμετρη δόνηση της αποπρωτονιομένης μορφής αντίστοιχα.

Με βάση τα παραπάνω η δόνηση της ομάδας C=O των πρωτονιωμένων προπιονικών αιμικών αλυσίδων του κυτοχρώματος ba_3 έχει αποδοθεί σε σήματα που εμφανίζονται στους 1708cm^{-1} και 1965cm^{-1} ^{15,29}. Η ύπαρξη της χαμηλότερης συχνότητας, η οποία σημαίνει εξασθένιση της ισχύς του δεσμού C=O, μπορεί να εξηγηθεί με την δημιουργία ισχυρότερων δεσμών υδρογόνου με γειτονικά αμινοξέα.

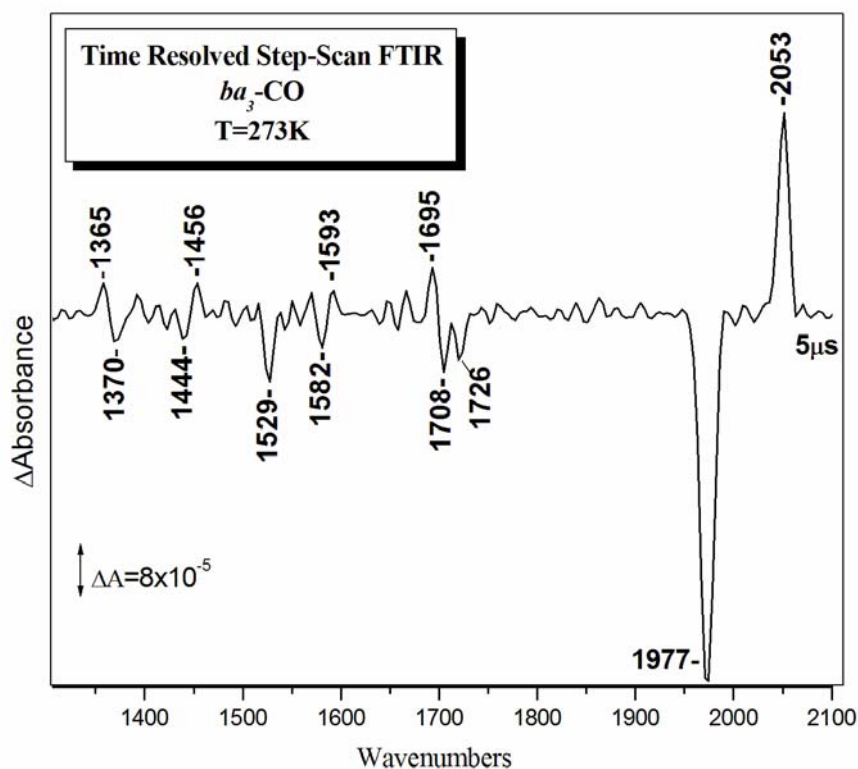
Ανάλογα η ασύμμετρη δόνηση της ομάδας C-O-O⁻ έχει αποδοθεί σε κορυφές στους 1570 cm^{-1} και 1528 cm^{-1} και η συμμετρική σε κορυφή που εντοπίζεται στους 1390 cm^{-1} σε φάσματα διαφοράς ανηγμένου/οξειδωμένου ενζύμου. Σε χρονοεξαρτώμενα πειράματα φωτόλυσης του συμπλόκου ba_3 -CO οι αντίστοιχες δονήσεις αναφέρονται στους 1529 cm^{-1} (ασύμμετρη δόνηση) και στους $1370/1390\text{ cm}^{-1}$ (συμμετρική δόνηση)³⁹. Η παρατήρηση και των δύο μορφών των προπιονικών ομάδων (ιονισμένης και μη) στην συγκεκριμένη μελέτη αναίρεσε την προηγούμενη θεώρηση πως στην κυτοχρωμική οξειδάση ba_3 οι προπιονικές αιμικές ομάδες είναι κυρίως πρωτονιωμένες. Στα φάσματα συνεχούς φωτόλυσης του σχήματος 3.3 οι κορυφές στους $1708/1965\text{ cm}^{-1}$ αποδίδονται στην πρωτονιομένη μορφή των προπιονικών ομάδων. Η δόνηση στους 1533 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί στην ασύμμετρη δόνηση ν(COO⁻) της αποπρωτονιομένης μορφής ενώ τα σήματα στους $1365/1370\text{ cm}^{-1}$ στην αντίστοιχη συμμετρική δόνηση.

Η απόδοση των δονήσεων πλευρικών αλυσίδων συγκεκριμένων αμινοξέων καθίσταται ακόμη περισσότερη πολύπλοκη. Για την κυτοχρωμική οξειδάση ba_3 έχουν αναφερθεί ορισμένες δονήσεις που αποδίδονται σε αμινοξικές πλευρικές αλυσίδες, χωρίς όμως να έχουν επιβεβαιωθεί με πειράματα μεταλλάξεων. Ανάμεσα σε αυτές περιλαμβάνονται και οι δονήσεις της καρβονυλικής ομάδας ασπαρτικών και γλουταμινικών καταλοίπων, οι οποίες εντοπίζονται πάνω από τους 1700 cm^{-1} όταν είναι πρωτονιωμένα και στις περιοχές 1400 cm^{-1} – 1420 cm^{-1} και 1580 cm^{-1} – 1590 cm^{-1} στην αποπρωτονιομένη τους μορφή. Στα φάσματα συνεχούς φωτόλυσης στις περιοχές αυτές εντοπίζονται πολλές αλληλοεπικαλυπτόμενες κορυφές και η ανάλυση αυτής της φασματικής περιοχής είναι ιδιαίτερα δύσκολη.

Οι περισσότερες από τις προαναφερθέντες δονήσεις εμφανίζονται και στα φάσματα μεταβατικού συμπλόκου ba_3 -CO, το οποίο προκύπτει μετά από την φωτόλυση με έναν παλμό *laser*. Ένα Time Resolved Step-Scan FTIR φάσμα διαφοράς του πλήρους ανηγμένου συμπλόκου ba_3 -CO, που έχει υποστεί φωτόλυση με ένα παλμό *laser* μήκους κύματος 532 nm και πλάτους $7\text{-}10\text{ ns}$, και το οποίο αντιστοιχεί σε χρόνο $5\text{ }\mu\text{s}$ από την διέγερση του δείγματος σε $\text{pH}=7.5$, παρουσιάζεται στο σχήμα 3.5.

Η φασματική ανάλυση είναι ίση με 8 cm^{-1} , και για αυτό οι τρεις κορυφές που αντιστοιχούν στο δεσμευμένο στον σίδηρο CO, δεν διαχωρίζονται αλλά εμφανίζονται σαν μία αρνητική κορυφή στους 1977 cm^{-1} . Η θετική κορυφή στους 2053 cm^{-1} αντιστοιχεί όπως και στα φάσματα συνεχούς φωτόλυσης στην δόνηση έκτασης του

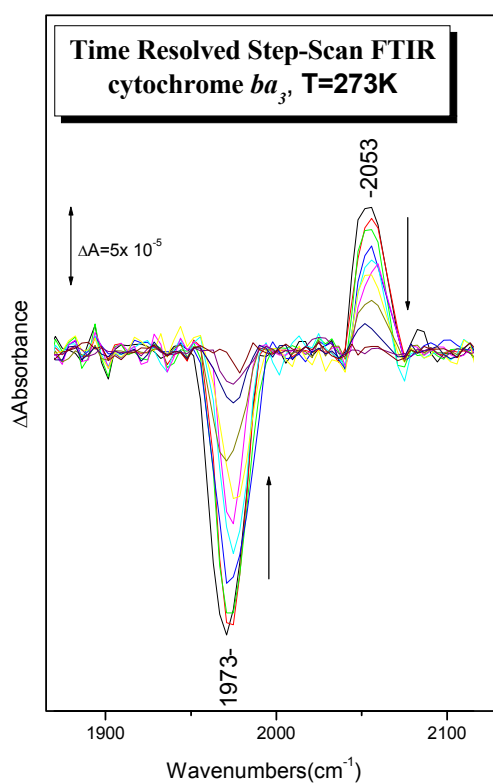
μονοξειδίου του άνθρακα το οποίο δεσμεύεται στον χαλκό. Η μείωση της έντασης της κορυφής στους 2053 cm^{-1} , η οποία ξεκινά μετά την έλευση λίγων ms μετά την φωτόλυση του δείγματος, συνοδεύεται από ταυτόχρονη αύξηση της κορυφής στους 1977 cm^{-1} . Μέχρι την εξισορρόπηση του δείγματος η αναλογία των κορυφών των δονήσεων $\text{Fe}^{2+}\text{-C=O}/\text{Cu}_B^+\text{-C=O}$ σε όλη την διάρκεια εξέλιξης του φαινομένου είναι περίπου ίση με 2, ενώ σε χρόνο 75 ms και οι δύο έχουν μηδενική ένταση. Ο σταθερός λόγος των εντάσεων των δύο κορυφών επιβεβαιώνει πως κανένα ποσοστό του CO δεν διαφεύγει από το ενεργό κέντρο σε θερμοκρασία δωματίου και έρχεται σε συμφωνία με άλλες μελέτες^{15,39}.



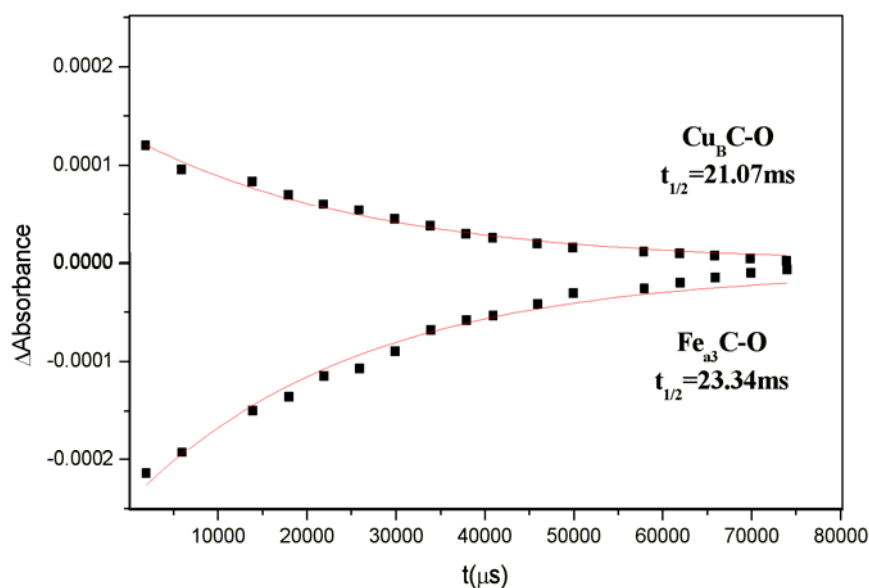
Σχήμα 3.5: Time resolved step- Scan FTIR φάσμα του συμπλόκου ba_3 , που αντιστοιχεί σε χρόνο $5\mu\text{s}$ μετά την φωτόλυση του δείγματος. Η οπτική διαδρομή ήταν $14\mu\text{m}$ και η φασματική ανάλυση 8cm^{-1} , ενώ το ποσοστό της φωτόλυσης 10% .

Η σταδιακή μεταβολή της έντασης των δονήσεων του μονοξειδίου του άνθρακα που σχετίζονται με την αίμη α_3 και τον Cu_B χαρακτηρίζει την αποδέσμευση του υποκαταστάτη από τον χαλκό και την επαναδέσμευση του στην αίμη όπως φαίνεται στο σχήμα 3.6. Το εμβαδόν των εντάσεων των δύο κορυφών μετρήθηκε σε

διάφορους χρόνους με σκοπό τον προσδιορισμό της σταθεράς ταχύτητας της αποδέσμευσης του CO από τον Cu_B (k_{1ob}) και της επαναδέσμευσης του στην αίμη (k_{2ob}). Οι μεταβολές των εντάσεων των παραπάνω κορυφών ακολουθούν κινητική πρώτης τάξης, όπως φαίνεται και στο σχήμα 3.7, όπου οι καμπύλες είναι εκθετική προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Οι τιμές των σταθερών που προέκυψαν με τον τρόπο αυτό είναι $k_{2ob} = 23.3s^{-1}$ και $k_{1ob} = 31.8s^{-1}$, ενώ πλησιάζουν αρκετά δημοσιευμένες τιμές⁴⁰.



Σχήμα 3.6 : Time Resolved step-scan φάσματα διαφοράς του δεσμευμένου με CO πλήρως ανηγμένου κυτοχρώματος ba_3 (pH 7.5) σε χρόνους 1, 3, 5, 13, 21, 23, 33, 40, 55, 60, 75 ms μετά την φωτόλυση του CO από τον αιμικό σίδηρο. Η φασματική διακριτική ικανότητα ήταν $8cm^{-1}$ και η χρονική ανάλυση 100ms.

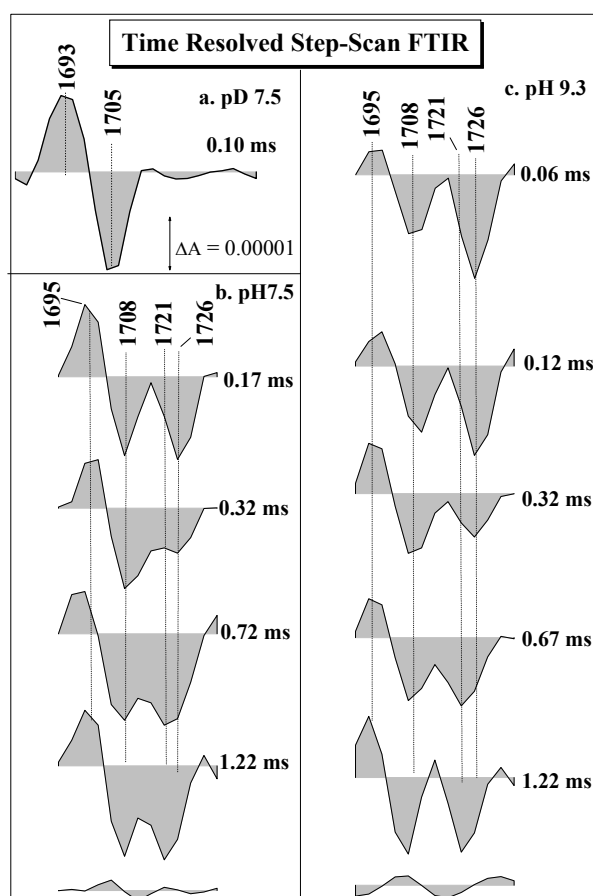


Σχήμα 3.7 : Διάγραμμα των μεταβολών απορρόφησης στους 2053cm^{-1} και 1977cm^{-1} , ως προς τον χρόνο t , μετά την φωτόλυση του CO από την αίμη a_3 .

Οι κορυφές στους $1708\text{ cm}^{-1}/1695\text{ cm}^{-1}$ αντιστοιχούν στις δονήσεις των προπιονικών ομάδων της αίμης a_3 , και με αντικατάσταση του νερού με D_2O , μετατοπίζονται κατά τρεις κυμματάριθμους χαμηλότερα. Επομένως κατά την φωτοδιάσπαση του CO η διαμόρφωση της πρωτεΐνης μεταβάλλεται κοντά στις προπιονικές ομάδες της αίμης a_3 . Επίσης έχει βρεθεί πως η χρονική εξέλιξη των κορυφών $1708/1665\text{ cm}^{-1}$ είναι παρόμοια της εξέλιξης των κορυφών στους 1973 cm^{-1} και 2053cm^{-1} , οι οποίες αντιστοιχούν στις δονήσεις του δεσμευμένου στο ενεργό κέντρο CO¹⁵.

Επίσης σε χαμηλότερους κυμματάριθμους διακρίνονται δονήσεις στους 1529cm^{-1} , η οποία όπως έχει αναφερθεί αποδίδεται στην ασύμμετρη δόνηση του καρβονυλίου των αποπρωτονιωμένων προπιονικών ομάδων, και στους $1365/1370\text{ cm}^{-1}$, οι οποίες αποδίδονται στην συμμετρική δόνηση της αντίστοιχης ομάδας. Οι δονήσεις στους $1444/1456\text{cm}^{-1}$ και $1582/1592\text{cm}^{-1}$ εμφανίζονται σε συχνότητες όπου αναμένονται οι συμμετρικές και ασύμμετρες δονήσεις αποπρωτονιωμένων καρβοξυλομάδων του αμινοξικού καταλοίπων. Οι δονήσεις αυτές μπορούν να διακριθούν και στα φάσματα συνεχούς φωτόλυσης με μικρή ένταση. Επίσης

εμφανίζεται και μια επιπλέον κορυφή στους 1726 cm^{-1} , η οποία είναι απύουσα στα φάσματα συνεχούς φωτόλυσης. Η δόνηση αυτή εμφανίζεται σε περιοχή χαρακτηριστική για της απορροφήσεις πρωτονιωμένων καρβονυλομάδων ασπαρτικών και γλουταμινικών καταλοίπων. Με βάση την κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης, σύμφωνα με την οποία το μόνο κατάλοιπο το οποίο βρίσκεται κοντά στο ενεργό κέντρο και θα μπορούσε να επηρεαστεί από την διάσπαση και μετανάστευση του CO, δίνοντας τις παραπάνω χαρακτηριστικές δονήσεις είναι το Asp372, οι κορυφές αυτές έχουν αποδοθεί στο συγκεκριμένο αμινοξύ³⁹.



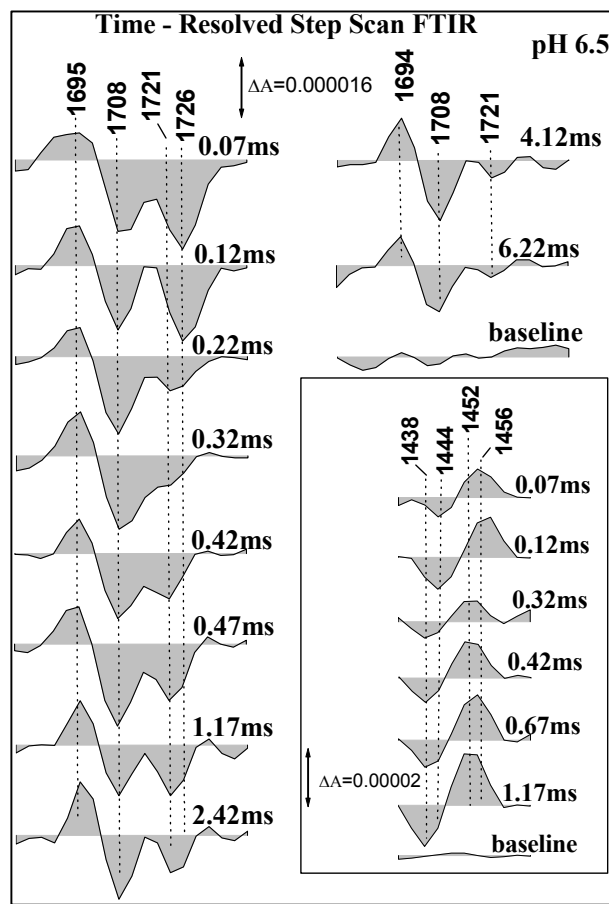
Σχήμα 3.8 : Time Resolved step-scan φάσματα διαφοράς του δεσμευμένου με CO πλήρως ανηγμένου κυτοχρώματος ba_3 α. Σε $pD=7.5$, όπου η δόνηση 1726cm^{-1} δεν ανιχνεύεται. β. Σε $pH 7.5$ σε χρόνους 0.17, 0.32, 0.72, 1.22ms και γ. Σε $pH=9.3$ σε χρόνους 0.06, 0.12, 0.32, 0.67, 1.22ms. Η φασματική διακριτική ικανότητα ήταν 8cm^{-1} και η χρονική ανάλυση $5\mu\text{s}$.

Ανταλλάσσοντας το νερό με D_2O η δόνηση στους 1726 cm^{-1} δεν είναι πλέον ανιχνεύσιμη, ούτε παρατηρείται μετατόπιση της σε χαμηλότερους κυματάριθμους,

γεγονός τα οποίο θα μπορούσε να ερμηνευθεί λόγω της αύξησης της ανηγμένης μάζας. Επιπλέον δεν έχει παρατηρηθεί σε φάσματα διαφοράς της ανηγμένης ως προς την οξειδωμένη μορφή του ενζύμου. Με βάση τα παραπάνω, η δόνηση αυτή έχει συσχετιστεί με το μεταβατικό σύμπλοκο $\text{Cu}_B^+ - \text{C}=\text{O}^{39}$. Η παρατήρηση της δόνησης στους 1726 cm^{-1} δεν είναι αποτέλεσμα αλλαγής της οξειδωτικής κατάστασης των μετάλλων του ενεργού κέντρου αλλά της διαταραχής η οποία προκαλείται από τον σχηματισμό του συμπλόκου $\text{Cu}_B^+ - \text{C}=\text{O}$. Η δόνηση αυτή δεν εμφανίζει ευαισθησία στην αλλαγή του pH, σε ένα εύρος από $\text{pH}=6.5$ ως $\text{pH}=9.3$, γεγονός τα οποίο δείχνει πως η τιμή pK_a του Asp372 είναι μεγαλύτερη από 9.3.

Παρατηρώντας την χρονική εξέλιξη αυτής της δόνησης βλέπουμε πως μετά την έλευση 200 μs περίπου αρχίζει να μετατοπίζεται σταδιακά κατά τέσσερις κυμματάριθμους χαμηλότερα. Σε χρόνο 1ms περίπου αυτή η μετατόπιση έχει πλήρως ολοκληρωθεί, και η δόνηση η οποία εμφανίζεται πλέον στους 1721 cm^{-1} , έχει την ίδια ένταση όπως και στους αρχικούς χρόνους. Στο ενδιάμεσο χρονικό διάστημα από 0.2ms ως 1 ms ο πληθυσμός των καταλοίπων με χαρακτηριστική συχνότητα δόνησης $\nu(\text{C}=\text{O})$ στους 1726 cm^{-1} μειώνεται συνεχώς με ταυτόχρονη αύξηση του πληθυσμού των καταλοίπων με χαρακτηριστική συχνότητα δόνησης στους 1721 cm^{-1} . Αυτή η μετατόπιση δεν εξαρτάται από την τιμή του pH, καθώς η ίδια συμπεριφορά παρατηρείται σε ένα εύρος από $\text{pH}=6.5$ ως $\text{pH}=9.3$.

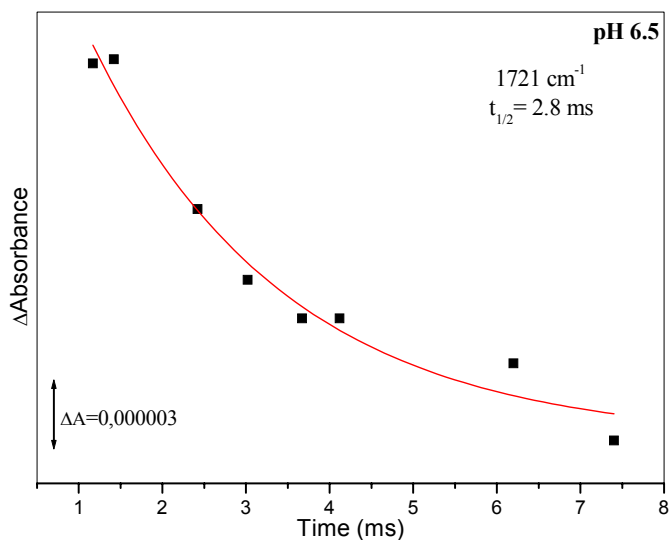
Επιπρόσθετα στο ίδιο χρονικό διάστημα στο οποίο παρατηρείται μετατόπιση από τους 1726 cm^{-1} στους 1721 cm^{-1} , παρατηρείται ανάλογη μετατόπιση και των δονήσεων που εμφανίζονται στους 1444 cm^{-1} και 1456 cm^{-1} . Όπως προαναφέρθηκε οι κορυφές αυτές έχουν αποδοθεί στην συμμετρική δόνηση της ομάδας COO^- της αποπρωτονιωμένης μορφής του Asp372. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο 3.9 μετά τα 200 μs περίπου οι κορυφές αυτές μετατοπίζονται από τους $1444/1456 \text{ cm}^{-1}$ στους $1438/1452 \text{ cm}^{-1}$ αντίστοιχα.



Σχήμα 3.9 : Time Resolved step-scan φάσματα διαφοράς του δεσμευμένου με CO πλήρως ανηγμένου κυτοχρώματος ba_3 α. Σε $pH=6.5$ σε χρόνους 0.07msως 6.22ms, όπου διακρίνεται η χρονική εξέλιξη της δόνησης στους $1726cm^{-1}$ που αποδίδεται στην πρωτονιωμένη μορφή του Asp372. Στο ένθετο παρουσιάζεται η δόνηση της αποπρωτονιωμένης μορφής του Asp372σε χρόνους 0.07ms-1.17ms . Η φασματική διακριτική ικανότητα ήταν $8cm^{-1}$ και η χρονική ανάλυση 5 μs .

Μετά από χρονικό διάστημα 2ms περίπου η ένταση της $1721cm^{-1}$ δόνησης αρχίζει να μειώνεται σημαντικά με αποτέλεσμα η κορυφή να μη είναι πλέον ανιχνεύσιμη μετά τα 6 ms. Ο υψηλός λόγος σήματος/θορύβου των Time-Resolved Step-Scan FTIR φασμάτων επέτρεψε την παρακολούθηση της χρονικής εξέλιξης αυτής της δόνησης, η οποία εξηγεί και την απουσία της από τα φάσματα συνεχούς φωτόλυσης. Η ένταση της μειώνεται εκθετικά με τον χρόνο και ο χρόνος ημιζωής της, όπως υπολογίστηκε από τις εντάσεις της στους διάφορους χρόνους, είναι ίσος με 2.8 ms. Το χρονικό διάστημα στο οποίο παρατηρείται η εξασθένηση του σήματος της

δόνησης της καρβονυλικής ομάδας του πρωτονιωμένου καταλοίπου Asp372, δεν συμπίπτει με τον χρόνο της σταδιακής μείωσης των εντάσεων των δονήσεων των προπιονικών ομάδων ή του δεσμευμένου CO. Αντίθετα αυτό που προκύπτει από τα παραπάνω δεδομένα, είναι ότι οι δύο διαδικασίες πραγματοποιούνται σχεδόν διαδοχικά, με την εξασθένηση της κορυφής στους 1726 cm^{-1} να προηγείται.



Σχήμα 3.10 : Διάγραμμα των μεταβολών απορρόφησης στους 1721 cm^{-1} ως προς τον χρόνο t , μετά την φωτόλυση του CO από την αίμη a_3 .

Οι υπόλοιπες δονήσεις οι οποίες σχετίζονται με το κατάλοιπο Asp372 δεν παρουσιάζουν ανάλογη χρονική εξέλιξη. Οι κορυφές στους $1444/1456\text{ cm}^{-1}$, αν και μετατοπίζονται κατά τέσσερις κυματάρια, δεν εμφανίζονται με μειωμένη ένταση μετά τα 2 ms. Αντίθετα είναι ανιχνεύσιμες ως και τα 6ms, με σχεδόν σταθερή ένταση. Επίσης οι κορυφές στους $1582/1592\text{ cm}^{-1}$, οι οποίες αποδίδονται στην συμμετρική δόνηση της ομάδας COO^- , του συγκεκριμένου ασπαρτικού καταλοίπου, διατηρούν επίσης την ένταση τους και είναι ανιχνεύσιμες και στα φάσματα συνεχούς φωτόλυσης, ενώ δεν παρατηρείται μετατόπιση των συχνοτήτων τους. Επιπρόσθετα οι δονήσεις οι οποίες έχουν αποδοθεί στην αποπρωτονιωμένη μορφή των προπιονικών ομάδων της αίμης a_3 , στους 1529 cm^{-1} και 1370 cm^{-1} δεν παρουσιάζουν αξιόλογες μεταβολές στην συχνότητα ή στην ένταση τους στο χρονικό διάστημα των 6 ms.

3.4 Ανάλυση – Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Η δέσμευση του μονοξειδίου του άνθρακα στο ενεργό κέντρο της κυτοχρωμικής οξειδάσης ba_3 έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός συμπλόκου, στο οποίο το 30% των αιμικών κέντρων παραμένουν αδέσμευτα, καθώς ένα μέρος του υποκαταστάτη δεσμεύεται στον χαλκό. Αυτή η συμπεριφορά είναι αποτέλεσμα της ασυνήθιστα μεγάλης συγγένειας του Cu_B του ενζύμου για το CO, η οποία διευκολύνει την πραγματοποίηση φασματοσκοπικών μετρήσεων. Έτσι η τιμή της σταθεράς ταχύτητας k_2 υποδηλώνει ότι οι παρατηρούμενες δονήσεις του υποκαταστάτη στο σύμπλοκο ισορροπίας δεν οφείλονται στην ύπαρξη ενός συμπλόκου a_3 -CO/ Cu_B -CO αλλά σε δύο διαφορετικά σύμπλοκα αίμης (a_3 -CO) και χαλκού (Cu_B -CO). Σύμφωνα με τα φασματοσκοπικά δεδομένα το σύμπλοκο της αίμης παρουσιάζει τρεις διαφορετικές διαμορφώσεις, ενώ η συναρμογή δεν φαίνεται να επηρεάζεται από το pH. Οι αναλογίες αλλά και οι συχνότητες των κορυφών που αντιστοιχούν σε δονήσεις του υποκαταστάτη παραμένουν σταθερές σε ένα εύρος pH από 6.5 ως 9.3. Αυτή η σταθερότητα καταδεικνύει ότι δεν υπάρχουν αλλαγές στη κατάσταση πρωτονίωσης των ιστιδινικών καταλοίπων του χαλκού σε τιμές pH κοντά στις φυσιολογικές. Σε μια τέτοια περίπτωση θα αναμένονταν μετατόπιση της συχνότητας δόνησης Cu_B C-O, εφόσον η αλλαγή της κατάστασης πρωτονίωσης των συναρμοσμένων στον χαλκό ιστιδινών συνοδεύεται από αλλαγή την ηλεκτρονικής πυκνότητας του δεσμού Cu-His και κατά συνέπεια αλλαγή της ηλεκτρονιακής προσφοράς από τα d τροχιακά του μετάλλου στα αντιδεσμικά π τροχιακά του υποκαταστάτη.

Η ταύτιση της συχνότητας δόνησης του δεσμευμένου στον χαλκό CO στο μεταβατικό και στο σύμπλοκο ισορροπίας δεν υποστηρίζει δομικές αλλαγές στο εγγύ περιβάλλον του χαλκού. Αντίθετα ο χαλκός φαίνεται να βρίσκεται σε ένα συμπαγές περιβάλλον, όπου η αναπροσαρμογή των υποκαταστατών του κατά την είσοδο και αποδέσμευση του CO δεν υποστηρίζεται με τα πειραματικά δεδομένα. Ο χαλκός εμπλέκεται στην καταλυτική λειτουργία του ενζύμου και υπήρξαν πολλές προτάσεις ότι τα ιστιδινικά κατάλοιπα με τα οποία είναι συναρμοσμένος συμμετέχουν σε διαδικασίες δέσμευσης και απελευθέρωσης πρωτονίων και ρυθμίζουν την σχετική θέση του μετάλλου σε σχέση με την αίμη a_3 ^{41,42}. Τα δεδομένα που προκύπτουν από τα φάσματα υπερύθρου του μεταβατικού και του συμπλόκου ισορροπίας φανερώνουν μια σταθερότητα η οποία αντιτίθεται στις παραπάνω προτάσεις.

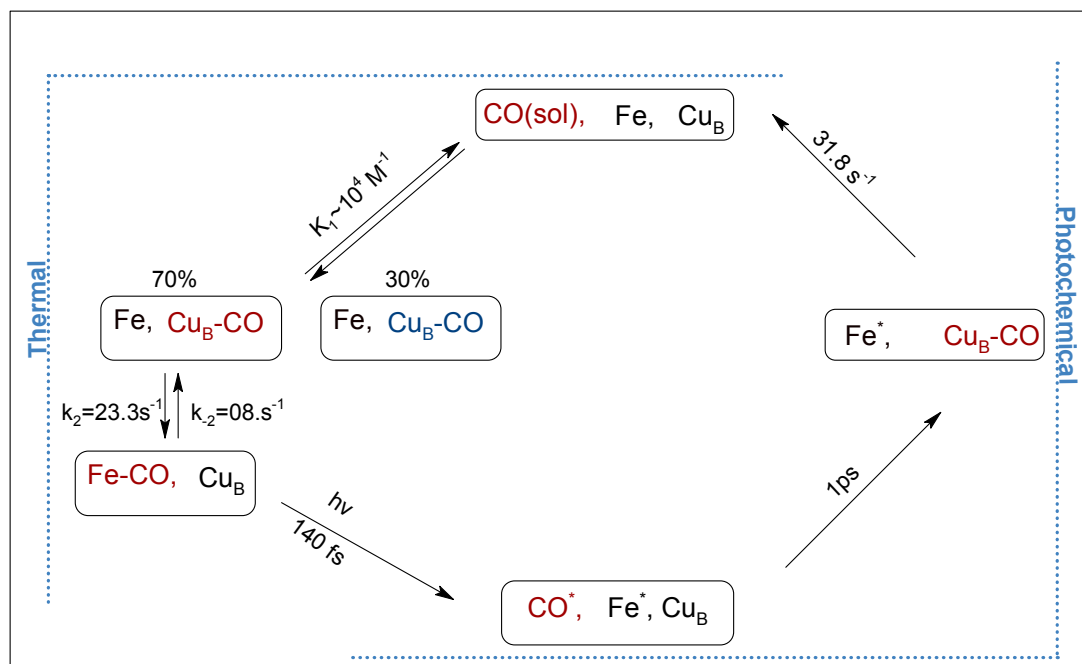
Φωτολύοντας το σύμπλοκο ba_3 -CO τα προκύπτοντα φάσματα διαφοράς παρέχουν πληροφορίες για τα δομικά χαρακτηριστικά τόσο του αρχικού συμπλόκου όσο και του παραγόμενου μετά την αποδέσμευση του υποκαταστάτη από τον χαλκό. Ιδιαίτερα στα φάσματα συνεχούς φωτόλυσης όπου το ποσοστό της φωτόλυσης φτάνει το 20% ο λόγος σήματος/θορύβου είναι πολύ υψηλός καθιστώντας ευκολότερη την ανάλυση των φασμάτων. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα τόσο για την δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης όσο και για δομικές αναπροσαρμογές συγκεκριμένων ομάδων, οι οποίες επάγονται από την φωτόλυση του δείγματος. Τέτοιες ομάδες σύμφωνα με τα φάσματα που ελήφθησαν είναι οι προπιονικές ομάδες της αίμης α_3 , οι φορμυλικές αιμικές ομάδες και το κατάλοιπο Asp372. Αν και τα φάσματα συνεχούς φωτόλυσης δεν αντικατοπτρίζουν το μεταβατικό σύμπλοκο, σε αντίθεση με τα Time Resolved Step-Scan FTIR φάσματα, πολλές φορές μπορούν να χρησιμεύσουν συμπληρωματικά. Στον ακόλουθο πίνακα δίνονται οι κυριότερες δονήσεις της πρωτεΐνης που ανιχνεύθηκαν και οι δονήσεις στις οποίες αποδίδονται.

Συχνότητα (cm^{-1}) Σε H_2O	Συχνότητα (cm^{-1}) Σε D_2O	Κατάσταση ενζύμου	Πιθανή Δόνηση
1708	1705	φωτολυόμενο	$\nu(\text{C}=\text{O})$:προπιονικές ομάδες
1695	1693	δεσμευμένο	$\nu(\text{C}=\text{O})$:προπιονικές ομάδες,
	1676	φωτολυόμενο	$\nu(\text{C}=\text{O})$:φορμυλικές ομάδες, amide I
	1668	δεσμευμένο	$\nu(\text{C}=\text{O})$:φορμυλικές ομάδες, amide I
	1661	δεσμευμένο	amide I (α -έλικα)
	1654	φωτολυόμενο	amide I (α -έλικα)
	1646	φωτολυόμενο	Amide I (β -πτυχωτή)
	1632	δεσμευμένο	Amide I (β -πτυχωτή)
1582	1582	δεσμευμένο	$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{O}^-)^{\text{asym}}$: Asp372
1533	1533	δεσμευμένο	$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{O}^-)^{\text{as}}$: προπιονικές ομάδες
1444	1448	Δεσμευμένο	$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{O}^-)^{\text{as}}$: Asp372
1370	1370	δεσμευμένο	$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{O}^-)^{\text{sym}}$: προπιονικές ομάδες
1365	1365	φωτολυόμενο	$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{O}^-)^{\text{sym}}$: προπιονικές ομάδες

Πίνακας 3.1: Οι κυριότερες δονήσεις του κυτοχρώματος ba_3 και του συμπλόκου του με CO στην περιοχή από 1350cm^{-1} - 1710cm^{-1} .

Οι δονήσεις του CO στο μεταβατικό σύμπλοκο εμφανίζονται στους 2053cm^{-1} , όταν αυτό είναι δεσμευμένο στον χαλκό και στους 1977cm^{-1} όταν είναι δεσμευμένο στον σίδηρο. Αυτή η δόνηση περιλαμβάνει και τις τρεις συχνότητες που εμφανίζει το CO στο σύμπλοκο ισορροπίας, οι οποίες δεν διαχωρίζονται λόγω της φασματικής ανάλυσης. Τα χρονοεξαρτώμενα φάσματα μπορεί να υστερούν σε διακριτική ικανότητα αλλά με τον τρόπο αυτό μειώνεται ο θόρυβος και επομένως βελτιώνεται η ποιότητα τους. Οι σταθερές k_{1ob} και k_{2ob} υπολογίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα και βρέθηκαν ίσες με 31.8s^{-1} και 23.3s^{-1} και αναφέρονται στην αποδέσμευση του CO από τον χαλκό και στην επαναδέσμευση του στην αίμη αντίστοιχα. Αυτές οι τιμές είναι αρκετά μικρότερες από τις τιμές που έχουν βρεθεί για άλλα ένζυμα της ομάδας των κυτοχρωμικών οξειδασών. Η σταθερά ταχύτητας k_{2ob} αφορά την συνολική αμφίδρομη πορεία k_2/k_{-2} . Γνωρίζοντας ότι $k_2=0.8\text{s}^{-1}$ και υποθέτοντας ότι $k_2 \gg k_{-2}$, η k_{2ob} μπορεί να θεωρηθεί περίπου ίση με k_2 . Όμως η k_{1ob} δεν μπορεί να συσχετιστεί με καμία από τις σταθερές k_1 και k_{-1} ή το πηλίκό τους καθώς εμφανίζουν εξάρτηση από την συγκέντρωση του CO, η οποία έχει στοιχεία κινητικής δευτέρας τάξεως.

Η αποδέσμευση του μονοξειδίου του άνθρακα από τον χαλκό φαίνεται να είναι το καθοριστικό στάδιο της επαναδέσμευσης στον αιμικό σίδηρο και ο μεγάλος χρόνος αυτής της διαδικασίας έχει ερμηνευθεί ως προϊόν της μικρής σταθεράς ταχύτητας της θερμική ισορροπίας του $\text{Cu}_B^+ - \text{CO}$ με CO^{15} . Η συνολική θερμική και φωτοχημική αποδέσμευση μπορεί να περιγραφεί σύμφωνα με το με το μοντέλο του σχήματος 3.11, το οποίο αποτελείται από ένα θερμικό και έναν φωτοχημικό κλάδο. Στο μοντέλο περιλαμβάνεται το μη φωτοευαίσθητο σύμπλοκο ισορροπίας $\text{Cu}_B^+ - \text{CO}$ και το ανάλογο μεταβατικό σύμπλοκο. Οι καταστάσεις με αστερίσκο υποδηλώνουν ότι το σύστημα δεν έχει επέλθει σε ισορροπία αλλά περιέχει περίσσεια ενέργειας λόγω της φωτόλυσης.



Σχήμα 3.11 : Μοντέλο της φωτοχημικής και θερμικής διάσπασης του CO από το ενεργό κέντρο του ba_3 .

Ο λόγος των δύο κορυφών του CO στο μεταβατικό σύμπλοκο παραμένει σχεδόν σταθερός και ίσος με 2 σε όλο το εύρος των pH που μελετήθηκε. Ανάλογα πειράματα σε δευτεριωμένο διαλύτη έχουν δείξει πως αυτός ο λόγος είναι μικρότερος (~1.4) σε αυτήν την περίπτωση¹⁵. Έτσι ενώ στην περίπτωση του D₂O το φωτολυόμενο CO φαίνεται να μεταφέρεται ποσοτικά στον χαλκό στην περίπτωση του νερού ένα μικρό ποσοστό παραμένει ελεύθερο στο διάλυμα πριν επαναδεσμευτεί στον αιμικό σίδηρο. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με πρόσφατες δημοσιεύσεις σύμφωνα με τις οποίες το 15% του φωτολυόμενου CO εγκλωβίζεται σε μια κοιλότητα στο εσωτερικό της πρωτεΐνης, κοντά στις προπιονικές ομάδες του πυρρολικού δακτυλίου A της αίμης a_3 , όπου παραμένει για λίγα μs. Στην συνέχεια διαχέεται στην πρωτεΐνη, χωρίς να δεσμευτεί στο χαλκό. Αυτό το ποσοστό δεν διαφεύγει από τα μεταλλικά κέντρα αλλά τελικά επαναδεσμεύεται στην αίμη, όπως και το CO το οποίο μετά την φωτόλυση δεσμεύεται στον χαλκό^{43,44}.

Η ανίχνευση των κορυφών στους 1708 cm⁻¹/1965 cm⁻¹ δείχνει ότι λόγω της φωτόλυσης η πρωτεΐνη υπόκειται σε δομικές μεταβολές κοντά στις προπιονικές ομάδες της αίμης a_3 . Η μετατόπιση της συχνότητας δόνησης του καρβονυλικού δεσμού αυτών των ομάδων στα φάσματα του μεταβατικού συμπλόκου σε χαμηλότερη τιμή δηλώνει εξασθένηση του δεσμού C=O και επομένως ενίσχυση του δικτύου δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει με παραπλήσιες ομάδες. Επομένως η

αποδέσμευση του υποκαταστάτη από τον αιμικό σίδηρο οδηγεί σε δομικές μεταβολές στην περιοχή των προπιονικών ομάδων της αίμης a_3 και ενός κοντινού καταλοίπου ή μορίου νερού. Λαμβάνοντας υπόψη την κρυσταλλική δομή του ενζύμου το μόνο αμινοξύ ικανό να σχηματίσει δεσμό υδρογόνου με το καρβονύλιο των προπιονικών ομάδων και να αναμειγνύεται στη παραπάνω διαδικασία είναι το Asp372. Όπως έχει αναφερθεί αυτό το κατάλοιπο είναι μέρος ενός πιθανού καναλιού πρωτονίων, το οποίο καταλήγει στην περιπλασματική πλευρά της μεμβράνης όπου συγκεντρώνονται μόρια νερού, τα οποία πιθανώς βρίσκονται σε ισορροπία με το νερό του διαλύτη.

Οι δονήσεις του συγκεκριμένου ασπαραγινικού καταλοίπου γίνονται ορατές στο φάσμα του μεταβατικού συμπλόκου, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει την συμμετοχή του στις δομικές αλλαγές που προκάλεσε η αποδέσμευση του CO. Η αντικατάσταση του υδατικού διαλύτη με D_2O έχει ως αποτέλεσμα η δόνηση της πρωτονιομένης μορφής του Asp372 να μην είναι πλέον ανιχνεύσιμη. Επομένως οι προπιονικές ομάδες της αίμης a_3 συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου με το Asp372, οι οποίοι διαταράσσονται από την παρουσία του D_2O . Η διακοπή αυτής της πρωτονιακής συσχέτισης έχει ως αποτέλεσμα την υιοθέτηση μιας διαφορετικής πρωτεϊνικής διευθέτησης σε αυτή την περιοχή. Η δόνηση στους 1726 cm^{-1} δεν ανιχνεύεται ούτε σε φάσματα διαφοράς οξειδωμένου/ανηγμένου ενζύμου. Επομένως η παρατήρηση της δόνησης που αποδίδεται στην πρωτονιομένη μορφή του Asp372 οφείλεται στην δημιουργία του μεταβατικού συμπλόκου λόγω της σύνδεσης αυτού του αμινοξέος με τις προπιονικές ομάδες και όχι σε αλλαγές της οξειδωτικής κατάστασης των μεταλλικών κέντρων.

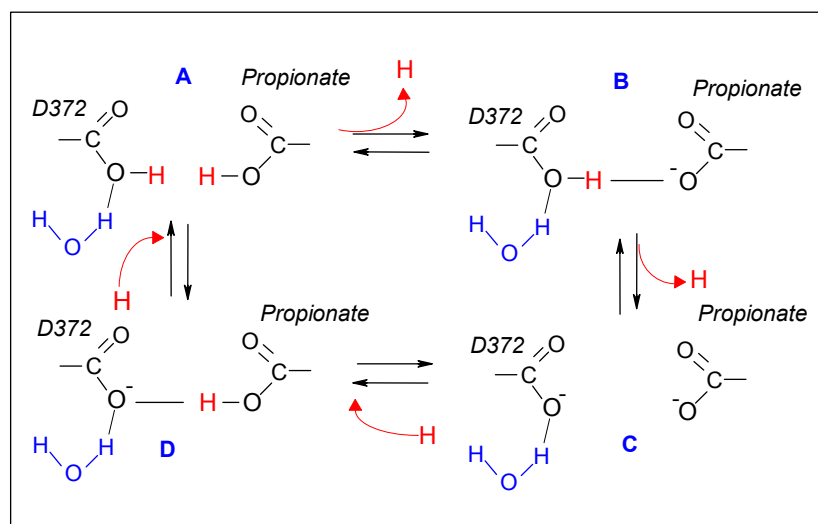
Η απόσταση αυτών των δύο ομάδων φτάνει μόλις τα 3.3 \AA , ενώ έχει προταθεί ότι μοιράζονται ένα κοινό πρωτόνιο, σε ένα εύρος pH 4-11.5. Επιπλέον η ανίχνευση τόσο πρωτονιομένων όσο και αποπρωτονιομένων μορφών του ασπαρτικού καταλοίπου D372 και των προπιονικών ομάδων, παραπέμπει στην ύπαρξη μιας ισορροπίας της μορφής $COOH \leftrightarrow COO^-$ ανάμεσα στις δύο μορφές της κάθε ομάδας. Καθώς και οι δύο ομάδες ανήκουν στο κανάλι μεταφοράς πρωτονίων Q , η ύπαρξη μιας τέτοιας ισορροπίας και η κοινή κατοχή ενός πρωτονίου ίσως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταφορά πρωτονίων μέσω αυτών.

Στην επαγομένη από την φωτόλυση διαταραχή συμμετέχουν και οι δύο μορφές (πρωτονιομένη και μη πρωτονιομένη) του Asp372 και των προπιονικών ομάδων, καθώς δονήσεις που οφείλονται σε δονήσεις και των δύο μορφών είναι

ανιχνεύσιμες στα φάσματα διαφοράς. Οι μετατοπίσεις των δονήσεων των δύο μορφών του Asp372 σε χαμηλότερους κυματάρθιμους δείχνει πως οι πρωτεϊνικές κινήσεις που προκαλεί αυτή η διαταραχή γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να ενισχύονται σταδιακά οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζει το κατάλοιπο, πιθανότατα με γειτονικό κατάλοιπο νερού. Οι δονήσεις των προπιονικών ομάδων δεν παρουσιάζουν περαιτέρω αλλαγές στην συχνότητα τους κατά την εξέλιξη του φαινομένου. Παρόλα αυτά η συμμετοχή των πρωτονιωμένων ασπαρτικών καταλοίπων φαίνεται να ολοκληρώνεται νωρίτερα. Η δόνηση που αντιστοιχεί σε αυτή την μορφή μετά την μετατόπιση της από τους 1726 cm^{-1} στους 1721 cm^{-1} αρχίζει να φθίνει σταδιακά, με αποτέλεσμα μετά τα 6 ms να έχει μηδενική ένταση. Αντίθετα η δόνηση της αποπρωτονιωμένης μορφής παρατηρείται και σε μεγαλύτερους χρόνους, όπως και οι δονήσεις των προπιονικών ομάδων. Η ελάττωση της έντασης των τελευταίων γίνεται σε χρόνους παραπλήσιους της φθοράς του μεταβατικού συμπλόκου $\text{Cu}_B\text{-CO}$. Επομένως τα δεδομένα φανερώνουν την ύπαρξη μιας δυναμικής σύζευξης μεταξύ αυτών των διαδικασιών. Η κίνηση του Asp372 δεν είναι αποτέλεσμα της αποδέσμευσης του CO από τον χαλκό και την επακόλουθη επαναδέσμευσης του στον αιμικό σίδηρο, αλλά προκαλείται με την διαδικασία της φωτόλυσης και πιθανώς να σχετίζεται με την δημιουργία του μεταβατικού συμπλόκου. Η εξασθένηση του σήματος της 1721 cm^{-1} δόνησης και η επαναφορά του CO στον σίδηρο είναι δύο διαδοχικά φαινόμενα, με την κίνηση των πρωτονιωμένων ασπαρτικών καταλοίπων να προηγείται.

Συνεπώς διαταράσσοντας το σύμπλοκο του ενζύμου με το μονοξειδίο του άνθρακα με ένα παλμό *laser* και μελετώντας την δυναμική του με την τεχνική Time Resolved Step-Scan FTIR είναι δυνατή η παρακολούθηση της επαγόμενης κίνησης των προπιονικών ομάδων της αίμης a_3 και του αμινοξέος Asp372. Καθώς οι δύο αυτές ομάδες συμμετέχουν στην μεταφορά πρωτονίων μέσω του Q καναλιού, οι μεταβατικές δομικές αλλαγές της πρωτεΐνης σε αυτή την περιοχή ίσως διευκολύνουν την μεταφορά των πρωτονίων μέσω αυτών των ομάδων ώστε να επιτρέψουν την μεταφορά τους στην έξοδο του καναλιού. Το ασπαρτικό αυτό κατάλοιπο σε συνδυασμό με την προπιονικές ομάδες είναι πιθανό να λειτουργούν σαν ένας μοριακός διακόπτης δεσμεύοντας και απελευθερώνοντας πρωτόνια και η φωτόλυση του δείγματος θα μπορούσε να αποτελέσει το ερέθισμα για την ενεργοποίησή του. Αυτή την λειτουργία των δύο ομάδων, λαμβάνοντας υπόψη την ύπαρξη των πρωτονιωμένων όσο και των αποπρωτονιωμένων μορφών τους, θα μπορούσε να

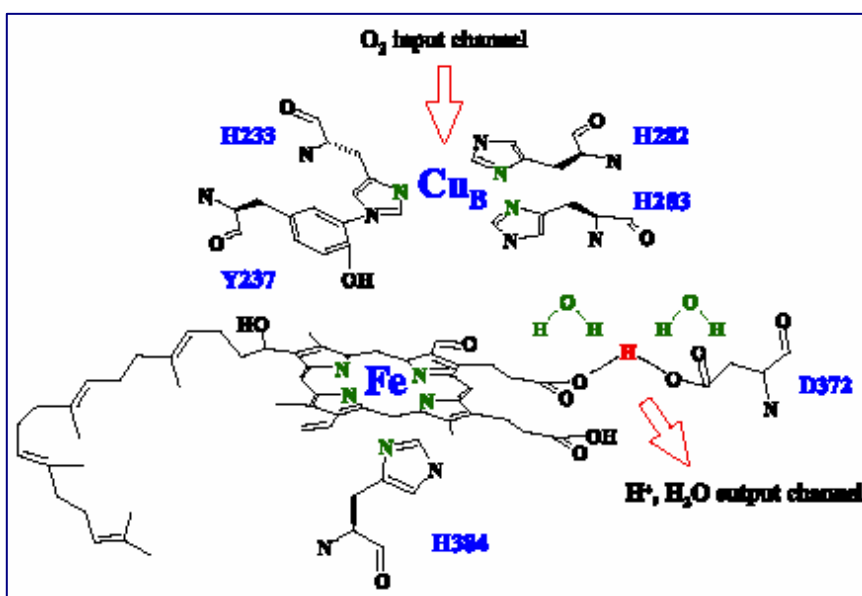
εξηγηθεί σύμφωνα με το σχήμα 3.12. Σε αυτό το μοντέλο το σύστημα στις καταστάσεις B και D, όπου οι δύο ομάδες κατέχουν ένα κοινό πρωτόνιο, μπορεί να δεχτεί ένα πρωτόνιο απελευθερώνοντας το πρώτο προς την δεξιαμενή μορίων νερού, η οποία τοποθετείται πάνω από τις προπιονικές ομάδες της αίμης. Η πρωτονιακή μεταφορά διακόπτεται από την ταυτόχρονη πρωτονίωση (κατάσταση A) ή αποπρωτονίωση (κατάσταση C) και των δύο ομάδων.



Σχήμα 3.12 : Μοντέλο της πρωτονιακής συσχέτισης μεταξύ της προπιονικής ομάδας του πυρρολικού δακτυλίου A της αίμης a_3 , του ασπαρτικού καταλοίπου και ενός μορίου νερού στην κυτοχρωμική οξειδάση ba_3 .

Η είσοδος του οξυγόνου στο ενεργό κέντρο και η απομάκρυνση μορίων νερού και πρωτονίων είναι φαινόμενα που δεν αφορούν μόνο τα μεταλλικά κέντρα αλλά και το πρωτεϊνικό περιβάλλον που τα περιβάλλει, το οποίο υπόκειται σε δομικές μεταβολές κατά την πραγματοποίηση των παραπάνω διαδικασιών. Για την είσοδο των υποκαταστατών, σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή του ενζύμου, έχει προταθεί η ύπαρξη ενός υδρόφοβου πόρου ενώ πρόσφατες μελέτες ενισχύουν την άποψη ότι το O_2 προσεγγίζει το ενεργό κέντρο από την περιοχή του Cu_B^{44} . Για την μεταφορά των πρωτονίων, όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχουν προταθεί αρκετές διαδρομές, μια από τις οποίες, το ονομαζόμενο Q κανάλι, καταλήγει στην περιοχή αποθεματοποίησης μορίων νερού, μέσω των προπιονικών ομάδων της αίμης a_3 και του αμινοξέος Asp372. Αν και το κανάλι Q δεν έχει παρατηρηθεί σε άλλες οξειδάσες τα τρία δομικά στοιχεία που αναφέρθηκαν εμφανίζουν υψηλό ποσοστό διατήρησης, με την

συμμετοχή της περιοχής συσσώρευσης μορίων νερού στην μετακίνηση πρωτονίων να αποδεικνύεται από πειράματα μεταλλάξεων. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα υποδεικνύουν πως ο Cu_B αποτελεί μια στάση για το οξυγόνο και πως το Asp372 με τις προπιονικές ομάδες της αίμης a_3 συμμετέχουν στην πρωτονιακή μεταφορά, πιθανώς δρώντας ως μοριακός διακόπτης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Επομένως οι δύο διαδικασίες εισαγωγής O_2 και εξαγωγής H_2O , H^+ μπορεί να περιγραφούν σύμφωνα με το μοντέλο του σχήματος 3.13, όπου το κανάλι εισαγωγής τοποθετείται στην περιοχή του χαλκού και το κανάλι εξαγωγής στην περιοχή των προπιονικών ομάδων του πυρρολικού δακτυλίου A της a_3 -Asp372- H_2O .



Σχήμα 3.13 : Μοντέλο για τα κανάλια εισαγωγής/εξαγωγής στην κυτοχρωμική οξειδάση ba_3 .

Βιβλιογραφία

- ¹ Ferguson-Miller, S., Babcock, G.T (1996) *Chem. Rev.* **96** 2889-2907.
- ² Malmstrom, B.G. (1990) *Chem. Rev.* **90**, 1247-1260.
- ³ Soulimane, T., Buse, G., Bourenkon, G. P. BartuniK, H. D., Huber, R., Than, M. E. (2000) *EMBO J.*, **19**, 1766-1776
- ⁴ Than, M., Soulimane, T., (2001) *Handbook of Metalloproteins* (Messereschimdt), A., Huber, R., Poulos, T. and Wieghardt, K., eds pp. 363-378, John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, UK.
- ⁵ Tsykihara, T., Aoyanama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S (1995) *Science* **269**, 1069-10774.
- ⁶ Tsykihara, T., Aoyanama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S (1996) *Science* **42**, 1136-1144.
- ⁷ Yoshikawa, S., (1998^a) *Science* **280**, 1729-1730
- ⁸ Iwata, S., Ostermier, C, Ludwig, B and Michel. H., (1995) *Nature* **375**, 660-669.
- ⁹ Ostermier, C. Harrenga, A., Ermler, U. and Michel. H (1997) *Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10547-10553. Michel. H
- ¹⁰ Giuffre, A., Stubauer G., Sarti P., Burnori M., Zumft W. G., Buse. and Soulimane, T. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14718-14723
- ¹¹ Kannt, A., Soulimane, T., Buse, G., Bamderg, E. and Michei, M. W., (1998) *FEBS Lett.* **434**, 17-22
- ¹² Iwata, S., Ostermier, C, Ludwig, B and Michel. H., (1995) *Nature* **375**, 660-669.
- ¹³ Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nalashima, R., Yaono, R., Yamashita, H., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C., P., Mizushima, T., Yamagushi, H. , Tomizaki, T., Tsukihara, T. (1998) *Science* **280**, 1723-1729.
- ¹⁴ Goldbeck, R. A., Einarsdottir, O., Timothy, D. D., Donald, B., Surrerus, K. K., Fee, J. A., and Kliger, D. S.. (1992) *Biochemistry* **31** 9376-9387.
- ¹⁵ Koutsoupakis, K., Stavrakis. S., Pinakoulaki, E., Soulimane, T., Varotsis, C., (2002) *J. Biol. Chem.* **277** 32860-32866
- ¹⁶ Woodruff, W. H., (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* **14**, 177-188.
- ¹⁷ Iwase, T., Varotsis, C., Shinzawa-Itoh, K., Kitagawa, T., (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1425-1416.

-
- ¹⁸ Einarsdottir, O., Dyer, R. B., Lemon, D. D., Killough, P. M., Hubig, S.M., Atherton, S. J., Lopez-Garriga, J. J., Woodruff, W. H., (1993) *Biochemistry* **32**, 12013-12024.
- ¹⁹ Stavrakis, S., Koutsoupakis, K., Pinakoulaki E., Urbani, A., Saraste, M., Varotsiw, C. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 3814-3815.
- ²⁰ Silietzkyi, S., Soulimane, T., Azarkina, N., Vydogina, T. V., buse, G., Kaulen, \a. and Konstantivov, A. (1999) *FEBS Lett.* **487**, 98-102.
- ²¹ Giuffre, A., Forte, E., Antonini, G., Ditri, E., Burnori, M., Soulimane, T and Base, G. (1999), *Biochemistry* **38**, 1057-1065
- ²² Einarsdottir, O., Killough, P.M., Fee, J.A., Woodruff, W. H. (1989), *J. Biol. Chem.* **264**, 2405-2408.
- ²³ Schmidt, B., McCracken, J., Ferguson-Miller, S. (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15539-15542.
- ²⁴ Hellwig, P., Behr, J., Ostremier, C., Oliver-Mathias H., Ppfitzner, U., Odenwald, A., Ludwig, B., Mitcel, H. and Mantele, W. (1998) *Biochemistry* **37**, 7390-7399.
- ²⁵ Puustinen, A., Bailey, J. A., Dyer, R. B., Mecklenbyrg, S. L., Wilkstrom, M. and Woodruff, W. H., (1997) *Biochemistry* , **36**, 13195-13200.
- ²⁶ Heitbrink, D., Sigurdson, H., Bolwien, C., Brzezinski, P.anf Heberle, J. (2002) *Biophys. J.* **82**, 1-10.
- ²⁷ Soulimane, T., Buse, G. (1995) *Eur. J. Biochem.* **227**, 5888-595.
- ²⁸ Nicholls, P. and Petersen, L. C., (1972) *Biochim, Biophys. Acta* **357**, 462-467.
- ²⁹ Hellwig, P, Soulimane, T, Buse, G., Mantele, W. , (1999) *Biochemistry* **38**, 9648-9658.
- ³⁰ Wang, J., W., Takahashi, S., Hosler, J., Mitchell, D. M., Ferguson-Miller, S., Gennis, R. B., Rousseau, D., (1995) *Biochemistry* **34**, 9819-9825.
- ³¹ Pinakoulaki, E., Pfitzner, U., Ludwig, B., Varotsis, C., (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 13563-13568.
- ³² Varotsis, C., Vambouka, M., (1998) *J. Phys. Chem. B.* **102**, 7670-7673.
- ³³ Park, S., Pan, L. P., Chan, S. I., Alben, J. O., (1996) *Biophysical J.* **71**, 1036-1047.
- ³⁴ Rost, B., Behr, L., Hellwig, P., Richter O. M. H, Ludwig, B., Michel, H., Mantele, W., (1999) *Biochemistry* **38**, 7565-7571.
- ³⁵ Krimm, S., Bandekar, J., (1986) *Adv. Protein Chem.* **38**, 181-367.
- ³⁶ Bandekar, J. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1120**, 123-143.

³⁷ Oertling, W.A., Surerus, K.K., Einarsdottir, O., Fee, J.A., Dyer, R. B., Woodruff, W. H. and Fee, J. A., (1992) *Biochemistry* **33**, 3128-3141.

³⁸ Behr, J., Hellwig, P., Mantele, W. and Michel, H. (1998) *Biochemistry* **37**, 7400-7406.

³⁹ Koutsoupakis, K., Soulimane, T., Varotsis, C., (2004) *Biophysical J.* **86**, 1-7.

⁴⁰ Koutsoupakis, K., Stavrakis, S., Soulimane, T., and Varotsis, C., (2003) *J. Biol. Chem* **278**, 14893-14896.

⁴¹ Puustinen, A., Wilkström, M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **94**, 10547-10553.

⁴² Das, T. P., Gomes, C. M., Texeira, M., Rousseeau, D. L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**, 9591-9596.

⁴³ Koutsoupakis, K., Soulimane, T., and Varotsis, C., (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 14728-14732.

⁴⁴ Koutsoupakis, K., Soulimane, T., and Varotsis, C., (2003) *J. Biol. Chem*, **278**, 36806-36809.