

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

FTIR Μελέτες της μυσφαιρίνης και της *caa*₃-
οξειδοαναγωγής απο το *Thermus Thermophilus*

Παπαδόπουλος Γιώργος

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

Ηράκλειο, 2006

Σύντομο βιογραφικό σημείωμα

Όνομα: Γιώργος Ν. Παπαδόπουλος

Ημερομηνία Γέννησης: 18 Δεκεμβρίου 1980

Τόπος Γέννησης: Αθήνα

Διεύθυνση Μόνιμης Κατοικίας: Αράδου 21
Ζωγράφου, Αθήνα, 157 71
Τηλ.: 210 7798525
E-mail: georgep@chemistry.uoc.gr

Εκπαίδευση:

2003 – 2005: Μεταπτυχιακό στο τμήμα χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης στο ΕΠΕΑΕΚ «Εφηρμοσμένη Μοριακή Φασματοσκοπία»

1998 – 2003: Πτυχίο στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης

2002 – 2003: **Πτυχιακή εργασία:** «Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων εκπεμπόμενα από επιφάνεια χρυσού επικαλυμμένη με οργανομένα οργανικά λεπτά υμένα» υπό την επίβλεψη του καθηγητή Θεοφάνη Ν. Κιτσόπουλο στο εργαστήριο Χημικής Δυναμικής, Ι.Τ.Ε.

Παρακολούθηση Επιστημονικών Σεμιναρίων: «Η Πολυμορφικότητα της Χημείας και οι Εφαρμογές της» / 19^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας / Ηράκλειο 2002

Γνώση Ξένων Γλωσσών: 1. Αγγλική (πτυχίο Lower)
2. Γερμανική (πτυχίο Grundstufe)

Άλλες Γνώσεις: Άρτιος χειρισμός σε λειτουργικό περιβάλλον Windows. Προγράμματα: Microcal Origin, Microsoft Word, Microsoft PowerPoint.

Δημοσιεύσεις:

Structural Dynamics of Heme-Copper Oxidases and Nitric Oxide Reductases: Time-resolved Step-Scan Fourier Transform Infrared and Time-resolved Resonance Raman Studies **Pinakoulaki, E., Koutsoupakis, K., Stavrakis, S., Aggelaki, M., Papadopoulos, G., Daskalakis, V., Varotsis, C., *J.Raman Spectrosc.* 36, 337-349 (2005)**

CV

Name: George N. Papadopoulos

Date of birth: 18th December 1980

Place of birth: Athens

Correspondence address: Aradou 21

Ano Ilisia

15771

Athens

Greece

Tel. +30 – 210 – 7798525

E-mail: georgep@chemistry.uoc.gr

EDUCATION:

2003 – 2005: **University of Crete (UOC), MSc Molecular Spectroscopy**

1998 – 2003: **University of Crete, BS in chemistry**

2002 – 2003: **final year project** on “Photoelectron Spectroscopy of Organized Organic Thin Films on Au surface” under the supervision of Professor Theofanis Kitsopoulos in the Laboratory of Chemical Dynamics at the Institute of Electronic Structure and Laser, part of the Foundation of Research and Technology Hellas (FORTH) in Heraklion, Crete.

LANGUAGES: English: (first certificate in English [C])

German: (Goethe Grundstufe [C])

COMPUTER SKILLS:

Microsoft Office (Word; Excel; PowerPoint), Internet explorer, Microsoft Outlook, Microcal Origin

PUBLICATIONS:

Structural Dynamics of Heme-Copper Oxidases and Nitric Oxide Reductases: Time-resolved Step-Scan Fourier Transform Infrared and Time-resolved Resonance Raman Studies **Pinakoulaki, E., Koutsoupakis, K., Stavrakis, S., Aggelaki, M., Papadopoulos, G., Daskalakis, V., Varotsis, C., *J.Raman Spectrosc.* 36, 337-349 (2005)**

Ευχαριστίες

Τελειώνοντας τις μεταπτυχιακές σπουδές στο τμήμα Χημείας του Παν/μίου Κρήτης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Κωνσταντίνο Βαρώτση για την ευκαιρία να δουλέψω στο εργαστήριο Βιοφυσικής Χημείας και για την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Ακόμα ευχαριστώ πολύ τους καθηγητές Σταύρο Φαράντο και Γιώργο Φρουδάκη, μέλη της εξεταστικής επιτροπής.

Επίσης τα μέλη του εργαστηρίου Κωνσταντίνο Κουτσουπάκη, Ευτυχία Πινακουλάκη, Μαριαλένα Αγγελάκη και Βαγγέλη Δασκαλάκη τόσο για τη βοήθεια τους σε θέματα τεχνικής φύσεως που αφορούσαν την πραγματοποίηση των πειραμάτων της εργασίας αυτής όσο και για τις συζητήσεις σε θέματα πάσης φύσεως, κατά τη διάρκεια λήψεως των φασμάτων.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Μαριαλένα Αγγελάκη για την κατανόησή της στην απροθυμία μου να μάθω μόνος μου κάποια πράγματα με αποτέλεσμα τη συνεχή έκκληση για τη βοήθειά της.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου για την ηθική και οικονομική υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια και τους φίλους μου που το έκαναν να αξίζει. Σε αυτούς αφιερώνεται η προσπάθεια αυτή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Βιογραφικό σημείωμα	2
Περιεχόμενα	5
Περίληψη	7
Κεφάλαιο 1: Μυοσφαιρίνη, δομή και λειτουργία	9
Εισαγωγή	10
Δυναμική φωτοδιάσπασης του CO	13
Βιβλιογραφία	20
Κεφάλαιο 2: Η κυτοχρωμική c οξειδάση <i>caa₃</i> από το <i>Thermus Thermophilus</i>	23
Εισαγωγή	24
Δομή οξειδασών	25
Δομή της <i>caa₃</i>	26
Η αντίδραση της κυτοχρωμικής οξειδάσης με το O ₂	31
Η κυτοχρωμική οξειδάση <i>caa₃</i> από το βακτήριο <i>Thermus Thermophilus</i>	32
Βιβλιογραφία	34
Κεφάλαιο 3: Δονητική φασματοσκοπία και lasers	37
Γενικά	38
Δονητική φασματοσκοπία	38
Ο αρμονικός ταλαντωτής	39
Υπέρυθρο φάσμα	40
Ηλεκτρική αναρμονικότητα	42
Μηχανική αναρμονικότητα	43
Φασματοφωτόμετρο FT-IR	45
Fourier Transform IR	47
Περιγραφή της τεχνικής step-scan	50
Θεωρία laser	53
Γενικά στοιχεία	53

Βασικά μέρη ενός laser	53
Ιδιότητες της laser ακτινοβολίας	54
Τεχνική Q – <i>switching</i>	55
Τεχνικές ανάμιξης μη γραμμικών οπτικών υλικών	56
Το Νεοδύμιο - YAG laser	58
Ανιχνευτής MCT	60
Βιβλιογραφία	61
Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα	63
A. Μυοσφαιρίνη	64
Εισαγωγή	64
Σκοπός	64
Πειραματικό μέρος	65
Αποτελέσματα	67
Συμπεράσματα	75
B. <i>caa3</i> οξειδοαναγωγή	77
Εισαγωγή	77
Πειραματικό μέρος	78
Αποτελέσματα	79
Συμπεράσματα	86
Βιβλιογραφία	87

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η φασματοσκοπική μελέτη της μυοσφαιρίνης. Η μυοσφαιρίνη είναι μια μικρή πρωτεΐνη αποθήκευσης και μεταφοράς οξυγόνου που βρίσκεται στους κόκκινους μύες. Μια προσθετική ομάδα αίμης που βρίσκεται στο εσωτερικό της πρωτεΐνης δεσμεύει αντιστρεπτα το οξυγόνο αλλά και άλλα μικρά αέρια μόρια όπως μονοξείδιο του άνθρακα και μονοξείδιο του αζώτου.

Χρησιμοποιώντας την τεχνική της FTIR φασματοσκοπίας χαρακτηρίστηκαν δονητικά τα προϊόντα της διαταραχής του συστήματος έπειτα από τη φωτόλυση του υποκαταστάτη από την αίμη. Η φασματοσκοπία υπερύθρου αποδुकνύεται ιδιαίτερα αποτελεσματική λόγω της υψηλής της ευαισθησίας και της μεγάλης φασματικής διακριτικής ικανότητας.

Τα πειράματα έγιναν στους 253 K, κοντά σε φυσιολογικές θερμοκρασίες, και τα αποτελέσματα συγκρίνονται με προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασίες υγρού αζώτου. Για τη φωτόλυση χρησιμοποιήθηκε laser συνεχούς φωτόλυσης μήκους κύματος 416 nm.

Στο δεύτερο μέρος αυτής της εργασίας παρουσιάζεται η κινητική μελέτη της caa_3 οξειδοαναγωγής από το βακτήριο *Thermus Thermophilus*.

Abstract

Aim of the present study was the spectroscopic investigation of myoglobin. Myoglobin is a small globular protein, found in red muscles, whose function is to store and facilitate diffusion of oxygen to the mitochondria. The heme group binds reversibly oxygen as well as other small gaseous ligands such as CO and NO.

We have applied FTIR spectroscopy to vibrationally characterize the products of the perturbation of the system after photodissociation of the ligand from heme iron. FTIR spectroscopy proves to be extremely efficient due to its high sensitivity and spectral resolution.

The experiments were conducted at 253 K, near physiological temperatures and the results were compared to previously published studies at cryogenic temperatures. The photolysis laser used was a CW laser at 416 nm.

In the second part, the kinetic study of *caa₃* oxydoreductase from *Thermus Thermophilus* is presented.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Μυοσφαιρίνη: Δομή και Λειτουργία

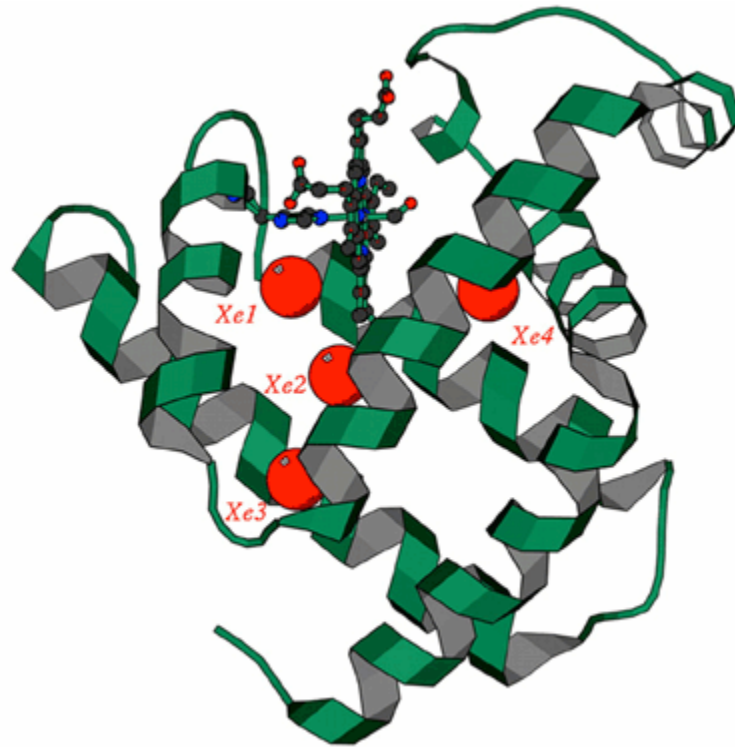
Εισαγωγή

Η μυοσφαιρίνη είναι μια μικρή σχετικά πρωτεΐνη 153 αμινοξέων και έχει μάζα περίπου 18 kd. Είναι η πρώτη πρωτεΐνη της οποίας η δομή αποκαλύφθηκε σε ατομικό επίπεδο (1). Η λειτουργία της είναι η αποθήκευση οξυγόνου αλλά και η μεταφορά του στα μιτοχόνδρια. Η ικανότητα της μυοσφαιρίνης να δεσμεύει οξυγόνο οφείλεται στην ύπαρξη, στο εσωτερικό της, μιας προσθετικής ομάδας αίμης. Πρόκειται για μία πρωτοπορφυρίνη με ένα κεντρικό άτομο σιδήρου. Το οξυγόνο δεσμεύεται στην ferrous μορφή του σιδήρου (Fe^{2+}). Η ανοιγμένη μορφή της μυοσφαιρίνης έχει επίσης την ικανότητα να δεσμεύει και άλλα μικρά αέρια ligands όπως CO και NO.

Η μυοσφαιρίνη είναι ένα ιδιαίτερα συμπαγές μόριο με πολύ λίγο κενό χώρο στο εσωτερικό της. Οι διαστάσεις της είναι 45 x 35 x 25 Å, μια τάξη μεγέθους μικρότερη απ' ό,τι αν ήταν τελείως ξεδιπλωμένη. Η μυοσφαιρίνη αποτελείται κυρίως από α-έλικες. Γύρω στο 70% της κύριας αλυσίδας είναι ελικωμένο σε οκτώ α-έλικες, ενώ αρκετό από το υπόλοιπο της αλυσίδας σχηματίζει στροφές μεταξύ των ελίκων.

Η αναδίπλωση της κύριας αλυσίδας της μυοσφαιρίνης, όπως και σε άλλες πρωτεΐνες, είναι πολύπλοκη και δεν έχει συμμετρία. Η γενική αρχή είναι ότι το εσωτερικό της αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από μη πολικά αμινοξέα όπως λευκίνη, βαλίνη, μεθειονίνη και φαινυλαλανίνη. Πολικά αμινοξέα όπως ασπαραγινικό, γλουταμινικό, λυσίνη και αργινίνη δεν υπάρχουν στο εσωτερικό. Τα μόνα πολικά αμινοξέα στο εσωτερικό της μυοσφαιρίνης είναι δύο ιστιδίνες που βρίσκονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη δέσμευση του οξυγόνου στην

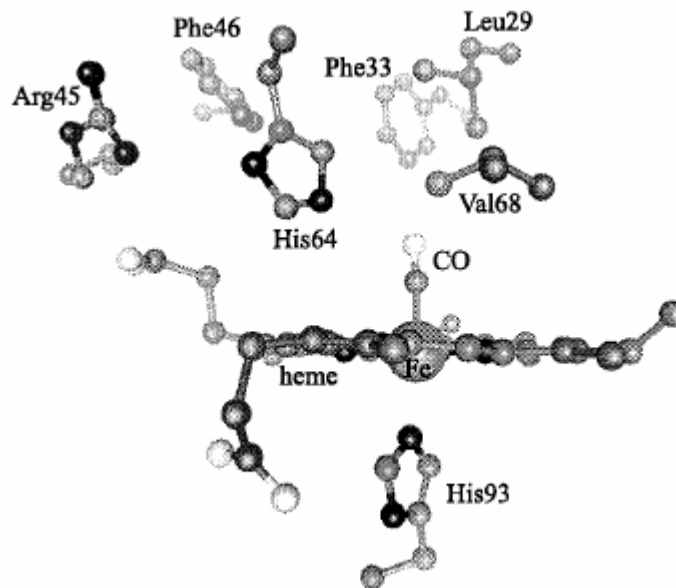
αίμη (2). Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται σχηματικά η δομή της μυοσφαιρίνης (σχήμα 1):



σχ.1. Κρυσταλλική δομή της μυοσφαιρίνης σε ισορροπία με αέριο Xe σε πίεση 7 atm. Οι κοιλότητες όπου είναι δεσμευμένα τα άτομα Xe παρουσιάζονται με κόκκινο. Επίσης παρουσιάζεται η αίμη και η δεσμευμένη σε αυτήν εγγύς ιστοιδίνη.

Η ομάδα της αίμης είναι τοποθετημένη σε μια εσοχή στο μόριο της μυοσφαιρίνης. Το άτομο του σιδήρου της αίμης είναι απ' ευθείας δεσμευμένο στην ιστοιδίνη His93 (*proximal* ιστοιδίνη, F8). Αυτή η ιστοιδίνη καταλαμβάνει την πέμπτη θέση συναρμογής. Η θέση δέσμευσης του οξυγόνου βρίσκεται από την άλλη μεριά του επιπέδου της αίμης, στην έκτη

θέση συναρμογής. Μία δεύτερη ιστοιδίνη (His64) βρίσκεται από τη μεριά δέσμευσης του οξυγόνου (*distal* περιβάλλον) χωρίς να είναι δεσμευμένη στην αίμη. Άλλα αμινοξέα που περιβάλλουν το δεσμευμένο υποκαταστάτη και είναι διατηρημένα σε περισσότερες από 60 μυοσφαιρίνες είναι τα Leu29, Val68 και Ile107. Ο υψηλός βαθμός διατήρησης αυτών των αμινοξέων είναι μια ένδειξη ότι τα κατάλοιπα αυτά είναι σημαντικά για τη λειτουργία της πρωτεΐνης: επηρεάζουν την ενέργεια και την κινητική για τη δέσμευση και την αποδέσμευση του υποκαταστάτη, όπως επίσης και τη μεταφορά του από το διάλυμα στο ενεργό κέντρο. Στο σχήμα 2 φαίνεται το ενεργό κέντρο της μυοσφαιρίνης:



σχ.2. Το ενεργό κέντρο της μυοσφαιρίνης με το CO συναρμοσμένο στον σίδηρο. Σημειώνονται τα κυριότερα αμινοξέα που υπάρχουν στο εγγύς και στο μακρινό περιβάλλον.

Η ομάδα δέσμευσης του οξυγόνου στο εσωτερικό της μυοσφαιρίνης δεν είναι προσβάσιμη για μικρά ligands όπως O₂, CO και NO, αφού η

τρισδιάστατη δομή της δεν έδειξε κάποιο κανάλι το οποίο θα μπορούσαν να ακολουθήσουν τα διατομικά αυτά μόρια για να προσεγγίσουν το σίδηρο της αίμης. Επομένως γίνεται αντιληπτό ότι για να υπάρξει διάχυση των μορίων αυτών μέσα στην πρωτεΐνη πρέπει να προηγηθούν δομικές αλλαγές που να δημιουργούν μεταβατικά κανάλια ώστε τα ligands να εισέρχονται και να εξέρχονται της πρωτεΐνης.

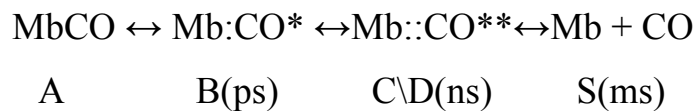
Αρχικά είχε προταθεί από τους Perutz και Matthews η λεγόμενη “Histidine-gate hypothesis” (3) σύμφωνα με την οποία η *distal* ιστοιδίνη (His64, E7) παρέχει μία “πύλη”, εκτελώντας μια περιστροφή της πλευρικής της αλυσίδας, επιτρέποντας έτσι πρόσβαση του υποκαταστάτη στον αιμικό σίδηρο. Αργότερα προτάθηκε με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (4) και πειράματα με μεταλλαγμένες μυσφαιρίνες (5) ότι η δέσμευση των διαφόρων μικρών μορίων στην αίμη είναι μια πύο πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει μεταβατικές δομικές αλλαγές δημιουργώντας εναλλακτικά κανάλια.

Δυναμική φωτοδιάσπασης του CO

Όλοι οι υποκαταστάτες που συναρμόζονται στον αιμικό σίδηρο μπορούν να φωτοδιασπαστούν (6) και η ακολουθούμενη αντίδραση μπορεί να μελετηθεί με χρονικώς εξαρτώμενη φασματοσκοπία. Μετά τη φωτοδιάσπαση σε θερμοκρασία δωματίου, ο υποκαταστάτης παραμένει για πολύ λίγο χρονικό διάστημα παγιδευμένος μέσα στην πρωτεΐνη πριν επανασυνδεθεί στον σίδηρό ή περάσει στον διαλύτη. Από τον διαλύτη η επανασύνδεση γίνεται αργά και ακολουθώντας διμοριακή κινητική. Η ενδομοριακή επανασύνδεση του υποκαταστάτη στον αιμικό σίδηρο (η οποία ονομάζεται *geminate*) εξαρτάται κινητικά από την μετανάστευση του

υποκαταστάτη μέσα στην πρωτεΐνη, δηλαδή από τη διαδρομή που ακολουθεί, και το γεγονός αυτό χρησιμοποιείται για να διερευνηθεί η δυναμική της πρωτεΐνης σε χρόνους από ps μέχρι ms μετά τη φωτόλυση (12-14). Το ποσοστό του φωτοδιασπασμένου υποκαταστάτη που επαναδεσμεύεται ενδομοριακά στη μυοσφαιρίνη είναι 4% (18).

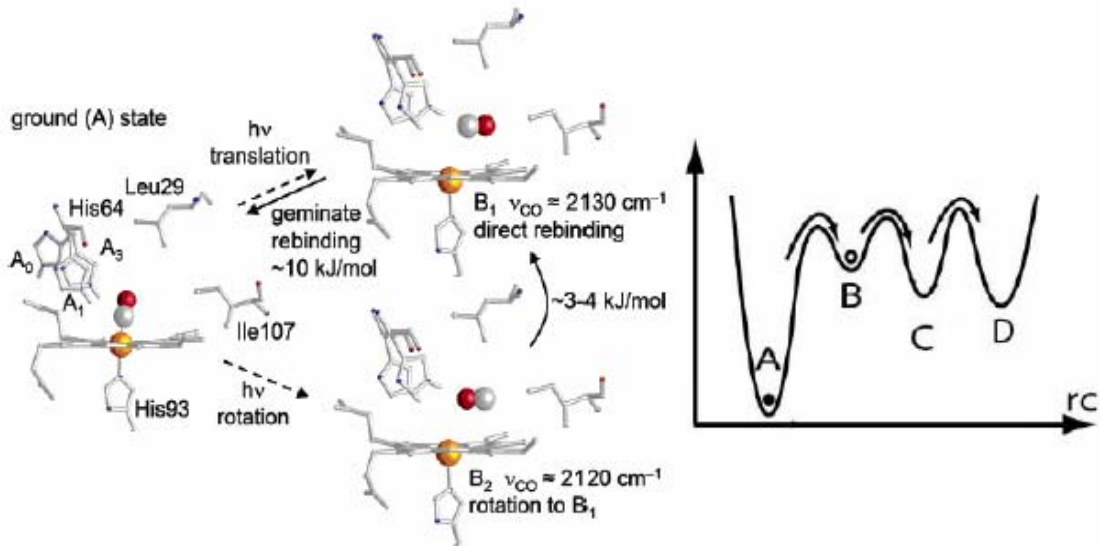
Η αντίδραση που προκαλείται από τη φωτόλυση του δεσμευμένου CO μπορεί να παρασταθεί σχηματικά ως εξής:



Το ελεύθερο αέριο CO απορροφάει στους 2143 cm^{-1} . Στο εσωτερικό της πρωτεΐνης ηλεκτροστατικά πεδία επιδρούν στο δίπολο του CO με αποτέλεσμα να παρατηρείται μετατόπιση στις συχνότητες τις οποίες απορροφάει τόσο το δεσμευμένο ($\sim 1950 \text{ cm}^{-1}$) όσο και το φωτοδιασπασμένο CO ($\sim 2130 \text{ cm}^{-1}$).

Το φωτοδιασπασμένο ligand (CO*) μετακινείται ταχύτατα (μέσα σε 1ps) στο πρωταρχικό *docking site* (B-κατάσταση) που βρίσκεται στο *distal* περιβάλλον της αίμης λαμβάνοντας δύο προσανατολισμούς (B₁ και B₂) που είναι και οι δύο παράλληλοι στο επίπεδο της αίμης (15). Οι Lim et. al. συμπέραναν από τα χρονικώς εξαρτώμενα IR δεδομένα τους ότι το CO* στη B-κατάσταση βρίσκεται παγιδευμένο από την πρωτεΐνη πολύ κοντά στον αιμικό σίδηρο, πάνω από τον πυρολικό δακτύλιο C της αίμης. Ο Anfirud και οι συνεργάτες του ανέφεραν επίσης ότι στην κατάσταση B₁ (2130 cm^{-1}) το οξυγόνο του CO “βλέπει” προς τον αιμικό σίδηρο ενώ στην κατάσταση B₂ (2120 cm^{-1}) το CO υιοθετεί τον αντίθετο προσανατολισμό. Οι Nienhaus et. al. βασιζόμενοι σε πειράματα μετάλλαξης (19), πρότειναν αντίθετους

προσανατολισμούς για τις καταστάσεις B_1 και B_2 . Επίσης η ίδια ομάδα πρότεινε ότι επαναδέσμευση στον αιμικό σίδηρο γίνεται μόνο απο την B_1 κατάσταση και το ενεργειακό φράγμα μετάβασης απο την B_2 στην B_1 είναι 3-4 kJ/mol (20). Παρακάτω φαίνονται σχηματικά (σχημα 3) όσα προαναφέρθηκαν.



σχ.3. σχηματική αναπαράσταση των A-καταστάσεων (δεσμευμένες) και των B-καταστάσεων. Τα άτομα O και C είναι κόκκινο και άσπρο αντίστοιχα. Δεξιά φαίνεται η ενεργειακή επιφάνεια της αντίδρασης. Παρουσιάζονται η δεσμευμένη κατάσταση A, όπως και οι καταστάσεις των φωτοπροϊόντων B, C και D.

Μεγάλη σύγχυση υπάρχει όσον αφορά την εξαγωγή συμπερασμάτων από δεδομένα που αφορούν την ενδομοριακή (*geminate*) επανασύνδεση του CO στην αίμη που λαμβάνει χώρα στο διάστημα από picoseconds μέχρι nanoseconds (C/D-καταστάσεις). Η γενική θεώρηση είναι ότι σε αυτές τις καταστάσεις ο υποκαταστάτης βρίσκεται παγιδευμένος σε νέες και πιο απομακρισμένες κοιλάτες μέσα στην πρωτεΐνη, που καλούνται δευτερεύουσες.

Το 1984 αποκαλύφθηκε η δομή της μυοσφαιρίνης όταν αυτή βρίσκεται σε ισορροπία με αέριο Xe (7) (σχήμα 1). Έτσι παρατηρήθηκε η ύπαρξη τεσσάρων κοιλοτήτων (Xe1-Xe4 – σε σειρά αυξανόμενης συγγένειας προς το Xe) οι οποίες προυπάρχουν στην μυοσφαιρίνη και δεσμεύουν από ένα μόριο Xe. Οι κοιλότητες αυτές είναι κενοί χώροι μέσα στην πρωτεΐνη που προκαλούνται από την αναδίπλωση των ελίκων της (*packing defects*). Έχουν ακτίνα μεγαλύτερη από 1.2Å και περιβάλλονται κυρίως από υδροφοβικά κατάλοιπα. Οι Xe1 και Xe2 είναι σχετικά κοντά στον σίδηρο -και μεταξύ τους- στην *proximal* πλευρά της αίμης. Μερικά από τα κατάλοιπα που περιβάλλουν αυτές τις κοιλότητες είναι τα Leu89, Ala90, His93, Leu104, Phe138 και Ile142. Η Xe3 βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και μακριά από το σίδηρο (13.5Å). Τα κατάλοιπα που την περιβάλλουν είναι τα Ala134 και Gly80. Η Xe4 βρίσκεται από την αντίθετη πλευρά της αίμης (*distal side*) σε έναν χώρο που φράσσεται από τα κατάλοιπα Gly25, Ile28, Leu29, Val68 και Ile107.

Είναι φανερό ότι η συσχέτιση ανάμεσα στη δομή και τη λειτουργία των πρωτεΐνων είναι πρωταρχικής σημασίας. Οι Scott και Gibson έδειξαν τον λειτουργικό ρόλο αυτών των κοιλοτήτων με κινητικές μελέτες (8) σε wild-type και μεταλλαγμένες μυοσφαιρίνες κάνοντας το σημαντικό βήμα της συσχέτισης ανάμεσα στις κοιλότητες δέσμευσης των μορίων Xe και των καναλιών επανασύνδεσης και διαφυγής του υποκαταστάτη. Πιο πρόσφατα, με χρονικώς εξαρτώμενα πειράματα x-ray κρυσταλλογραφίας (9-11) και φασματοσκοπίας (12), δείχθηκε ότι μετά τη φωτόλυση, το CO μεταναστεύει από το *distal* περιβάλλον της αίμης στην Xe1 κοιλότητα που βρίσκεται στην *proximal* μεριά μέσω μιας διαδρομής που περιλαμβάνει το σύνολο των κοιλοτήτων. Έτσι οι Xe1-Xe4 κοιλότητες εμφανίζονται ως “σταθμοί” κατά τη μετανάστευση του ligand μακριά από το ενεργό κέντρο.

Πειράματα προσομοίωσης μοριακής δυναμικής (4,16) οδήγησαν στο χαρακτηρισμό πολλαπλών καναλιών για την διαφυγή του CO από τη μυοσφαιρίνη. Ο υποκαταστάτης βρέθηκε παγιδευμένος για αρκετό χρονικό διάστημα σε διάφορες κοιλότητες μέσα στην πρωτεΐνη, οι οποίες αντιστοιχούν στις θέσεις δέσμευσης του Xe. Μεταφορά του υποκαταστάτη ανάμεσα στις κοιλότητες ή διαφυγή του στο διάλυμα αποδείχθηκε σπάνια και ταχύτατη αφού προϋποθέτει την υπερνίκηση ενεργειακών φραγμάτων. Η διαφυγή από την πρωτεΐνη εμφανίστηκε μέσω διαφόρων διαδρομών, αλλά οι περισσότερες τροχιές περνούν από μια διαδρομή κοντά στην αίμη, την Pe107 (G8) και την Val68 (E11). Σε κάθε περίπτωση μικρές δομικές μεταβατικές αλλαγές αποδεικνύονται ουσιώδεις για την διαφυγή του υποκαταστάτη από την πρωτεΐνη στο διάλυμα.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι συχνότητες στις οποίες έχει ανιχνευτεί το δεσμευμένο και το φωτοδιασπασμένο CO μέσα στη μυοσφαιρίνη, όπως επίσης και οι κοιλότητες στις οποίες αντιστοιχεί η κάθε συχνότητα:

Πίνακας 1

ΔΕΣΜΕΥΜΕΝΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ				
	A ₀	A ₁	A ₃	
$\nu_{CO}(cm^{-1})$	1965	1944	1935	
ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΦΩΤΟΔΙΑΣΠΑΣΗΣ				
	B ₁	B ₂	C/D	
$\nu_{CO}(cm^{-1})$	2131	2118	2120-2130	
location	Πάνω απο τον πυρολλικό δακτυλιο C της αίμης	Πάνω απο τον πυρολλικό δακτυλιο C της αίμης	Xe1/Xe4	

Επίσης, σημαντική συνεισφορά στην διασάφηση της διαδικασίας διαφυγής του CO από τη μυοσφαιρίνη στο διάλυμα υπο φυσιολογικές θερμοκρασίες, έχουν πειράματα που μελετάνε την επίδραση του Xe στην όλη διαδικασία (17). Τα πειράματα αυτά γίνονται με την τεχνική *Transient Grating* η οποία παρέχει απ' ευθείας μέτρηση των αλλαγών στον μοριακό όγκο της πρωτεΐνης. Η προκύπτων ρυθμός διαφυγής του υποκαταστάτη αυξάνεται με την αυξανόμενη πίεση του αερίου Xe. Η εξάρτηση του ρυθμού από την πίεση είναι σύμφωνη με την εξάρτηση του πληθυσμού Xe στην κοιλότητα Xe1. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι όταν ένα άτομο Xe μπλοκάρει την κοιλότητα Xe1, το CO διαφεύγει μέσω άλλης πορείας. Οι Nishihara et. al. έδειξαν ότι ο συνεχής τρόπος με τον οποίο αποδίδεται σχηματικά η αντίδραση που προκαλείται μετά τη φωτόλυση του CO (βλ. παραπάνω) είναι μάλλον απλοικός, τουλάχιστον όσον αφορά την υγρή κατάσταση (Mb διαλυμένη-και όχι σε κρυσταλλική μορφή) και τις

φυσιολογικές θερμοκρασίες. Έτσι προτάθηκε ένα άλλο πιο πολύπλοκο μοντέλο που περιλαμβάνει διακλαδισμένες διαδρομές μεταξύ περισσότερων μεταβατικών ενδιάμεσων.

Αν και η μυοσφαιρίνη είναι η πιο απλή πρωτεΐνη και αποτελεί ερευνητικό αντικείμενο εδώ και πολλές δεκαετίες, πολλά ακόμα παραμένουν ανεξιχνίαστα όσον αφορά τη σχέση μεταξύ δομής και λειτουργίας αυτών των μοριακών μηχανών.

Βιβλιογραφία

1. Kendrew, J. C., R. E. Strandberg, B. E. Hart, R. G. Davies, D. R. Phillips, and V. C. Shore. (1960) *Nature* **185**, 422-427
2. Lubert Stryer, 1988, *Biochemistry*, Freeman, New York, 3rd edition
3. Perutz, M. F., and F. S. Matthews (1966) *J. Mol. Biol.* **21**, 199-202
4. Elber, R., and M. Karplus (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9161-9175
5. Huang, X., and S. G. Boxer (1994) *Nat. Struct. Biol.* **1**, 226-229
6. Gibson, Q. H. & Ainsworth, S. (1957) *Nature* **180**, 1416-1417
7. Tilton, R. F., I. D. Kuntz, and G. A. Petsko (1984) *Biochemistry* **23**, 2849-2857
8. Scott, E. E., and Q. H. Gibson (1997) *Biochemistry* **36**, 11909-11917
9. Bourgeois, D., B. Vallone, F. Schotte, A. Arcovito, A. E. Miele, G. Sciara, M. Wulff, P. Anfinrud, and M. Brunori (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 8704-8709
10. Srajer, V., Z. Ren, T.-Y. Teng, M. Schmidt, T. Ursby, D. Bourgeois, C. Pradervand, W. Schildkamp, M. Wulff, and K. Moffat (2001) *Biochemistry* **40**, 13802-13815
11. Schotte, F., M. Lim, T. A. Jackson, A. V. Smirnov, J. Soman, J. S. Olson, J. G. N. Phillips, M. Wulff, and P. A. Anfinrud (2003) *Science* **300**, 1944-1947
12. Scott, E. E., Q. H. Gibson, and J. S. Olson (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 5177-5188
13. Gibson, Q. H. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 20155-20158

14. Lim, M., Jackson, T. A. & Anfinsen, P. A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 5801-5804
15. Lim, M., Jackson, T. A. & Anfinsen, P. A. (1997) *Nat. Struct. Biol.* **4**, 209
16. Elber, R., Roitberg, A., Simmerling, C., Goldstein, R., Li, H., Verkhivker, G., Keiser, C., Zhang, J., Ulitsky, A. (1995) *Comput. Phys. Comm.* **91**, 159
17. Nishihara, Y., Sakakura, M., Kimura, Y., Terazima, M. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11877-11888
18. Henry, E. R., Sommer, J. H., Hofrichter, J., Eaton, W. A. (1983) *J. Mol. Biol.* **166**, 443
19. Nienhaus, K., Deng, P., Olson, J. S., Warren, J. J., Nienhaus, G. U. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 42532-42544
20. Nienhaus, K., Olson, J. S., Franzen, S., Nienhaus, G. U. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 40-41

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Η κυτοχρωμική *c* οξειδάση *caa₃* από το *Thermus
Thermophilus*

Εισαγωγή

Η κυτοχρωμική οξειδάση είναι το τελικό μεμβρανικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο της αναπνευστικής αλυσίδας στου ευκαρυωτικούς αλλά και προκαρυωτικούς αερόβιους οργανισμούς. Ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας, τα οποία προέρχονται απο την τροφή, διασχίζουν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων σε μία σειρά οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, με τελικό αποδέκτη το μοριακό οξυγόνο, το οποίο ανάγεται σε νερό. Η κυτοχρωμική οξειδάση είναι το ένζυμο που καταλύει αυτή την αντίδραση.

Τα αναπνευστικά συγκροτήματα όπως οι κυτοχρωμικές οξειδάσες, βρίσκονται, στην περίπτωση των ευκαρυωτικών κυττάρων μέσα στη εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και στα προκαρυωτικά κύτταρα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η ελεύθερη ενέργεια που εκλείεται απο τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις κατά τη διαδικασία της μεταφοράς ηλεκτρονίων συζεύγνεται με τη δημιουργία ηλεκτροχημικού δυναμικού κατά μήκος της μεμβράνης που τελικά χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του ATP. Με άλλα λόγια, τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας συζεύγνουν την μεταφορά ηλεκτρονίων από υψηλό σε χαμηλό δυναμικό με τη άντληση πρωτονίων από την μιτοχονδριακή μήτρα προς την εξωτερική πλευρα της μεμβράνης. Στη συνέχεια η ATP συνθάση αξιοποιεί την διαφορά δυναμικού που έχει δημιουργηθεί, καταλύοντας τη σύνθεση του ATP και οδηγώντας τα πρωτόνια πίσω στη μήτρα.

Στο τελευταίο στάδιο της αλυσίδας η κυτοχρωμική οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων απο το κυτόχρωμα *c* στο μοριακό οξυγόνο ανάγοντάς το σε νερό σύμφωνα με την αντίδραση:



Εκτός από τα πρότνια που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό του νερού (4H^+), αντλούνται επιπλέον τέσσερα πρωτόνια – που χαρακτηρίζονται scalar – ($4\text{H}_{\text{in}}^+ \rightarrow 4\text{H}_{\text{out}}^+$) αυξάνοντας ακόμα περισσότερο την διαμεμβρανική διαβάθμιση H^+ . Οι κυτοχρωμικές οξειδάσες έτσι συμβάλλουν στην δημιουργία του ηλεκτροχημικού δυναμικού της μεμβράνης και επομένως στη διατήρηση της ενέργειας στο κύτταρο.

Η οικογένεια των κυτοχρωμικών οξειδασών περιλαμβάνει μέλη τα οποία μπορεί να διαφέρουν ως προς τον τύπο των αιμών τις οποίες περιέχουν και στον αριθμο των υπομονάδων τους αλλά παρουσιάζουν και πολλές δομικές ομοιότητες. Η υπομονάδα I που διατηρείται σε όλες τις κυτοχρωμικές οξειδάσες περιέχει μια αίμη χαμηλού spin, όπως επίσης και το ενεργό κέντρο του ενζύμου, όπου λαμβάνει χώρα η αναγωγή του O_2 , ένα διπυρινικό κέντρο που αποτελείται απο μία αίμη υψηλού spin και ένα άτομο χαλκού (Cu_B). Η αίμη χαμηλού spin έχει αριθμο συναρμογής έξι και συναρμόζεται με δύο κατάλοιπα ιστιδίνης His I-94 και His I-413 (σύμφωνα με την αρίθμηση του κυτοχρώματος aa_3 από το *P. Denitrificans*).⁽¹⁾

Δομή οξειδασών

Η δομή της μιτοχονδριακής κυτοχρωμικής οξειδάσης από καρδιά βοδιού (2-4), όπως επίσης και των κυτοχρωμάτων aa_3 από το βακτήριο εδάφους *Paracoccus Denitrificans* (1) και ba_3 από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus Thermophilus* (5), προσδιορίστηκαν τα τελευταία χρόνια με την μέθοδο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X, προσφέροντας μοναδικές πληροφορίες για τα δομικά χαρακτηριστικά των ενζύμων της οικογένειας των τελικών οξειδασών. Μία από τις δομικές διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στην μιτοχονδριακή κυτοχρωμική οξειδάση και στα βακτηριακά

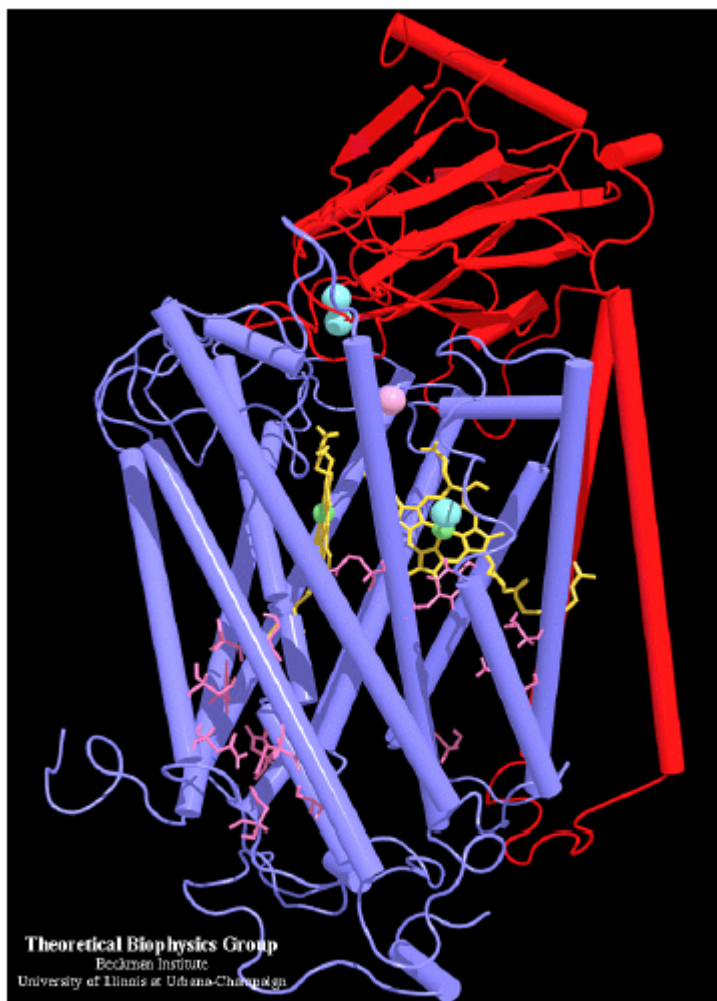
ένζυμα εντοπίζεται στον αριθμό των υπομονάδων που περιέχουν (13 και 3-4 υπομονάδες αντίστοιχα) καθιστώντας τις βακτηριακές οξειδάσες απλούστερες δομικά. Παρά, όμως, τη μεγάλη απόσταση που χωρίζει εξελικτικά τους ευκαρυωτικούς από τους προκαρυωτικούς οργανισμούς, οι τρισδιάστατες δομές δείχνουν ότι οι υπομονάδες I και II εμφανίζουν κοινά χαρακτηριστικά σε όλες τις κυτοχρωμικές οξειδάσες (6). Η οικογένεια των τελικών αιμοχαλκοξειδασών χαρακτηρίζεται από την παρουσία, στην υπομονάδα I, μίας low-spin αίμης της οποίας όλες οι θέσεις συναρμογής είναι συμπληρωμένες, και ένα μοναδικό διμεταλικό κέντρο που αποτελείται από μία υψηλού spin αίμη και ένα άτομο χαλκού Cu_B . Η αίμη χαμηλού spin είναι ο δότης ηλεκτρονίων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, όπου λαμβάνει χώρα η καταλυτική αντίδραση.

Παρακάτω θα αναφερθεί η δόμη της μιτοχονδριακής κυτοχρωμικής οξειδάσης από καρδιά βοδιού, όπως αποκαλύφθηκε από την τρισδιάστατη κρυσταλλική δομή, όπως επίσης και μερικά ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της caa_3 κυτοχρωμικής οξειδάσης από το βακτήριο *Thermus Thermophilus*.

Δομή της aa_3

Η μιτοχονδριακή κυτοχρωμική οξειδάση από καρδιά βοδιού (σχήμα 1) είναι ένα σύμπλοκο 13 υπομονάδων (2-4). Όταν η δομή παρατηρείται κάθετα στη μεμβράνη, το σύνολο των υπομονάδων I, II και III φαίνεται να σχηματίζει ένα τραπέζιο ύψους 55 Å και πλάτους 90 Å προς την εσωτερική πλευρά της μεμβράνης και περίπου 75 Å προς την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης. Η υπομονάδα I είναι κυλινδρική και καταλαμβάνει το κεντρικό μέρος του ενζύμου. Οι υπομονάδες II και III συνδέονται με την υπομονάδα I, αλλά δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.

Η υπομονάδα III υπάρχει σε όλες τις κυτοχρωμικές οξειδάσες, αλλά είναι άγνωστη η λειτουργία της. Από όσα γνωρίζουμε δε φαίνεται να σχετίζεται με τη δέσμευση των οξειδοαναγωγικών κέντρων ή το μηχανισμό της μετατόπισης των πρωτονίων, εφόσον το υποσύμπλοκο που αποτελείται αποκλειστικά από τις υπομονάδες I και II απομονώνεται και είναι πλήρως ενεργό. Έχει προταθεί ότι η υπομονάδα III σχηματίζει την είσοδο ενός καναλιού μεταφοράς του O₂ στο διπυρηνικό κέντρο (3). Επίσης είναι πιθανό να έχει και δομικό ρόλο συμβάλλοντας στη συγκρότηση της πρωτεΐνης. Η υπομονάδα II (Σχήμα 1 - κόκκινο) αποτελείται από δυο διαμεμβρανικές έλικες και μια μεγάλη σφαιρική υδατοδιαλυτή περιοχή, το καρβοξυτελικό άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, το οποίο βρίσκεται πάνω από την υπομονάδα I στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης (3,11). Αυτή η περιοχή συγκρατεί το Cu_A, ο οποίος βρίσκεται μόλις 7 Å μακριά από το κοντινότερο σημείο της επιφάνειας της υδατοδιαλυτής περιοχής. Σε συμφωνία με προηγούμενες EPR μελέτες, οι δομές του ενζύμου έδειξε ότι ο Cu_A είναι ουσιαστικά ένα διπυρηνικό κέντρο χαλκού μικτού σθένους, της μορφής Cu_A^{1.5+} - Cu_A^{1.5+}. Τα δύο ιόντα του χαλκού απέχουν μεταξύ τους 2.5 Å και συνδέονται με δύο γέφυρες θείου δύο κυστεινών (Cys200, Cys196). Δύο επιπλέον υποκαταστάτες υπάρχουν σε κάθε χαλκό, ο Cu_{A1} συνδέεται με μια ιστοιδίνη (His161) και μια μεθειονίνη (Met207), ενώ ο Cu_{A2} ενώνεται με ένα γλουταμινικό οξύ (Glu198) και μια ιστοιδίνη (His204). Κάθε ιόν χαλκού σχηματίζει ένα παραμορφωμένο τετραεδρικό σύμπλοκο, έτσι ώστε τα δύο ιόντα χαλκού και τα δύο άτομα του θείου που τα συνδέουν να βρίσκονται όλα στο ίδιο επίπεδο.



σχ.1. Κρυσταλλική δομή της κυτοχρωμικής οξειδάσης απο καρδιά βοδιού.

Η υπομονάδα I (Σχήμα 1 - γαλάζιο) είναι η μεγαλύτερη και η καλύτερα διατηρημένη πολυπεπτιδική αλυσίδα στις τελικές οξειδάσες. Αποτελείται απο 12 διαμεμβρανικές έλικες και περιέχει τα υπόλοιπα τρία οξειδοαναγωγικά κέντρα (3,11). Όταν παρατηρείται από την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης, οι 12 έλικες φαίνεται να σχηματίζουν ανα 4 ένα ημικύκλιο, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται τρεις πόροι, οι A, B, C. Ο πόρος A φράσσεται απο τα υψηλά διατηρημένα αρωματικά αμινοξέα.

Αντίθετα ο πόρος B περιέχει την αίμη α_3 και το Cu_B , ενώ ο πόρος C περικλείει την αίμη α . Τα τρία οξειδοαναγωγικά κέντρα βρίσκονται περίπου περίπου 13 Å κάτω από την εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης (θετική πλευρά) και 30 Å πάνω από την εσωτερική επιφάνεια (αρνητική πλευρά). Έτσι αποφεύγεται η απελευθέρωση, από το ενεργό κέντρο στο κύτταρο, μερικώς ανηγμένων τοξικών ενδιάμεσων οξυγόνου.

Τα επίπεδα της αίμης α και της α_3 σχεδόν κάθετα στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης, αλλά οι δύο αίμες δεν είναι παράλληλες μεταξύ τους. Δεσμευμένες στην ίδια έλικα και με τις προπιονικές τους ομάδες να κατευθύνονται προς την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης, οι δύο αίμες σχηματίζουν μεταξύ τους γωνία 104°. Η απόσταση μεταξύ των δύο ιόντων σιδήρου είναι 14 Å, ενώ οι προπιονικές ομάδες πλησιάζουν μεταξύ τους μέχρι τα 4.5 Å. Η χαμηλού σπιν αίμη α έχει δύο αξονικά ligands ιστιδίνης, τις His61, His378 της υπομονάδας I. Η φαρνεσυλική αλυσίδα της αίμης κατευθύνεται προς τη μιτοχονδριακή μήτρα (το κυτταροπλασμα) παραμένοντας στον πόρο C. Έτσι, μαζί με τα γειτονικά υδροφοβικά κατάλοιπα, η φαρνεσυλική αλυσίδα εμποδίζει την πρόσβαση της αίμης α στη μιτοχονδριακή μήτρα ή το κυτταρόπλασμα. Η αίμη α είναι πιθανό να συνδέεται με το Cu_A , μέσω ενός δικτύου δεσμών υδρογόνου, το οποίο σχηματίζεται από την His240 του Cu_A , τον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ Arg438 και Arg439 της υπομονάδας I και μια από τις προπιονικές ομάδες (3).

Η υψηλού σπιν αίμη α_3 (σχήμα 2) έχει ένα μόνο αξονικό υποκαταστάτη ιστιδίνης, τη His376, η οποία βρίσκεται στην ίδια έλικα με τη His378 της αίμης α (2-4,11). Η His376 αναφέρεται ως *proximal* ιστιδίνη και σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την πεπτιδική καρβονυλική ομάδα της Cly351 (2). Η ισχύς του δεσμού αυτού αναμένεται να επηρεάζει τις

Τα έξι κατάλοιπα ιστιδίνης με τα οποία συναρμόζονται οι δύο ομάδες αίμης και ο Cu_B , διατηρούνται σε υψηλό βαθμό μεταξύ των αιμοχαλκοοξειδασών και αποτελούν το δεύτερο κριτήριο ορισμού αυτής της οικογένειας

Η Tyr244 (Y244) είναι επίσης ένα από τα πλέον διατηρημένα αμινοξέα στην οικογένεια των αιμοχαλκοοξειδασών και βρίσκεται μόλις 3.2 Å μακριά από τον Fe της αίμης α_3 (2-4,11). Οι κρυσταλλικές δομές της κυτοχρωμικής οξειδάσης δείχνουν ότι η Tyr244 συνδέεται με τη His240 του Cu_B μέσω ενός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του C της Tyr244 και του N της His240 (σχήμα 2) (4,11). Η ύπαρξη του ομοιοπολικού δεσμού μειώνει σημαντικά το pK_a της Tyr244, η οποία επίσης αλληλεπιδρά με τη φαρνεσυλική αλυσίδα της αίμης α_3 σχηματίζοντας ένα δεσμό υδρογόνου με την υδροξυλική της ομάδα OH. Η φαινολική ομάδα της Tyr244 είναι διευθετημένη με τέτοιο τρόπο ώστε η υδροξυλική ομάδα OH να κατευθύνεται προς το διπυρηνικό κέντρο στο οποίο γίνεται η δέσμευση του O_2 . Λόγω της θέσης της Tyr244, στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, αλλά και τού μοναδικού για τη βιολογία δεσμού που σχηματίζει με την His240 έχει προταθεί ότι η Tyr244 είναι ο δότης ενός επιπλέον ηλεκτρονίου που απαιτείται για την ενεργοποίηση και την αναγωγή του O_2 από την κυτοχρωμική οξειδάση (14).

Η αντίδραση της κυτοχρωμικής οξειδάσης με το O_2

Πολλές φασματοσκοπικές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό των ενδιάμεσων κατά τη διάρκεια της ανάγωγής του μοριακού οξυγόνου σε νερό, από την κυτοχρωμική οξειδάση. Η αναγωγή του O_2 συζεύγνυται με τη μεταφορά τεσσάρων πρωτονίων δια

μήκους της μεμβράνης (15). Ο καταλυτικός κύκλος περιγράφεται συχνά σαν μια σειρά καταστάσεων του διπυρρινικού κέντρου αίμης $a_3 - Cu_B$, όπου δεσμεύεται το οξυγόνο (16). Το οξυγόνο λαμβάνει ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα c μέσω των μεταλλικών κέντρων Cu_A και αίμης a (17).

Αρχικά έχουμε δέσμευση του O_2 στο Cu_B^{1+} σχηματίζοντας το σύμπλοκο $Cu_B^{1+}-O_2$ και στη συνέχεια μεταφορά του O_2 στο $Fe_{a_3}^{+2}$ σχηματίζοντας το πρώτο ενδιάμεσο της χημείας οξυγόνου το ονομαζόμενο ως όξυ ενδιάμεσο ($Fe_{a_3}^{+2}-O_2$). Με μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στο οξυγόνο έχουμε τα περόξυ ενδιάμεσα ($Fe_{a_3}^{+3}-O^-O^-$ και $Fe_{a_3}^{+3}-O^-OH$). Έπειτα με τη συμμετοχή ενός ακόμα ηλεκτρονίου σχάζεται ο δεσμός O-O και προκύπτει το φέρρυλ ενδιάμεσο ($Fe_{a_3}^{+4}=O$) το οποίο υπάρχει σε δύο φασματοσκοπικά ξεχωριστές δομές, την P και την F . Η P μορφή, η οποία απορροφάει στα 607nm, εμφανίζεται αρχικά και στη συνέχεια η F μορφή που απορροφάει στα 580nm. Πειράματα προσωμοίωσης μοριακής δυναμικής (18) έδειξαν ότι οι διαφορές στις απορροφήσεις του φέρρυλ ενδιάμεσου οφείλονται σε επαναδιοργάνωση της πρωτεΐνης, από το P στο F , γύρω από το ενεργό κέντρο που προκαλούνται από το *distal* περιβάλλον της αίμης. Εν συνεχεία, με τη μεταφορά ενός ακόμα ηλεκτρονίου στο διπυρρινικό κέντρο, σχηματίζεται η υδρόξυ μορφή ($Fe_{a_3}^{+3}-O^-H$) και με τη μεταφορά πρωτονίων ο κύκλος ολοκληρώνεται και το ένζυμο επιστρέφει στην ανηγμένη του μορφή.

Η κυτοχρωμική οξειδάση *caa3* από το βακτήριο *Thermus Thermophilus*

Υπό περιορισμένη ποσότητα οξυγόνου το εξαιρετικά θερμοφιλο Gram-αρνητικό βακτήριο *Thermus Thermophilus* εκφράζει δύο διαφορετικά κυτοχρωματά, το *caa3* και το *ba3* (7), ως τελικές οξειδάσες που καταλύουν

την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό. Όπως αναφέρθηκε, η κρυσταλλική δομή του ba_3 έχει γίνει γνώστη (8) ενώ το κυτόχρωμα caa_3 δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Η caa_3 -οξειδάση περιέχει ανάλογες κεντρικές υπομονάδες με την ευκαριωτική μιτοχονδριακή κυτοχρωμική οξειδάση aa_3 (9), περιλαμβάνοντας και μία αίμη τύπου c , η οποία είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την πρωτεΐνη, κάτι που έχει βρεθεί για ελάχιστα άλλα βακτήρια (10). Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι το ένζυμο αυτό αποτελείται από δύο συνδεδεμένες πρωτεΐνες. Η μικρότερη πρωτεΐνη αποτελείται από την τυπική για την οικογένεια των οξειδασών υπομονάδα II που περιέχει το μικτού σθένους ομοπυρηνικό κέντρο χαλκού [$CuA^{1.5+}$ - $CuA^{1.5+}$] που συνδέεται απευθείας με το κυτόχρωμα c . Η μεγαλύτερη πρωτεΐνη περιέχει την υπομονάδα I με τις αίμες a , a_3 και το κέντρο του Cu_B , και την υπομονάδα III.

Βιβλιογραφία

1. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., Michel, H. (1995) *Nature* **376**, 660-669
2. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1995) *Science* **269**, 1069-1074
3. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1996) *Science* **272**, 1136-1144
4. Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T., and Tsukihara, T. (1998) *Science* **280**, 1723-1729
5. Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R., Than, M. E. (2000) *EMBO J.* **19**, 1766-1776
6. Pereira, M.M., Santana, M., Texeira, M. (2001) *Biochimica et Biophysica Acta* **1505** 185-208
7. Than, M. E. and Soulimane, T. (2001) in *Handbook of Metalloproteins* (Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T., and Wieghardt, K., eds) pp 363-378, Wiley, Chichester
8. Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R., and Than, M. E. (2000) *EMBO J.* **19**, 1766-1776
9. Hellwig, P., Soulimane, T. and Mantele, W. (2002) *Eur. J. Biochem.* **269**, 4830-4838
10. Pereira, M.M., Verkhovskaya, M.L., Texeira, M. and Verkhovsky, M.I. (2000) *Biochemistry* **39**, 6336-6340
11. Ostermeier, C.; Harrenga, A.; Ermler, U.; Michel, H. (1997) *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 10547-10553.

12. Van Gelder, B. F., Beinert, H. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* **189**, 1-24
13. Fan, Y. C., Acmed, L., Blackburn, N. J., Boswell, J. S., Verkhovskaya, M. L., Hoffman, B. M., Wikstrom, M. (1995) *Biochemistry* **34**, 10245-10255
14. Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A. & Babcock G. T. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 8020-802
15. Wikstrom, M. (1977) *Nature* **266**, 271-273
16. Bloch, D., Belevich, I., Jasaitis, A., Ribacka, C., Puustinen, A., Verkhovsky, I. M. and Wikstrom, M. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 529-533
17. Babcock, G. T., Wikstrom, M., (1992) *Nature (London)* **356**, 301
18. Daskalakis, V.,

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Δονητική Φασματοσκοπία και lasers

Γενικά

Η αλληλεπίδραση του φωτός με τα μόρια υπόκειται σε διάφορους περιορισμούς. Το μήκος κύματος της προσπίπτουσας δέσμης φωτός στο μόριο καθορίζει, γενικά, το είδος της διέγερσης που θα προκληθεί. Έτσι ένα μόριο μπορεί να διεγερθεί περιστροφικά, δονητικά ή ηλεκτρονικά, σε σειρά αυξανόμενης ενέργειας της προσπιπτουσας ακτινοβολίας.

Δίνοντας σε ένα μόριο αρκετή ενέργεια ώστε να προκληθεί ηλεκτρονική διέγερση, προκαλούμε ταυτόχρονα και δονητικές διεγέρσεις, αφού αυτές είναι μικρότερης ενέργειας. Αν η διέγερση είναι δονητική, προκαλούνται ταυτόχρονα και διεγέρσεις περιστροφικών βαθμών ελευθερίας.

Δονητική φασματοσκοπία

Ένα μόριο απορροφά IR ακτινοβολία όταν η ενέργεια της προσπίπτουσας ακτινοβολίας συμπίπτει με την ενέργεια μια μετάβασης του μορίου μεταξύ δύο δονητικών επιπέδων της βασικής ηλεκτρονικής κατάστασης. Η απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από ένα μόριο καθίσταται δυνατή όταν υπάρχει αλλαγή στη διπολική ροπή που χαρακτηρίζει ένα συγκεκριμένο τρόπο δόνησης. Δηλαδή το μόριο πρέπει να περιέχει ένα δίπολο το οποίο να δονείται με συχνότητα ίση με τη συχνότητα του παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η μόνιμη διπολική ροπή δίνεται από τη σχέση

$$\mu_o = e x r \quad (1)$$

όπου e το φορτίο, και r η απόσταση που χωρίζει τα θετικά από τα αρνητικά φορτία. Με άλλα λόγια η πιθανότητα της δονητικής μεταβασης σε ένα μόριο και συνεπώς η ένταση της ταινίας στο φάσμα εξαρτάται από την αλλαγή της διπολικής ροπής που συμβαίνει στο μόριο κατά τη μετάβαση αυτή.

Ο αρμονικός ταλαντωτής

Μία δόνηση ενός διατομικού μορίου μπορεί να αναπαρασταθεί με το κλασικό μοντέλο του αρμονικού ταλαντωτή. Θεωρούμε το σύστημα ως δύο σφαίρες (άτομα) οι οποίες συνδέονται με ένα ελατήριο. Για μικρές παραμορφώσεις ο νόμος του *Hooke* μας δίνει:

$$F = -dV(x)/dx = -kx \quad (2)$$

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. Ολοκληρώνοντας παίρνουμε:

$$V(x) = (1/2)kx^2 \quad (3)$$

το σχήμα της οποίας είναι η γνωστή παραβολή.

Η κβαντομηχανική χαμιλτωνειανή για αρμονικό ταλαντωτή μίας διάστασης δίνεται από την εξίσωση:

$$H = -(\hbar^2/2\mu)(d^2/dx^2) + (1/2)kx^2 \quad (4)$$

όπου μ η ανηγμένη μάζα των πυρήνων. Από την παραπάνω η εξίσωση του *Schrodinger* γίνεται:

$$(d^2\Psi_v/dx^2)+[(2\mu E_v/\hbar^2)-(\mu kx^2/\hbar^2)]\Psi_v=0 \quad (5)$$

Λύνοντας την προηγούμενη παίρνουμε:

$$E_v=h\nu(v+1/2) \quad (6)$$

όπου ν η κλασική συχνότητα δόνησης:

$$\nu=(1/2\pi)(k/\mu)^{1/2} \quad (7)$$

Η παραπάνω εξίσωση δείχνει ότι τα δονητικά επίπεδα ισαπέχουν ενεργειακά κατά $h\nu$ και ότι το επίπεδο με $\nu = 0$ έχει ενέργεια $1/2h\nu$, γνωστή σαν ενέργεια μηδενικού σημείου. Μικρότερη τιμή από αυτή δεν μπορεί να πάρει ακόμα και σε θερμοκρασία 0 K λόγω της αρχής της απροσδιοριστίας του *Heisenberg*.

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 μάζα και επομένως το k δεν αλλάζει κατά την ισοτοπική αντικατάσταση.

Υπέρυθρο φάσμα

Η διπολική ροπή μετάβασης για μία μετάπτωση από το n στο m δονητικό επίπεδο με δονητικές κυματοσυναρτήσεις Ψ'' και Ψ' αντίστοιχα, δίνεται από την σχέση:

$$R = \int \Psi' * \mu \Psi'' dx \quad (8)$$

όπου x είναι η μετατόπιση της διαπυρηνικής απόστασης από την ισορροπία και μ η διπολική ροπή του μορίου στη βασική ηλεκτρονική κατάσταση. Η διπολική ροπή είναι μηδέν για ομοπυρηνικά διατομικά μόρια δίνοντας και $R = 0$ με αποτέλεσμα όλες οι δονητικές μεταβάσεις να είναι απαγορευμένες. Για ένα ετεροπυρηνικό μόριο η μ δεν είναι μηδέν και εξαρτάται από το x . Αυτή η μεταβολή μπορεί να εκφραστεί σαν μία σειρά *Taylor*:

$$\mu = \mu_e + (d\mu/dx)_e x + (1/2!)(d^2\mu/dx^2)_e x^2 \dots \quad (9)$$

όπου το e αναφέρεται στην διαμόρφωση ισορροπίας. Η ροπή μετάβασης τώρα γίνεται:

$$R_v = \mu_e \int \Psi_v' * \Psi_v'' dx + (d\mu/dx)_e \int \Psi_v' * x \Psi_v'' dx + \dots \quad (10)$$

Αφού οι Ψ' και Ψ'' είναι ιδιοσυναρτήσεις της ίδιας χαμιλτωνειανής είναι ορθογώνιες, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι όταν $v' \neq v''$:

$$\int \Psi_v' * \Psi_v'' dx = 0 \quad (11)$$

Οπότε ο πρώτος όρος μηδενίζεται και η εξίσωση γίνεται:

$$R_v = (d\mu/dx)_e \int \Psi_v' * x \Psi_v'' dx + \dots \quad (12)$$

Η διπολική ροπή μεταβασης είναι μη μηδενική μόνο αν το μ εξαρτάται από τη μετατόπιση x . Επομένως, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, μία δόνηση είναι ενεργή στο IR αν η διπολική ροπή μεταβάλλεται.

Ο όρος $(d\mu/dx)_e$ είναι μη μηδενικός μόνο αν:

$$\Delta v = \pm 1 \quad (13)$$

Η παραπάνω σχέση αποτελεί τον *δονητικό κανόνα επιλογής*.

Αν το παρατηρούμενο φάσμα είναι απορρόφηση, οι εντάσεις των μεταβάσεων μειώνονται καθώς το ν'' αυξάνεται λόγω της κατανομής *Boltzmann* που δίνει:

$$N_v/N_0 = \exp(-E_v/kT) \quad (14)$$

Οι εντάσεις των μεταβάσεων είναι ανάλογες του R_v^2 και του $(d\mu/dx)_e^2$.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι φασματικοί κανόνες επιλογής λένε μόνο αν μία μετάβαση μπορεί να συμβεί και δεν λένε τίποτα για την ένταση της η οποία μπορεί να είναι μηδέν ή πολύ μικρή.

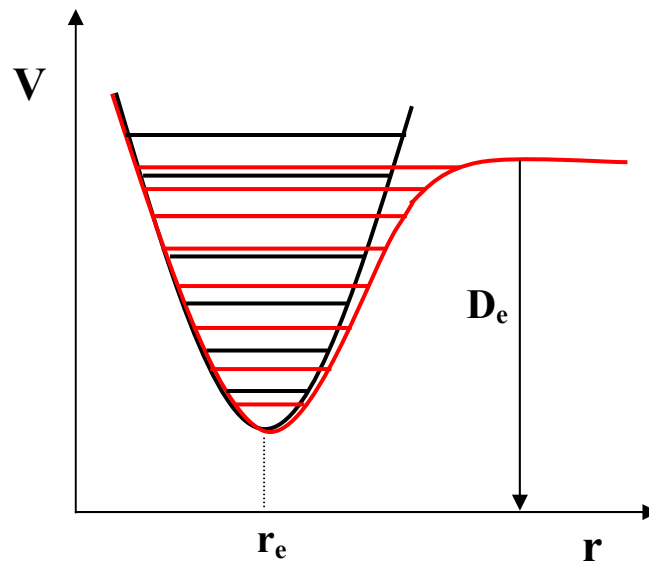
Ηλεκτρική αναρμονικότητα

Η εξίσωση (9) περιλαμβάνει όρους του x υψωμένους στη δεύτερη ή και σε μεγαλύτερη δύναμη. Αν η έκφραση της διπολικής ροπής ήταν γραμμική ως προς το x , η μεταβολή της θα ήταν αρμονική ως προς αυτή την παράμετρο. Η επίδραση των υψηλοτέρων όρων είναι γνωστή σαν αναρμονικότητα. Επειδή σχετίζεται με τις ηλεκτρικές ιδιότητες του μορίου ονομάζεται *ηλεκτρική αναρμονικότητα*. Ένα αποτέλεσμα της είναι να μετασχηματίζει τον δονητικό κανόνα επιλογής από $\Delta v = \pm 1$ σε $\Delta v = \pm 1$,

$\pm 2, \pm 3, \dots$. Όμως επειδή η ηλεκτρική αναρμονικότητα είναι συνήθως μικρή, η επίδραση της έγκειται σε μικρή μόνο συνεισφορά στις εντάσεις των $\Delta n = \pm 2, \pm 3, \dots$ μεταβάσεων οι οποίες είναι γνωστές σαν *αρμονικές δονήσεις*.

Μηχανική αναρμονικότητα

Όπως η ηλεκτρική συμπεριφορά ενός διατομικού μορίου δεν είναι ακριβώς αρμονική, έτσι και η μηχανική παρουσιάζει αποκλίσεις από αυτή. Η συνάρτηση δυναμικού, τα δονητικά ενεργειακά επίπεδα και οι κυματοσυναρτήσεις προήλθαν από την υπόθεση ότι οι δονητικές κινήσεις υπακούουν στον νόμο του *Hooke*, αλλά αυτή η υπόθεση είναι έγκυρη μόνο όταν το r δεν διαφέρει πολύ από το r_e . Σε μεγάλες τιμές r ξέρουμε ότι το μόριο διασπάται και σχηματίζονται άτομα τα οποία δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Τότε η σταθερά δύναμης είναι μηδέν και το r μπορεί να αυξηθεί χωρίς περαιτέρω αλλαγή της δυναμικής ενέργειας V . Αυτή η συμπεριφορά δεν προβλέπεται από το νόμο του *Hooke*. Η καμπύλη της δυναμικής ενέργειας γίνεται επίπεδη όταν $V = D_e$, όπου D_e η ενέργεια διάσπασης, όπως φάνεται στο παρακάτω σχήμα. Με μαύρο παρουσιάζεται η καμπύλη δυναμικής ενέργειας του αρμονικού ταλαντωτή όπως αυτή περιγράφεται από το νόμο του *Hooke*, ενώ με κόκκινο η καμπύλη του αναρμονικού ταλαντωτή.



σχ.1. καμπύλη δυναμικής ενέργειας του αρμονικού ταλαντωτή (μαύρο) και του αναρμονικού ταλαντωτή (κόκκινο)

Καθώς αυξάνεται η ενέργεια, η σταθερά δύναμης τείνει προς το μηδέν και ο δεσμός γίνεται ασθενέστερος. Σε μικρές τιμές r τα θετικά φορτία των δύο πυρήνων προκαλούν αμοιβαία άπωση. Συγκριτικά, η καμπύλη του αρμονικού ταλαντωτή είναι στενότερη από αυτή του αναρμονικού, όπως φαίνεται στο σχήμα και οι παρατηρούμενες αποκλίσεις οφείλονται στην *μηχανική αναρμονικότητα*.

Μία επίδραση της μηχανικής αναρμονικότητας είναι ότι ο κανόνας επιλογής $\Delta n = \pm 1$ μετατρέπεται στον $\Delta n = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$, αλλά οι αρμονικές μεταβάσεις είναι συνήθως ασθενέστερες σε σχέση με τις βασικές. Αφού και η μηχανική αναρμονικότητα έχει την ίδια επίδραση με την ηλεκτρική και τα δύο είδη αναρμονικότητας συνεισφέρουν στις εντάσεις των αρμονικών μεταβάσεων.

Η μηχανική αναρμονικότητα σε αντίθεση με την ηλεκτρική επηρεάζει και τις τιμές των δονητικών όρων όπως και τις κυματοσυναρτήσεις. Οι τιμές των όρων του αρμονικού ταλαντωτή δίνονται τώρα από μία σειρά:

$$G(v) = \omega_e(v + 1/2) - \omega_e x_e(v + 1/2)^2 + \omega_e y_e(v + 1/2)^3 + \dots \quad (15)$$

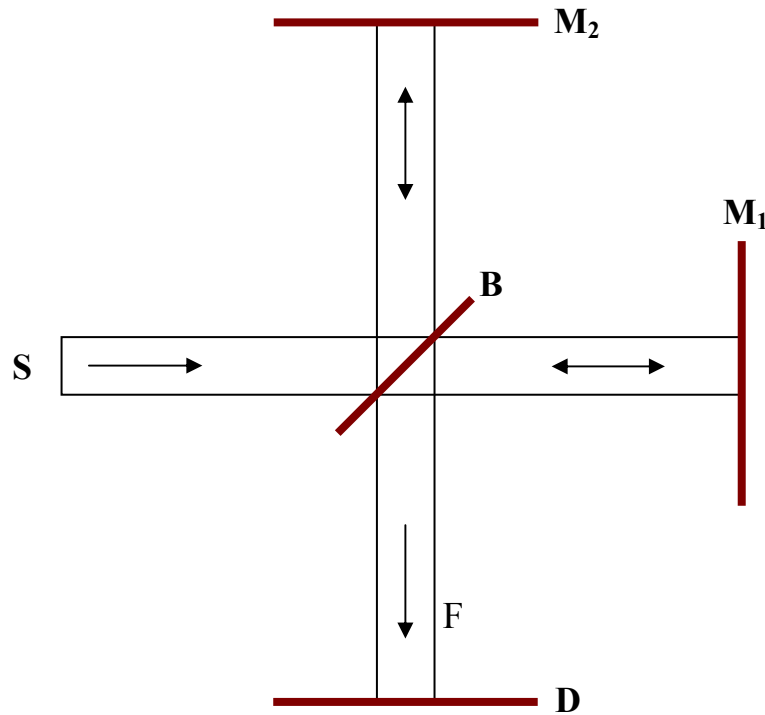
όπου ω_e είναι ο δονητικός κυματαριθμός του ταλαντωτή και $\omega_e x_e$, $\omega_e y_e$ αναρμονικές σταθερές. Η πρώτη από αυτές τις σταθερές έχει σαν αποτέλεσμα τα ενεργειακά επίπεδα να πλησιάζουν καθώς αυξάνεται το v , σε αντίθεση με τον αρμονικό ταλαντωτή όπου ισαπέχουν. Τα επίπεδα του αναρμονικού ταλαντωτή στο όριο διάσπασης συγκλίνουν, μετά το οποίο υπάρχει μία συνέχεια επιπέδων.

Φασματοφωτόμετρο FT-IR

Τα δονητικά φάσματα λαμβάνονται με ένα φασματοφωτόμετρο FT-IR. Αυτό έχει ως βάση λειτουργίας το συμβολόμετρο Michelson, το οποίο χρησιμοποιείται για να δημιουργηθεί ένα συμβολογράφημα. Μαθηματική επεξεργασία του συμβολογραφήματος δίνει το φάσμα απορρόφησης IR. Η λειτουργία του συμβολομέτρου συνίσταται στον διαχωρισμό μιας δέσμης ακτινοβολίας σε δύο μέρη και στον επανασυνδιασμό των δεσμών αφού πρώτα εισαχθεί μια διαφορά διαδρομής. Έτσι, δημιουργείται μία συνθήκη κάτω από την οποία μπορεί να επιτευχθεί συμβολή μεταξύ των δύο δεσμών. Ένα συμβολόμετρο Michelson φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 2)

Αυτό αποτελείται από δύο κάθετους μεταξύ τους επίπεδους καθρέπτες (M_1 και M_2), ένας εκ των οποίων (M_1) μπορεί και κινείται κατά μήκος του άξονα που είναι κάθετος στο επίπεδο του. Ο κινητός καθρέπτης μπορεί να

είτε να κινείται με σταθερή ταχύτητα, είτε να κρατείται σε ισαπέχουσα μεταξύ τους σημεία για καθορισμένες χρονικά περιόδους και να μεταπηδά γρήγορα μεταξύ αυτών των σημείων. Ανάμεσα στους δύο καθρέπτες υπάρχει ένας διαχωριστής δέσμης (*beam splitter-B*) όπου η δέσμη ακτινοβολίας από την εξωτερική πηγή μπορεί μερικώς να ανακλαστεί προς τον σταθερό καθρέπτη και μερικώς να διαπεράσει προς τον κινητό καθρέπτη. Μετά τη επιστροφή των δεσμών στον διαχωριστή, αυτές συνδυάζονται και επαναδιαχωρίζονται. Λόγω του φαινομένου της συμβολής η ένταση της δέσμης που φτάνει στον ανιχνευτή (*D*) εξαρτάται από την διαφορά διαδρομής των δεσμών στα δύο μέρη του συμβολομέτρου. Σε ένα φασματοφωτόμετρο, η μεταβολή της έντασης της δέσμης που φτάνει στον ανιχνευτή σαν συνάρτηση της διαφοράς διαδρομής δίνει την φασματική πληροφορία.



σχ.2. το συμβολόμετρο Michelson.

Fourier Transform IR

Αρχικά υποθέτουμε ότι το φως απο την πηγή είναι μονοχρωματικό με μήκος κύματος λ . Οι δύο διαχωρισμένες δέσμες όταν επανασυνδιάζονται δημιουργείται η δέσμη f . Προσθέτοντας τα ηλεκτρικά πεδία των δύο δεσμών βρισκουμε την ένταση της f :

$$I_f = \frac{1}{2} B_f \left[1 + \cos \left(\frac{2\pi\delta}{\lambda} \right) \right] \Leftrightarrow$$
$$I_f = \frac{1}{2} B_f \left[1 + \cos \left(2\pi\delta \tilde{\nu} \right) \right] \quad (16)$$

όπου δ είναι η διαφορά διαδρομής των δύο δεσμών μονοχρωματικής ακτινοβολίας και B_f η ένταση της f αν $\delta=0$.

Αν χ είναι η διαφορά των αποστάσεων του κινητού και του ακίνητου καθρέφτη από τον διαχωριστή δέσμης, τότε $\delta=2\chi$. Τα χ και δ αλλάζουν με το χρόνο. Όταν το δ είναι ακέραιος πολλαπλάσιος του μήκους κύματος ($\delta=n\lambda$) τότε $\cos(2\pi\delta/\lambda)=1$ και $I_f=B_f$. Οι προηγουμένως διαχωρισθείσες δέσμες επανασυνδιάζονται σε φάση. Όταν το $\delta=(n+1/2)\lambda$, τότε $\cos(2\pi\delta/\lambda)=-1$ και $I_f=0$. Οι δέσμες συναντώνται εκτός φάσης (καταστρεπτική συμβολή).

Όταν η δέσμη f περάσει μέσα από το δείγμα, η απορρόφηση του δείγματος αλλάζει τα I_f και B_f σε I_g και B_g . Για πολυχρωματικές πηγές ακτινοβολίας πρέπει να ολοκληρώσουμε την παραπάνω σχέση πάνω από όλη την περιοχή των συχνοτήτων για να πάρουμε τα I_f και I_g . Επίσης το B_g είναι συνάρτηση του μήκους κύματος (του κυματάριθμου) $B_g = B_g(\tilde{\nu})$

αφού η απορρόφηση του δείγματος και το φως που εκπέμπεται από την πηγή εξαρτώνται από το μήκος κύματος. Έτσι έχουμε:

$$I_g(\delta) = \frac{1}{2} \int_0^{\infty} B_g(\tilde{\nu}) \left[1 + \cos(2\pi\delta\tilde{\nu}) \right] d\tilde{\nu} \Leftrightarrow$$

$$I_g(\delta) = \frac{1}{2} \int_0^{\infty} B_g(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} + \frac{1}{2} \int_0^{\infty} B_g(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\delta\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} \quad (17)$$

Ο ανιχνευτής καταγράφει το I_g σαν συνάρτηση του χρόνου και αφού το δ είναι γνωστό κάθε στιγμή ο ανιχνευτής μας δίνει τη συνάρτηση $I_g(\delta)$. Όταν η διαφορά διαδρομής είναι μηδεν ($\delta=0$), φώς όλων των συχνοτήτων στις διαχωρηθείσες δέσμες επανασυνδιάζεται σε φάση και η ένταση I_g έχει μέγιστο. Η τιμή αυτής της μέγιστης έντασης δίνεται από την παραπάνω εξίσωση θέτοντας όπου $\delta=0$:

$$I_g(0) = \int_0^{\infty} B_g(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} \quad (18)$$

και έτσι η εξίσωση γίνεται:

$$I_g(\delta) = \frac{1}{2} I_g(0) + \frac{1}{2} \int_0^{\infty} B_g(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\delta\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} \quad (19)$$

Ορίζουμε $F(\delta)=I_g(\delta)-1/2 I_g(0)$ και η εξίσωση γίνεται:

$$F(\delta) = \frac{1}{2} \int_0^{\infty} B_g(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\delta\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} \quad (20)$$

Η συνάρτηση του συμβολογραφήματος είναι γνωστή αφού το $I_g(\delta)$ και το $I_g(0)$ είναι γνωστά. Η συνάρτηση $B_g(\nu)$ είναι η ένταση της ακτινοβολίας που φτάνει στο ανιχνευτή σαν συνάρτηση του κυματάριθμου, με διαφορά διαδρομής μηδενική, και αυτό είναι ακριβώς το φάσμα που ενδιαφέρει.

Συμφωνα με ένα μαθηματικό θεώρημα της ανάλυσης *Fourier* αν οι συναρτήσεις $F(g)$ και $B_g(\nu)$ συνδέονται με την παραπάνω σχέση και αν η παράγωγος της $F(g)$ είναι μηδενική στο $\delta=0$ (το οποίο ισχύει αφού η $I_g(\delta)$ έχει maximum στο $\delta=0$ και η $F(g)$ διαφέρει από την $I_g(\delta)$ κατα μια σταθερα), τότε η συνάρτηση $B_g(\nu)$ δίνεται από τη σχέση:

$$B_g = 8 \int_0^{\infty} F(\delta) \cos(2\pi \tilde{\nu} \delta) d\delta \quad (21)$$

Όπως φαίνεται από την παραπάνω σχέση, για μέγιστη ακρίβεια στον υπολογισμό του B_g , θα πρέπει να γίνουν μετρήσεις με το δ να τείνει στο άπειρο. Πρακτικά όμως $1cm < \delta < 20cm$ με αποτέλεσμα το άπειρο όριο στην ολοκλήρωση να παίρνει την τιμή του δ_{max} . Πιο συγκεκριμένα αν η μέγιστη διαφορά διαδρομής του συμβολομέτρου είναι δ_{max} , τότε η υψηλότερη διακριτική ικανότητα που μπορεί να επιτευχθεί είναι:

$$\Delta(\tilde{\nu}) = (\delta_{max})^{-1} \quad (22)$$

Το φάσμα $B_g(\nu)$ υπολογίζεται από την συνάρτηση $F(g)$ μέσω ενός υπολογιστή.

Αφού η δέσμη που χρησιμοποιείται είναι μία λαμβάνεται πρώτα το φάσμα της κυψελίδας με τον διαλύτη (background), και έπειτα το φάσμα

του δείγματος (sample). Στη συνέχεια ο υπολογιστής υπολογίζει το φάσμα απορρόφησης.

Ένα FT-IR φασματοφωτόμετρο δίνει καλύτερης ποιότητας φάσματα από τα αντίστοιχα των *dispersive* φασματοφωτομέτρων λόγω του ότι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία σε πολύ μεγάλη περιοχή κυματαρίθμων φτάνει ταυτόχρονα στον ανιχνευτή και χρησιμοποιείται στο σύνολό της για να υπολογιστεί το φάσμα $B_g(\nu)$, σε αντίθεση με τα *dispersive* όργανα όπου ένα πολύ μικρό μέρος της ακτινοβολίας καταγράφεται από τον ανιχνευτή κάθε στιγμή. Επιπροσθέτως, η αναλογία σήματος/θορύβου (signal-to-noise ratio) μπορεί να βελτιωθεί περαιτέρω κάνοντας πολλές επαναλαμβανόμενες μετρήσεις και παίρνοντας το μέσο όρο των φασμάτων. Με αυτόν τον τρόπο ο θόρυβος τείνει να μηδενιστεί αφού είναι τυχαία θετικός ή αρνητικός.

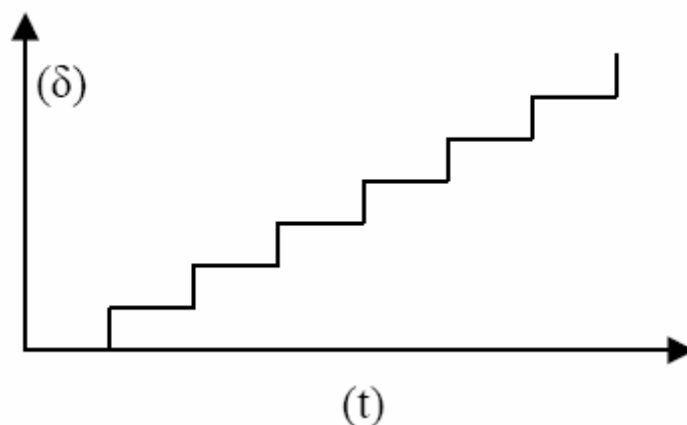
Περιγραφή της τεχνικής step-scan

Με την **step-scan** φασματοσκοπία είναι δυνατή η παρακολούθηση πειραματικών διαδικασιών που συμβαίνουν ταυτόχρονα σε μια περιοχή συχνοτήτων (frequency domain) και χρόνου (time domain). Η τεχνική της *scan-scan FT-IR* φασματοσκοπίας, που χρησιμοποιείται για τη μελέτη χρονικά εξαρτημένων πειραμάτων, επιτυγχάνεται κρατώντας σταθερό το κινούμενο καθρέπτη του συμβολομέτρου κατά την διάρκεια συλλογής των αποτελεσμάτων. Στην τεχνική αυτή η διαδρομή (από $-d$ σε $+d$) που διανύει ο κινούμενος καθρέπτης, διαχωρίζεται σε πολλά τμήματα με αποτέλεσμα αντί της συνεχούς κίνησης του καθρέπτη να έχουμε μία κίνηση βήμα προς βήμα. Σε κάθε βήμα ο κινούμενος καθρέπτης σταματά και το, επαγόμενο από το παλμό ενός laser σήμα προκαλεί μια παροδική αλλαγή στην απορρόφηση του δείγματος η οποία οδηγεί σε μια περαιτέρω αλλαγή της

έντασης στο συγκεκριμένο σημείο του συμβολογραφήματος. Συγκεκριμένα το συνολικό χρονικό προφίλ της φασματικής αλλαγής του δείγματος, η οποία προέρχεται από την εφαρμογή ενός παλμού, συλλέγεται και καταγράφεται ως ο μέσος όρος σε κάθε σημείο του καθρέπτη και σε κάθε χρονική στιγμή. Στη συνέχεια όλα τα δεδομένα τα οποία αντιστοιχούν σε κάθε σημείο του καθρέπτη σχηματίζουν μια σειρά από συμβολογραφήματα που το κάθε ένα αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο χρόνο. Το σήμα του συμβολογραφήματος παράγεται με την ολοκλήρωση του σήματος του ανιχνευτή κατά την διάρκεια του χρόνου στην οποία ο κινούμενος καθρέπτης παραμένει ακίνητος. Ο καθρέπτης επιτελεί το επόμενο βήμα και το συνολικά χρονικά εξαρτώμενο συμβολογραφήμα καταγράφεται λαμβάνοντας υπόψη τις παροδικές αλλαγές που συμβαίνουν σε όλα τα βήματα. Αυτό το σύνολο των δεδομένων μετασχηματίζεται σε χρονικά εξαρτώμενο φάσμα αφού επεξεργαστούν τα χρονικά εξαρτώμενα συμβολογραφήματα που προέρχονται από τις αλλαγές της έντασης.

Στην time-resolved step-scan FT-IR φασματοσκοπία η αλλαγή απορρόφησης που συμβαίνει στο δείγμα πρέπει να καταγράφεται με βάση ενός δείγματος αναφοράς (background). Με αυτό το τρόπο παίρνουμε τα φάσματα διαφοράς τα οποία υπολογίζονται από την εξής μαθηματική σχέση:

$$\Delta A = -\log(I_S/I_R) \quad (23)$$



σχ.4. Απεικόνιση της κίνησης του καθρέπτη κατά την step-scan τεχνική

όπου I_S , I_R οι εντάσεις του προς μελέτη δείγματος και του δείγματος αναφοράς αντίστοιχα. Ο κύριος περιορισμός της *time-resolved step-scan FT-IR* φασματοσκοπίας είναι η μη δυνατή επίτευξη να έχουμε την μέγιστη ευαισθησία και την μέγιστη χρονική διακριτική ικανότητα ταυτόχρονα. Αυτό οφείλεται στη χαμηλή ένταση της πηγής που έχει σαν συνέπεια τη χαμηλή ροή φωτονίων. Για σχετικά χαμηλές χρονικές διακριτικές ικανότητες της τάξης των μs , είναι απαραίτητοι 16-bit ADC μετατροπείς καθώς και MCT (Mercury Cadmium Telluride) ανιχνευτές που η μέγιστη απόκριση τους φτάνει το παραπάνω χρόνο. Για πολύ υψηλές χρονικές διακριτικές ικανότητες, πρέπει να χρησιμοποιούνται 12-bit (50ns) και 8-bit (5ns) ADC μετατροπείς καθώς και γρήγοροι φωτοβολταϊκοί MCT ανιχνευτές.

Θεωρία laser

Γενικά στοιχεία

Η λέξη **laser** είναι ένα ακρονύμιο που προέρχεται από τα αρχικά των λέξεων ενίσχυση του φωτός από την επαγόμενη εκπομπή ακτινοβολίας (light amplification by the stimulated emission of radiation). Η λειτουργία του βασίζεται στην εξαναγκασμένη εκπομπή φωτονίων από ένα ενεργό μέσο.

Η εκπομπή ακτινοβολίας μπορεί να είναι είτε αυθόρμητη είτε επαγόμενη:



Για να κυριαρχήσει η διαδικασία της εκπομπής από αυτή της απορρόφησης πρέπει να συμβεί μία αναστροφή πληθυσμών μεταξύ των δύο εμπλεκόμενων επιπέδων n και m έτσι ώστε $N_n > N_m$ όπου N_i ο πληθυσμός του επιπέδου i . Για να αναστραφεί η κανονική κατανομή πληθυσμών *Boltzmann* απαιτείται μία εισαγωγή ενέργειας. Η διαδικασία κατά την οποία συμβαίνει η αναστροφή των πληθυσμών ονομάζεται άντληση. Ένα σύστημα στο οποίο έχει ήδη επιτευχθεί αυτή η αναστροφή αναφέρεται σαν ενεργό μέσο και μπορεί να δράσει σαν ενισχυτής προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Βασικά μέρη ενός laser

Ένα *laser* αποτελείται κυρίως από τρία μέρη:

1. Το ενεργό μέσο που ενισχύει το προσπίπτον ηλεκτρομαγνητικό κύμα.

2. Την αντλία ενέργειας που επιλεκτικά αντλεί ενέργεια στο ενεργό μέσο ώστε να επιτευχθεί η αναστροφή των πληθυσμών.

3. Το οπτικό αντηχείο αποτελούμενο από δύο αντίθετα τοποθετημένους καθρέπτες που αποθηκεύουν μέρος της επαγόμενης εκπομπής.

Η αντλία ενέργειας (flashlamps, εκκένωση αερίων ή ακόμα και άλλο *laser*) προκαλεί μία κατανομή πληθυσμών στο μέσο του *laser* που αποκλίνει από την κατανομή *Boltzmann* που ισχύει για την θερμική ισορροπία. Σε ικανά μεγάλη ισχύ άντλησης η πληθυσμιακή πυκνότητα του διεγερμένου επιπέδου μπορεί να ξεπεράσει αυτή του μη διεγερμένου. Σε μία τέτοια αναστροφή πληθυσμών ο ρυθμός της επαγόμενης εκπομπής ξεπερνάει τον ρυθμό της απορρόφησης και το ηλεκτρομαγνητικό κύμα που διέρχεται από το ενεργό μέσο ενισχύεται.

Η λειτουργία του οπτικού αντηχείου είναι η επιλεκτική ανατροφοδότηση της ακτινοβολίας που εκπέμπεται από τα διεγερμένα μόρια του ενεργού μέσου. Πάνω από ένα συγκεκριμένο κατώφλι άντλησης αυτή η ανατροφοδότηση μετατρέπει τον *laser* ενισχυτή σε *laser* ταλαντωτή. Αυτό επιτυγχάνεται έχοντας το ενεργό μέσο ανάμεσα σε δύο καθρέπτες υψηλής αντανάκλασης (ο ένας λίγο μικρότερης, ώστε να επιτρέπει την διόδο της επαγόμενης ακτινοβολίας και τον σχηματισμό της δέσμης του *laser*). Η περιοχή μεταξύ των δύο καθρεπτών ονομάζεται κοιλότητα *laser*. Ο ένας από τους καθρέπτες επιτρέπει 1-10 % της ακτινοβολίας να διαφεύγει ως δέσμη *laser*. Η ενέργεια της επαγόμενης ακτινοβολίας αποθηκεύεται στο αντηχείο, μεταξύ των δύο καθρεπτών, και η πυκνότητα φασματικής ενέργειας μπορεί να γίνει μεγάλη.

Ιδιότητες της laser ακτινοβολίας

Η laser ακτινοβολία έχει τέσσερις ιδιότητες:

1. Κατευθυντικότητα. Η δέσμη *laser* που διαφεύγει από τον καθρέπτη της κοιλότητας είναι υψηλά παράλληλη, γεγονός το οποίο είναι συνέπεια των αυστηρών απαιτήσεων ευθυγράμμισης των καθρεπτών της κοιλότητας. Η απόκλιση της δέσμης είναι λίγα milliradians.

2. Μονοχρωματικότητα. Αν τα ενεργειακά επίπεδα n και m είναι αυστηρά ορισμένα, τότε η σχέση του *Planck* περιορίζει το εύρος του μήκους κύματος της ακτινοβολίας, αν και ανεξάρτητα από την φύση του ενεργού μέσου, το γεγονός ότι η κοιλότητα του *laser* είναι σε συντονισμό μόνο με συγκεκριμένες συχνότητες μειώνει από μόνο του αυτό το εύρος.

3. Λάμψη. Αυτή ορίζεται σαν την εκπεμπόμενη ισχύ ανά μονάδα επιφάνειας ανά μονάδα στερεάς γωνίας και είναι πολύ υψηλή σε σχέση με οποιαδήποτε συμβατική πηγή. Ο λόγος είναι το ότι η στερεά γωνία γύρω από την οποία γίνεται η κατανομή ενέργειας είναι πολύ μικρή στην περίπτωση των *laser*.

4. Συμφωνία. Οι συμβατικές πηγές ακτινοβολίας είναι μη σύμφωνες το οποίο σημαίνει ότι ηλεκτρομαγνητικά κύματα σχετιζόμενα με δύο φωτόνια ίδιου μήκους κύματος είναι εκτός φάσης. Η συμφωνία της *laser* ακτινοβολίας είναι χρονική και χωρική, διαρκεί σχετικά αρκετά και επεκτείνεται σε σχετικά μεγάλη απόσταση.

Τεχνική Q - switching

Για να αποκτήσουμε έναν απλό, μικρής διάρκειας και ισχυρό παλμό από ένα *laser* που αντλείται με flashlamps αναπτύχθηκε η τεχνική του *Q - switching*.

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

$$Q = 2\pi\nu E_c t / E_t \quad (25)$$

Το Q - *switching* είναι μία λειτουργία κατά την οποία ο παράγοντας Q της κοιλότητας του *laser* μειώνεται για μικρή χρονική περίοδο εμποδίζοντας την ακτινοβολία από το να αντανακλάται μπρος και πίσω 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:

$$P_p = E_p / \Delta t \quad (26)$$

Έτσι ένας στενότερος παλμός οδηγεί σε αυξημένη ισχύ του.

Τεχνικές ανάμιξης μη γραμμικών οπτικών υλικών

Πέρα από τα διάφορα είδη ρυθμιζόμενων *laser* έχουν αναπτυχθεί και πηγές ρυθμιζόμενης σύμφωνης ακτινοβολίας που βασίζονται στην μη γραμμική αλληλεπίδραση έντονης ακτινοβολίας με άτομα ή μόρια σε κρυστάλλους. Παραγωγή δεύτερης αρμονικής, παραγωγή αθροίσματος ή διαφοράς συχνοτήτων, παραμετρικές διαδικασίες ή επαγόμενη *Raman* σκέδαση είναι παραδείγματα τέτοιων τεχνικών ανάμιξης μη γραμμικών οπτικών υλικών που έχουν πετύχει να καλύψουν όλο το φασματικό εύρος

από το Vacuum UltraViolet (VUV) έως το Far InfraRed (FIR) με έντονες, σύμφωνες και ρυθμιζόμενες πηγές ακτινοβολίας.

Όπως είναι γνωστό το ταλαντούμενο ηλεκτρικό πεδίο E της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, το επαγόμενο ηλεκτρικό δίπολο μ και η πολωσιμότητα α σχετίζονται με την εξίσωση:

$$\mu = \alpha E \quad (27)$$

Στην πραγματικότητα αυτή η εξίσωση είναι μόνο μία προσέγγιση και η διπολική ροπή πρέπει να εκφραστεί σαν άθροισμα όρων:

$$\begin{aligned} \mu &= \mu^{(1)} + \mu^{(2)} + \mu^{(3)} + \dots \\ &= \alpha E + (1/2)\beta E^2 + (1/6)\gamma E^3 + \dots \quad (28) \end{aligned}$$

όπου το β είναι γνωστό σαν υπερπολωσιμότητα και το γ σαν δεύτερη υπερπολωσιμότητα. Όποιες επιδράσεις λόγω του δευτέρου ή μεγαλύτερου όρου στην παραπάνω σειρά αναφέρονται σαν μη γραμμικές επιδράσεις διότι προέρχονται από όρους που δεν είναι γραμμικοί στο E . Αυτοί οι όροι είναι συνήθως μικροί αλλά η υψηλή ισχύς, χαρακτηριστικό της *laser* ακτινοβολίας, τους κάνουν σημαντικούς.

Το μέγεθος του ταλαντούμενου ηλεκτρικού πεδίου δίνεται από την σχέση:

$$E = A \sin 2\pi \nu t \quad (29)$$

όπου A το πλάτος και ν η συχνότητα. Όμως:

$$E^2 = A^2 (\sin 2\pi \nu t)^2 = (1/2)A^2 (1 - \cos 2\pi 2\nu t) \quad (30)$$

και η ακτινοβολία που εκπέμπεται από το δείγμα περιέχει λόγω του $\mu^{(2)}$ όρου, κάποιο ποσοστό με διπλάσια συχνότητα της προσπίπτουσας. Το φαινόμενο λέγεται διπλασιασμός συχνότητας ή παραγωγή δεύτερης αρμονικής. Με ανάλογο τρόπο οι μεγαλύτεροι όροι της σειράς μπορούν να παράγουν την τρίτη και τέταρτη αρμονική συχνότητα.

Έτσι ένα *laser* με λειτουργία στην ορατή περιοχή έχει την δυνατότητα να λειτουργήσει και στην υπεριώδη περιοχή όπου τα διαθέσιμα *laser* είναι λίγα. Η αποτελεσματικότητα του διπλασιασμού της συχνότητας είναι σχετικά μικρή από 10 έως 25 %.

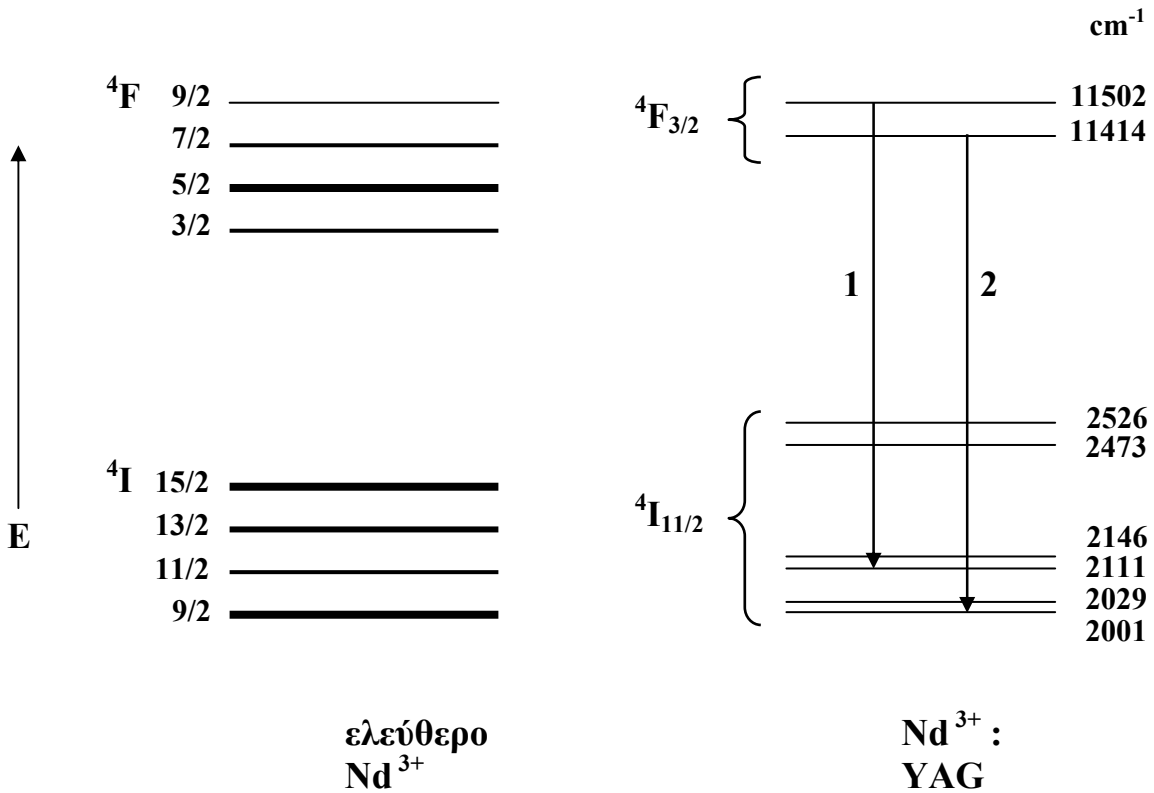
Το Νεοδύμιο - YAG laser

Δράση *laser* μπορεί να επαχθεί σε ιόντα Νεοδυμίου (Nd^{3+}) εμβαπτισμένα σε κατάλληλη στερεή μήτρα. Διάφορες μήτρες μεταξύ των οποίων και κάποιοι ειδικοί ύαλοι είναι κατάλληλοι, αλλά ένας από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους είναι ο *Yttrium Aluminium Garnet* ($Y_3Al_5O_{12}$) που αναφέρεται σαν YAG.

Τα άτομα του νεοδυμίου έχουν μία βασική διαμόρφωση $\dots 4d^{10}4f^45s^25p^66s^2$ και μία 5I_4 βασική κατάσταση. Η βασική διαμόρφωση του Nd^{3+} είναι $\dots 4d^{10}4f^35s^25p^6$ και προκύπτει ότι οι σημαντικοί όροι για το *laser* είναι οι 4I και 4F . Για τον πρώτο $L = 6$ και $S = 3/2$ δίνοντας $J = 15/2, 13/2, 11/2$ και $9/2$ στην προσέγγιση *Russell - Saunders*. Η πολλαπλή σχάση είναι κανονική και το ίδιο συμβαίνει και για τον όρο 4F όπου έχουμε $J = 9/2, 7/2, 5/2$ και $3/2$.

Η δράση του *laser* περιλαμβάνει κυρίως την $^4F_{3/2} - ^4I_{11/2}$ μετάβαση περίπου στα 1.06 μm . Από την στιγμή που η $^4I_{11/2}$ δεν είναι η βασική κατάσταση το *laser* λειτουργεί σε ένα σύστημα τεσσάρων επιπέδων.

Στο ελεύθερο Nd^{3+} η μετάβαση ${}^4\text{F}_{3/2} - {}^4\text{I}_{11/2}$ είναι διπλά απαγορευμένη, παραβιάζοντας τόσο τον κανόνα επιλογής $\Delta L = 0, \pm 1$ όσο και αυτόν του $\Delta J = 0, \pm 1$. Στον κρύσταλλο YAG η ${}^4\text{I}_{11/2}$ κατάσταση του Nd^{3+} διαχωρίζεται σε έξι, λόγω αλληλεπιδράσεων κρυσταλλικού πεδίου, και η ${}^4\text{F}_{3/2}$ σε δύο μέρη, όπως φαίνονται στο σχήμα 4 με τα ενεργειακά επίπεδα. Υπάρχουν οκτώ μεταβάσεις συγκεντρωμένες γύρω από τα 1.06 μm , αλλά μόνο οι δύο σημειωμένες είναι σημαντικές για το *laser*. Σε θερμοκρασία δωματίου η μετάβαση 1 στα 1.0648 μm κυριαρχεί, ενώ σε θερμοκρασία 77 K ευνοείται η μετάβαση 2 στα 1.0612 μm .



σχήμα 4. Ενεργειακά επίπεδα του Nd^{3+} όταν αυτό είναι ελεύθερο και μέσα στον κρύσταλλο YAG.

Μία λάμπα κρυπτού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για άντληση συνεχούς κύματος ή flashlamps για πολύ μεγαλύτερης ισχύος παλμική λειτουργία.

Η ράβδος του $\text{Nd}^{3+} : \text{YAG}$ είναι μήκους λίγων εκατοστών και περιέχει από 0.5 έως 2 % κατά βάρος Nd^{3+} . Στην παλμική λειτουργία η ισχύς του κάθε παλμού είναι ικανά υψηλή για την παραγωγή της δεύτερης, τρίτης και τέταρτης αρμονικής συχνότητας στα 532, 355 και 266 nm αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας κατάλληλη διάταξη κρυστάλλων.

Ανιχνευτής MCT

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

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

Για τη 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.

Βιβλιογραφία

1. Demtroder W. (1996) *Laser Spectroscopy*, Springer - Verlag, Berlin
2. Hollas J. M. (1996) *Modern Spectroscopy*, Wiley, Chichester
3. Levine I. N. (1995) *Physical Chemistry*, McGraw - Hill International Editions, Singapore
4. Continuum Minilite Nd : YAG Laser User Manual

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Αποτελέσματα

A. ΜΥΟΣΦΑΙΡΙΝΗ

Εισαγωγή

Ο δομικός χαρακτηρισμός των προϊόντων που προκύπτουν από τη φωτοδιάσπαση του CO από τον αιμικό σίδηρο είναι πολύ δύσκολος και είναι επιτυχημένος μόνο αν κάποιο από τα προϊόντα φτάσει ένα πλυθησμιακό όριο, δηλαδή αν υπάρχουν μετά τη φωτοδιάσπαση, αρκετά μόρια σε κάποια συγκεκριμένη κατάσταση ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευσή τους. Το ανιχνευτικό αυτό κατώφλι εξαρτάται φυσικά από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για το χαρακτηρισμό. Με την τεχνική της x-ray diffraction η κατάσταση πρέπει να έχει πλυθησμό 20-30%. Αντίθετα, η FT-IR τεχνική είναι πολύ πιο ευαίσθητη και μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και καταστάσεις που πλυθησμιακά είναι στο όριο του 1% (1). Οι μετρήσεις μπορούν να γίνουν και σε διαφορετικές θερμοκρασίες παρέχοντας έτσι πληροφορίες για τα ενεργειακά φράγματα κατά τη μετανάστευση του υποκαταστάτη από το ενεργό κέντρο. Επιπροσθέτως, χρονικώς εξαρτώμενα πειράματα μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τη δυναμική της πρωτεΐνης.

Σκοπός

Σε αυτή την εργασία μελετήθηκε η δεσμευμένη με CO μυοσφαιρίνη και τα προϊόντα της φωτόλυσής της με laser συνεχούς φωτόλυσης με τη φασματοσκοπία FTIR. Σκοπός ήταν κρατώντας σταθερή τη θερμοκρασία κοντά σε φυσιολογικές συνθήκες, στους 253K, να χαρακτηρίσουμε τα προϊόντα της φωτόλυσης με laser μήκους κύματος 416 nm και να εξετάσουμε αν τα αποτελέσματά που παίρνουμε είναι συγκρίσιμα με αυτά

των πολύ χαμηλών θερμοκρασιών (25, 26). Τα φάσματα που λήφθηκαν παρέχουν σημαντικές λεπτομέρειες για τη δόμή των προϊόντων φωτόλυσης, την εξαρτησή τους από το pH και τη θερμοκρασία.

Πειραματικό μέρος

Τα δείγματα που εξετάστηκαν ετοιμάστηκαν διαλύοντας μυοσφαιρίνη σκελετικού μυ αλόγου (sk-Mb - Sigma) σε ρυθμιστικό διάλυμα. Για τα δείγματα που προετοιμάστηκαν σε pH7.5 και pH8.8 χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό Tris/HCl 50mM. Για τα δείγματα σε pH4.6 διαλύθηκε μυοσφαιρίνη σε ρυθμιστικό sodium acetate (CH₃COONa). Για τα πειράματα σε D₂O χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό Tris/DCl 50mM pD7.5. Το pH του κάθε διαλύματος μετρήθηκε με τη χρήση ενός πεχαμέτρου. Το διάλυμα σε D₂O μετρήθηκε και υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο $pD = pH + 0.4$. Τα δείγματα είχαν τελική συγκέντρωση ~2.5mM σε μυοσφαιρίνη. Η αναγωγή της μυοσφαιρίνης έγινε με την προσθήκη sodium dithionate (Na₂S₂O₄) αφού πρώτα είχε απομακρυνθεί το οξυγόνο από το διάλυμα με τέσσερις κυκλούς ανάμεσα σε κενό και αέριο Ar. Για την παραγωγή του δεσμευμένου με ¹²CΟ ενζύμου κάθε δείγμα εκτέθηκε σε ατμόσφαιρα ¹²CΟ μετά την αναγωγή. Το ίδιο και για τη δέσμευση του ¹³CΟ. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν αεροστεγώς σε μια ερμητικά κλειστή κυψελίδα FTIR αποτελούμενη από δύο παράθυρα CaF₂. Η κυψελίδα ήταν καλυμμένη από χαλκοσωλήνα μέσα στον οποίο έρρεε διάλυμα νερού/γλυκόλης σε θερμοκρασία 253K ρυθμιζόμενη από έναν Julabo Circulator. Για την προετοιμασία του δείγματος της αιμοσφαιρίνης δεσμευμένης με CO (HbCO) επαναλήφθηκε η παραπάνω διαδικασία.

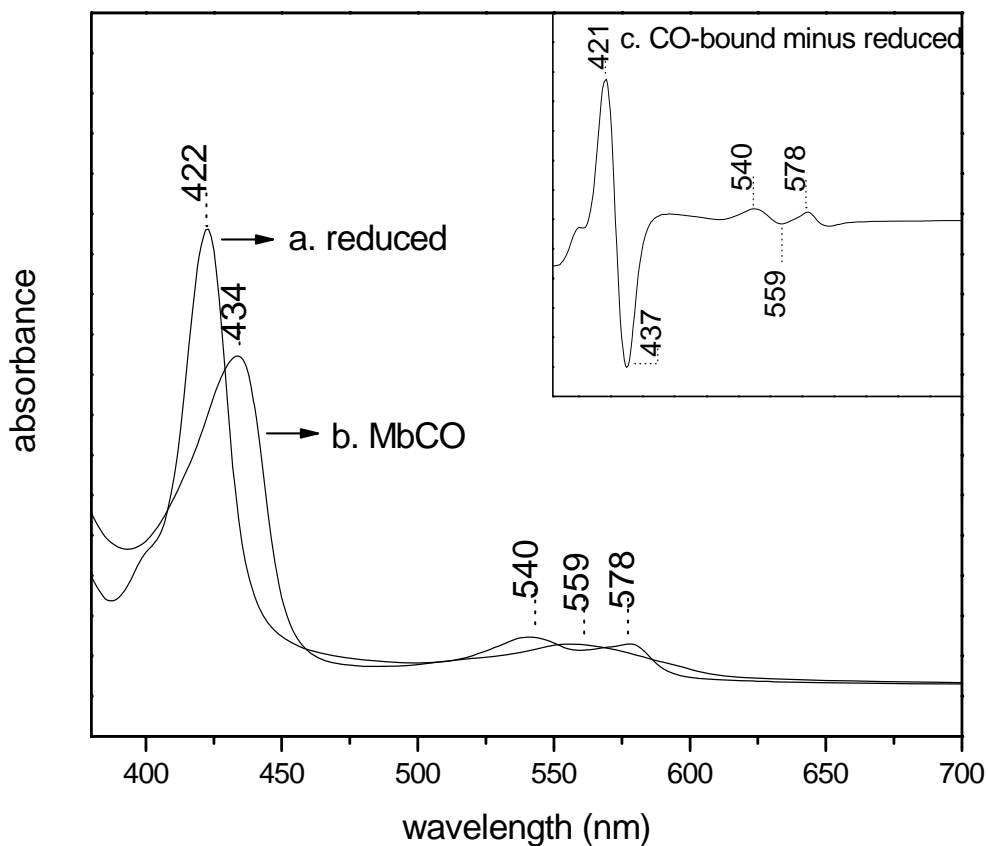
Ως πηγή φωτόλυσης χρησιμοποιήθηκε ένα laser διόδου, μήκους κύματος 416nm και ισχύος ~10mW. Οι FTIR μετρήσεις

πραγματοποιήθηκαν με ένα φασματοφωτόμετρο BRUCKER Equinox IFS55 με την επιλογή για time-resolved step-scan μετρήσεις. Το φασματοφωτόμετρο ήταν εφοδιασμένο με έναν ανιχνευτή MCT (Mercury Cadmium Tellurium, Graseby Infrared D316) με κατώτερο όριο ανίχνευσης τους 600cm^{-1} . Τα φάσματα λήφθηκαν με διακριτική ικανότητα 4cm^{-1} . Κάθε τελικό φάσμα που παρουσιάζεται είναι ο μέσος όρος περίπου 15-20 ανεξάρτητων φασμάτων.

Η δέσμευση του CO στα σύμπλοκα MbCO και HbCO επιβεβαιώθηκε λαμβάνοντας το οπτικό φάσμα ηλεκτρονικής απορρόφησης κάθε δείγματος πριν και μετά κάθε μέτρηση. Αυτό έγινε με ένα φασματοφωτόμετρο ορατού – υπεριώδους Perkin Elmer Lambda 20.

Αποτελέσματα

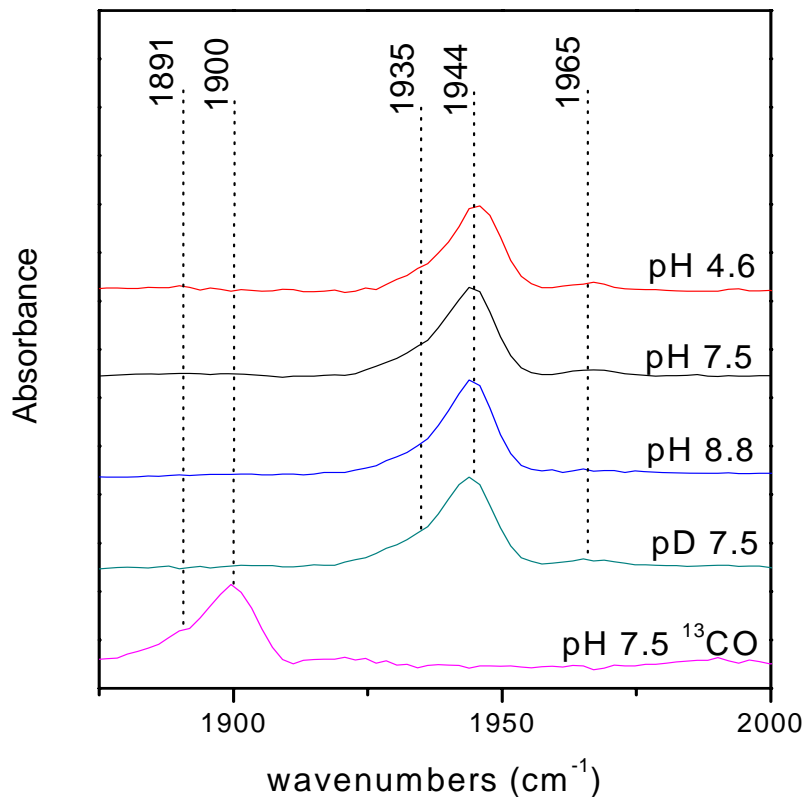
Στο φάσμα ορατού της ανηγμένης μυοσφαιρίνης (σχήμα 1, a) διακρίνεται η Soret απορρόφηση της αίμης b^{2+} στα 422 nm και σε υψηλότερα μήκη κύματος απορρόφηση στα 559 nm. Η συναρμογή του CO στη μυοσφαιρίνη (σχήμα 1, b) μετατοπίζει τη Soret απορρόφηση στα 434 nm και την ταινία των 559 nm στα 540 nm, ενώ εμφανίζεται και μία ταινία στα 578 nm. Το φάσμα διαφοράς του δεσμευμένου με CO συμπλόκου μείον του αδέσμευτου ανοιγμένου (σχήμα 1, c) επιβεβαιώνει τη συναρμογή του υποκαταστάτη στο ενεργό κέντρο.



σχ.1. Φάσμα οπτικής απορρόφησης της ανηγμένης μορφής της μυοσφαιρίνης (a) και της

δεσμευμένης με CO μορφής της (b). Στο ένθετο (c) φαίνεται το φάσμα διαφοράς, το οποίο προκύπτει από την αφαίρεση του a από το b και δηλώνει την συναρμογή του υποκαταστάτη στο ενεργό κέντρο.

Το απόλυτο φάσμα υπερέθρου του συμπλόκου της ανηγμένης μυοσφαιρίνης με το μονοξείδιο του άνθρακα εμφανίζει τρεις χαρακτηριστικές απορροφήσεις. Στο σχήμα 2 φαίνονται οι απορροφήσεις αυτές σε τρία διαφορετικά pH και σε pD.



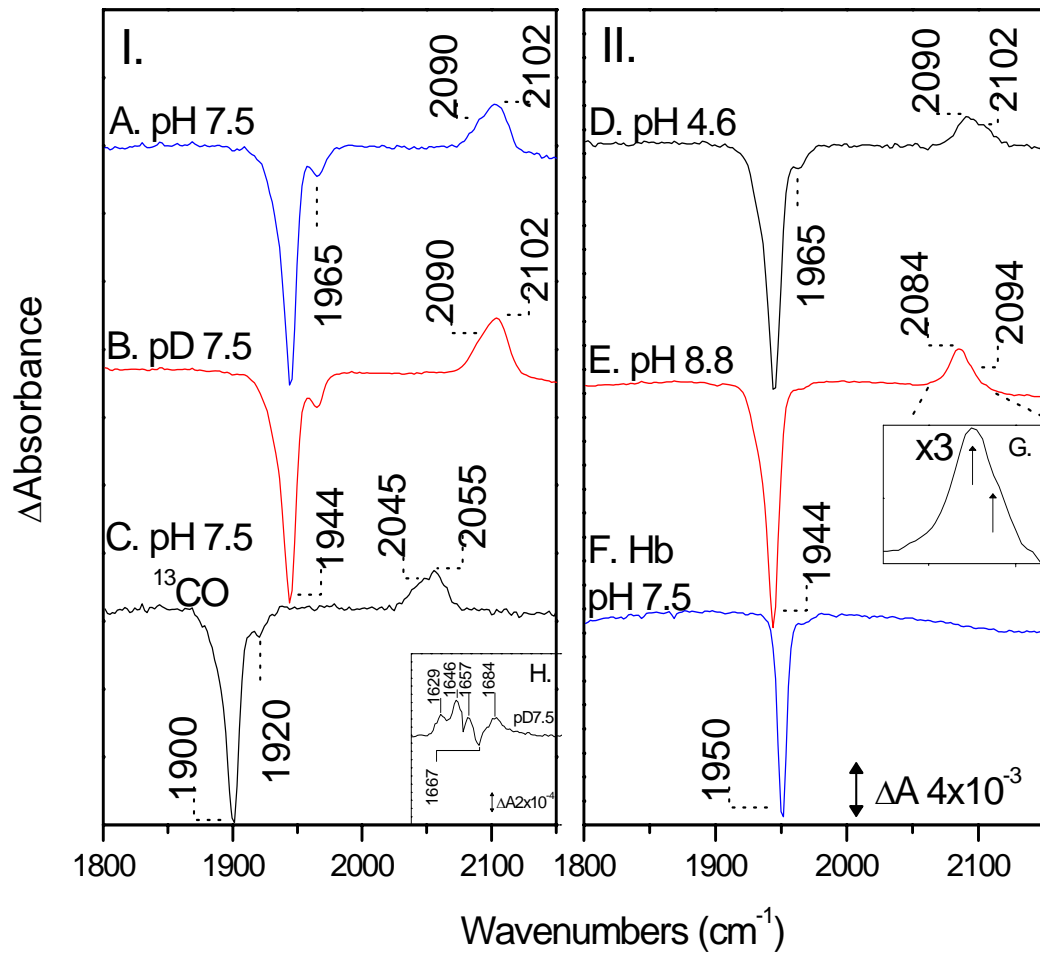
σχ.2. FTIR φασματα του δεσμευμένου με CO συμπλόκου της μυοσφαιρίνης σε τιμές pH 4.6, 7.5, 8.8 και pD7.5.

Οι απορροφήσεις αυτές μετατοπίζονται κατά την ισοτοπική αντικατάσταση με ¹³CO, παρουσιάζοντας μετατόπιση περίπου κατά 45 cm⁻¹.

Αντιστοιχούν στις δεσμευμένες καταστάσεις (Α-καταστάσεις) της μυοσφαιρίνης. Η απορρόφηση στους 1944 cm^{-1} αποδίδεται στην A_1 κατάσταση της δεσμευμένης μορφής. Αυτή στους 1935 cm^{-1} στην A_3 και αυτή στους 1965 cm^{-1} στην A_0 . Η πολλαπλότητα της απορρόφησης της δεσμευμένης μορφής του ενζύμου έχει συνδεθεί με τον αριθμό των διαμορφώσεων στις οποίες βρίσκεται το ένζυμο. Συγκριτικές μελέτες πολλών μυοσφαιρίνων με μεταλλάξεις στο μακρινό (*distal*) περιβάλλον της αίμης έδειξαν ότι η πολλαπλότητα αυτή οφείλεται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο δεσμευμένο στην αίμη CO και των διαφορετικών περιβαλλόντων της (2,3) που αλλάζουν την ηλεκτρονική κατανομή και την τάξη δεσμού του Fe-CO συμπλόκου και ακολούθως μετατοπίζεται η συχνότητα της δόνησης τάσης του CO (4). Η διαφορά στις τρεις δονήσεις τάσης της δεσμευμένης με CO μορφής της μυοσφαιρίνης στους 1944 cm^{-1} , στους 1935 cm^{-1} και στους 1965 cm^{-1} οφείλεται κυρίως στη θέση της μακρυνής ιστιδίνης (5,6). Σε χαμηλό pH η πλευρική αλυσίδα του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης είναι πρωτονιωμένη και απομακρυσμένη από το ενεργό κέντρο (7). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μία “ανοικτή” διαμόρφωση στο ενεργό κέντρο που έχει συνδεθεί με την κατάσταση A_0 . Η κλειστή διαμόρφωση στο ενεργό κέντρο έχει συνδεθεί με τις καταστάσεις A_1 και A_3 , στις οποίες το μερικώς θετικό φορτίο του N_ϵ -H του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με το δεσμευμένο CO(5,8-11). Όπως φαίνεται από τα φάσματα του σχήματος 2, η A_0 διαμόρφωση που ευνοείται σε χαμηλό pH δεν υπάρχει σε pH 8.8 σε συμφωνία με ήδη δημοσιευμένες μελέτες..

Ο φωτοδιασπασμένος CO υποκαταστάτης που παγιδεύεται μέσα στην πρωτεΐνη δίνει δόνηση τάσης με συχνότητα διαφορετική από αυτή που έχει το ελεύθερο αέριο CO (2143 cm^{-1}). Σε αναλογία με τις κορυφές των Α-

καταστάσεων, οι διαφορετικές δονήσεις τάσης του υποκαταστάτη που φαίνονται στα φάσματα μετά τη φωτόλυση εξαρτώνται από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται το CO, κυρίως από το φαινόμενο *Stark*, δηλαδή τη δράση τοπικών ηλεκτρικών πεδίων πάνω στο δίπολο του CO.



σχ.3. FTIR φάσματα διαφοράς συνεχούς φωτόλυσης του MbCO συμπλόκου (A-E) σε διάφορα pH και σε D₂O, όπως επίσης και του HbCO (F) σε θερμοκρασία -20C.

Φωτολύοντας τα σύμπλοκα MbCO και HbCO, το CO αποσπάται από τον αιμικό σίδηρο και διαχέεται μέσα στην πρωτεΐνη. Έπειτα μπορεί είτε να επαναδεσμευτεί ενδομοριακά είτε να περάσει στον διαλύτη. Με αυτόν τον τρόπο επάγουμε μια διαταραχή στο σύμπλοκο και φασματικά βλέπουμε τις αλλαγές που προκλήθηκαν τόσο στον υποκαταστάτη (CO) και στο περιβάλλον του ενεργού κέντρου της όσο και στη δομή της πρωτεΐνης γενικότερα. Στα φάσματα διαφοράς που φαίνονται στο σχήμα 3 οι κορυφές που παρουσιάζουν αρνητική απορρόφηση αντιστοιχούν σε δονήσεις του συμπλόκου πριν τη φωτόλυση ενώ τα θετικά σήματα σε δονήσεις του προιόντος της φωτόλυσης.

Η διπλή αρνητική κορυφή στα 1965 cm^{-1} και στα 1944 cm^{-1} με ώμο στα 1935 cm^{-1} αποδίδεται στον δεσμευμένο στον σίδηρο της αίμης υποκαταστάτη του αρχικού συμπλόκου (A_0 , A_1 και A_3 αντίστοιχα). Επίσης μία ευρεία θετική κορυφή εμφανίζεται γύρω στους 2100 cm^{-1} . Πιο συγκεκριμένα η κορυφή εμφανίζεται, στα φάσματα του σχήματος, μέγιστο στους 2102 cm^{-1} και ώμο στους 2090 cm^{-1} για τα pH7.5 και pH7.5 (σχήμα 3, φάσματα A, B), ενώ για το pH4.6 (φάσμα D) μέγιστο στους 2090 cm^{-1} και ώμο στους 2102 cm^{-1} . Πρέπει να τονιστεί ότι τα πειράματα, στα διάφορα pH, επαναλήφθηκαν πολλές φορές και η αναλογία μεταξύ των 2102 cm^{-1} και 2090 cm^{-1} ήταν πάντα διαφορετική ακόμα και σε δείγματα του ίδιου pH. Παρ' όλ' αυτά τα δείγματα του pH8.8 (φάσμα E) έδιναν πάντα ίδια αναλογία μεταξύ των κορυφών και μάλιστα οι θετικές κορυφές βρίσκονται μετατοπισμένες. Έτσι για το pH8.8 έχουμε μια κορυφή στους 2084 cm^{-1} με έναν ώμο στους 2094 cm^{-1} . Στο ένθετο G (x3) φαίνονται καθαρότερα οι δύο κορυφές.

Κατά τη φωτόλυση του Mb¹³CO (φάσμα C) βλέπουμε ότι η δόνηση του φωτολυόμενου αρχικού συμπλόκου έχει μετατοπιστεί κατά 44 cm^{-1}

($1944\text{ cm}^{-1} \rightarrow 1900\text{ cm}^{-1}$), όπως αναμενόταν. Το ίδιο συμβαίνει με την θετική κορυφή. Παρατηρείται η ευαίσθησία της σε ισοτοπική αντικατάσταση με επισημασμένο ^{13}CO και μετατοπίζεται κατά 45 cm^{-1} . Σύμφωνα με τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά προτείνεται ότι οι κορυφές στην περιοχή των 2100 cm^{-1} είναι η δόνηση τάσης του ελεύθερου CO καθώς αυτό έχει φωτοδιασπαστεί και βρίσκεται παγιδευμένο μέσα στην πρωτεΐνη. Η πολλαπλότητα αλλά και το μεγάλο εύρος των θετικών κορυφών στα φάσματα διαφοράς ίσως οφείλεται σε διαφορετικούς προσανατολισμούς που υιοθετεί ο υποκαταστάτης στην τοποθεσία που ανιχνεύεται.

Όπως αναφέρθηκε, τα πειράματα της δέσμευσης/φωτολύσης του CO από τέτοια συστήματα, παρ' όλο που το CO δεν είναι το φυσιολογικό υπόστρωμα, δίνουν πολλές πληροφορίες όσον αφορά τη μετανάστευση του υποκαταστάτη μακριά από το ενεργό κέντρο, τα χαρακτηριστικά των κοιλοτήτων στις οποίες μεταφέρεται (αφού η δόνηση τάσης του CO είναι πολύ ευαίσθητη σε εξωτερικά ηλεκτρικά πεδία) αλλά και των δομικών πρωτεϊνικών αλλαγών που συμβαίνουν κατά την επαγόμενη (από τη φωτόλυση) διαταραχή.

Είναι γνωστό ότι η δεόξυ μορφή της μυοσφαιρίνης (deoxyMb) υιοθετεί μια διαμόρφωση κατά την οποία ο σίδηρος της αίμης έχει συμπληρωμένες τις πέντε θέσεις συναρμογής και βρίσκεται 0.3 \AA έξω από το επίπεδο της αίμης, προς την πλευρά της εγγύς ιστιδίνης His93. Κατά τη δέσμευση του υποκαταστάτη συμπληρώνεται η έκτη θέση συναρμογής και ο σίδηρος έρχεται στο επίπεδο της αίμης (12). Αυτή η κίνηση του σιδήρου πιστεύεται ότι είναι σημαντική όσον αφορά τη μετάδοση του σήματος από την αίμη στην πρωτεΐνη, για τη δέσμευση/αποδέσμευση του υποκαταστάτη.

Επίσης ερωτήματα εγείρονται γύρω από τον ρόλο των δύο προπιονικών ομάδων της αίμης στις αλλαγές που συμβαίνουν στην

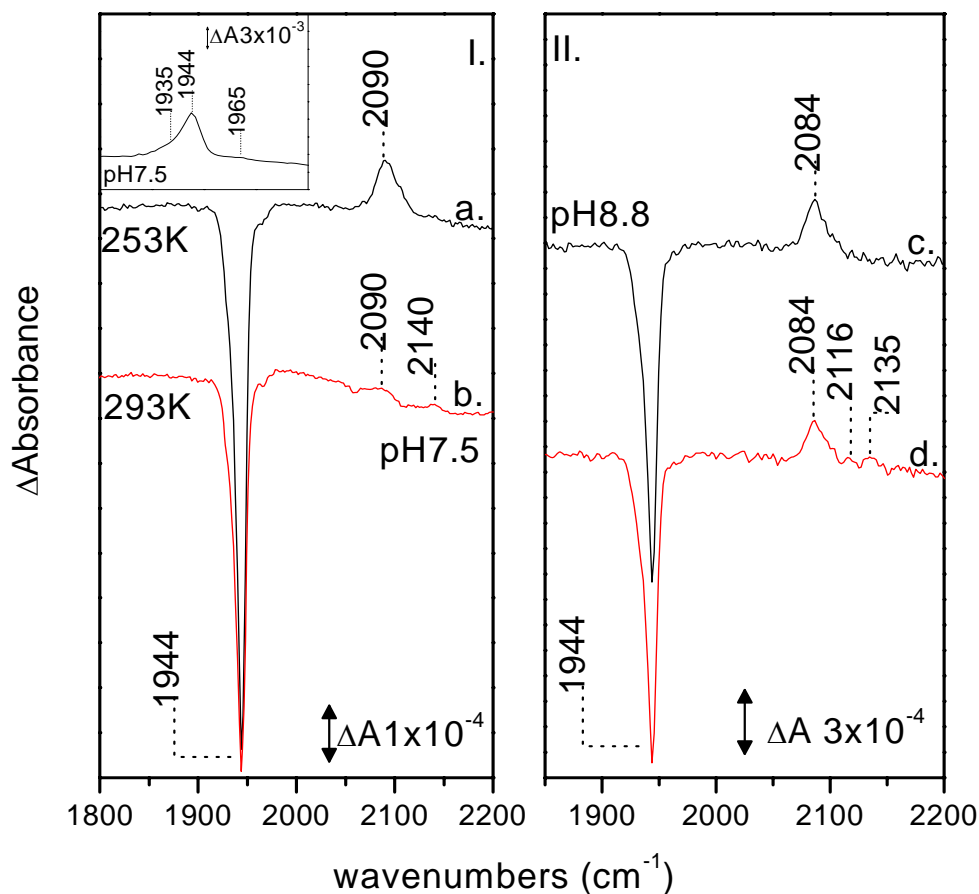
πρωτεΐνη σε σχέση με τις αλλαγές στο ενεργό κέντρο. Με άλλα λόγια είναι πολύ σημαντικό να βρεθεί ο τρόπος με τον οποίο η πρωτεΐνη “αντιλαμβάνεται” τις όποιες αλλαγές συμβαίνουν στην αίμη. Η 6-προπιονική ομάδα βρίσκεται προς την μακρινή (*distal*) πλευρά της αίμης σχηματίζοντας δεσμό υδρογόνου με το κατάλοιπο Arg45 ενώ η 7-προπιονική ομάδα βρίσκεται από την εγγύς (*proximal*) πλευρά της αίμης σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα Ser92 και His97 (12).

Ο Kitagawa και οι συνεργάτες του ερέυνησαν τον ρόλο των 6 και 7-προπιονικών ομάδων της αίμης στη μυοσφαιρίνη σε πειράματα ultraviolet resonance raman (UVR) με μεταλλαγμένες μυοσφαιρίνες και μυοσφαιρίνες στις οποίες οι ομάδες των προπιονικών της αίμης είχαν αντικατασταθεί από μεθυλικές ομάδες (13). Από τα δεδομένα τους συμπεράναν ότι ο δεσμός υδρογόνου της 6-προπιονικής ομάδας δεν παίζει ρόλο στη επικοινωνία μεταξύ της αίμης και της πρωτεΐνης. Επίσης έδειξαν ότι το δίκτυο δεσμών υδρογόνου στο εγγύς περιβάλλον της αίμης ανάμεσα στην 7-προπιονική ομάδα και τα κατάλοιπα της F-έλικας ρυθμίζουν τις δομικές αλλαγές της πρωτεΐνης κατά τη δέσμευση/αποδέσμευση του CO.

Στο ένθετο Η του σχήματος 3 φαίνεται το φάσμα διαφοράς συνεχούς φωτόλυσης της MbCO από τους 1600 cm^{-1} έως τους 1700 cm^{-1} σε D_2O όπου αναμένονται δονήσεις των προπιονικών αλλά και των amide I. Η θετική δόνηση που παρατηρείται στους 1684 cm^{-1} έχει αποδοθεί στη συμμετρική δόνηση τάσης της πρωτονιωμένης ομάδας $-\text{COOH}$ του 6-προπιονικού (14). Οι υπόλοιπες δονήσεις που σημειώνονται είναι δονήσεις που αποδίδονται σε δονήσεις έκτασης της ομάδας $\text{C}=\text{O}$ των πεπτιδικών δεσμών, συζευγμένες με τις δονήσεις έκτασης CN και κάμψης NH (amide I).

Στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 4-I.) παρουσιάζεται το φάσμα διαφοράς της μυοσφαιρίνης σε pH7.5 σε θερμοκρασία 253K (a.) και σε θερμοκρασία

δωματίου (b.), μετά από διέγερση στα 416 nm. Η αρνητική κορυφή στους 1944 cm^{-1} είναι η δόνηση τάσης του CO όταν αυτό είναι δεσμευμένο στον σίδηρο πριν τη φωτόλυση.



σχ.4. Φάσματα διαφοράς του συμπλόκου MbCO σε pH7.5 (I.) και σε pH8.8 (II.).στο ένθετο φαίνεται το απόλυτο φάσμα του MbCO.

Σε θερμοκρασία 253 K παρουσιάζεται μια θετική κορυφή –μετά τη φωτόλυση- στους 2090 cm^{-1} . Σε θερμοκρασία δωματίου (φάσμα b.) αυτή η κορυφή μειώνεται δραματικά και επίσης εμφανίζεται μία ακόμα θετική στους 2140 cm^{-1} . Από το μέγεθος των απορροφήσεων συμπεραίνουμε ότι οι

δονήσεις στα 2090 cm^{-1} και στα 2140 cm^{-1} αφορούν δονήσεις τάσης του CO αφού αυτό έχει φωτοδιασπαστεί και βρίσκεται μέσα στην πρωτεΐνη. Η θερμοκρασία φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στον πλυθισμό των φωτοδιασπασμένων μορίων CO που ανιχνεύονται στην κατάσταση των 2090 cm^{-1} .

Στο σχήμα 4 Π. παρουσιάζονται επίσης φάσματα διαφοράς του συμπλόκου MbCO σε pH8.8. Το φάσμα c. είναι μέσος όρος έξι ανεξάρτητων φασμάτων διαφοράς που αποκτήθηκαν περίπου τα δέκα πρώτα λεπτά της φωτόλυσης με 416 nm . Καθώς η φωτόλυση συνεχίζεται σε μεγαλύτερους χρόνους, παρατηρείται μια αισθητή μείωση της θετικής κορυφής στους 2084 cm^{-1} και ταυτόχρονη εμφάνιση δύο επιπλέον κορυφών στους 2116 cm^{-1} και στους 2135 cm^{-1} . Αυτό φαίνεται στο φάσμα d. που είναι μέσος όρος έξι ανεξάρτητων φασμάτων μετά από 15-20 λεπτά φωτόλυσης. Οι συχνότητες αυτές είναι πολύ κοντά στις καταστάσεις B_2 και B_1 αντίστοιχα, όπου το CO βρίσκεται πάνω από τον πυρολικό δακτύλιο C της αίμης, με διαφορετικούς προσανατολισμούς.

Συμπεράσματα

Οι καταστάσεις του ελεύθερου φωτοδιασπασμένου CO στους $\sim 2100\text{ cm}^{-1}$ δεν έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία. Έπομένως κάτω από τις πειραματικές μας συνθήκες (φωτοδιέγερση του δείγματος στα 416 nm πολύ κοντά στη solet απορρόφηση της αίμης και εκτέλεση του πειράματος στους 253K) ανιχνέυσουμε το CO σε μία κατάσταση στην οποία βρίσκεται παγιδευμένο πρίν επιστρέψει στον αιμικό σίδηρο. Εκτιμάται ότι το CO έχει φωτοδιασπαστεί – αφού η δόνηση τάσης του μετατοπίστηκε από τους 1944 cm^{-1} στους 2090 cm^{-1} – και βρίσκεται σε μία νέα κατάσταση η οποία δεν

έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά. Η κατάσταση αυτή διαφέρει από τις B-, C- και D-καταστάσεις αφού οι συχνότητες στις οποίες εμφανίζεται η δόνηση του CO όταν είναι παγιδευμένο στις κοιλότητες αυτών των καταστάσεων είναι πολύ μικρότερη. Επίσης ένα χαρακτηριστικό αυτής της κατάστασης είναι η εξάρτηση της δόνησης του CO από το pH, κάτι που δεν έχει αναφερθεί σε καμία από τις άλλες καταστάσεις B-, C- και D-.

B. caa₃ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΑΣΗ

Εισαγωγή

Τα FTIR φάσματα των δεσμευμένων με CO κυτοχρωμικών οξειδασών αποκαλύπτουν πολλά χαρακτηριστικά του διπυρινικού κέντρου σιδήρου-χαλκού, όπως επιδράσεις του περιβάλλοντος της αίμης και του χαλκού πάνω στον δεσμευμένο υποκαταστάτη. Χρονικώς εξαρτώμενα πειράματα FTIR παρέχουν πληροφορίες δυναμικής της πρωτεΐνης έπειτα από την φωτοδιάσπαση του υποκαταστάτη (15-20). Η ισχυρή απορρόφηση υπερύθρου που εμφανίζει το μονοξείδιο του άνθρακα σε συνδυασμό με την δυνατότητα διεξαγωγής χρονοεξαρτώμενων πειραμάτων καθιστούν τη φασματοσκοπία υπερύθρου μια ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδο για την μελέτη τέτοιων συστημάτων. Έτσι είναι εφικτή η λεπτομερής μελέτη της φωτοδυναμικής του συμπλόκου ενζύμου-CO καθώς καθίσταται δυνατή η παρακολούθηση της κίνησης ακόμα και ενός αμινοξικού καταλοίπου.

Σε αυτή την εργασία μελετήθηκε το δεσμευμένο με CO κυτόχρωμα *caa₃* από τον θερμόφιλο οργανισμό *Thermus Thermophilus* με τη φασματοσκοπία FTIR και time-resolved step-scan FTIR στους χρόνους από 0-4 ms μετά τη φωτόλυση του CO. Φωτοδιάσπαση του υποκαταστάτη από τον αιμικό σίδηρο οδηγεί σε μεταβατική σύνδεση του CO στον Cu_B (σε 1ps) από όπου αποδεσμεύεται αργά επιστρέφοντας στον σίδηρο. Σε παλαιότερες μελέτες της *caa₃* κυτοχρωμικής οξειδασής (19) βρέθηκε ότι η αποδέσμευση του CO από το Cu_B είναι διφασική με την πρώτη φάση να εκτείνεται μέχρι τα 100 μs ενώ τη δεύτερη φάση να αρχίζει περίπου στο 1 ms και να τελειώνει στα 80 ms. Κατά την πρώτη φάση αποδέσμευσης του CO από το

χαλκό δεν παρατηρείται δεσμευτή του CO πίσω στον σίδηρο της αίμης σε αντίθεση με τη δεύτερη φάση κατά την οποία το CO επιστρέφει στον Fe^{2+} .

Πειραματικό μέρος

Το κυτόχρωμα *caa₃* απομονώθηκε από τα κύτταρα του βακτηρίου *Thermus Thermophilus* σύμφωνα με ήδη δημοσιευμένες διαδικασίες (21). Η συγκέντρωση των δειγμάτων ήταν ~1mM σε pD7.6. Η τιμή του pD υπολογίστηκε από ένα πεχάμετρο και σύμφωνα με τη σχέση $pD=pH+0.4$. Η αναγωγή έγινε με την προσθήκη sodium dithionate ($Na_2S_2O_4$) αφού πρώτα είχε απομακρυνθεί το οξυγόνο από το διάλυμα με τέσσερις κυκλούς ανάμεσα σε κενό και αέριο Ar. Για την παραγωγή του δεσμευμένου με CO ενζύμου κάθε δείγμα εκτέθηκε σε ατμόσφαιρα CO μετά την αναγωγή. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν αεροστεγώς σε μια ερμητικά κλειστή κυψελίδα FTIR αποτελούμενη από δύο παράθυρα CaF_2 . Το μήκος της οπτικής διαδρομής ήταν 14 μm .

Ως πηγή φωτόλυσης χρησιμοποιήθηκε η διπλασιασμένη συχνότητα (532nm) ενός Continuum Minilite Nd:YAG laser (7-10ns πλάτος παλμού, 3Hz, 4mJ/παλμό). Οι FTIR μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με ένα φασματοφωτόμετρο BRUCKER Equinox IFS55 με την επιλογή για time-resolved step-scan μετρήσεις. Το φασματοφωτόμετρο ήταν εφοδιασμένο με έναν ανιχνευτή MCT (Mercury Cadmium Tellurium, Graseby Infrared D316) με κατώτερο όριο ανίχνευσης τους 600 cm^{-1} . Τα φάσματα λήφθηκαν με διακριτική ικανότητα 8 cm^{-1} .

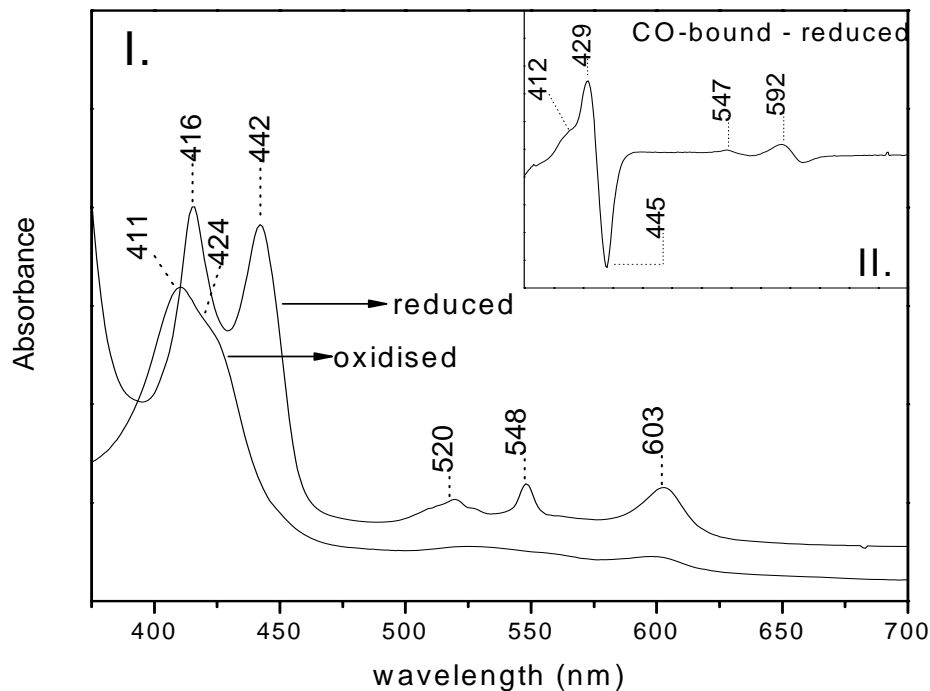
Τα πειράματα επαναλήφθηκαν έξι φορές με τη χρήση διαφορετικών δειγμάτων για τη διαπίστωση της επαναληψιμότητάς των αποτελεσμάτων.

Κάθε φάσμα αντιστοιχεί σε μέσο όρο 10 ανεξάρτητων φασμάτων από κάθε μέτρηση που αντιστοιχούν στον ίδιο χρόνο.

Η δέσμευση του CO στα σύμπλοκα επιβεβαιώθηκε λαμβάνοντας το οπτικό φάσμα ηλεκτρονικής απορρόφησης κάθε δείγματος πριν και μετά κάθε μέτρηση. Αυτό έγινε με ένα φασματοφωτόμετρο ορατού – υπεριώδους Perkin Elmer Lambda 20.

Αποτελέσματα

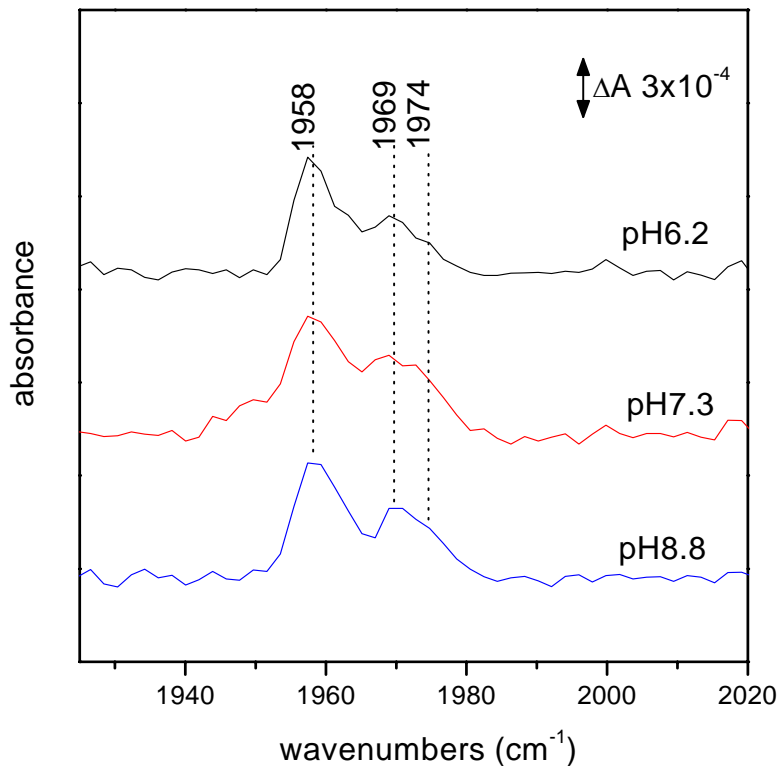
Στο φάσμα ορατού της ανηγμένης caa_3 οξειδάσης (σχήμα 1) διακρίνονται Soret απορρόφησεις στα 411 nm (αίμη c^{3+}) και 424 nm (αίμες a^{3+} και a_3^{3+}) και σε υψηλότερα μήκη κύματος απορρόφηση στα 600 nm.



σχ.1. Φάσμα οπτικής απορρόφησης της οξειδομένης και της ανηγμένης μορφής της caa_3 οξειδάσης (I). Στο ένθετο (II) φαίνεται το φάσμα διαφοράς της δεσμευμένης με CO μορφής μείον την ανηγμένη που δηλώνει την συναρμογή του υποκαταστάτη στο ενεργό κέντρο.

Η ανηγμένη μορφή του ενζύμου έχει Soret απορροφήσεις στα 416 nm (αίμη c^{3+}) και 442 nm (αίμες a^{3+} και a_3^{3+}) και στην περιοχή του ορατού στα 520 και 548 nm (αίμη c^{3+}) και στα 603 nm (αίμες a^{3+} και a_3^{3+}). Το φάσμα διαφοράς στο ένθετο δηλώνει την συναρμογή του CO στο ενεργό κέντρο.

Το απόλυτο φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου της ανηγμένης caa_3 οξειδάσης με το μονοξείδιο του άνθρακα εμφανίζει τρεις χαρακτηριστικές απορροφήσεις.

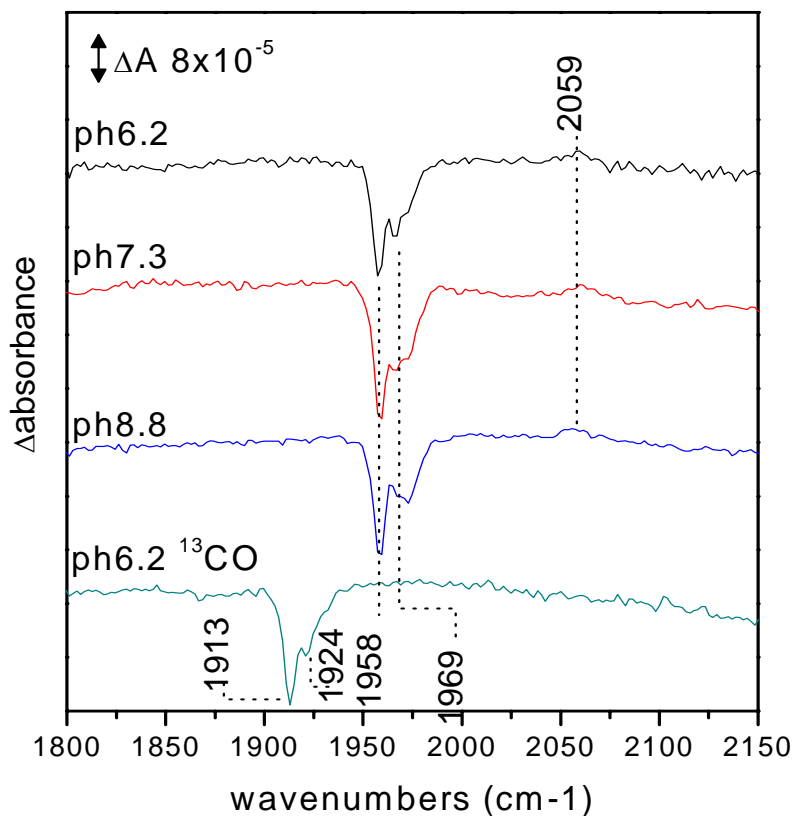


σχ.2. FTIR φασματα του δεσμευμένου με CO συμπλόκου της μυοσφαιρίνης σε τιμές pH 4.6, 7.5, 8.8 και pD7.5.

Στο σχήμα 2 φαίνονται οι απορροφήσεις αυτές σε τρία διαφορετικά pH. Η κύρια κορυφή εντοπίζεται στους 1958 cm^{-1} ενώ υπάρχουν δύο μικρότερες κορυφές στους 1969 cm^{-1} και 1974 cm^{-1} . Οι κορυφές αυτές αποδίδονται στην δόνηση τάσης του συναρμοσμένου με τον σίδηρο CO. Παρατηρούμε ότι οι σχετικές εντάσεις των τριών κορυφών δεν αλλάζουν με τη μεταβολή του pH ούτε έχουμε φαινόμενα μετατόπισης της συχνότητας δόνησης. Η πολλαπλότητα της κορυφής έχει αποδοθεί σε διαφορετικές διαμορφώσεις του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος γύρω από το δεσμευμένο CO. Αυτές ονομάζονται α -, β - και γ - διαμορφώσεις και οφείλονται σε αλλαγές στην απόσταση ανάμεσα στον αιμικό σίδηρο και στον Cu_B (22,23). Η α -διαμόρφωση αντιστοιχεί σε μία κλειστή διαμόρφωση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου στην οποία το δεσμευμένο CO αλληλεπιδρά ισχυρά με τον Cu_B , ενώ στη β -διαμόρφωση ο Cu_B είναι απομακρυσμένος από το CO (24). Στη γ -διαμόρφωση ο Cu_B βρίσκεται ακόμα πιο κοντά στη δεσμευμένη με CO αίμη με αποτέλεσμα η ομάδα του CO να υφίσταται μεγαλύτερη επίδραση και να απόμακρύνεται περισσότερο από την προτιμητέα θέση της (22). Η κύρια κορυφή στους 1958 cm^{-1} αποδίδεται στη β -διαμόρφωση ενώ οι μικρότερες στους 1969 cm^{-1} και 1974 cm^{-1} στις α - και γ -διαμορφώσεις αντίστοιχα (19). Έτσι η caa_3 κυτοχρωμική οξειδάση είναι το μόνο ένζυμο που περιέχει μια α -τυπου αίμη στην οποία η β -διαμόρφωση είναι σταθερή.

Όταν το σύμπλοκο φωτοδιασπάται, το CO μεταφέρεται μεταβατικά στον Cu_B . Στο σχήμα 3 φαίνονται τα φάσματα διαφοράς πριν τη φωτόλυση μείον μετά. Η φωτόλυση έγινε με ένα laser διόδου μήκους κύματος 416 nm . Οι κορυφές που παρουσιάζουν αρνητική απορρόφηση αντιστοιχούν σε

δονήσεις του συμπλόκου πριν τη φωτόλυση ενώ τα θετικά σήματα σε δονήσεις του προϊόντος της φωτόλυσης.

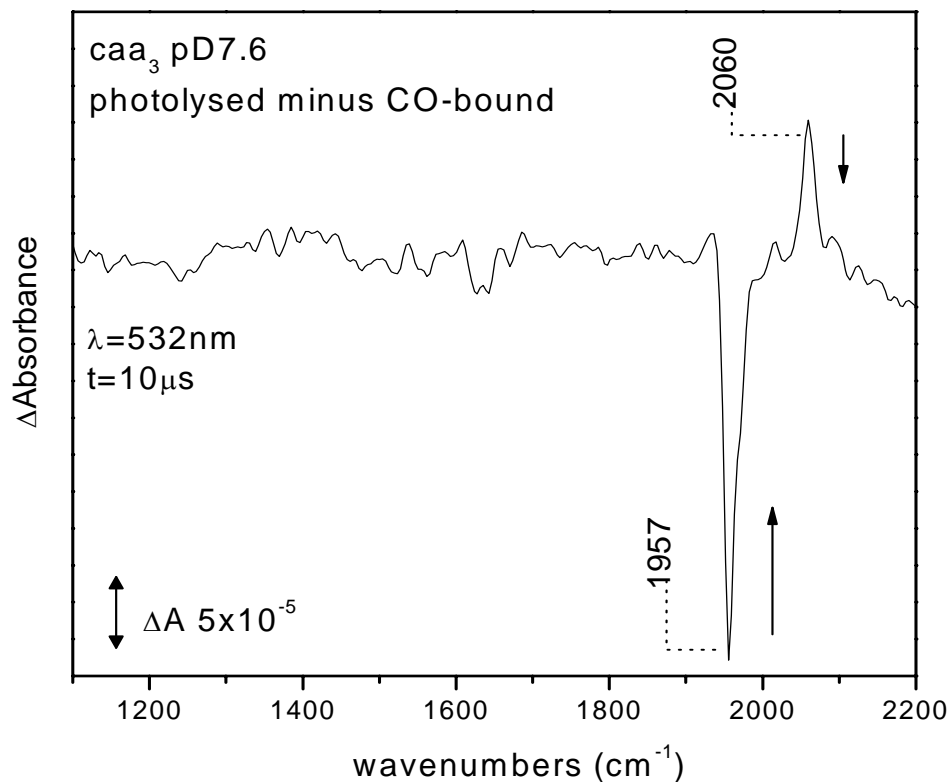


σχ.3. FTIR φάσματα διαφοράς συνεχούς φωτόλυσης του συμπλόκου με ^{12}CO και με ^{13}CO σε διάφορα pH

Η αρνητική κορυφή στα 1958 cm^{-1} και στα 1969 cm^{-1} αποδίδεται στον δεσμευμένο στον σίδηρο της αίμης υποκαταστάτη του αρχικού συμπλόκου. Επίσης εμφανίζεται μία πολύ μικρή θετική κορυφή γύρω στους 2059 cm^{-1} . Αυτή η κορυφή αποδίδεται στη δόνηση τάσης του CO το οποίο έχει μεταναστεύσει στο χαλκό. Κατά τη φωτόλυση του συμπλόκου στο οποίο δεσμεύτηκε ^{13}CO βλέπουμε ότι η δόνηση του φωτολυόμενου αρχικού

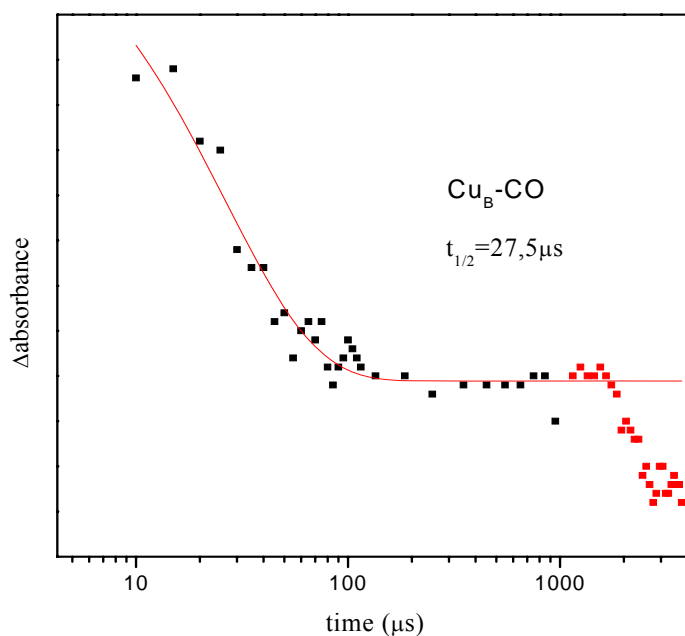
συμπλόκου έχει μετατοπιστεί κατά 45 cm^{-1} ($1958 \text{ cm}^{-1} \rightarrow 1913 \text{ cm}^{-1}$), όπως αναμενόταν. Η θετική δόνηση δεν παρατηρείται καθόλου λόγω της κακής ποιότητας του φάσματος.

Όπως αναφέρθηκε, μετά τη φωτόλυση το CO δεσμεύεται στον χαλκό και μετά από λίγα ms επαναδεσμεύεται στον σίδηρο. Η αποδέσμευση από τον χαλκό ακολουθεί δύο φάσεις. Η επαναδέσμευση και η αποδέσμευση φαίνονται στο φάσμα ως μειώσεις έντασεων των θετικών και αρνητικών κορυφών αφού πρόκειται για φάσματα διαφοράς. Στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 4) φαίνεται ένα τέτοιο φάσμα διαφοράς που αντιστοιχεί σε χρόνο 10 μs μετά τη φωτόλυση.



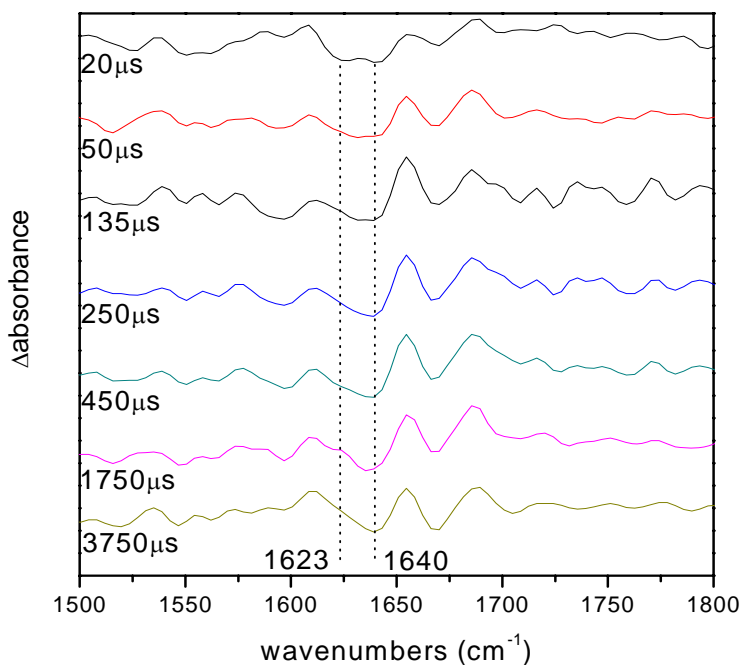
σχ.4. FTIR φάσμα διαφοράς σε χρόνο 10 μs μετά τη φωτόλυση του συμπλόκου με $\lambda = 532 \text{ nm}$.

Στο φάσμα φαίνεται η θετική κορυφή στους 2060 cm^{-1} και μία αρνητική στους 1957 cm^{-1} . Επίσης στην περιοχή κάτω από τους 1700 cm^{-1} φαίνονται δονήσεις της πρωτεΐνης που προκαλούνται από την αλλαγή που προκλήθηκε στο σύστημα (φωτόλυση του δεσμευμένου υποκαταστάτη). Με το χρόνο η θετική κορυφή (2060 cm^{-1}) χάνει ένταση μέχρι τα $100\text{ }\mu\text{s}$ και μετά παραμένει σταθερή μέχρι περίπου τα 3 ms (πρώτη φάση). Έπειτα συνεχίζει να μειώνεται η έντασή της με την ταυτόχρονη μείωση και της έντασης της αρνητικής κορυφής στους 1957 cm^{-1} (δεύτερη φάση). Κατά τη δεύτερη φάση, δηλαδή, της αποδέσμευσης του CO από το χαλκό παρατηρείται επαναδέσμευση του CO στη αίμη. Η διαδικασία επαναδέσμευσης του υποκαταστάτη διαρκεί περίπου 80 ms . Παρακάτω (σχήμα 5) φαίνεται η μεταβολή της απορρόφησης στους 2060 cm^{-1} ως προς το χρόνο μετά τη φωτόλυση.



σχ.5. Μεταβολή της έντασης στους 2060 cm^{-1} ως προς το χρόνο μετά τη φωτόλυση.

Κατά την πρώτη φάση της μεταβολής της έντασης στους 2060 cm^{-1} παρατηρείται μία αλλαγή στην ένταση της αρνητικής κορυφής στους 1623 cm^{-1} όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 5).



σχ.6. Η ένταση στους 1623 cm^{-1} σε διάφορους χρόνους μετά τη φωτόλυση.

Παρατηρείται ότι η αρνητική κορυφή στους 1623 cm^{-1} αρχικά ($20\text{ }\mu\text{s}$) έχει την ίδια ένταση με την κορυφή στους 1640 cm^{-1} . Μετά τα $135\text{ }\mu\text{s}$ όμως χάνει εξ' ολοκλήρου την έντασή της. Αυτό συμβαίνει ταυτόχρονα με την πρώτη φάση της μεταβολής της έντασης στους 2060 cm^{-1} .

Συμπεράσματα

Η κορυφή στους 2060 cm^{-1} είναι η δόνηση τάσης του CO όταν αυτό είναι συναρμοσμένο μεταβατικά στον χαλκό. Η μείωση της έντασης στους 2060 cm^{-1} είναι, όπως αναφέρθηκε, διφασική. Κατα την πρώτη φάση της μείωσης οι υπόλοιπες δονήσεις της πρωτεΐνης παραμένουν αμετάβλητες. Η μόνη αλλαγή που παρατηρείται είναι μείωση της κορυφής στους 1623 cm^{-1} , ταυτόχρονη με την μείωση της πρώτης φάσης στους 2060 cm^{-1} . Η δόνηση στους 1623 cm^{-1} έχει αποδοθεί σε δονήσεις της amide I περιοχής που αντιστοιχούν σε δονήσεις έκτασης της ομάδας C=O των πεπτιδικών δεσμών, συζευγμένες με τις δονήσεις έκτασης CN και κάμψης NH.

Βιβλιογραφία

1. Nienhaus, K., Deng, P., Olson, J. S.; Warren, J. J., Nienhaus, G. U. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 42532-42544
2. Braunstein, D. P., Chu, K., Egeberg, K. D., Frauenfelder, H., Mourant, J. R., Nienhaus, G. U., Ormos, P., Sligar, S. G., Springer, B. A. & Young, R. D. (1993) *Biophys. J.* **65**, 2447-2454
3. Li, T., Quillin, M. L., G. N. Phillips, J. & Olson, J. S. (1994) *Biochemistry* **33**, 1433-1446
4. Phillips, G. N. Jr., Teodoro, M. L., Li, T., Smith, B., & Olson, J. S. (1999) *J. Phys. Chem. B* **103**, 8817-8829
5. Yang, F., and Phillips, G. N., Jr. (1996) *J. Mol. Biol.* **256**, 762–774
6. Vojtechovsky, J., Chu, K., Berendzen, J., Sweet, R. M., and Schlichting, I. (1999) *Biophys. J.* **77**, 2153–2174
7. Muller, J. D., McMahon, B. H., Chien, E. Y., Sligar, S. G., and Nienhaus, G. U. (1999) *Biophys. J.* **77**, 1036–1051
8. Tian, W. D., Sage, J. T., and Champion, P. M. (1993) *J. Mol. Biol.* **233**, 155–166
9. Park, E. S., Andrews, S. S., Hu, R. B., and Boxer, S. G. (1999) *J. Phys. Chem. B* **103**, 9813–9817
10. Park, E. S., Boxer, S. G. (2002) *J. Phys. Chem.* **106**, 5800–5806
11. Franzen, S. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 13271–13281
12. Takano, T. (1977) *J. Mol. Biol.* **110**, 569-584
13. Gao, Y., El-Mashtoly, S. F., Pal, B., Hayashi, T., Harada, K., Nakagawa, T. & Kitagawa, T. *Unpublished Results*

14. Schlereth, D., Mantele, W. (1992) *Biochemistry* **31**, 7494-7502
15. Koutsoupakis, K., S. Stavrakis, E. Pinakoulaki, T. Soulimane, and C. Varotsis (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 32860-32866
16. Koutsoupakis, K., S. Stavrakis, T. Soulimane, and C. Varotsis (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 14893-14896
17. Koutsoupakis, K., S. T. Soulimane, and C. Varotsis. 2003 *J. Biol. Chem.* **278**, 36806-36809
18. Koutsoupakis, K., S. T. Soulimane, and C. Varotsis. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 14728-14732
19. Pinakoulaki, E., T. Soulimane, and C. Varotsis. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 32867-32874
20. Koutsoupakis, K., S. T. Soulimane, and C. Varotsis. (2004) *Biophysical J.* **86**, 2438-2444
21. Gerscher, S., Hildebreand, P., Soulimane, T., Buse, G. (1998) *Biospectroscopy* **4**, 365-377
22. Pinakoulaki, E. Pfitzner, U. Ludwig, B., and Varotsis C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 13563-13568

23. Das, T. K., Tomson, F. K., Gennis, R. B., Gordon, M., and Rousseau, D. L. (2001) *Biophys. J.* **80**, 2039-2045
24. Wang, J., Takahashi, S., Hosler, P. H., Mitchell, D. M., Ferguson-Miller, S., Gennis R. B., and Rousseau, D. L. (1995) *Biochemistry* **34**, 9819-9825
25. Lamb, D. C., Nienhaus, K., Arcovito, A., Draghi, F., Miele, A. E., Brunori, M. & Nienhaus, G. U. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 11636-11644
26. Kriegl, J. M., Nienhaus, K., Deng, P., Fuchs, J. & Nienhaus, G. U. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 7069-7074