

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Διδακτορική διατριβή

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕ
ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER ΧΡΟΝΙΚΗΣ
ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ba_3 ΑΠΟ
ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Thermus thermophilus*

Αντώνης Νικολαΐδης

Λεμεσός 2016

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕ
ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER ΧΡΟΝΙΚΗΣ
ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ba_3 ΑΠΟ
ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Thermus thermophilus*

ΤΟΥ
Αντώνη Νικολαΐδη

Λεμεσός 2016

ΕΝΤΥΠΟ ΕΓΚΡΙΣΗΣ

Διδακτορική διατριβή

**ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ
FOURIER ΧΡΟΝΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ba_3
ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Thermus thermophilus***

Παρουσιάστηκε από

Αντώνη Νικολαΐδη

Επιβλέπων καθηγητής: Κωνσταντίνος Βαρώτσης

Μέλος επιτροπής (Πρόεδρος): Σταύρος Φαράντος

Μέλος επιτροπής: Δημήτριος Άγγλος

Μέλος επιτροπής: Κωνσταντίνος Βαρώτσης

Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

Ιούνιος, 2016

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Αντώνης Νικολαΐδης, 2016

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Βιοκατάλυσης και Βιοτεχνολογίας του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου και θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου, αρχίζοντας από τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ. Κωνσταντίνο Βαρώτση, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, την παραχώρηση του εργαστηρίου και του εργαστηριακού εξοπλισμού για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, για την πολύτιμη βοήθεια και γνώσεις που μου παρείχε καθώς και για την άψογη συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα δύσκολα αλλά αποδοτικά έτη.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συνάδελφους μου υποψήφιους διδάκτορες, Αριστόδημο Ιωάννου, Αναστασία Αδάμου και Γιάννα Βούζα για την συναδελφική αλληλεγγύη που έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια που συνεργαστήκαμε.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την πολύτιμη συμπαράσταση τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή έγινε με σκοπό τη μελέτη της ba_3 οξειδοαναγωγάσης απομονωμένης από το βακτήριο *Thermus thermophilus* με φασματοσκοπία υπερέθρου με μετασχηματισμό Fourier με χρονική ανάλυση. Η ba_3 οξειδοαναγωγάση έχει τρεις ζωτικής σημασίας λειτουργίες, καταλύει την αναγωγή του οξυγόνου σε νερό, την αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου σε οξείδιο του διαζώτου και την οξείδωση του μονοξειδίου του άνθρακα σε διοξείδιο του άνθρακα. Το ενεργό της κέντρο, στο οποίο γίνονται αυτές οι διεργασίες, αποτελείται από μια αίμη a_3 και ένα άτομο χαλκού, Cu_B .

Στην πρώτη ενότητα μελετήθηκε το κανάλι εισόδου πρωτονίων στο ενεργό κέντρο της οξειδοαναγωγάσης ba_3 με τη χρήση της «φωτεινή μείον σκοτεινή» (*light minus dark*) φασματοσκοπίας υπερέθρου με μετασχηματισμό Fourier και με την ανταλλαγή διαλύτη $H_2^{16}O/H_2^{18}O/D_2^{16}O$. Η πρωτονίωση/αποπρωτονίωση των ενεργών καρβοξυλικών πλευρικών αλυσίδων από δίκτυα νερών που σχηματίζουν τα κανάλια εισόδου των πρωτονίων και εξόδου στις πρωτεΐνες είναι σημαντικά βήματα για την πρωτεϊνική κατάλυση. Ένα εξαιρετικό σύστημα για τη μελέτη τέτοιων βασικών αρχών είναι η οξειδοαναγωγάση ba_3 που απομονώνεται από το βακτήριο *Thermus thermophilus*, επειδή χρησιμοποιεί ένα κανάλι εισόδου πρωτονίων για τη μεταφορά των πρωτονίων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και για τη διεξαγωγή της χημείας οξυγόνου αλλά και για την άντληση πρωτονίων. Ανιχνεύτηκε η αλληλεπίδραση της προπιονικής ομάδας A της αίμης a_3 και του ζευγαριού Asp372–His376, τα οποία σχηματίζουν τη βαλβίδα του καναλιού εξόδου των πρωτονίων με τα εσωτερικά μόρια νερού στην ba_3 οξειδοαναγωγάση. Το κανάλι εισόδου των πρωτονίων αποτελείται από αρκετά μόρια νερού, συμπεριλαμβανομένων και των w941/w946 που είναι ενωμένα με δεσμούς υδρογόνου με την πρωτονιωμένη μορφή της προπιονικής ομάδας A- H^+ , λειτουργώντας ως κατιόν Zundel. Επίσης κατέστη δυνατός ο εντοπισμός των δύο ευαίσθητων στο $H_2^{18}O$ ταινιών απορρόφησης στους 3640 και 3634 cm^{-1} που δείχνει την ύπαρξη μορίων νερού ασθενώς δεσμευμένων με δεσμούς υδρογόνου.

Στη δεύτερη ενότητα εφαρμόστηκε η τεχνική χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερέθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) για την παρακολούθηση του ενεργού κέντρου της δεσμευμένης με μονοξείδιο του άνθρακα, θερμοφίλης ba_3 οξειδοαναγωγάσης καθώς αυτή εκτελεί τη λειτουργία της. Τα nsTRS²-FTIR στιγμιότυπα των φωτολυμένων αίμη a_3 Fe-CO/ Cu_B ειδών, συνέλαβαν ένα «μεταβατικό

στάδιο» του οποίου οι πλευρικές αλυσίδες εμποδίζουν το φωτολυμένο CO να εισέλθει στην κοιλότητα εγκλωβισμού (docking site). Εντοπίστηκαν τρία σετ κορυφών του «παγιδευμένου» CO που προκύπτουν από το φωτοπροϊόν του φωτολυμένου συμπλόκου ba_3 -CO, με διαφορετικό προσανατολισμό και παρουσιάζουν διαφορετική κινητική. Οι τροχιές του «παγιδευμένου» CO στους 2122, 2129 και 2137 cm^{-1} αναφέρονται ως B₂, B₁ και B₀ ενδιάμεσα στάδια, αντίστοιχα. Τα παρών δεδομένα υπογραμμίζουν την αναδυόμενη γενική στρατηγική των αιμοπρωτεϊνών, που λειτουργούν είτε ως καταλυτικά ένζυμα, είτε ως μεταφορείς υποκαταστατών και επίσης τη σημασία των νερών και των μηχανισμών μεταφοράς πρωτονίων στην κοιλότητα εγκλωβισμού (docking site) που είναι απαραίτητα στο αναπνευστικό ένζυμο για τη λειτουργία του ως ο κύριος ενεργειακός μετατροπέας στη βιολογία.

Στην τρίτη ενότητα έγινε μια εκτενή μελέτη της συμπεριφοράς και λειτουργίας της πρωτεΐνης όταν αυτή βρίσκεται σε διαφορετικό περιβάλλον από το φυσιολογικό της. Αυτό επιτεύχθηκε με την αλλαγή του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος με χρήση διαλυτών με διαφορετικές τιμές pH και pD και με τη χρήση της φασματοσκοπικής τεχνικής χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR). Με την τεχνική αυτή λήφθηκαν και μελετήθηκαν τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm^{-1} σε χρόνο, $t_d = 100$ -80000 ns, του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου ba_3 -CO που υπέστη φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm και έγινε εφικτή η μελέτη που έχει η επίδραση του διαλύτη στην πρωτεϊνική δυναμική του ενζύμου.

Τέλος, στην τέταρτη ενότητα μελετήθηκε η συμπεριφορά της οξειδοαναγωγής ba_3 όταν αυτή μεταβαίνει από μια τεταμένη σε μια πιο χαλαρή διαμόρφωση. Η οξειδοαναγωγή ba_3 καταλύει την τεσσάρων ηλεκτρονίων αναγωγή του O₂ σε H₂O, μετατρέποντας την ενέργεια αυτής της αντίδρασης σε μια διαμεμβρανική πρωτονιακή κινητήρια δύναμη, τη δυο ηλεκτρονίων αναγωγή του NO σε N₂O και τελικά τη δυο ηλεκτρονίων οξείδωση του CO σε CO₂. Για την πραγματοποίηση αυτών των αντιδράσεων, η κυτοχρωμική οξειδάση ba_3 εισέρχεται σε μια τεταμένη κατάσταση και καθώς ολοκληρώνονται οι αντιδράσεις και απομακρύνονται τα προϊόντα τους από το ενεργό της κέντρο, αυτή τείνει να εισέλθει σε μια πιο χαλαρή διαμόρφωση. Με την τεχνική χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid

Scan FTIR) δίνεται η δυνατότητα για μελέτη της συμπεριφοράς της πρωτεΐνης μετά τη φωτόλυση του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου ba_3 -CO. Με τη φωτόλυση του δεσμού Fe-CO της αίμης a_3 από ένα παλμό 7 ns από ένα παλμικό laser μήκους κύματος 532 nm, προσδίδεται ένα τεράστιο ποσό ενέργειας σε ολόκληρη την πρωτεΐνη. Αυτή η ενέργεια ωθεί την πρωτεΐνη να αλλάξει την κατάσταση στην οποία βρίσκεται και μπει μια τεταμένη κατάσταση. Καθώς περνά ο χρόνος η ενέργεια του παλμού εξασθενεί και η πρωτεΐνη τείνει να πάρει μια πιο χαλαρή διαμόρφωση. Η διαδικασία της πρωτεϊνική χαλάρωσης (protein relaxation) μπορεί να παρατηρήθηκε και να μελετήθηκε με την τεχνική χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) όπως επίσης και ο ρυθμός με τον οποίο χαλαρώνει (relaxation rate) το ένζυμο.

Λέξεις κλειδιά: ns Time-Resolved Step-Scan FTIR, Rapid scan FTIR, ba_3 οξειδοαναγωγή

ABSTRACT

This thesis's aim was to study the ba_3 oxidase from *Thermus thermophilus* using Time-Resolved Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a tool. The binuclear center of ba_3 oxidase consists of a high spin heme a_3 and a Cu_B and catalyzes the oxygen reduction to water, the NO reduction to N_2O and the CO oxidation to CO_2 .

At first we study the proton loading site into the active site of ba_3 oxidase using the *light minus dark* FTIR spectroscopy and the $H_2^{16}O/H_2^{18}O/D_2^{16}O$ solvent exchange. We were able to detect the interactions between the Propionate A of heme a_3 and the D372-H376 pair that forms the exit channel's valve and also the two $H_2^{18}O$ sensitive bands at 3640 and 3634 cm^{-1} that shows the existence of water molecules that forms weak hydrogen bonds.

The second step was to observe the active site of the fully reduced ba_3 -CO complex using the Time-Resolved Step-Scan FTIR spectroscopy. With this technique we were able to watch and identify the three intermediate states B_0 , B_1 and B_2 of the photolyzed CO that was trapped inside a docking site near the binuclear center.

Third step was to study the behavior of ba_3 oxidase after changing the solvent's pH and pD values and observe it using the ns Time-Resolved Step-Scan FTIR spectroscopic technique as a tool.

Finally we studied the ba_3 oxidase's relaxation rate after the photolysis of the fully reduced ba_3 -CO complex, using the spectroscopic technique Time-Resolved Rapid Scan FTIR.

Keywords: ns Time-Resolved Step-Scan FTIR, Rapid scan FTIR, ba_3 oxidase, relaxing rate, protein relaxation

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της *ba₃* οξειδοαναγωγάσης που απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus thermophilus*, ένα αρνητικό κατά Gram αερόβιο βακτήριο που μπορεί και αναπτύσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες μέχρι και 80⁰C, γεγονός που κάνει τη μελέτη του να έχει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον. Πολλοί ερευνητές κατά το παρελθόν προσπάθησαν να δώσουν απαντήσεις σε πολύ μεγάλα ερωτήματα όπως με πιο τρόπο μπορεί και επιβιώνει και πως μπορεί η συγκεκριμένη οξειδοαναγωγάση να εκτελεί με απόλυτη επιτυχία τις ζωτικές της λειτουργίες σε ένα ακραίο περιβάλλον. Οι ζωτικές λειτουργίες της *ba₃* οξειδοαναγωγάσης είναι η αναπνοή, δηλαδή η αναγωγή του οξυγόνου (O₂) σε νερό (H₂O), η αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO), ενός επιβλαβούς για το περιβάλλον αερίου, σε οξείδιο του διαζώτου (N₂O) και η οξείδωση ενός άλλου επιβλαβές αερίου του μονοξειδίου του άνθρακα (CO) σε διοξείδιο του άνθρακα (CO₂). Οι λειτουργίες της *ba₃* οξειδοαναγωγάσης είναι και ο λόγος για τον οποίο αυτή η οξειδοαναγωγάση έχει μεγάλη περιβαλλοντολογική σημασία.

Κατά τη διατριβή μου έχω χρησιμοποιήσει διάφορες τεχνικές της φασματοσκοπίας υπερύθρου. Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία υπερύθρου είναι ότι είναι μια τεχνική με την οποία ο ερευνητής μπορεί να μελετήσει δομικές αλλαγές που συμβαίνουν στο ένζυμο κατά τη διάρκεια της λειτουργίας του. Περισσότερο έχω εστιάσει στις τεχνικές χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) και χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) έχοντας ως στόχο τη μελέτη των δομικών αλλαγών που συμβαίνουν χρονικά στην πλήρως ανηγμένη και δεσμευμένη με μονοξείδιο του άνθρακα μορφή της *ba₃* οξειδοαναγωγάσης όταν γίνεται φωτόλυση του συμπλόκου της αίμης α_3 -CO από ένα παλμό 532nm.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	vi
ABSTRACT	ix
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	x
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	xi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xv
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	xvi
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	xxiv
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ	xxv
1 Δράση, δομή και λειτουργία της ba_3 οξειδοαναγωγάσης	1
1.1 Το βακτήριο <i>Thermus thermophilus</i>	1
1.2 Κυτοχρωμική ba_3 οξειδοαναγωγάση	2
1.2.1 Δομή της ba_3 κυτοχρωμικής οξειδοαναγωγάσης	3
1.2.2 Κανάλια μεταφοράς ηλεκτρονίων	10
1.2.3 Κανάλια μεταφοράς πρωτονίων και κανάλι εισόδου υποκαταστατών	11
1.3 Φασματοφωτομετρική και κινητική ανάλυση του υποκαταστάτη CO στην ba_3 οξειδοαναγωγάση – Προσομοίωση της λειτουργίας της αναπνοής	14
1.3.1 Κινητική δέσμευσης, φωτοδιάσπασης και ανασυνδυασμού του διμοριακού υποκαταστάτη μονοξειδίου του άνθρακα (CO) στην ba_3 οξειδοαναγωγάση	15
1.3.2 Μεταφορά ηλεκτρονίων στην οξειδοαναγωγάση του κυτοχρώματος c	21
1.3.3 Μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ της αίμης b και της αίμης a_3 στην ba_3 οξειδοαναγωγάση	23
1.3.4 Απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο του Cu_A στο διπυρηνικό κέντρο αίμης $a_3 - Cu_B$ της ba_3 οξειδοαναγωγάσης	26
1.4 Παραπομπές	27
2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου	30

2.1	Βασικές αρχές φασματοσκοπίας	30
2.2	Δονητική φασματοσκοπία – Φασματοσκοπία Υπερύθρου	31
2.3	Είδη δονήσεων	33
2.4	Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier	37
2.4.1	Διάταξη φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) – Συμβολόμετρο Michelson	38
2.4.2	Το συμβολογράφημα – Μετασχηματισμοί Fourier	40
2.4.3	Συναρτήσεις αποδισμού (Apodization functions) – Φαινόμενα φάσεων	43
2.4.4	Μειονεκτήματα – Πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας υπερύθρου	54
2.5	Παραπομπές	55
3	Πειραματικό Μέρος – Πειραματικές διαδικασίες	56
3.1	Τεχνική χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns Time-Resolved Step-Scan FTIR)	57
3.2	Τεχνική χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR)	62
3.3	Παραπομπές	65
4	Εντοπισμός μορίων νερού με λειτουργικό ρόλο, δεσμευμένων με δεσμούς υδρογόνου με πρωτονιωμένες / αποπρωτονιωμένες καρβοξυλικές πλευρικές αλυσίδες κλειδιά του αναπνευστικού ενζύμου ba_3 οξειδοαναγωγή	67
4.1	Περίληψη	67
4.2	Εισαγωγή	67
4.3	Πειραματικές διαδικασίες	72
4.3.1	Προετοιμασία δειγμάτων	72
4.3.2	Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)	73
4.4	Αποτελέσματα – Συζήτηση	75
4.5	Συμπεράσματα	85

4.6	Παραπομπές.....	85
5	Παρακολουθώντας την νανοδευτερολέπτων πορεία μετανάστευσης των υποκαταστατών και τη δομική ανάπαυση της πρωτεΐνης: Δομές των B ₀ , B ₁ και B ₂ ενδιάμεσων καταστάσεων	88
5.1	Περίληψη.....	88
5.2	Εισαγωγή.....	88
5.3	Υλικά και μέθοδοι.....	93
5.3.1	Προετοιμασία δειγμάτων.....	93
5.3.2	Τεχνική χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS ² -FTIR).....	93
5.4	Αποτελέσματα.....	94
5.5	Συμπεράσματα.....	107
5.6	Παραπομπές.....	108
6	Μελέτη της πρωτεϊνικής δυναμικής της κυτοχρωμικής οξειδοαναγωγής ba ₃ χρησιμοποιώντας την τεχνική χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns Time-Resolved Step-Scan FTIR).....	110
6.1	Εισαγωγή.....	110
6.2	Πειραματικές διαδικασίες.....	111
6.2.1	Προετοιμασία Δειγμάτων.....	111
6.2.2	Τεχνική χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (nanosecond TRS ² -FTIR).....	112
6.3	Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	113
6.4	Συμπεράσματα.....	129
6.5	Παραπομπές.....	131
7	Μελέτη της πρωτεϊνικής χαλάρωσης της κυτοχρωμικής οξειδοαναγωγής ba ₃ χρησιμοποιώντας την τεχνική χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR)	133

7.1	Εισαγωγή	133
7.2	Πειραματικές διαδικασίες.....	134
7.2.1	Προετοιμασία δειγμάτων	134
7.2.2	Τεχνική χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) 134	
7.3	Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	137
7.4	Συμπεράσματα	149
7.5	Παραπομπές.....	150
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ		152
	Παράμετροι πειράματος χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS ² -FTIR)	152
	Παράμετροι πειράματος χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) 153	

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Κινητικά δεδομένα διαφόρων οξειδοαναγωγάσεων. ²⁸	17
Πίνακας 2. Φασματοσκοπική ανάλυση σε σχέση με το ρυθμό σάρωσης του φασματοφωτόμετρου υπερύθρου Vertex 70n με μέγιστη ταχύτητα σάρωσης 160 kHz.	64
Πίνακας 3. Πιθανές αποδόσεις των κορυφών που ανιχνεύτηκαν στα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS ² -FTIR).	128
Πίνακας 4. Πιθανές αποδόσεις των κορυφών που αντιστοιχούν στη δευτερεύουσα δομή του Amide I και ανιχνεύτηκαν στα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS ² -FTIR) με διαλύτη D ₂ O.	129
Πίνακας 5. Πιθανές αποδόσεις των κορυφών που ανιχνεύτηκαν στα φάσματα χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR).	148

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Το βακτήριο <i>Thermus Thermophilus</i> HB8 (http://www.thermus.org/).	1
Εικόνα 2. Η αναπνευστική αλυσίδα του βακτηρίου <i>Thermus thermophilus</i>	2
Εικόνα 3. Απεικόνιση της ba_3 κυτοχρωμικής οξειδοαναγωγής από το βακτήριο <i>Thermus thermophilus</i> . Η εικόνα δημιουργήθηκε με το λογισμικό PyMOL (PDB 1EHK).	4
Εικόνα 4. Αίμη b και διπυρηνικό κέντρο αίμης $a_3 - Cu_B$ της ba_3 οξειδοαναγωγής. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το λογισμικό PyMOL (PDB 1EHK).	5
Εικόνα 5. Διπυρηνικό ενεργό κέντρο αίμης $a_3 - Cu_B$ με τους υποκαταστάτες τους και χώρος που βρίσκεται στην κρυσταλλική δομή της ba_3 οξειδοαναγωγής. Το άτομο σιδήρου απεικονίζεται ως ροζ σφαίρα και του χαλκού ως μπλε σφαίρα. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το λογισμικό PyMOL (PDB 1EHK).	7
Εικόνα 6. Απεικόνιση της υπομονάδας II (μπλε) της ba_3 οξειδοαναγωγής με το ομοδιπυρηνικό κέντρο των ατόμων χαλκού, Cu_A (κόκκινες σφαίρες) και τους υποκαταστάτες τους. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα PyMOL (PDB 1EHK).	9
Εικόνα 7. Δύο προτεινόμενοι μηχανισμοί μεταφοράς ηλεκτρονίων στην ba_3 οξειδοαναγωγή από το <i>Thermus thermophilus</i> . A) Το κανάλι αίμης $b - αίμης a_3 - Cu_B$ μέσω των αμινοξέων His386, Phe385 και His384. B) Το απευθείας $Cu_A - Cu_B$ κανάλι μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω των αμινοξέων Gln151, Tyr136, Trp229 και His283. Τα άτομα του χαλκού, Cu_A απεικονίζονται ως μπλε σφαίρες και τα άτομα του σιδήρου της αίμης b και a_3 και του Cu_B απεικονίζονται ως κόκκινες σφαίρες. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα PyMOL (PDB 1EHK). ²⁸	11
Εικόνα 8. Τα 2 πιθανά κανάλια μεταφοράς πρωτονίων στην ba_3 οξειδοαναγωγή. <i>EMBO J.</i> 19 (2000) 1766-1776. ¹	13
Εικόνα 9. Μοντέλο κινητικής του μηχανισμού συναρμογής του CO στο διπυρηνικό κέντρο αίμης a_3-Cu_B της οξειδοαναγωγής ba_3 από το εξαιρετικά θερμόφιλο βακτήριο <i>Thermus thermophilus</i> HB8. ²⁸	15
Εικόνα 10. Απεικόνιση της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα c_{552} στο ομοδιπυρηνικό κέντρο που αποτελείται από δυο άτομα χαλκού μικτού σθένους, $[Cu_A^{+1.5}-Cu_A^{+1.5}]$,	

που απεικονίζονται σαν κόκκινες σφαίρες και τους υποκαταστάτες τους της υπομονάδας II (μπλε) της ba_3 οξειδοαναγωγής.....	22
Εικόνα 11. Απεικόνιση της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα c_{552} αρχικά στο ομοδιπυρηνικό κέντρο της υπομονάδας II (μπλε) που αποτελείται από δυο άτομα χαλκού μικτού σθένους $[Cu_A^{+1.5}-Cu_A^{+1.5}]$, που απεικονίζονται σαν μπλε σφαίρες της ba_3 οξειδοαναγωγής. Στη συνέχεια τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στην αίμη b και ακολούθως στο διπυρηνικό κέντρο της ba_3 οξειδοαναγωγής που απαρτίζεται από την αίμη a_3 και το άτομο Cu_B (μπλε σφαίρα).	24
Εικόνα 12. Απεικόνιση των κβαντικών ενεργειακών καταστάσεων ενός μορίου.	30
Εικόνα 13. Απεικόνιση δόνησης ενός διατομικού μορίου όταν αυτό απορροφήσει υπέρυθρη ακτινοβολία.	32
Εικόνα 14. Νόμος του Hooke απεικονισμένος με ελατήριο και σφαίρες.....	33
Εικόνα 15. Πειραματική απεικόνιση του νόμου Lambert-Beer.....	34
Εικόνα 16. Είδη δονήσεων.....	36
Εικόνα 17. Διαγραμματική απεικόνιση συμβολόμετρου Michelson.....	39
Εικόνα 18. Δημιουργία ενισχυτικών και καταστροφικών κροσσών συμβολής ως αποτέλεσμα της απόστασης του διαχωριστή δέσμης από τα κάτοπτρα του συμβολόμετρου Michelson....	40
Εικόνα 19. Μετασχηματισμός Fourier του συμβολογραφήματος σε φάσμα.....	43
Εικόνα 20. Ο μετασχηματισμός Fourier μιας συνάρτησης Boxcar μονάδας πλάτους που εκτείνεται από το $-\Delta$ στο $+\Delta$. Αυτή η συνάρτηση έχει τη μορφή της ημιτονοειδούς συνάρτησης $\sin x/x$	45
Εικόνα 21. Μετασχηματισμός Fourier ενός αστάθμιστου ημιτονοειδούς συμβολογραφήματος δημιουργημένου από μια μονοχρωματική γραμμή σε κυματάριθμο $\tilde{\nu}_1$. Η μέγιστη καθυστέρηση αυτού του συμβολογραφήματος είναι Δ εκατοστόμετρα.....	45
Εικόνα 22. Η συνάρτηση sinc^2 σχήματος γραμμής του οργάνου, υπολογισμένη για τριγωνικά αποδισμικά συμβολογραφήματα.	46
Εικόνα 23. α) Συμβολογράφημα μορφής ημιτονοειδούς κύματος. β) Αποτέλεσμα που προκύπτει εφαρμόζοντας συνημιτονοειδή μετασχηματισμό Fourier σε αυτό το συμβολογράφημα.....	49

Εικόνα 24. Τυπικό συμβολογράφημα μιας μελανής πηγής στην περιοχή του σημείου μηδενικής καθυστέρησης (centerburst) μετρημένης με ένα ταχείας σάρωσης (rapid-scanning) συμβολόμετρο. Η ελαφρά ασυμμετρία που υπάρχει υποδεικνύει ένα μικρό ποσοστό τερετισμού.....	50
Εικόνα 25. Λειτουργία ενός τυπικού FT-IR φασματοφωτόμετρου. Η δέσμη από την πηγή χωρίζεται με ένα διαχωριστή δέσμης, στη συνέχεια οι δύο νέες δέσμες που προκύπτουν χτυπούν σε καθρέπτες και επιστρέφουν πίσω στο διαχωριστή δέσμης όπου και ενώνονται εκ νέου. Οι εκθέτες R και T εκφράζουν την αντανάκλαση (Reflection) και την μετάδοση (Transmission).....	52
Εικόνα 26. Διαγραμματική απεικόνιση της χρονικής κλίμακας των πειραματικών τεχνικών χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns Time-Resolved Step-Scan FTIR) και χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR).....	56
Εικόνα 27. Διαγραμματική σύγκριση της τεχνικής χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns Time-Resolved Step-Scan FTIR) σε σχέση με τη συμβατική μέθοδο.	58
Εικόνα 28. Διάγραμμα διαδικασίας που λαμβάνει χώρα ανά βήμα του κινητού καθρέπτη του συμβολόμετρου κατά τη διάρκεια της χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns Time-Resolved Step-Scan FTIR). Τα σημεία της χρονικής εξέλιξης του συστήματος είναι με μπλε χρώμα ενώ με κίτρινο χρώμα είναι τα σημεία αναφοράς.....	60
Εικόνα 29. Πειραματική διάταξη για τα πειράματα χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns Time-Resolved Step-Scan FTIR).....	61
Εικόνα 30. Αρχή τεχνικής χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR).	62
Εικόνα 31. Διαγραμματική απεικόνιση των πειραματικών μετρήσεων φωτόλυσης του συμπλόκου <i>ba</i> ₃ -CO με την τεχνική χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή	

ταχύτητα φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR).	64
Εικόνα 32. Δομή του διπυρηνικού κέντρου αίμη a_3 -Cu _B της ba_3 οξειδοαναγωγάσης του κυτοχρώματος c από το βακτήριο <i>Thermus thermophilus</i> (PDB κωδικός 1EHK). Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα PyMOL και η κρυσταλλική δομή της ba_3 οξειδοαναγωγάσης λήφθηκε από την τράπεζα δεδομένων πρωτεϊνών (Protein Data Bank) με κωδικό αρχείου 1EHK ¹²	68
Εικόνα 33. Περιοχή των προπιονικών ομάδων της αίμης a_3 της ba_3 οξειδοαναγωγάσης από το βακτήριο <i>Thermus thermophilus</i> που επιδεικνύει τα κατάλοιπα που παρουσιάζουν ενδιαφέρον. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα PyMOL και η κρυσταλλική δομή της ba_3 οξειδοαναγωγάσης λήφθηκε από την τράπεζα δεδομένων πρωτεϊνών (Protein Data Bank) με κωδικό αρχείου 1EHK. ¹²	71
Εικόνα 34. Πειραματική διάταξη πειραμάτων φωτόλυσης με laser συνεχούς κύματος (CW).	74
Εικόνα 35. Μηχανισμός συναρμογής του CO στο κυτόχρωμα ba_3	75
Εικόνα 36. «Φωτεινά» μείον «σκοτεινά» φάσματα (<i>light minus dark</i>) FTIR των δεσμευμένων με CO μορφών της πλήρως ανηγμένης ba_3 οξειδοαναγωγάσης στην φασματική περιοχή 1900-2200 cm^{-1} στον ενδεδειγμένο διαλύτη. Κάθε φάσμα είναι ο μέσος όρος 3000 επιμέρους φασμάτων. Η φασματική ανάλυση είναι 4 cm^{-1} . Το μήκος κύματος της φωτόλυσης ήταν 447 nm. Τα ένθετα δείχνουν τα σύμπλοκα αίμης Fe- ¹³ CO και Cu _B - ¹³ CO της φυσικής αφθονίας. 77	77
Εικόνα 37. Φωτεινά μείον σκοτεινά (<i>Light minus dark</i>) FTIR φάσματα της δεσμευμένης με CO πλήρως ανηγμένης μορφής της κυτοχρωμικής οξειδοαναγωγάσης ba_3 στην φασματική περιοχή 1600-1700 cm^{-1} στον αντίστοιχο διαλύτη. Κάθε φάσμα είναι ο μέσος όρος 3000 επιμέρους φασμάτων. Η φασματική ανάλυση είναι 4 cm^{-1} . Το μήκος κύματος της φωτόλυσης ήταν 447 nm. Τα ένθετα δείχνουν την περιοχή των δονήσεων έκτασης των καρβοξυλίων (μαύρο) προσαρμοσμένων με εξίσωση Gaussian (μπλέ).....	80
Εικόνα 38. «Φωτεινά» μείον «σκοτεινά» (<i>Light minus dark</i>) FTIR φάσματα της δεσμευμένης με CO πλήρως ανηγμένης μορφής της κυτοχρωμικής οξειδοαναγωγάσης ba_3 στις φασματικές περιοχές 1500-1600 cm^{-1} και 3600-3760 cm^{-1} στον αντίστοιχο διαλύτη. Κάθε φάσμα είναι ο μέσος όρος 3000 επιμέρους φασμάτων. Η φασματική ανάλυση είναι 4 cm^{-1} . Το μήκος κύματος της φωτόλυσης ήταν 447 nm.	82

Εικόνα 39. Το ενεργό κέντρο της ba_3 οξειδάσης του κυτοχρώματος c μετά τη δέσμευση του CO. Η εικόνα δείχνει το σχηματισμό του συμπλόκου A και συμπλόκου B του συμπλόκου ba_3 -CO.90

Εικόνα 40. Η περιοχή των προπιονικών ομάδων της αίμης a_3 της ba_3 οξειδοαναγωγάσης από το *Thermus thermophilus* απεικονίζει τα κατάλοιπα ενδιαφέροντος. Το κόκκινο βέλος (IN) δείχνει το κανάλι της αρχικής δέσμευσης του CO στον Cu_B πριν και ακολούθως τη δέσμευση του στο σίδηρο της αίμης a_3 . Τα μπλε βέλη δείχνουν τη διαδρομή που ακολουθεί το φωτολυόμενο CO από την αίμη a_3 που βρίσκεται κοντά στην περιοχή του Cu_B (20%) στην περιοχή(ες) εγκλωβισμού (docking site(s)) στις περιοχές w941w946-H376 και προπιονική ομάδα A-w927. Το σήμα stop υποδεικνύει ότι το εγκλωβισμένο (docked) CO δε διαφεύγει στο πρωτεϊνικό περιβάλλον. Τα διατομικά μόρια που απεικονίζονται με κόκκινες και πράσινες σφαίρες απεικονίζουν τα μόρια του CO. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα PyMOL και η κρυσταλλική δομή της ba_3 οξειδοαναγωγάσης λήφθηκε από την τράπεζα δεδομένων πρωτεϊνών (Protein Data Bank) με κωδικό 1EHK.92

Εικόνα 41. (A) Φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) της δεσμευμένης με ¹²CO μορφής του πλήρες ανηγμένου κυτοχρώματος ba_3 -CO (pH 7.0) στους ενδεδειγμένους χρόνους. Η περιοχή του εγκλωβισμένου (docked) ¹²CO απεικονίζεται στην εικόνα 38B και το αντίστοιχο σε ¹³CO στην εικόνα 38C. Τα φάσματα της περιοχής του εγκλωβισμένου (docked) ¹²CO σε D₂O απεικονίζονται στην εικόνα 38D.96

Εικόνα 42. Μεγεθυμένη εικόνα των φασμάτων διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1690-1760 cm⁻¹. Οι συνθήκες είναι οι ίδιες όπως και στην εικόνα 37. ...98

Εικόνα 43. Ένα μοντέλο για την κινητική του CO, χαλάρωσης της αίμης και χημείας συντονισμού στο διπυρηνικό κέντρο αίμης a_3 - Cu_B και δυναμικής των προπιονικών ομάδων A και D. Μετά τη φωτόλυση του CO από την αίμη a_3 , 80-85 % του CO δεσμεύεται στο Cu_B (κατάσταση B) και το υπόλοιπο 15-20 % βρίσκεται αρχικά πάνω από την προπιονική ομάδα D (κατάσταση C) και στη συνέχεια μεταβαίνει στην περιοχή μεταξύ των προπιονικών ομάδων A και D της αίμης a_3 (κατάσταση E). Οι καταστάσεις B-E που έχουν αστερίσκο είναι τεταμένες, μη ισορροπημένες καταστάσεις της αίμης a_3 εξαιτίας της τεταμένης δόνησης (unrelaxed vibration) Fe²⁺-His. Στην κατάσταση F (80%) της αίμης a_3 είναι σε μια χαλαρή κατάσταση με το CO δεσμευμένο στο Cu_B όπου το υπόλοιπο 20% (κατάσταση G) της αίμης

a_3 βρίσκεται σε μια χαλαρή κατάσταση και το CO βρίσκεται σε μια περιοχή εγκλωβισμού (docking site) μεταξύ των προπιονικών ομάδων A και D της αίμης a_3 . Στην κατάσταση H (80%), της αίμης a_3 είναι φωτο-χαλαρή με το CO δεσμευμένο στο Cu_B όπου στο υπόλοιπο 20% (κατάσταση I) το CO έχει φύγει από την θέση στην οποία βρισκόταν προηγουμένως στην κατάσταση G. Τέλος, στην κατάσταση A το διαλυτοποιημένο CO και το δεσμευμένο στο Cu_B , επαναδεσμεύονται στην αίμη a_3101

Εικόνα 44. Μοντέλο της πρωτονιακής συσχέτισης της προπιονικής ομάδας A της αίμης a_3 , του D372 και του μορίου νερού w927.....111

Εικόνα 45. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm^{-1} ($t_d = 100-80000$ ns, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου ba_3 -CO σε pH7.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm.115

Εικόνα 46. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm^{-1} ($t_d = 100-80000$ ns, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου ba_3 -CO σε pH6.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm.117

Εικόνα 47. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm^{-1} ($t_d = 100-80000$ ns, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου ba_3 -CO σε pH9.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm.119

Εικόνα 48. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm^{-1} ($t_d = 100-80000$ ns, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου ba_3 -CO σε pD7.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm.122

Εικόνα 49. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm^{-1} ($t_d = 100-80000$ ns, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως

ανηγμένου συμπλόκου ba_3 -CO σε pH6.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm.	125
Εικόνα 50. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS ² -FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm^{-1} ($t_d = 100$ -80000 ns, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου ba_3 -CO σε pH9.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 ns από laser 532 nm.	127
Εικόνα 51. Πειραματική διάταξη της τεχνικής χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) που χρησιμοποιήθηκε για τα εν λόγω πειράματα. Στην εικόνα φαίνεται η πορεία που ακολουθεί η υπέρυθη ακτινοβολία καθώς και η πορεία που ακολουθεί ο παλμός 532nm του Nd:YAG laser, όπως επίσης και τα διάφορα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη των πειραμάτων.	136
Εικόνα 52. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm^{-1} ($t_d = 1$ -120 ms, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου ba_3 -CO σε pH7.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm.	139
Εικόνα 53. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm^{-1} ($t_d = 1$ -120 ms, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου ba_3 -CO σε pH5.6 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm.	142
Εικόνα 54. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm^{-1} ($t_d = 1$ -120 ms, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου ba_3 -CO σε pH9.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm.	144
Εικόνα 55. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm^{-1} ($t_d = 1$ -120 ms, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική	

ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου ba_3 -CO σε pH 7.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm147

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

FTIR spectroscopy	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
IR	Υπέρυθρο
NO	Μονοξείδιο του αζώτου
CO	Μονοξείδιο του άνθρακα
CN	Κυάνιο
N ₂ O	Οξείδιο του διαζώτου ή αέριο του γέλιου
CO ₂	Διοξείδιο του άνθρακα
Mb	Μυοσφαιρίνη
Hb	Αιμοσφαιρίνη
FT	Μετασχηματισμός Fourier
H ₂ O	Νερό
O ₂	Οξυγόνο
D ₂ O	«βαρύ» ύδωρ
Mg	Μαγνήσιο
PDB	Protein Data Bank
cm ⁻¹	κυματάριθμος
QM/MM	Quantum Mechanical / Molecular Mechanical
CW	Συνεχές κύμα
nsTRS ² -FTIR	Nanosecond Time-Resolved Step-Scan FTIR
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
S/N	Signal to Noise ratio
D372	Ασπαραγινικό οξύ 372

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

FTIR spectroscopy	Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier
Apodization functions	Συναρτήσεις αποδισμού
Interferograms	Συμβολογραφήματα
Docking site	Περιοχή εγκλωβισμού
Docked CO	Εγκλωβισμένο CO
Site-directed mutagenesis	Τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση
Relaxing rate	Ρυθμός χαλάρωσης
Protein relaxation	Χαλάρωση πρωτεΐνης
Nanosecond Time-Resolved Step-Scan FTIR	Χρονική ανάλυση νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier
Rapid Scan FTIR	Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα

1 Δράση, δομή και λειτουργία της ba_3 οξειδοαναγωγάσης

1.1 Το βακτήριο *Thermus thermophilus*

Το βακτήριο *Thermus thermophilus* είναι ένα αρνητικό κατά Gram αερόβιο βακτήριο που μπορεί και αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 50 έως 82°C, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 65°C. Αυτή η ιδιότητα το κατατάσσει στην κατηγορία των θερμοφίλων βακτηρίων. Το συναντάμε συνήθως σε θερμές πηγές. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από μια θερμοπηγή στην Ιαπωνία το 1971.²⁷ Το βακτήριο *Thermus thermophilus* έχει δύο στελέχη, το HB8 και το HB27. Το στέλεχος HB8 μπορεί να ζήσει τόσο σε αερόβιες, όσο και σε αναερόβιες συνθήκες, σε αντίθεση με το στέλεχος HB27 που μπορεί να ζήσει μόνο σε αερόβιες συνθήκες. Το βακτήριο *Thermus thermophilus* παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για τη βασική έρευνα με ένα από τους κυριότερους λόγους τη σταθερότητα της βασικής δομής της πρωτεΐνης και το πώς ο εν λόγω οργανισμός υιοθετεί στρατηγικές επιβίωσης σε αρκετά υψηλές θερμοκρασίες, στις οποίες η συγκέντρωση του οξυγόνου είναι περιορισμένη.²⁶ Επίσης τα θερμοφιλα βακτήρια του γένους *Thermus thermophilus* μπορούν να επιβιώσουν και σε ακραίες συνθήκες όσο αφορά το pH, από όξινες συνθήκες (pH3.4), μέχρι πολύ βασικές συνθήκες (pH9.0) και αυτό είναι ένας από τους πιο ενδιαφέρον παράγοντες για μελέτη.

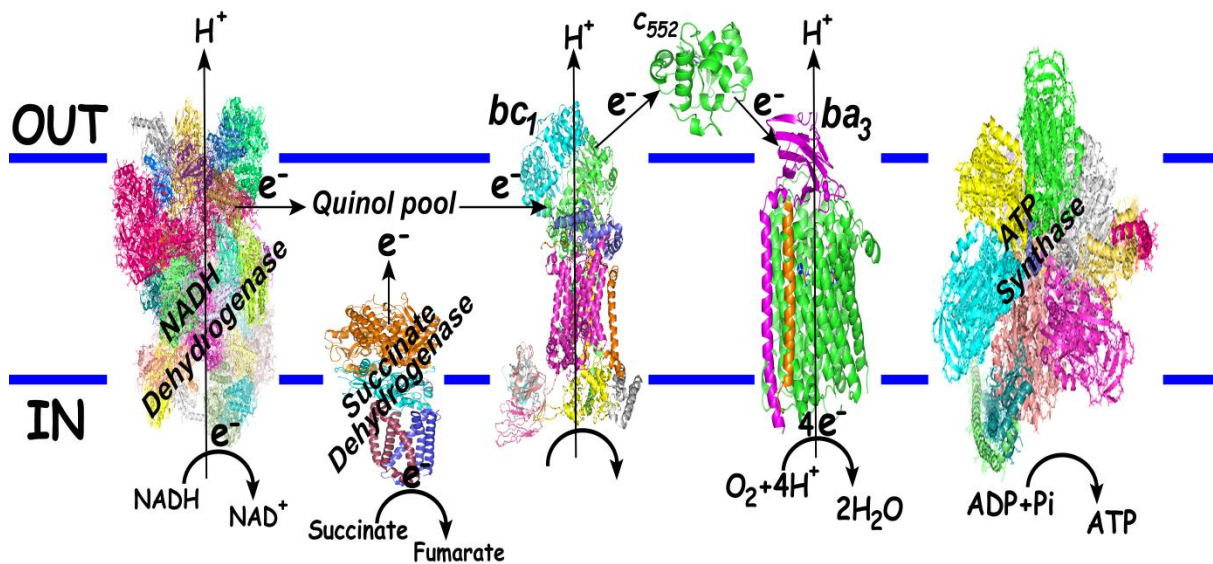


Εικόνα 1. Το βακτήριο *Thermus Thermophilus* HB8 (<http://www.thermus.org/>).

1.2 Κυτοχρωμική ba_3 οξειδοαναγωγή

Η κυτοχρωμική ba_3 οξειδοαναγωγή ανήκει στην οικογένεια των αιμοχαλκοξειδάσεων και είναι το τελευταίο μεμβρανικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο της αναπνευστικής αλυσίδας τόσο στους ευκαρυωτικούς αλλά και στους προκαρυωτικούς αερόβιους οργανισμούς και απομονώνεται από το βακτήριο *Thermus thermophilus* HB8 (ATCC 27634). Η λειτουργία αυτού του ενζύμου είναι η κατάλυση της αναγωγής του μοριακού οξυγόνου O_2 σε νερό H_2O με την πρωτονιακή μετατόπιση εγκάρσια της εσωτερικής βακτηριακής μεμβράνης, αλλά και του μονοξειδίου του αζώτου NO σε μονοξείδιο του διαζώτου N_2O κάτω από αναγωγικές αναερόβιες συνθήκες, παράλληλα με την οξείδωση του κυτοχρώματος *c*. Άλλη μια λειτουργία της ba_3 κυτοχρωμικής οξειδάσης είναι η οξείδωση του CO σε CO_2 .²⁸ Η ελεύθερη ενέργεια αυτής της αντίδρασης διατηρείται σαν μία διαμεμβρανική βαθμίδωση πρωτονίων η οποία οδηγεί στην σύνθεση του ATP.

Respiratory Chain of *Thermus thermophilus*



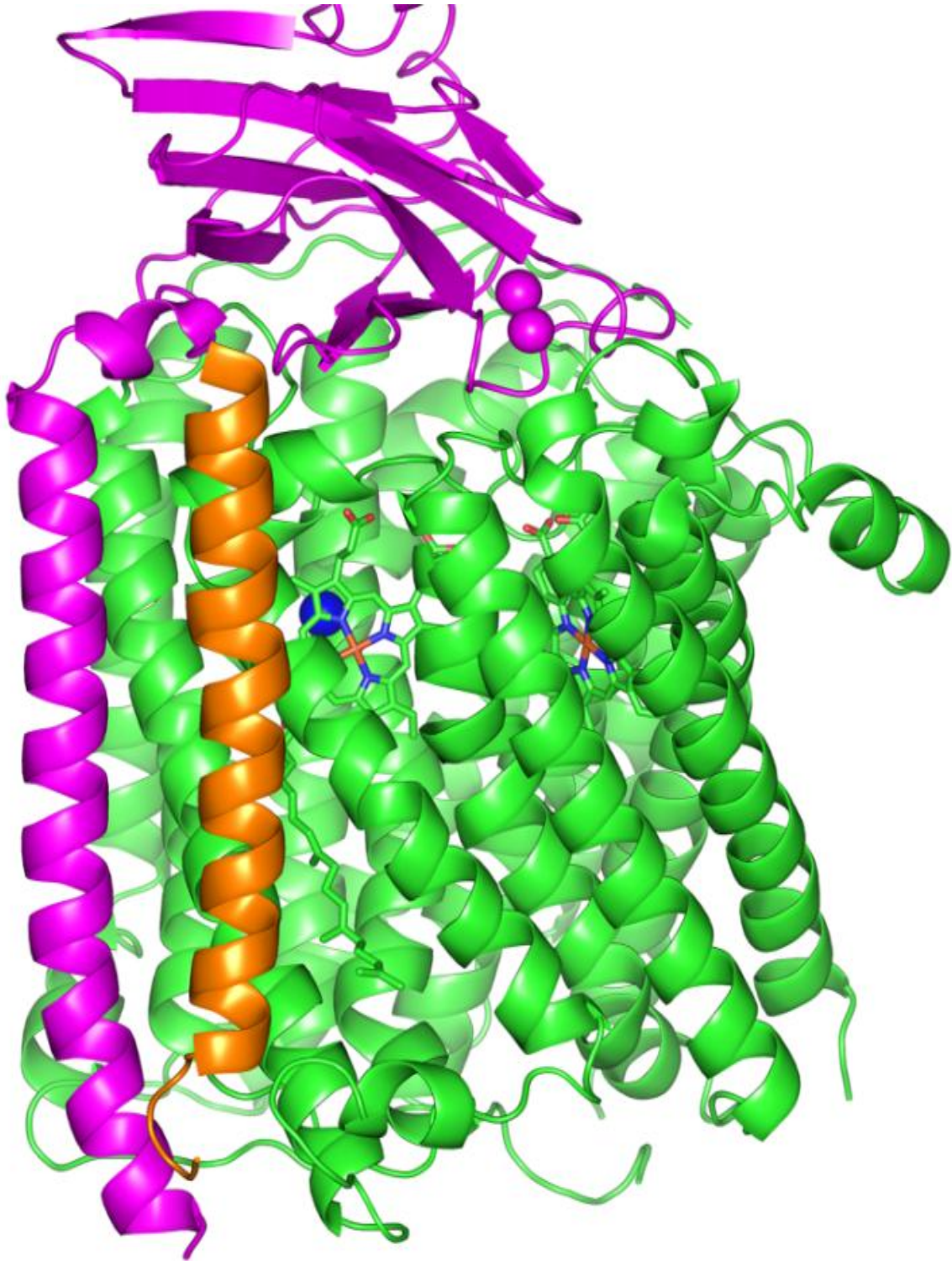
Εικόνα 2. Η αναπνευστική αλυσίδα του βακτηρίου *Thermus thermophilus*.

Η ba_3 κυτοχρωμική οξειδοαναγωγή απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus thermophilus*, όπως επίσης και η ομόλογη της caa_3 κυτοχρωμική οξειδοαναγωγή και εκφράζεται υπό συνθήκες περιορισμένης συγκέντρωσης οξυγόνου.

Η ba_3 οξειδοαναγωγή (84884 Da, 764 αμινοξικά κατάλοιπα) διαθέτει ένα ομοδιπυρηνικό σύμπλοκο χαλκού, Cu_A , στην υπομονάδα II, μια χαμηλού spin αίμη b με αριθμό συναρμογής 6 ($6c$) και ένα διπυρηνικό κέντρο που αποτελείται από ένα άτομο χαλκού Cu_B και μια υψηλού spin αίμη a_3 που βρίσκονται στην υπομονάδα I. Η αίμη a_3 της ba_3 οξειδοαναγωγής περιέχει μια φαρνεσυλική αλυσίδα αντί της γερανυλικής αλυσίδας που απαντάται στις περισσότερες ευκαρυωτικές και βακτηριακές οξειδάσες. Το σημείο όπου γίνονται οι αντιδράσεις, όπως η αναγωγή του οξυγόνου στην ba_3 οξειδοαναγωγή, το διπυρηνικό κέντρο αίμης a_3 - Cu_B , παρουσιάζει μία σειρά από ασυνήθιστα χαρακτηριστικά, όπως είναι η ιδιαίτερη δραστικότητα απέναντι σε εξωγενείς ως προς την αίμη υποκαταστάτες, όπως το CN^- , CO , H_2O_2 και το NO . Χαρακτηριστική είναι η συγγένεια του Cu_B για το CO , η οποία στην ανηγμένη ba_3 οξειδοαναγωγή είναι 50-100 φορές υψηλότερη από αυτή του ομόλογου μη βακτηριακού ενζύμου από καρδιά βοοειδούς.

1.2.1 Δομή της ba_3 κυτοχρωμικής οξειδοαναγωγής

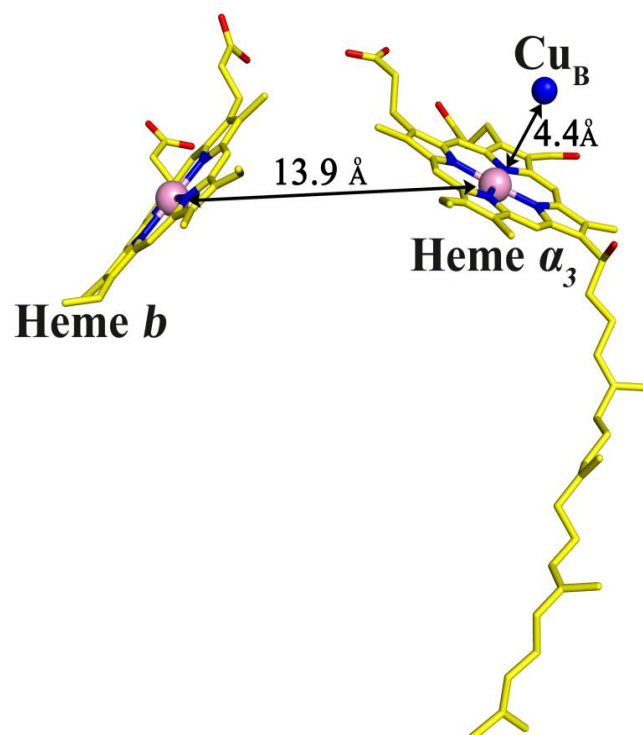
Το σύμπλοκο της ba_3 οξειδοαναγωγής του κυτοχρώματος c συνθέτεται από τρεις πρωτεϊνικές υπομονάδες, I, II και II_a και σχηματίζει μια δέσμη από 15 διαμεμβρανικές έλικες ($54 \times 50 \text{ \AA}$) όπως επίσης και μια μικρή περιπλασματική περιοχή ($35 \times 29 \times 20 \text{ \AA}$). Το κύριο μέρος του συμπλόκου αποτελείται από την υπομονάδα I με 13 διαμεμβρανικές έλικες που ενώνουν τις αίμες a_3 και b όπως επίσης και το χαλκό Cu_B . Οι βρόγχοι που συνδέουν τις 13 έλικες της υπομονάδας I είναι μικρότεροι από αυτούς που απαντώνται σε άλλες κυτοχρωμικές οξειδάσες. Η πιο πάνω είναι ιδιότητα των θερμοσταθερών πρωτεϊνών. Συνδέεται με τις υπομονάδες II και II_a με μια διαμεμβρανική έλικα αντίστοιχα. Η περιπλασματική περιοχή της υπομονάδας II περιέχει τον κύριο αποδέκτη ηλεκτρονίων, Cu_A . Οι αίμες b και a_3 βρίσκονται στην υδροφοβικό πυρήνα της υπομονάδας I περίπου 15 \AA μακριά από την περιπλασματική επιφάνεια. Οι αποστάσεις του ατόμου του χαλκού Cu_A από τον σίδηρο της αίμης b , τον σίδηρο της αίμης a_3 και από τον χαλκό Cu_B , είναι 19.0, 21.8, και 21.6 \AA αντίστοιχα.



Εικόνα 3. Απεικόνιση της *ba₃* κυτοχρωμικής οξειδοαναγωγάσης από το βακτήριο *Thermus thermophilus*. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το λογισμικό PyMOL (PDB 1EHK).

1.2.1.1 Αίμη *b* και διπυρηνικό κέντρο αίμης α_3 - Cu_B της ba_3 οξειδοαναγωγάσης

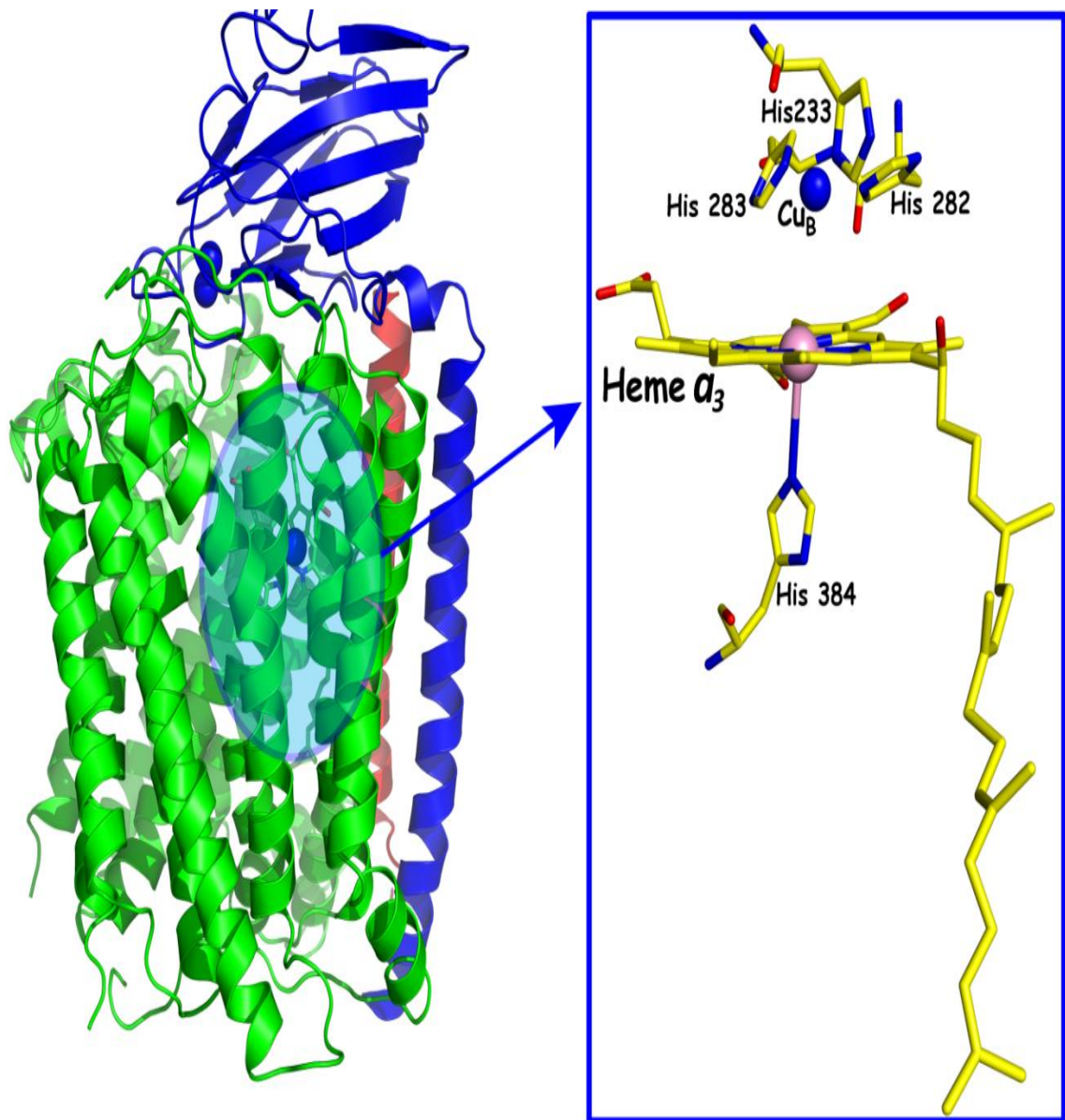
Η αίμη *b* είναι η απλούστερη μορφή πρωτεϊνικής αίμης και περιέχει ένα χαμηλού spin άτομο σιδήρου με δύο ιστιδίνες, την His72/ α_2 και την His386/ α_{10} ως αξονικοί υποκαταστάτες σε απόσταση 2.2 Å η κάθε μια. Η περιοχή συναρμογής του υψηλού spin σιδήρου της αίμης α_3 αποτελείται από πέντε συναρμοσμένους υποκαταστάτες και ολοκληρώνεται με τον υποκαταστάτη του ενεργού κέντρου, ο οποίος λειτουργεί ως γέφυρα μεταξύ του σιδήρου της αίμης α_3 και του Cu_B . Το άτομο σιδήρου της αίμης α_3 βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με την αίμη και η απόσταση από την αξονικά ενωμένη ιστιδίνη (His384/ α_{10}) είναι 3.3 Å, απόσταση πολύ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη σε άλλες ομόλογες πρωτεΐνες (2.1 Å για το *P. denitrificans* και 1.9 Å για την οξειδοαναγωγάση από καρδιά βοοειδούς). Η απόσταση μεταξύ του σιδήρου της αίμης *b* και του σιδήρου της αίμης α_3 είναι 13.9 Å. Ο χαλκός Cu_B βρίσκεται 4.4 Å μακριά από τον σίδηρο της αίμης α_3 . Η αίμη α_3 χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός φορμυλικού γκρουπ και ενός υδροφοβικού υδρόξυ-αίθυλ-γερανύλ-γερανυλικού τμήματος.¹



Εικόνα 4. Αίμη *b* και διπυρηνικό κέντρο αίμης α_3 - Cu_B της ba_3 οξειδοαναγωγάσης. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το λογισμικό PyMOL (PDB 1EHK).

Ο χαλκός Cu_B έχει ως υποκαταστάτες τρεις ιστιδίνες, τις His233, His283 και His282. Η απόσταση του σιδήρου της αίμης α_3 και του OH⁻ της τυροσίνης (Y237) είναι 5.6 Å. Η His233 είναι ενωμένη ομοιοπολικά με την Tyr237. Η αίμη α_3 είναι συναρμοσμένη αξονικά με την His384 και η προπιονική ομάδα A είναι ενωμένη με δεσμό υδρογόνου με την His376 και την Asp372 και η προπιονική ομάδα D με την Arg449 και την Y133. Η ηλεκτρονιακή πυκνότητα μεταξύ των δύο μετάλλων του διπυρηνικού κέντρου έχει σφαιρικό σχήμα και αποδίδεται καλύτερα σαν ένα άτομο οξυγόνου με ίση απόσταση 2.3 Å από τον σίδηρο και τον χαλκό αντίστοιχα.¹

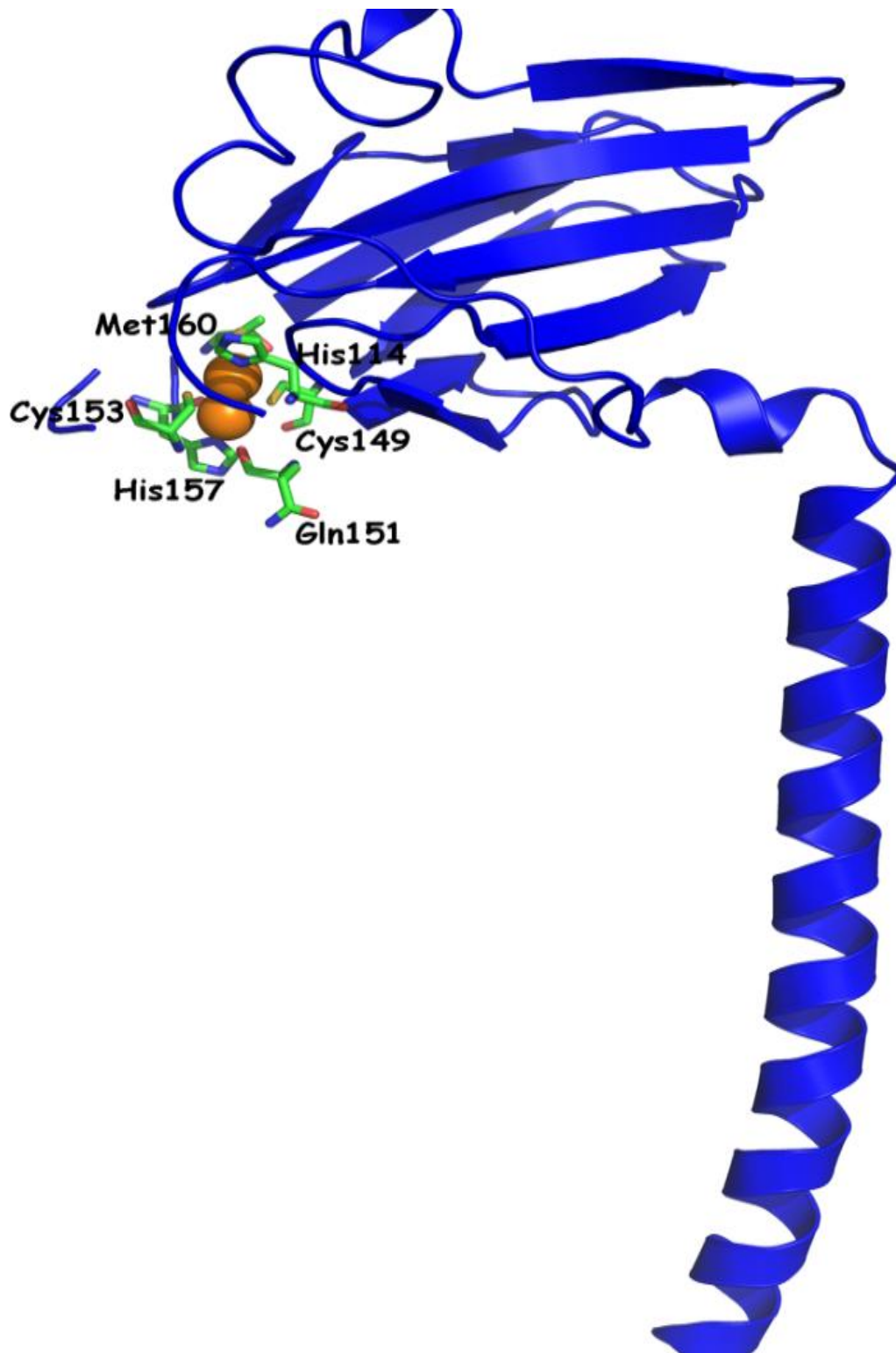
Οι δύο πρώτες κυτοχρωμικές οξειδοαναγωγάσες που χαρακτηρίστηκαν δομικά έχουν αρκετές ομοιότητες όσο αφορά την αλληλουχία τους (> 50%) όπως και την δομή των κυρίως υπομονάδων τους I και II. Αντίθετα η ba_3 οξειδάση παρουσιάζει πολύ μικρή ομολογία αλληλουχίας (<20%), ενώ απουσιάζουν τα περισσότερα κατάλοιπα που σχηματίζουν τα κανάλια των πρωτονίων στις άλλες οξειδάσες. Παρόλα αυτά, το ένζυμο υπό συνθήκες ισορροπίας παράγει ηλεκτρικό διαμεμβρανικό δυναμικό και αντλεί πρωτόνια. Ενώ 1.0 H⁺/e⁻ καταναλώνεται για τον σχηματισμό του νερού, η ba_3 οξειδοαναγωγάση εμφανίζει μία μειωμένη ικανότητα άντλησης πρωτονίων της τάξης των 0.4-0.5 H⁺/e⁻ σε αντίθεση με τα ≈ 1.0 H⁺/e⁻ που παρατηρήθηκαν στις άλλες αιμοχαλκοξειδάσες.



Εικόνα 5. Διπυρηνικό ενεργό κέντρο αίμης $a_3 - Cu_B$ με τους υποκαταστάτες τους και χώρος που βρίσκεται στην κρυσταλλική δομή της ba_3 οξειδοαναγωγάσης. Το άτομο σιδήρου απεικονίζεται ως ροζ σφαίρα και του χαλκού ως μπλε σφαίρα. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το λογισμικό PyMOL (PDB 1EHK).

1.2.1.2 Υπομονάδα II και ομο-διπυρηνικό κέντρο χαλκού Cu_A

Η υπομονάδα II έχει μόνο μια διαμεμβρανική έλικα που είναι σταθερά συνδεδεμένη με την υπομονάδα I. Είναι η μοναδική υπομονάδα με μια πολική περιοχή που αποτελείται από ένα 10-ελικοειδές β-βαρέλι (barrel) και η οποία βρίσκεται στην περιπλαστική πλευρά της μεμβράνης και περιέχει μια ομο-διπυρηνική Cu_A περιοχή. Η Cu_A περιοχή είναι μια μοναδική μεταλλοπρωτεΐνη στην οποία το οξειδοαναγωγικό κέντρο της οξειδωμένης πρωτεΐνης περιέχει ένα μικτής οξειδωτικής κατάστασης (mixed-valence) σύμπλοκο [Cu_A^{1.5+}-Cu_A^{1.5+}] στο οποίο το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο μετεγκαταστάται πάνω από τα δυο άτομα του χαλκού που είναι και οι αρχικοί δέκτες ηλεκτρονίων από τη μεμβράνη και το κυτόχρωμα c₅₅₂. Η Cu_A περιοχή είναι συμμετρική σε σχέση με τις δυο ιστιδίνες (His114 και His157) και με τις δυο κυστεΐνες (Cys149 και Cys153). Η απόσταση μεταξύ των δυο ατόμων του χαλκού, Cu_A, είναι 2.4 Å. Οι ιμιδαζολικοί δακτύλιοι δεν είναι βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο αλλά η γωνία μεταξύ τους είναι μικρότερη από ότι σε άλλες οξειδάσες (~25°). Τα δυο θειολικά τμήματα (-SH) των κυστεϊνών κατάλοιπων, Cys149 και Cys153, δρουν σαν γέφυρα μεταξύ των ατόμων χαλκού Cu_A. Ο χαλκός Cu₂ του ομοδιπυρηνικού κέντρου Cu_A είναι συντονισμένος με την Cys149, Cys153, His114 και την Met160 με αποστάσεις 2.4, 2.4, 2.1, και 2.5 Å αντίστοιχα. Ο δεύτερος χαλκός, Cu₁, του κέντρου Cu_A είναι συντονισμένος με τις Cys149, Cys153, His157 και Gln151 με αποστάσεις 2.5, 2.3, 2.1 και 2.8 Å αντίστοιχα.¹



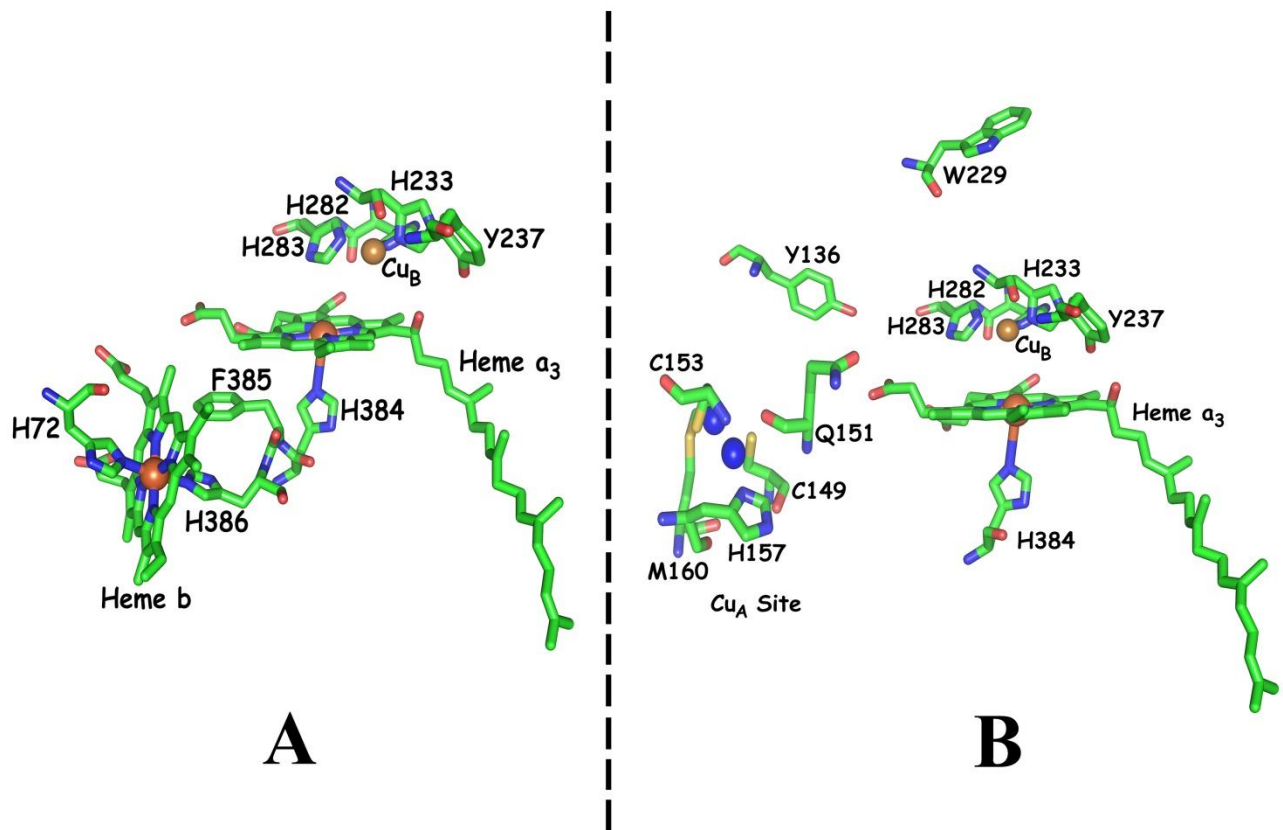
Εικόνα 6. Απεικόνιση της υπομονάδας II (μπλε) της ba_3 οξειδοαναγωγάσης με το ομο-διπυρηνικό κέντρο των ατόμων χαλκού, Cu_A (κόκκινες σφαίρες) και τους υποκαταστάτες τους. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα PyMOL (PDB 1EHK).

1.2.2 Κανάλια μεταφοράς ηλεκτρονίων

Κατά τον μηχανισμό αναγωγής του οξυγόνου στο διπυρηνικό κέντρο, θεωρείται αναγκαία η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από τον χαλκό Cu_B . Η μεταφορά ηλεκτρονίων από τον χαλκό Cu_A μέσω της αίμης b στο διπυρηνικό κέντρο της αίμης $a_3 - Cu_B$ είναι ικανοποιητικά αποδεδειγμένη και τα αντίστοιχα αμινοξέα (Arg450, Arg449 και Phe385) διατηρούνται και στην ba_3 οξειδοαναγωγή όπως και σε άλλες ομόλογες οξειδάσες (aa_3 οξειδοαναγωγή από το βακτήριο *P. denitrificans*).

$Cu_A \rightarrow$ low spin αίμη $b \rightarrow$ high spin αίμη $a_3 - Cu_B$

Λαμβάνοντας υπόψη τις μέχρι σήμερα γνωστές δομές των διαφόρων κυτοχρωμικών οξειδοαναγωγάσεων, φαίνεται ότι τα ζωτικά κατάλοιπα και τα προτεινόμενα κανάλια μεταφοράς ηλεκτρονίων από τον Cu_A στις αίμες διατηρούνται. Η Tyr136 σχηματίζει ένα ισχυρό δεσμό υδρογόνου με την Trp229. Το π -σύστημα αυτού του κατάλοιπου δείχνει μια παράλληλη αλληλεπίδραση με το π -σύστημα της His283, ενός υποκαταστάτη του Cu_B . Αυτό το κατάλοιπο μπορεί να σχηματίζει ένα κανάλι μεταφοράς ηλεκτρονίων από τον Cu_A απευθείας στον Cu_B , που εκτός από την σχετικά μεγάλη απόσταση μεταξύ του Cu_A και της Tyr136 (10.5 Å) εμπλέκει αρκετά π -συστήματα και μερικούς ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου και συναρμογής.



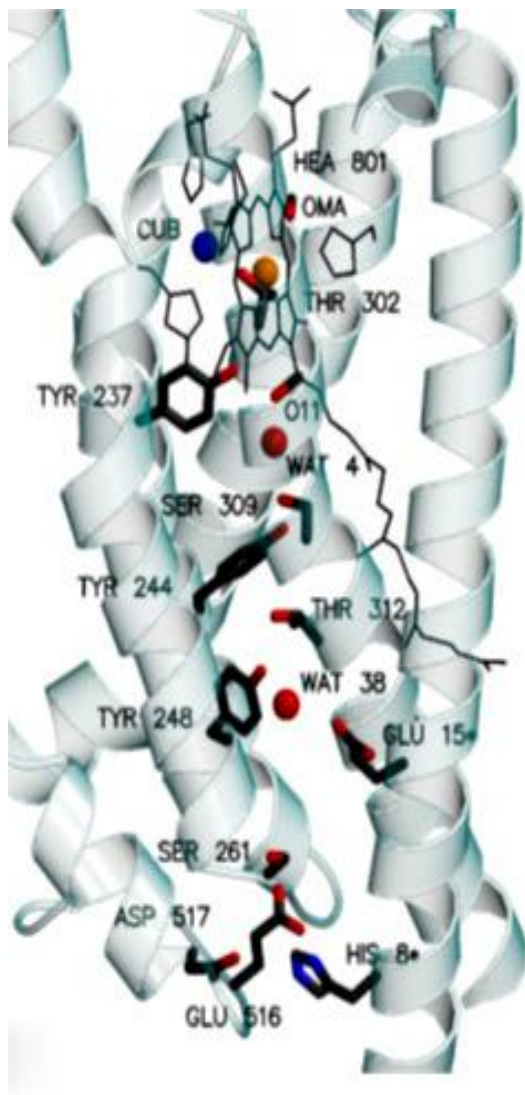
Εικόνα 7. Δύο προτεινόμενοι μηχανισμοί μεταφοράς ηλεκτρονίων στην ba_3 οξειδοαναγωγή από το *Thermus thermophilus*. Α) Το κανάλι αίμης b – αίμης a_3 – Cu_B μέσω των αμινοξέων His386, Phe385 και His384. Β) Το απευθείας Cu_A – Cu_B κανάλι μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω των αμινοξέων Gln151, Tyr136, Trp229 και His283. Τα άτομα του χαλκού, Cu_A απεικονίζονται ως μπλε σφαίρες και τα άτομα του σιδήρου της αίμης b και a_3 και του Cu_B απεικονίζονται ως κόκκινες σφαίρες. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα PyMOL (PDB 1EHK).²⁸

1.2.3 Κανάλια μεταφοράς πρωτονίων και κανάλι εισόδου υποκαταστατών

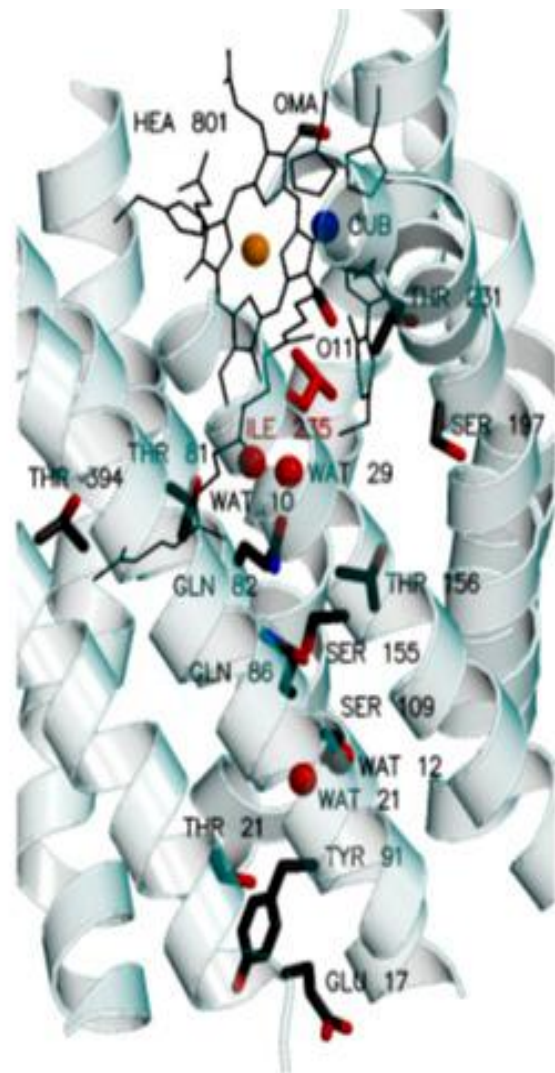
Η κρυσταλλική δομή της ba_3 οξειδοαναγωγής αποκαλύπτει δύο πιθανά κανάλια μεταφοράς πρωτονίων. Το πρώτο κανάλι αποτελείται από τα κατάλοιπα που ανήκουν κυρίως στις διαμεμβρανικές έλικες $\alpha 6$ και $\alpha 8$ και οδηγούν στην τυροσίνη Tyr237 ($\alpha 6$) του ενεργού κέντρου, που είναι ενωμένη ομοιοπολικά στην ιστιδίνη His233, υποκαταστάτη του Cu_B . Το κανάλι αυτό, λόγω της τοποθέτησης του στο μόριο μπορεί να συγκριθεί με το κανάλι μεταφοράς πρωτονίων K.

Το δεύτερο κανάλι μεταφοράς πρωτονίων οδηγείται από την Glu17 ($\alpha 1$) μέσω της Tyr91 ($\alpha 2$), Thr21 ($\alpha 1$), δυο μόρια νερού, Wat21 και Wat12, και ενός αριθμού πολικών καταλοίπων όπως η Ser155 ($\alpha 4$), Thr156 ($\alpha 4$) και Gln82 ($\alpha 2$) σε μια εσωτερική κοιλότητα που είναι σχετικά κοντά στο ενεργό κέντρο (12.6 Å) και είναι γεμάτη με τα μόρια νερού Wat10 και Wat29. Το πως κινούνται τα πρωτόνια από εκεί και πέρα δεν είναι αρκετά σαφές. Μπορεί να προσεγγίζουν το διπυρηνικό κέντρο είτε άμεσα από την εσωτερική κοιλότητα είτε μέσω της Ser197 και της Thr231. Αλλιώς τα πρωτόνια μπορεί να μεταφέρονται μέσω της Thr81 και της Thr394 στην Ser391 του τρίτου καναλιού μεταφοράς πρωτονίων. Βάση της τοποθεσίας αυτού του καναλιού μεταφοράς πρωτονίων μέσα στο μόριο μπορεί να συγκριθεί με το κανάλι μεταφοράς πρωτονίων D. Παρόλα αυτά, ελάχιστα αμινοξέα διατηρούνται, ακόμα και σε καίριες θέσεις όπως αυτή του Glu278 (*Paracoccus denitrificans*) που είναι σημαντικότερο για την λειτουργικότητα του καναλιού D και την άντληση πρωτονίων σε άλλες οξειδάσες, το οποίο έχει αντικατασταθεί από την Ile235. Ωστόσο η ba_3 οξειδοαναγωγή έχει την δυνατότητα άντλησης πρωτονίων ακόμα και σε μειωμένη μορφή.

Η παρουσία της Ile235 στην ba_3 οξειδοαναγωγή ευνοεί τον σχηματισμό ενός υδροφοβικού πόρου που αρχίζει από την μέση της μεμβράνης μέχρι το ενεργό κέντρο. Ένας σχετικά μικρότερος πόρος βρίσκεται στην δομή της ομόλογης οξειδοαναγωγής του *Paracoccus denitrificans* και συζητήθηκε ότι πρόκειται για ένα κανάλι εισόδου οξυγόνου. Εφόσον η ba_3 οξειδοαναγωγή εκφράζεται σε ατμόσφαιρα μειωμένη σε οξυγόνο, και σε σχέση με την μειωμένη διαλυτότητα του νερού σε υψηλές θερμοκρασίες, η πρωτοποριακή κατασκευή ενός καναλιού οξυγόνου είναι πιο κατάλληλη. Το εύρημα αυτό συνάδει με τις δομές της κινολικής aa_3 οξειδοαναγωγής από το Αρχαίο *S. acidocaldarius* και της κυτοχρωμικής οξειδοαναγωγής ba_3 από το *N. Pharaonis*, όπου η Glu278 (*P. denitrificans*) αντικαθίσταται από μια βαλίνη. Αυτοί οι οργανισμοί αναπτύσσονται επίσης σε περιβάλλον χαμηλής περιεκτικότητας σε οξυγόνο και σε υψηλές θερμοκρασίες. Η αντικατάσταση του Glu278 από την Ile235 ή την βαλίνη καταργεί ένα από τα κατάλοιπα κλειδιά που είναι σημαντικά για την άντληση πρωτονίων σε άλλες οξειδάσες και μπορεί να είναι υπεύθυνη για την μειωμένη ικανότητα άντλησης πρωτονίων της ba_3 οξειδοαναγωγής. Προφανώς ο σχηματισμός ενός υδρόφοβου περιμετρικά καναλιού εισόδου οξυγόνου και συνεπώς η προμήθεια σε επαρκή ποσότητες οξυγόνου της ba_3 οξειδοαναγωγής είναι σημαντικότερη για τη λειτουργία του ενζύμου κάτω από συνθήκες έλλειψης οξυγόνου παρά η άντληση πρωτονίων.



K-pathway



D-pathway

Εικόνα 8. Τα 2 πιθανά κανάλια μεταφοράς πρωτονίων στην *ba3* οξειδοαναγωγάση. *EMBO J.* 19 (2000) 1766-1776.¹

1.3 Φασματοφωτομετρική και κινητική ανάλυση του υποκαταστάτη CO στην ba_3 οξειδοαναγωγή – Προσομοίωση της λειτουργίας της αναπνοής

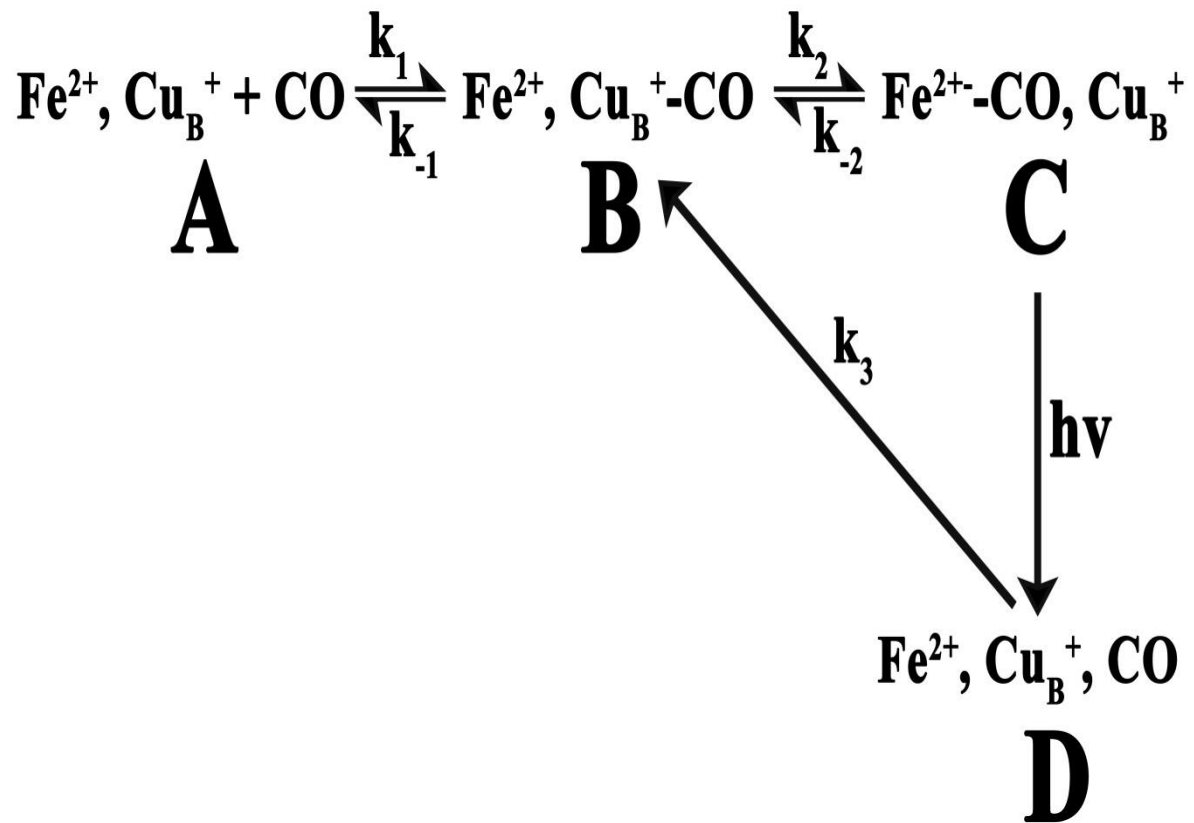
Οι περισσότερες βιοχημικές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις περιλαμβάνουν ενδομοριακή λήψη ηλεκτρονίων μέσω ενός ζευγαριού δότη-δέκτη.³⁰⁻³⁴ Ο προσδιορισμός της δυναμικής και των καναλιών της μεταφοράς των ηλεκτρονίων (electron transfer-ET) είναι ύψιστης σημασίας για την κατανόηση αρκετών καταλυτικών αντιδράσεων, ειδικά όταν οι οξειδοαναγωγικές αλλαγές συνδέονται με άλλες διεργασίες όπως είναι η μεταφορά πρωτονίων και τα φαινόμενα πρωτονίωσης/αποπρωτονίωσης. Εφόσον τα κανάλια μεταφοράς ηλεκτρονίων και οι δομικές αλλαγές που οδηγούν σε μετεγκαταστάσεις πρωτονίων ελέγχονται από την πρωτεϊνική δομή, η ταυτοποίηση των αλυσίδων μεταφοράς ηλεκτρονίων και των πρωτονιακών κατάλοιπων είναι ένα απαραίτητο στάδιο για την κατανόηση όλου του μηχανισμού λειτουργίας.

Η οξειδοαναγωγή ba_3 του κυτοχρώματος c που απομονώνεται από το εξαιρετικά θερμοφίλο βακτήριο *Thermus thermophilus* HB8 εκφράζεται κάτω από συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (47-85 °C) και περιορισμένης περιεκτικότητας σε οξυγόνο. Ως ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που βρίσκεται στην αναπνευστική αλυσίδα του βακτηρίου, βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη και καταλύει την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό (λειτουργία της αναπνοής), μια διεργασία που συνδέεται με την ταυτόχρονη μεταβίβαση πρωτονίων από το κυτόπλασμα στο περίπλασμα. Επιπρόσθετα, η οξειδοαναγωγή ba_3 και η ομόλογη της caa_3 είναι ικανές για την αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου NO σε οξείδιο του διαζώτου (N₂O) με μειωμένη όμως δραστηριότητα. Παρόλο που η οξειδοαναγωγή ba_3 δεν έχει παρόμοια σύνθεση με άλλες ομόλογες οξειδοαναγωγάσες του κυτοχρώματος c (<20%), εντούτοις τα τέσσερα οξειδοαναγωγικά κέντρα της οξειδοαναγωγάσης ba_3 έχουν πολύ μεγάλες ομοιότητες με αυτά που απαντούνται σε άλλες οξειδάσες.⁴⁰⁻⁴² Η αντίδραση του οξυγόνου σε νερό (λειτουργία αναπνοής) είναι μια μονόδρομη μη αντιστρεπτή κάτω από φυσιολογικές συνθήκες αντίδραση στην ba_3 οξειδοαναγωγή. Για να μελετηθούν τα κανάλια μεταφοράς ηλεκτρονίων και πρωτονίων καθώς και η όλη συμπεριφορά της ba_3 οξειδοαναγωγάσης, χρησιμοποιήθηκε ένα αέριο παρόμοιου μεγέθους με το O₂ το οποίο δεν αντιδρά άμεσα με την ba_3 οξειδοαναγωγή, το μονοξείδιο του άνθρακα (CO). Έτσι φωτίζοντας το δεσμό της αίμης a_3 -CO μπορεί εύκολα να παρατηρηθεί η πορεία του CO

μέσα στην πρωτεΐνη, η οποία θα είναι ίδια με αυτή που ακολουθεί το οξυγόνο όταν αναχθεί σε νερό κατά τη διάρκεια της λειτουργίας της αναπνοής.

1.3.1 Κινητική δέσμευσης, φωτοδιάσπασης και ανασυνδυασμού του διμοριακού υποκαταστάτη μονοξειδίου του άνθρακα (CO) στην ba_3 οξειδοαναγωγή

Στην εικόνα 9 παρουσιάζεται το μοντέλο κινητικής του μηχανισμού συναρμογής του CO στο διπυρηνικό κέντρο αίμης a_3 -Cu_B της οξειδοαναγωγής ba_3 . Στο σύμπλοκο ba_3 -CO υπάρχει ένα ποσοστό 25 – 75 % θερμικής κατανομής μεταξύ των καταστάσεων B και C που δεν παρουσιάζεται σε καμία άλλη κυτοχρωμική οξειδοαναγωγή. Παρόλα αυτά, το σύμπλοκο ισορροπίας Cu_B⁺-CO δεν φωτολύεται και παραμένει αμετάβλητο κατά τη διαδικασία φωτοδιάσπασης – επανασυναρμογής του συμπλόκου a_3^{2+} -CO και κατά τη διαδικασία σχηματισμού – διάσπασης του μεταβατικού συμπλόκου Cu_B⁺-CO.



Εικόνα 9. Μοντέλο κινητικής του μηχανισμού συναρμογής του CO στο διπυρηνικό κέντρο αίμης a_3 -Cu_B της οξειδοαναγωγής ba_3 από το εξαιρετικά θερμόφιλο βακτήριο *Thermus thermophilus* HB8.²⁸

Στην πιο πάνω εικόνα η σταθερά k_1 αντιπροσωπεύει τη δέσμευση του CO στο Cu_B και η σταθερά k_2 αντιπροσωπεύει τη δέσμευση του CO στο σίδηρο της αίμης α_3 . Από την άλλη, οι σταθερές k_{-1} και k_{-2} αντιπροσωπεύουν τις αντίστροφες διεργασίες και τέλος η σταθερά k_3 αντιπροσωπεύει το σχηματισμό του μεταβατικού συμπλόκου Cu_B^+-CO από το επαγόμενο φωτοπροϊόν (κατάσταση D) που αναμένεται ότι σχηματίζεται σε λιγότερο από 100 fs, όπως βρέθηκε σε πειράματα που διενεργήθηκαν στην α_3 οξειδοαναγωγή.⁴³⁻⁴⁴

Οι πέντε εξισώσεις που περιγράφουν κινητικά το σύστημα της εικόνας 9 είναι :

$$\frac{d[Fe-CO,Cu]}{dt} = k_2[Fe, Cu - CO] - k_{-2}[Fe - CO, Cu] = k_{2obs}[Fe, Cu]_T \quad (1)$$

$$\frac{d[Fe,Cu-CO]}{dt} = k_1[Fe, Cu][CO] - k_{-1}[Fe, Cu - CO] + k_{-2}[Fe - CO, Cu] - k_2[Fe, Cu - CO] = -k_{1obs}[Fe, Cu]_T - k_{2obs}[Fe, Cu]_T \quad (2)$$

$$K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[Fe,Cu-CO]}{[Fe,Cu][CO]} \quad (3)$$

$$K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}} = \frac{[Fe-CO,Cu]}{[Fe,Cu-CO]} \quad (4)$$

$$[Fe, Cu]_T = [Fe, Cu] + [Fe, Cu - CO] \quad (5)$$

Όπου Fe και Cu αντιστοιχούν στον σίδηρο Fe^{2+} της αίμης a_3 και στο Cu_B^+ , αντίστοιχα και $[Fe,Cu-CO]$ και $[Fe-CO,Cu]$ αντιστοιχούν στα ανάλογα δεσμευμένα με CO σύμπλοκα. Τα $[Fe,Cu]_T$ και $[Fe,Cu]$ αντιστοιχούν στην ολική συγκέντρωση του ενζύμου και στη συγκέντρωση του μη δεσμευμένου με CO ενζύμου, αντίστοιχα. Και τέλος οι k_{1obs} και k_{2obs} είναι οι μετρημένες πειραματικά σταθερές του ρυθμού διάσπασης του μεταβατικού συμπλόκου Cu_B^+-CO και του ρυθμού επαναδέσμευσης του CO στην αίμη a_3 , αντίστοιχα.²⁸ Στην περίπτωση της ba_3 οξειδοαναγωγάσης είναι γνωστό ότι $k_{-2} = 0.8 s^{-1}$ και $K_1 = 10^4 M^{-1}$.⁴⁵ Και οι δυο πιο πάνω τιμές είναι πολύ μεγαλύτερες από αυτές που βρέθηκαν σε άλλες οξειδοαναγωγάσες (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Κινητικά δεδομένα διαφόρων οξειδοαναγωγάσεων.²⁸

Οξειδοαναγωγάση	k_{2obs} (s^{-1})	K_1 (M^{-1})	K_2	k_1 ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{-1} (s^{-1})	k_2 (s^{-1})	k_{-2} (s^{-1})
Bovine aa_3	90	87	4×10^{-4}	6×10^7	7×10^5	1030	0.023
<i>P. denitrificans</i> aa_3	42	53	---	5×10^7	1×10^6	780	---
<i>E. coli</i> bo	60	400	---	2×10^5	500	190	---
<i>T. thermophilus</i> caa_3	40	3900	---	8×10^7	2×10^4	50	---
<i>T. thermophilus</i> ba_3	28.6	~10000	35.8	29.4		28.6	0.8

Στον μηχανισμό της εικόνας 9 γίνεται η υπόθεση μιας ταχείας ισορροπίας ($K_1=k_1/k_{-1}$) μεταξύ των καταστάσεων A και B. Όταν αυτή η ισορροπία είναι ταχεία σε σχέση με τις άλλες διεργασίες μετά το σχηματισμό της κατάστασης B από την κατάσταση D, η παρατήρηση του επανασχηματισμού της κατάστασης C, ακολουθούμενης από τη φωτοδιάσπαση του από ένα παλμό laser θα είναι κινητικά ταυτόσημη με τον απευθείας σχηματισμό της κατάστασης C από το μη δεσμευμένο ένζυμο και το μονοξείδιο του άνθρακα (CO). Η ισχύς της πιο πάνω υπόθεσης μπορεί να επαληθευτεί μετά τον προσδιορισμό των σταθερών των σχετικών ρυθμών.

Υποθέτοντας ότι $k_2 \gg k_{-2}$, η εξίσωση (1) μπορεί να μετασχηματιστεί στην ακόλουθη:

$$k_2[Fe, Cu - CO] = k_{2obs}[Fe, Cu]_T \quad (6)$$

Ο συνδυασμός των εξισώσεων 3, 5 και 6 καταλήγει στην ακόλουθη εξίσωση:

$$k_2 K_1 [Fe, Cu][CO] = k_{2obs}[Fe, Cu]_T \Rightarrow k_{2obs} = k_2 \frac{[CO]}{[CO] + \frac{1}{K_1}}$$

(7)

Για να επιτευχθεί το πιο πάνω αποτέλεσμα, έγινε η υπόθεση ότι οι καταστάσεις A και B βρίσκονται σε ισορροπία και έτσι αυτή που καθορίζει την ταχύτητα της διεργασίας είναι η

$$K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}}$$

Όταν $[CO] \ll 1/K_1$ (μη κορεσμένες συνθήκες) τότε $[Fe, Cu]_T \approx [Fe, Cu]$ και σύμφωνα με την εξίσωση 7 οδηγείται στην πιο κάτω εξίσωση:

$$k_{2obs} = k_2 K_1 [CO] \quad (8)$$

Και η εξίσωση 6 μπορεί να μετασχηματιστεί στην ακόλουθη εξίσωση:

$$k_2 K_1 [CO] [Fe, Cu]_T = k_{2obs} [Fe, Cu]_T \quad (9)$$

Όσο η συγκέντρωση του [CO] τείνει να εξισωθεί με τον όρο $1/K_1$ τότε παρουσιάζεται κορεσμός. Έτσι οι εξισώσεις 5 και 7 πρέπει να αναδιαμορφωθούν στις ακόλουθες:

$$[Fe, Cu]_T \approx [Fe, Cu - CO] \quad (10)$$

Και

$$k_2 = k_{2obs} \quad (11)$$

Έτσι η εξίσωση 6 μπορεί τώρα να αναδιαμορφωθεί και να γίνει:

$$k_2 [Fe, Cu]_T = k_{2obs} [Fe, Cu]_T \quad (12)$$

Στην περίπτωση του ba_3 -CO μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι υπάρχει κορεσμός επειδή $[CO] = 10^{-3}$ M και τότε $[CO] \gg 1/K_1 = 10^{-4}$ M. Έτσι από την εξίσωση 11 μπορεί να υπολογιστεί η σταθερά ταχύτητας k_2 .

Η διάσπαση του μεταβατικού συμπλόκου $\text{Cu}_B^+ \text{-CO}$ συνοδεύεται από την επακόλουθη επαναδέσμευση του CO στην αίμη α_3 και υποδεικνύει την απουσία ή την αποσύνθεση οποιουδήποτε θερμοδυναμικού ή κινητικού φραγμού. Αυτή την υπόθεση έρχεται να ενισχύσει η παρατήρηση που έγινε για το φαινόμενο στο pH7.5, όπου παρατηρήθηκαν και μετρήθηκαν οι τιμές για τις πειραματικές σταθερές ταχύτητας $k_{1obs} = 29.4 \text{ s}^{-1}$ και $k_{2obs} = 24.8 \text{ s}^{-1}$. Η τιμή της k_{2obs} είναι μεγαλύτερη από την k_2 (0.8 s^{-1}) κατά 31 φορές, έτσι η προηγούμενη υπόθεση $k_2 \gg k_{-2}$ είναι έγκυρη. Επιπλέον, δεν χρειάζεται να γίνει η υπόθεση ότι η σταθερά που καθορίζει το ρυθμό είναι η K_2 και επομένως προκύπτει $k_{-1} \gg k_2$.

Η γρήγορη ισορροπία μεταξύ των καταστάσεων A και B ($K_1 = 10^4 \text{ M}$) είναι υπεύθυνη για την κινητική ταυτοποίηση των δυο διεργασιών που οδηγούν στο σχηματισμό του συμπλόκου $[\text{Fe-CO,Cu}]$, αυτής που ακολουθεί τη φωτοδιάσπαση (k_{2obs}) και της θερμικής (k_2). Το ακόλουθο τελικό αποτέλεσμα $k_2 = k_{2obs}$ έχει ισχύ μόνο για την ba_3 οξειδοαναγωγή γιατί είναι η μοναδική οξειδοαναγωγή που παρουσιάζει κορεσμένη κινητική συμπεριφορά υπό κανονικές συνθήκες θερμοκρασίας (293 K) και πίεσης (1 atm) CO. Η αιτία αυτής της συμπεριφοράς είναι η εξαιρετικά μεγάλη συγγένεια που έχει ο Cu_B με το CO (K_1), σε αντίθεση με όσα έχουν αναφερθεί για τις άλλες οξειδοαναγωγές.

Η διαφορική εξίσωση 2 δεν μπορεί να λυθεί εξαιτίας των πολλών άγνωστων μεταβλητών. Αν γίνει η υπόθεση ότι η σταθερά που ρυθμίζει το ρυθμό είναι η K_2 , τότε $k_{-1} \gg k_2 \gg k_{-2}$. Επιπρόσθετα, εξαιτίας των κορεσμένων συνθηκών γίνεται $[\text{Fe,Cu}]_T \approx [\text{Fe}, \text{Cu-CO}] \Rightarrow [\text{Fe,Cu}] \approx 0$. Έτσι η εξίσωση 2 μπορεί να απλοποιηθεί στην πιο κάτω:

$$k_{-1} = k_{1obs} + k_{2obs} \quad (13)$$

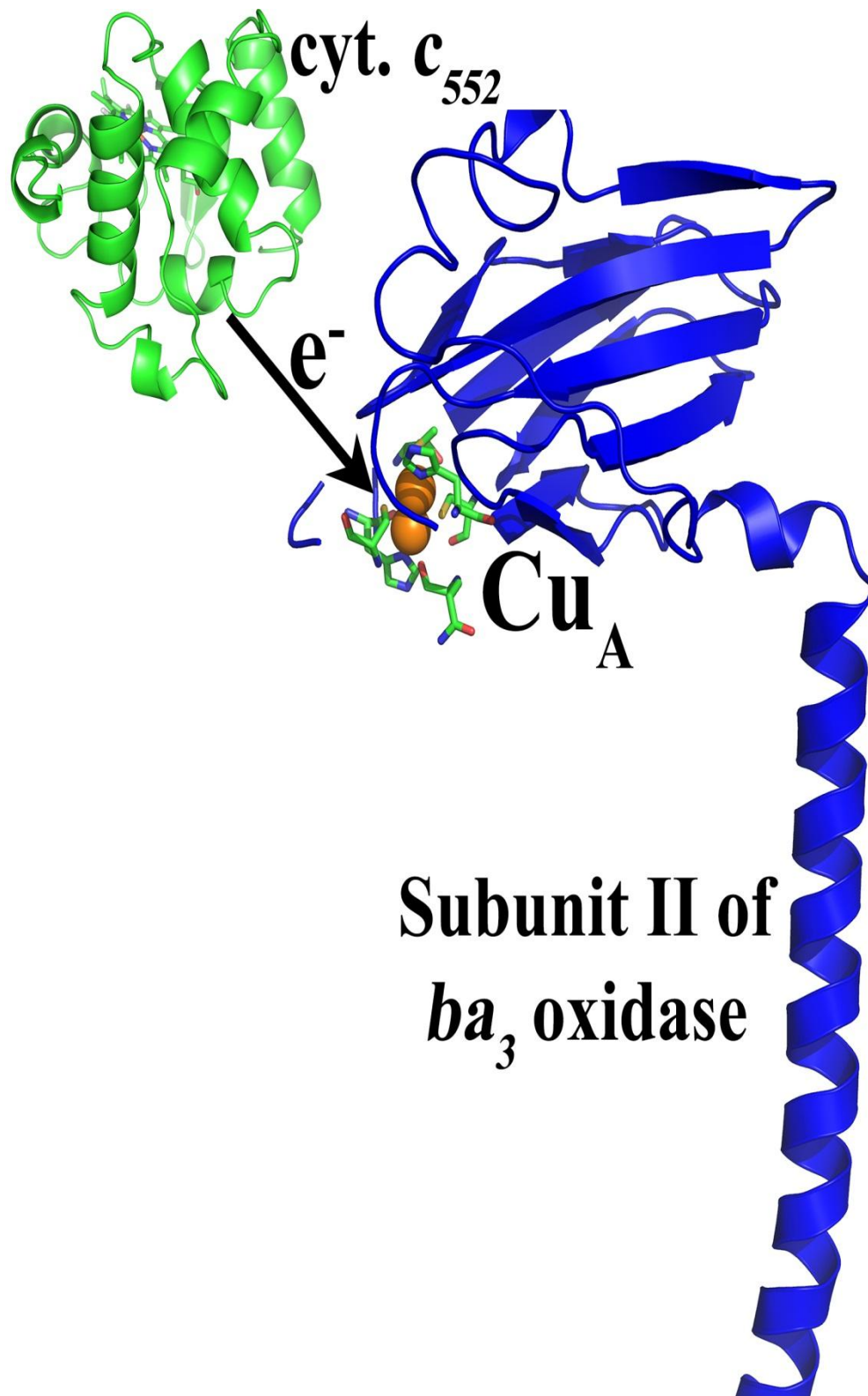
Εντούτοις οι παραγόμενες τιμές της k_1 δεν υποστηρίζουν την υπόθεση $k_{-1} \gg k_2 \gg k_{-2}$ και έτσι δεν μπορεί να γίνει αποδεκτή. Αν γίνει η υπόθεση ότι η σταθερά που ρυθμίζει το ρυθμό είναι η K_1 τότε οδηγεί ακριβώς στο ίδιο αποτέλεσμα ότι:

$$k_{-1} = k_{1obs} + k_{2obs}$$

Συνοψίζοντας, στην περίπτωση του ba_3 -CO και οι δύο K_1 και K_2 είναι σταθερές που ρυθμίζουν το ρυθμό, εφόσον καμία τους δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι φτάνει στην ισορροπία γρηγορότερα από την άλλη. Επιπλέον, η ba_3 κυτοχρωμική οξειδοαναγωγή είναι η μοναδική οξειδοαναγωγή που παρουσιάζει συμπεριφορά κορεσμένης κινητικής εφόσον $[CO] \gg 1/K_1$.

1.3.2 Μεταφορά ηλεκτρονίων στην οξειδοαναγωγή του κυτοχρώματος c

Η οξειδοαναγωγή του κυτοχρώματος c παρουσιάζει ένα περίπλοκο μοτίβο μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω του ισχυρά δεσμευμένου υποστρώματος και των οξειδοαναγωγικών περιοχών που περιλαμβάνουν ενδιάμεσους συμπράγοντες, μεγάλες αποστάσεις, μεταξύ των ασθενώς δεσμευμένων οξειδοαναγωγικών κέντρων.^{34,38,46,47} Στην αερόβια αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων του εξαιρετικά θερμοφιλου βακτηρίου *Thermus thermophilus*, τα ηλεκτρόνια προέρχονται από το κυτόχρωμα c_{552} και εισέρχονται στην ba_3 κυτοχρωμική οξειδοαναγωγή μέσω του ομο-διπυρηνικού κέντρου Cu_A .^{1,48-51} Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτού του ζευγαριού είναι κυρίως υδρόφοβες σε σχέση με άλλες οξειδοαναγωγάσες όπου παρουσιάζουν ένα ηλεκτροστατικό χαρακτήρα.⁵² Επιπρόσθετα, η φυσιολογική κατεύθυνση αυτής της αντίδρασης ενοείται θερμοδυναμικά, αφού τα οξειδοαναγωγικά δυναμικά, E_m , του κυτοχρώματος c_{552} και του συμπλόκου Cu_A της ba_3 κυτοχρωμικής οξειδοαναγωγάσης είναι 200 – 230 mV και 240 – 260 mV, αντίστοιχα.^{45,52} Παρόμοιες τιμές για το σύμπλοκο Cu_A έχουν βρεθεί από τις aa_3 οξειδοαναγωγάσες προερχόμενες από καρδιά βοοειδούς και το *P. denitrificans*.⁵³ Το επόμενο στάδιο στην ba_3 οξειδοαναγωγή περιλαμβάνει την μεταφορά ηλεκτρονίων από το Cu_A στην αίμη b , μια αντίδραση που δεν ενοείται θερμοδυναμικά εφόσον η χαμηλού spin αίμη b παρουσιάζει ένα οξειδοαναγωγικό δυναμικό των 210 mV.⁴⁸⁻⁴⁹ Υπολογισμοί με τη μέθοδο των ρευμάτων σήραγγας (tunneling currents) στην aa_3 οξειδοαναγωγή από καρδιά βοοειδούς εισηγούνται ότι η μεταφορά τους γίνεται μέσω καναλιών που περιλαμβάνουν τους αμινοξικούς υποκαταστάτες του Cu_A , His157, Gln151, Cys149 και Cys 153 και το ζευγάρι αργινινών, Arg449 και Arg450. Το ρεύμα εισέρχεται στην αίμη μέσω της προπιονικής ομάδας D.⁵⁴

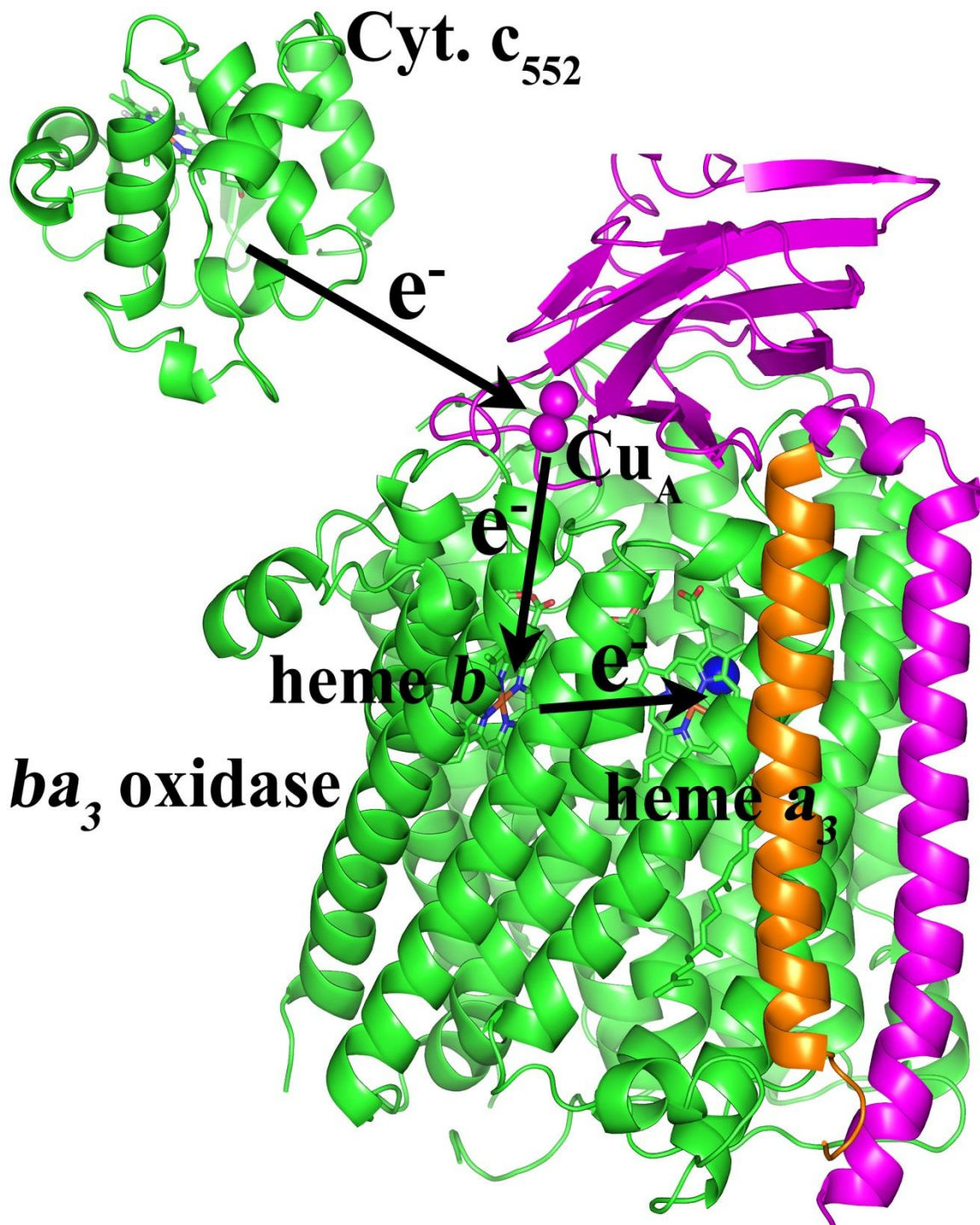


Subunit II of *ba*₃ oxidase

Εικόνα 10. Απεικόνιση της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα *c*₅₅₂ στο ομο-διπυρηνικό κέντρο που αποτελείται από δυο άτομα χαλκού μικτού σθένους, [Cu_A^{+1.5}-Cu_A^{+1.5}], που απεικονίζονται σαν κόκκινες σφαίρες και τους υποκαταστάτες τους της υπομονάδας II (μπλε) της *ba*₃ οξειδοαναγωγάσης.

1.3.3 Μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ της αίμης b και της αίμης a_3 στην ba_3 οξειδοαναγωγή

Το τελευταίο στάδιο στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι η μεταφορά του μέσω του καναλιού αίμης b – αίμης a_3 . Αυτό το κανάλι χαρακτηρίζεται από υψηλή κινητήρια δύναμη αφού τα μέσα οξειδοαναγωγικά δυναμικά της αίμης a_3 και αίμης b βρέθηκαν στα 430 mV και 210 mV, αντίστοιχα. Για τη μελέτη αυτού του καναλιού μεταφοράς ηλεκτρονίων έγιναν πειράματα φωτόλυσης στο μικτής οξειδοαναγωγικής κατάστασης ba_3 -CO σύμπλοκο για την παρακολούθηση της αντίστροφης μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ της αίμης a_3 και αίμης b . Η βάση για την εξέταση αυτού του καναλιού είναι ότι η μεταφορά ηλεκτρονίων στις πρωτεΐνες γίνεται μέσω μονού- ή πολύ- ηλεκτρονιακών οξειδοαναγωγικών κέντρων που συνήθως συνδέονται μέσω μιας αλυσίδας αμινοξικών κατάλοιπων με τους τρεις παράγοντες που επηρεάζουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων να είναι η απόσταση, η κινητήρια δύναμη ΔG και η ενέργεια αναδιοργάνωσης λ . Η αίμη b και η αίμη a_3 συνδέονται μέσω των αμινοξέων His386, Phe385 και His384 (Εικόνα 7A) , ένα μοτίβο που απαντάται σε όλες τις οξειδάσες που είναι γνωστές οι κρυσταλλικές τους δομές. Προηγούμενες έρευνες που έχουν γίνει στις aa_3 οξειδοαναγωγάσες υπέδειξαν ότι τα κυρίαρχα κανάλια μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι μέσω άλματος μεταξύ των δυο αιμών και μέσω των ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ της His386, της Phe385 και της His384 (αρίθμηση της ba_3 οξειδοαναγωγάσης). Μια σύγκριση μεταξύ των διαθέσιμων κρυσταλλικών δομών έδειξε ότι αυτά τα κανάλια είναι επίσης λειτουργικά στην ba_3 οξειδοαναγωγάση.



Εικόνα 11. Απεικόνιση της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα c_{552} αρχικά στο ομο-διπυρηνικό κέντρο της υπομονάδας II (μπλε) που αποτελείται από δυο άτομα χαλκού μικτού σθένους, [$Cu_A^{+1.5}-Cu_A^{+1.5}$], που απεικονίζονται σαν μπλε σφαίρες της ba_3 οξειδοαναγωγής. Στη συνέχεια τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στην αίμη b και ακολούθως στο διπυρηνικό κέντρο της ba_3 οξειδοαναγωγής που απαρτίζεται από την αίμη a_3 και το άτομο Cu_B (μπλε σφαίρα).

Προηγούμενες μελέτες που έγιναν στις aa_3 οξειδοαναγωγάσες αποκάλυψαν είτε μη διακριτά δυναμικά για τις δυο αίμες, είτε υψηλότερο δυναμικό για την χαμηλού σπιν αίμη. Σε αντίθεση, η ba_3 οξειδοαναγωγή παρουσιάζει αντίστροφα δυναμικά των 210 mV και 285 / 430 mV για τις αίμες b και a_3 , αντίστοιχα. Επιπλέον, και οι δυο τιμές μετατοπίζονται σε πιο θετικά δυναμικά από ότι άλλες αίμες b σε άλλες πρωτεΐνες (Mb 40 mV) και άλλες αίμες a_3 σε άλλες πρωτεΐνες (350 mV στην aa_3 οξειδοαναγωγή από το *P. denitrificans*).⁵³ Η διαφορά των δυναμικών της αίμης b με της αίμης a_3 είναι εξαιτίας της παρουσίας του C-8 φορμυλικού υποκαταστάτη στην αίμη a_3 , που είναι μια ηλεκτρο-απωθητική ομάδα (electron-withdrawing group). Οι παρατηρημένες μετατοπίσεις σε πιο θετικά δυναμικά είναι αποτέλεσμα του αυξανόμενου θετικού φορτίου στις αίμες. Αυτό μπορεί να συμβαίνει είτε λόγω της πρωτονίωσης των προπιονικών ομάδων που βρίσκονται στις αίμες, είτε λόγω υψηλής υδροφοβικότητας και τέλος είτε λόγω διαφοροποίησης των αξονικών υποκαταστατών των αιμών. Όντως η υπομονάδα I της ba_3 οξειδοαναγωγάσης είναι βυθισμένη σε μια εξαιρετικά υδρόφοβη περιοχή έχοντας $pI = 10.4$ και ένα καθαρό φορτίο +9.⁵⁵ Αυτό το μη πολικό, χαμηλό διηλεκτρικό μικρό-περιβάλλον δεν επιτρέπει στην αίμη να λάβει ηλεκτρονιακή πυκνότητα από τα μόρια νερού. Επιπρόσθετα, φασματοσκοπικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι προπιονικές ομάδες που ανήκουν στις αίμες b και a_3 είναι μερικώς πρωτονιωμένες στην ba_3 οξειδοαναγωγή^{14,45} σε σχέση με άλλες aa_3 οξειδοαναγωγάσες και επίσης ο αξονικός υποκαταστάτης της αίμης a_3 , η His384, εμφανίζει ένα μεγαλύτερο Fe-N δεσμό των 3.3 Å,¹ αποτρέποντας έτσι σε μεγάλο βαθμό το Fe να λάβει ηλεκτρόνια. Αυτές οι τρεις παράμετροι προκύπτουν από ότι είναι γνωστό σε άλλες οξειδάσες και έχουν συντονιστεί με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να αυξήσουν θετικό φορτίο με τις αίμες. Αυτό οδηγεί στην αύξηση των μέσων δυναμικών και της σταθεροποίησης της αναγωγικής κατάστασης που βρίσκονται οι αίμες.

1.3.4 Απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο του Cu_A στο διπυρηνικό κέντρο αίμης α₃ – Cu_B της ba₃ οξειδοαναγωγάσης

Από την πρώτη διαθέσιμη κρυσταλλική δομή της αα₃ οξειδοαναγωγάσης από καρδιά βοοειδούς προτάθηκε ότι τα ηλεκτρόνια μπορούν να ληφθούν από το διπυρηνικό κέντρο μέσω μιας απευθείας μεταφορά από το σύμπλοκο του Cu_A. Επιπρόσθετα ο T. Soulimane και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν μια κρυσταλλική δομή της ba₃ οξειδοαναγωγάσης και υπέδειξαν μια απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων από το Cu_A στο διπυρηνικό κέντρο μέσω ενός Cu_A – Cu_B καναλιού ηλεκτρονίων.¹ Αυτό το κανάλι (εικόνα 7B) περιλαμβάνει τα αμινοξικά κατάλοιπα υποκαταστάτες του Cu_A, Q151, Y136, W229 και H283, ενός από τους υποκαταστάτες του Cu_B, και μια απόσταση 21.6 Å μεταξύ των δυο μετάλλων. Στην ba₃ οξειδοαναγωγάση, το σύμπλοκο Cu_A παρουσιάζει ένα μέσο αναγωγικό δυναμικό (midpoint reduction potential) των 250 mV παρόμοιο με αυτό που παρατηρήθηκε στην αα₃ οξειδοαναγωγάση από το *P. denitrificans*. Το αναγωγικό δυναμικό του Cu_B δεν είναι ακόμη γνωστό, εντούτοις σύμφωνα με αυτό που προσδιορίστηκε στην αα₃ οξειδοαναγωγάση (412 mV)⁵³ αναμένεται παρόμοιο ή ακόμα και μεγαλύτερο δυναμικό. Αυτό το στάδιο αν είναι ενεργό τότε χαρακτηρίζεται από υψηλή κινητήρια δύναμη (high driving force). Από την άλλη, αρκετές φασματοσκοπικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η μεταφορά ηλεκτρονίων από το κανάλι Cu_A – Cu_B δεν είναι ενεργή, πιθανότατα εξαιτίας της μεγάλης απόστασης μεταξύ του Cu_A και της Y136 και μιας μεγάλης ενέργειας αναδιαμόρφωσης (reorganization energy). Εντούτοις, η ba₃ οξειδοαναγωγάση είναι ένα ιδανικό σύστημα για τη μελέτη τέτοιων φαινομένων μέσω των συμπλόκων ισορροπίας της αίμης α₃ Fe²⁺-CO και του Cu_B¹⁺-CO, τα πειραματικά δεδομένα²⁸ αποκλείουν την πιθανότητα της αντίστροφης ροής ηλεκτρονίων από το Cu_B ή την αίμη α₃ στο Cu_A. Παρόλα αυτά, η πιθανότητα της απευθείας μεταφοράς ηλεκτρονίων από το Cu_A στο Cu_B ή την αίμη α₃ δεν πρέπει να αποκλειστεί.

1.4 Παραπομπές

1. T. Soulimane, G. Buse, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, R. Huber, M. E. Than, *EMBO J.*, 2000, **19**, 1766-1776
2. C. Koutsoupakis, T. Soulimane, C. Varotsis, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 36806-36809
3. H. B. Gray, J. R. Winkler, *Annu. Rev. Biochem.* 1996, **65**, 537-561
4. M. Porrini, V. Daskalakis, S. C. Farantos, C. Varotsis, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 12129-12135
5. L. M. Blomberg, M. R. A. Blomberg, P. E. M. Siegbahn, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2005, **99**, 949-958
6. K. Koutsoupakis, S. Stavrakis, T. Soulimane, C. Varotsis, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 14893-14896
7. Than M. E., Soulimane T. *Handbook of Metalloproteins* (2001) 363-378
8. T. Soulimane, G. E. Buse, *J. Biochem.* 1995, **27**, 588-595
9. S. Stavrakis, K. Koutsoupakis, E. Pinakoulaki, A. Urbani, M. Saraste, C. Varotsis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 3814-3815
10. C. Varotsis, Y. Zhang, E. H. Appelman, G. T. Babcock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 237-241
11. Y. Chen, L. Hunsicker-Wang, R. L. Pacoma, E. Luna, J. A. Fee, *Protein Expression and Purification*, 2005, **40**, 299-318
12. C. E. Slutter, R. Langen, D. Sanders, S. M. Lawrence, P. Wittung, A. J. Di Bilio, M. G. Hill, J. A. Fee, J. H. Richards, J. R. Winkler, Bo. G. Malmstrom, *Inorganica Chimica Acta*, 1996, **243**, 141-145
13. B. Liu, Y. Zhang, J. T. Sage, S. M. Soltis, T. Doukov, Y. Chen, C. D. Stout, J. A. Fee, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, **1817**, 658-665
14. K. Koutsoupakis, S. Stavrakis, E. Pinakoulaki, T. Soulimane, C. Varotsis, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 32860-32866
15. C. Koutsoupakis, E. Pinakoulaki, S. Stavrakis, V. Daskalakis, C. Varotsis, *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 2004, **1655**, 347-352
16. T. Egawa, Y. Chen, J. A. Fee, S-R Yeh, D. L. Rousseau, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, **1817**, 666-671
17. A. Sujak, N. J. M. Sanghamitra, O. Maneg, B. Ludwig, S. Mazumbar, *Biophysical Journal*, 2007, **93**, 2845-2851

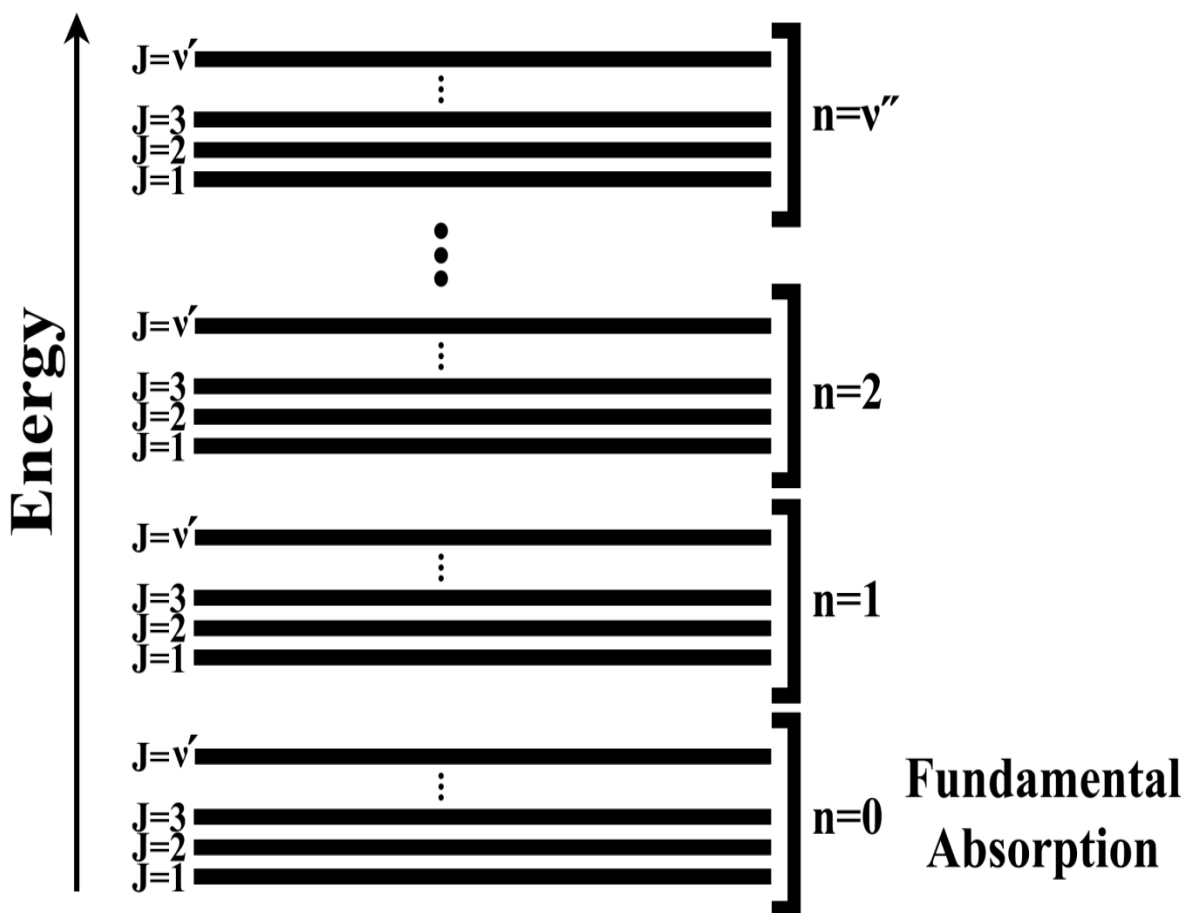
18. S. A. Siletsky *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, **1767**, 1383-1392
19. D. Heitbrink, H. Sigurdson, C. Bolwien, P. Brzezinski, J. Heberle, *Biophysical Journal*, 2002, **82**, 1-10
20. S. A. Siletsky, A. A. Konstantinov, *Biochimica et Biophysica Acta* 2012, **1817**, 476-488
21. H-Y. Chang, S.K. Choi, A.S. Vakkasoglu, Y. Chen, J. Hemp, J.A. Fee, R.B. Gennis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, **109**, 5259-5264
22. C. von Balmos, P. Adelroth, R.B. Gennis, P. Brzezinski, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, **1817**, 650–657
23. H. Lepp, E. Svahn, K. Faxén, P. Brzezinski, *Biochemistry*, 2008, **47**, 4929–4935
24. T. Soulimane, M. E. Than, M. Dewor, R. Huber, G. Buse, *Protein Science* 2000, **9**, 2068-2073
25. B. H. Zimmermann, C. I. Nitsche, J. A. Fee, F. Rusnak, E. Munck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, **85**, 5779-5783
26. A. Henne *et al.*, *Nature Biotechnology*, 2004, **22**, 547 – 553.
27. T. Oshima, and K. Imahori, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1974, **24**, 102–112.
28. C. Koutsoupakis, T. Soulimane, C. Varotsis, *J. Biol. Chem.*, 2012, **287**, 37495-37507
29. S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig and H. Michel, *Nature*, 1995, **376**, 660-669.
30. R. A. Marcus and N. Sutin, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1985, **811**, 265-322.
31. C. C. Page, C. C. Moser, X. Chen, and P. L. Dutton, *Nature*, 1999, **402**, 47-52.
32. C. C. Page, C. C. Moser and P. L. Dutton, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2003, **7**, 551-556.
33. C. C. Moser, C. C. Page, R. Farid, and P. L. Dutton, *Bioenerg. Biomembr.*, 1995, **27**, 263-274.
34. H. B. Gray and J. R. Winkler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2005, **102**, 3534-3539.
35. J. J. Regan, B. E. Ramirez, J. R. Winkler, H. B. Gray, and B. G. Malmström, *Bioenerg. Biomembr.*, 1998, **30**, 35-39.
36. M-L. Tan, I. Balabin and J. N. Onuchic, *Biophys. J.*, 2004, **86**, 1813-1819.
37. P. Brzezinski, *Biochemistry*, 1996, **35**, 5611-5615.
38. A. Jasaitis, F. Rappaport, E. Pilet, U. Liebl and M. H. Vos, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2005, **102**, 10882-10886.
39. B. C. Hill, *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 2419-2425.,
40. J. Keightley, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 20345-20358.

41. L. M. Hunsicker-Wang, R. L. Pacoma, Y. Chen, J. A. Fee, and C. D. Stout, *Acta Cryst.*, 2005, **D61**, 340-343.
42. B. Liu, *et al.*, *Biochemistry*, 2009, **48**, 820-826.
43. Ó. Einarsdóttir, *et al.*, *Biochemistry*, 1993, **32**, 12013-12024.
44. W. H. Woodruff, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1993, **25**, 177-188.
45. A. Giuffrè, *et al.*, *Biochemistry*, 1999, **38**, 1057-1065.
46. E. Pilet, A. Jasaitis, U. Liebl and M. H. Vos, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2004, **101**, 16198-16203.
47. M. I. Verkhovsky, A. Jasaitis and M. Wikström, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, **1506**, 143-146.
48. P. Hellwig, T. Soulimane, G. Buse, and W. Mäntele, *Biochemistry*, 1999, **38**, 9648-9658.
49. F. L. Sousa, A. F. Veríssimo, A. M. Baptista, T. Soulimane, M. Teixeira and M. M. Pereira, *Biophys. J.*, 2008, **94**, 2434-2441.
50. O. Farver, Y. Chen, J. A. Fee and I. Pecht, *FEBS Letters*, 2006, **580**, 3417-3421.
51. I. Szundi, C. Funatogawa, J. A. Fee, T. Soulimane and Ó. Einarsdóttir, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2010, **107**, 21010-21015.
52. O. Maneg, B. Ludwig and F. Malatesta, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 46734-46740.
53. E. A. Gorbikova, K. Vuorilehto, M. Wikstöm and M. I. Verkhovsky, *Biochemistry*, 2006, **45**, 5641-5649.
54. D. M. Medvedev, I. Daizadeh and A. A. Stuchebrukhov, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 6571-6582.
55. J. A. Keightley, B. H. Zimmermann, M. A. Mather, P. Springer, A. Pastuszyn, D. M. Lawrence and J. A. Fee, *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 20345-20358.

2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου

2.1 Βασικές αρχές φασματοσκοπίας

Όταν ένα μόριο αλληλεπιδρά με ηλεκτρομαγνητικό πεδίο γίνεται μεταφορά ενέργειας από το πεδίο στο μόριο όταν ικανοποιείται η συνθήκη του Bohr, $\Delta E = h\nu$, όπου ΔE η διαφορά ενέργειας μεταξύ δύο κβαντισμένων ενεργειακών καταστάσεων του μορίου, $h = 6.626 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$ η σταθερά του Planck και ν η συχνότητα της ακτινοβολίας. Κάθε ηλεκτρονιακή στάθμη υποδιαιρείται σε στάθμες ταλαντώσεων, οι οποίες χαρακτηρίζονται από τον κβαντικό αριθμό ταλαντώσεως n ($n = 0, 1, 2, 3, \dots, n'$), ενώ κάθε στάθμη ταλαντώσεως υποδιαιρείται σε στάθμες περιστροφής των οποίων η ενέργεια χαρακτηρίζεται από τον κβαντικό αριθμό J ($J = 0, 1, 2, \dots, v'$).



Εικόνα 12. Απεικόνιση των κβαντικών ενεργειακών καταστάσεων ενός μορίου.

2.2 Δονητική φασματοσκοπία – Φασματοσκοπία Υπερύθρου

Η φασματοσκοπία υπερύθρου στηρίζεται στην αλληλεπίδραση της ύλης με το υπέρυθρο φως. Η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί αλλαγές στη διπολική ροπή, μ , του μορίου δημιουργώντας δονήσεις. Οι δονήσεις αυτές, που απαντώνται σε ένα φάσμα υπερύθρου, μπορούν να δώσουν την ταυτότητα των χημικών ειδών, που υπάρχουν στο δείγμα.

Ένα μόριο απορροφά υπέρυθη 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:

$$\mu = e \cdot r$$

Όπου μ η διπολική ροπή, e το φορτίο και r η απόσταση μεταξύ θετικών και αρνητικών φορτίων.

Αν ένα ετεροπυρηνικό διατομικό μόριο δονείται σε μία συγκεκριμένη συχνότητα, η μοριακή διπολική ροπή επίσης ταλαντώνεται γύρω από την τιμή ισορροπίας της. Το ταλαντωμένο δίπολο απορροφά ενέργεια από το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο μόνο αν το τελευταίο ταλαντώνεται με την ίδια συχνότητα του δίπολου.

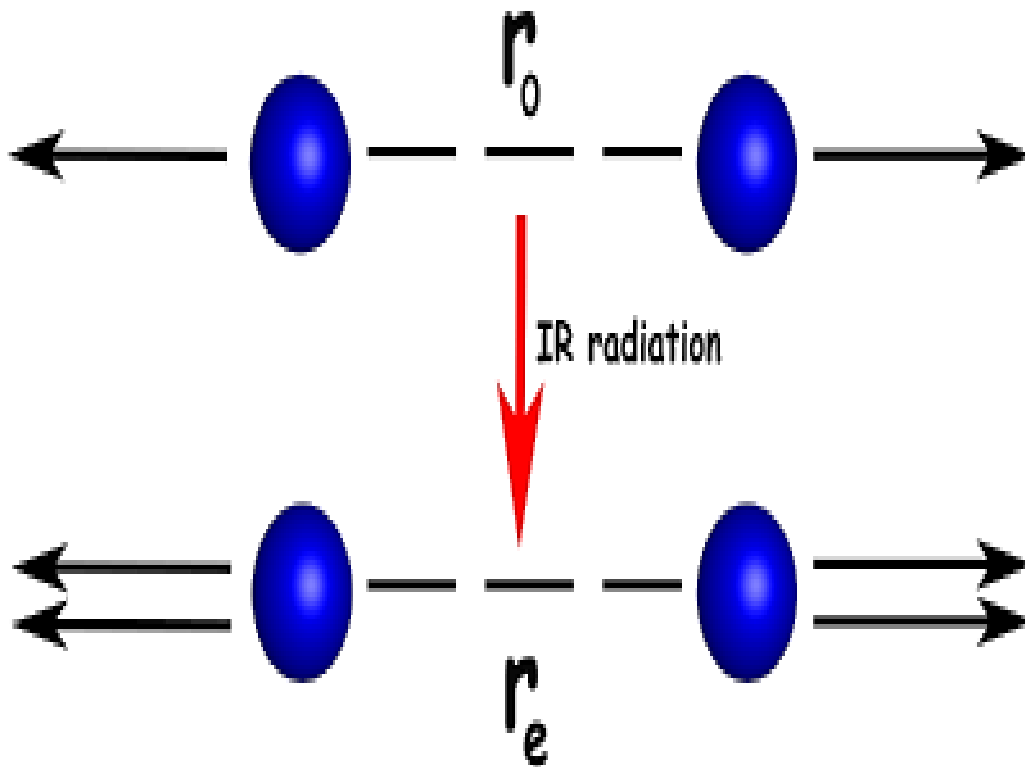
Για δονητικές κινήσεις η διπολική ροπή μ μπορεί να γραφεί σαν ένα άθροισμα όρων:

$$\mu = \mu_0 + \left(\frac{\partial \mu}{\partial q} \right) q + \dots$$

όπου μ_0 η μόνιμη διπολική ροπή και q η δονητική μετατόπιση η οποία ορίζεται σαν:

$$q = r - r_e$$

όπου r η διαπυρηνική απόσταση και r_e η ίδια απόσταση κατά την ισορροπία.



Εικόνα 13. Απεικόνιση δόνησης ενός διατομικού μορίου όταν αυτό απορροφήσει υπέρυθρη ακτινοβολία.

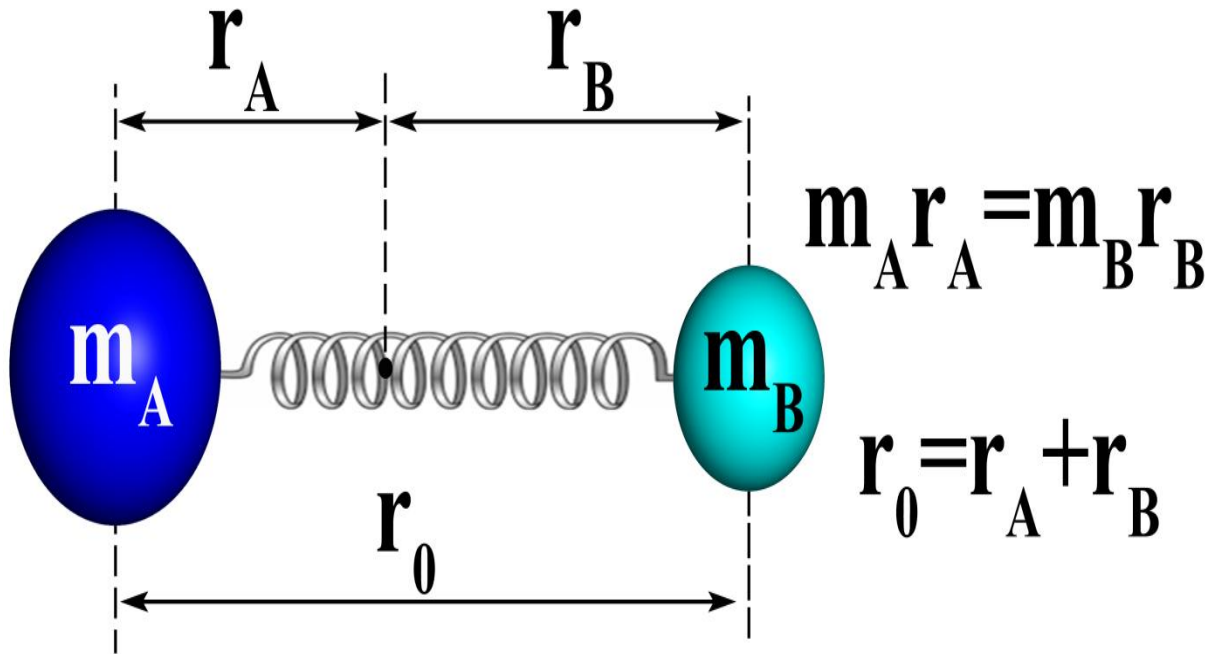
Το ποσό της υπέρυθρης ακτινοβολίας που απορροφάται κατά τη διάρκεια μίας δόνησης, καθώς και η ένταση της στο λαμβανόμενο φάσμα εξαρτάται από την πιθανότητα της δονητικής μετάβασης, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από την αλλαγή της διπολικής ροπής που συνοδεύει αυτή τη μετάβαση. Έχει αποδειχθεί ότι η ένταση της απορρόφησης στο υπέρυθρο είναι ανάλογη του τετραγώνου της μεταβολής της διπολικής ροπής P ως προς τη μετατόπιση q του πυρήνα, στη διάρκεια της δόνησης:

$$I_{IR} \sim \left(\frac{\partial p}{\partial q} \right)^2$$

Αυτό σημαίνει ότι μία δόνηση είναι ενεργή στο υπέρυθρο (IR) όταν μεταβάλλει τη διπολική ροπή και όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της διπολική ροπής, τόσο μεγαλύτερη είναι και η ένταση της δόνησης.

2.3 Είδη δονήσεων

Η θεωρία των μοριακών διεγέρσεων περιγράφεται απλά με το μοντέλο του αρμονικού ταλαντωτή. Το σύστημα θεωρείται ότι αποτελείται από δυο σφαίρες μάζας m , συνδεδεμένες μέσω ενός αβαρούς ελατηρίου, του οποίου η τάση δίνεται από μια σταθερά k .



Εικόνα 14. Νόμος του Hooke απεικονισμένος με ελατήριο και σφαίρες.

Σύμφωνα με το νόμο του Hooke, η συχνότητα δόνησης του ελατηρίου, δίνεται από την σχέση:

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

όπου k είναι η σταθερά, και μ είναι η ανοιγμένη μάζα που δίνεται από την σχέση :

$$\mu = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B}$$

m_A , m_B είναι οι μάζες των σφαιρών.

Επιπλέον, η ενέργεια του συστήματος, σύμφωνα με την θεωρία του κλασικού αρμονικού ταλαντωτή δίνεται από την σχέση : $E = \frac{1}{2} k x^2$

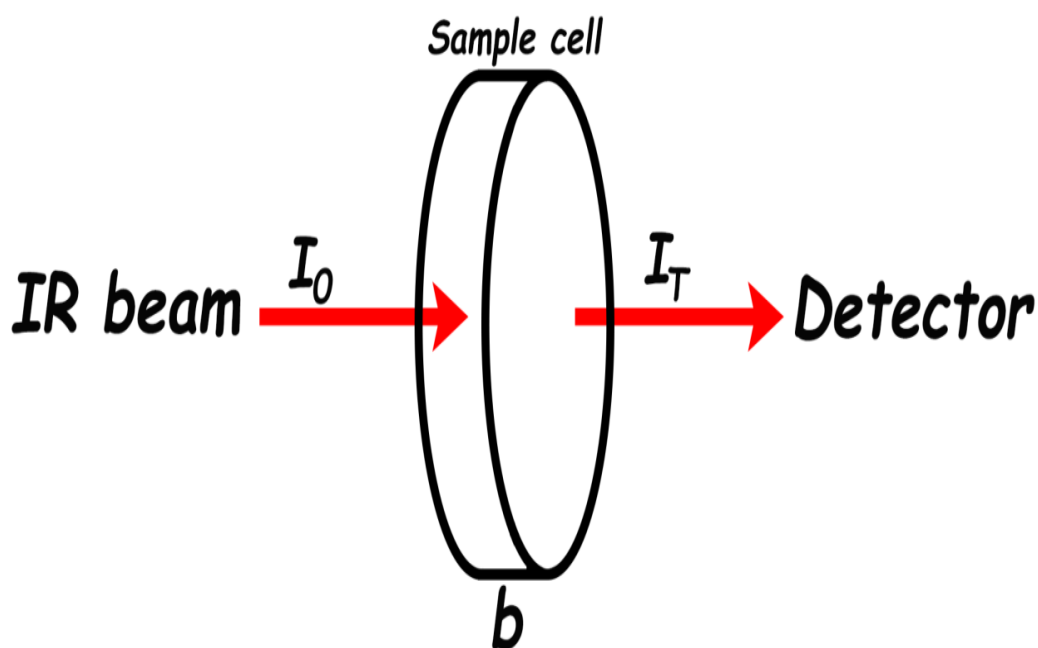
όπου x είναι η μετατόπιση του ελατηρίου. Επειδή το x μπορεί να πάρει οποιαδήποτε τιμή, κάθε τιμή ενέργειας κατά την κλασσική άποψη είναι επιτρεπτή, συμπεράσμα, όμως, που κβαντομηχανικά δεν ευσταθεί. Έτσι, σύμφωνα με την κβαντομηχανική, η ενέργεια του συστήματος δίνεται από την σχέση:

$$E = \left(n + \frac{1}{2} \right) h\nu$$

Όπου ν είναι η συχνότητα δόνησης και n είναι ο δονητικός κβαντικός αριθμός (vibrational quantum number) που παίρνει τιμές $(0, 1, 2, \dots)$. Συνεπώς, η ενέργεια του κβαντομηχανικού ταλαντωτή μπορεί να είναι μόνο ακέραιο πολλαπλάσιο του $\frac{1}{2} h\nu$. Η ενέργεια με $n=0$, $E_0 = \frac{1}{2} h\nu$, ονομάζεται ενέργεια μηδενικού σημείου και υπάρχει ακόμα και στη θερμοκρασία του απόλυτου μηδέν, γιατί είναι ανεξάρτητη από τις θερμικές κινήσεις των μορίων. Η φασματική γραμμή για το ενεργειακό άλμα $n=0 \rightarrow n=1$ έχει σημαντική ένταση και καλείται θεμελιώδης απορρόφηση (fundamental absorption), ενώ η $n=0 \rightarrow n=2$ και $n=0 \rightarrow n=3$ έχουν πολύ μικρότερη ένταση και καλούνται πρώτη και δεύτερη υπερτονική (first and second overtones), αντίστοιχα. Η ένταση των δονήσεων μετριέται ποσοτικά από την εξίσωση του Lambert-Beer:

$$I_v = I_0 \times 10^{-\epsilon bc}$$

Όπου I_v η ένταση της ακτινοβολίας που εξέρχεται από το δείγμα πάχους b , συγκέντρωσης c και μοριακού συντελεστή απορρόφησης ϵ και I_0 η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.



Εικόνα 15. Πειραματική απεικόνιση του νόμου Lambert-Beer.

Κάθε μόριο μπορεί να δονείται με πολλούς τρόπους (vibrational modes). Για μόρια που αποτελούνται από N αριθμό ατόμων, τα γραμμικά μόρια (linear molecules) δονούνται με $3N-5$ τρόπους ενώ τα μη γραμμικά μόρια (non-linear molecules) δονούνται με $3N-6$ τρόπους. Συμμετρικά μόρια όπως N_2 , O_2 δεν είναι IR ενεργά οπότε και δεν γίνονται αντιληπτά στο υπέρυθρο φάσμα αλλά μόνο στο φάσμα Raman. Αντιθέτως, ασύμμετρα μόρια όπως CO_2 , H_2O είναι IR ενεργά και απορροφούν στο υπέρυθρο φάσμα με πολλούς τρόπους. Οι δονήσεις που λαμβάνουν χώρα σε ένα μόριο διακρίνονται στις :

Δονήσεις τάσης (stretching vibrations) : Τα άτομα του δεσμού διαδοχικά πλησιάζουν και απομακρύνονται μεταξύ τους κινούμενα κατά μήκος του δεσμού.

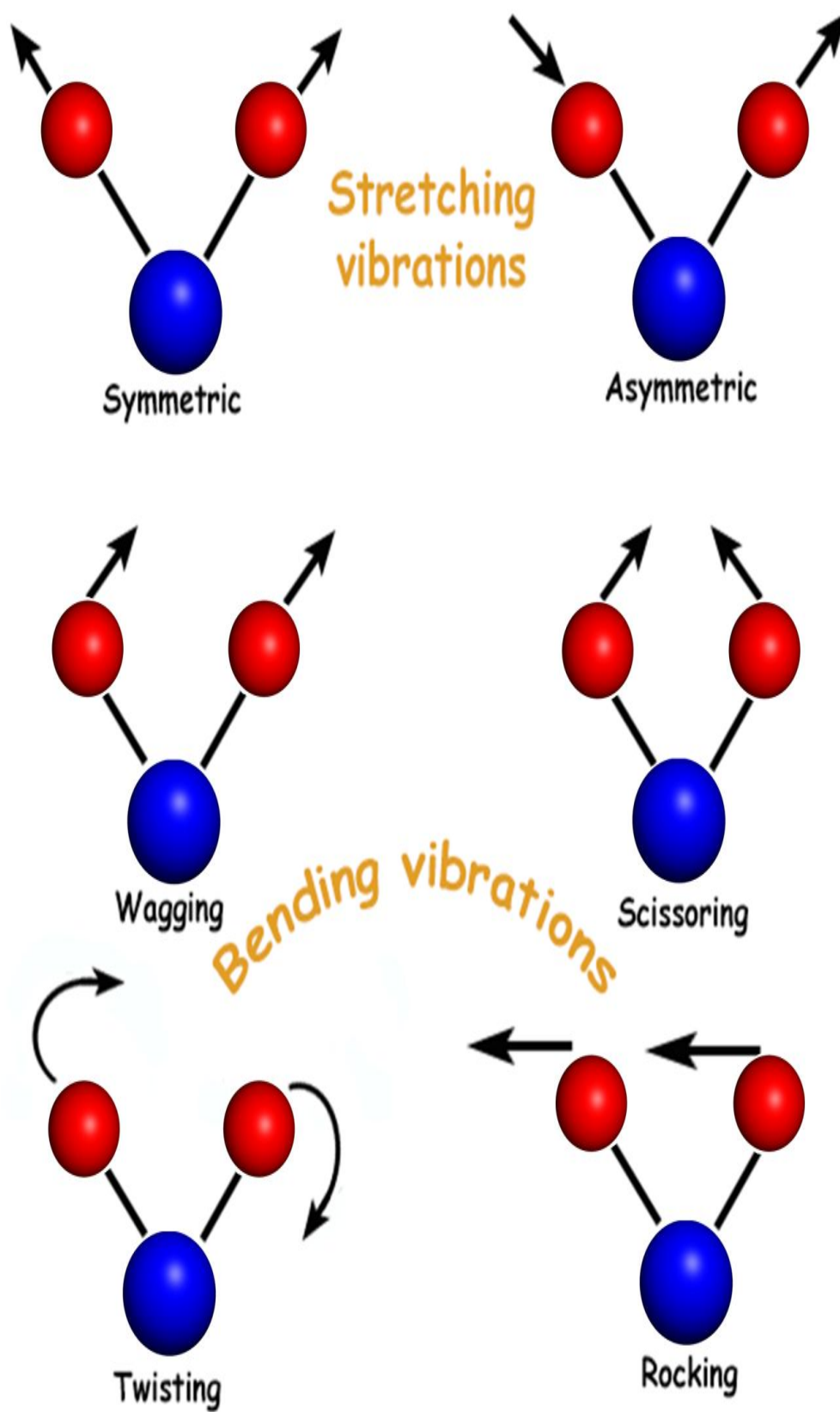
Δονήσεις κάμψης (bending vibrations) : Τα άτομα των γειτονικών δεσμών κινούνται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να αλλάζει η γωνία των δεσμών.

Δονήσεις σείσης (wagging vibrations) : Οι δονήσεις αυτές παράγονται όταν μια μη γραμμική μονάδα τριών ατόμων πάλλεται εντός του επιπέδου ισορροπίας που σχηματίζεται από τα άτομα και τους δεσμούς.

Δονήσεις αιώρησης (rocking vibrations) : Συμβαίνουν όταν η ίδια δομική μονάδα πάλλεται εκτός του επιπέδου ισορροπίας.

Δονήσεις συστροφής (twisting vibrations) : Συμβαίνουν όταν η ίδια δομική μονάδα περιστρέφεται γύρω από τον δεσμό που τη συνδέει με το υπόλοιπο τμήμα του μορίου.

Δονήσεις ψαλιδιού ή παραμόρφωσης (scissoring or deformation vibrations) : Παράγονται όταν δύο μη συνδεόμενα άτομα κινούνται μπρος-πίσω και προς τη μεταξύ τους διεύθυνση.



Εικόνα 16. Είδη δονήσεων.

Βασικότεροι παράμετροι μιας ζώνης απορρόφησης στο υπέρυθρο :

- 1) Θέση της ζώνης : Αναφέρεται σαν ο κυματάρθμος της μέγιστης απορρόφησης (σε cm^{-1}).
- 2) Πλάτος ημιζώνης (Bandwidth) : Το φαινόμενο πλάτος ημιζώνης, $\Delta\tilde{\nu}_{1/2}$, αναφέρεται σαν το πλάτος σε cm^{-1} στο ήμισυ του ύψους της ταινίας απορρόφησης.
- 3) Ένταση : Η φαινόμενη μοριακή απορροφητικότητα που μετρίεται στο μέγιστο της κορυφής, και δίνεται από τον νόμο του Beer, $A = \epsilon bc$
- 4) Ολοκληρωμένη ένταση : Είναι η μέτρηση του εμβαδού της κορυφής και δίνεται από τον τύπο :

$$B = \int_{\tilde{\nu}_1}^{\tilde{\nu}_2} \epsilon \cdot d\tilde{\nu} \text{ σε } \text{l/mol.cm}^2$$

Οι μοριακές ταλαντώσεις ορισμένων ομάδων είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστικές. Αυτός είναι και ο λόγος που η φασματοσκοπία υπέρυθρου είναι κατάλληλη για τον χαρακτηρισμό ορισμένων ομάδων σε ένα μόριο (π.χ. υδροξύλια, καρβοξύλια, αμινομάδες, αμίδια, διπλοί και τριπλοί δεσμοί κ.α).

2.4 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier

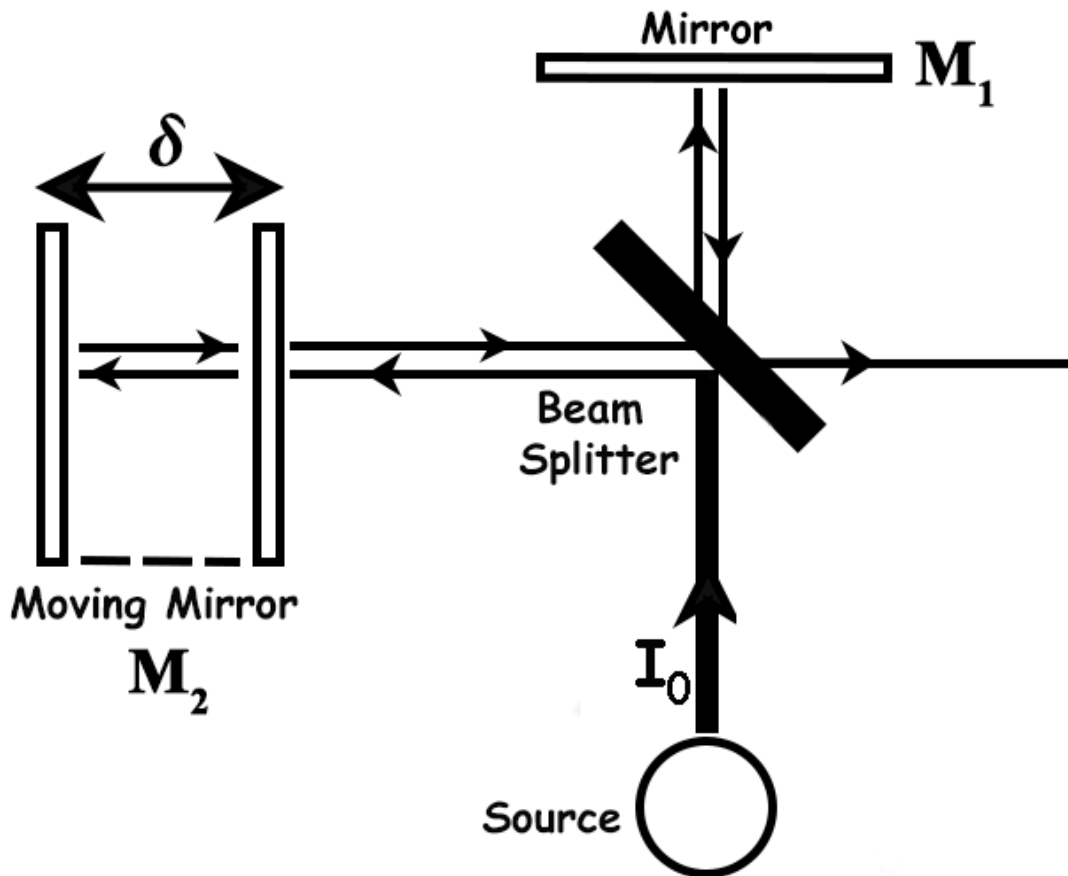
Το υπέρυθρο είναι το τμήμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που εκτείνεται πέρα από το ορατό και φτάνει μέχρι την περιοχή των μικροκυμάτων. Διακρίνεται σε τρεις περιοχές, το Εγγύς υπέρυθρο, NIR ($14000\text{-}4000\text{cm}^{-1}$), το Κυρίως υπέρυθρο, Mid-IR ($4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$) και το Άπω υπέρυθρο, Far-IR ($400\text{-}20\text{cm}^{-1}$). Στην περιοχή όμως αυτή η ευαισθησία του φασματοφωτόμετρου IR είναι περιορισμένη και οι εντάσεις των απορροφήσεων πολύ μικρές, με αποτέλεσμα να σκεπάζονται από το θόρυβο. Η αδυναμία των κοινών φασματοφωτόμετρων IR (και άλλων μεθόδων φασματοσκοπίας) υπερνικήθηκε με τη φασματοσκοπία IR με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform IR Spectroscopy, FTIR).

Η ανάλυση κατά Fourier ή μετασχηματισμός Fourier είναι η ανάλυση μιας μαθηματικής συνάρτησης ή μιας πειραματικά λαμβανομένης καμπύλης με τη μορφή μιας τριγωνομετρικής σειράς. Η μέθοδος βασίζεται στην καταγραφή του φάσματος με συμβολομετρικές μετρήσεις (interferometric measurements) που υπερτερούν των κοινών μηχανισμών σάρωσης του φάσματος. Είναι μέθοδος μη καταστρεπτική, παρουσιάζει αρκετά μεγάλη αξιοπιστία και ταχύτητα λήψης του φάσματος (όλες οι μετρήσεις απαιτούν λίγα δευτερόλεπτα), υψηλή ευαισθησία μέτρησης και χαρακτηρίζεται από μηχανική απλότητα, αφού το κινούμενο μέρος της διάταξης είναι ο κινούμενος καθρέφτης του συμβολόμετρου.

Επομένως, η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared spectroscopy) είναι μια μέθοδος λήψης υπέρυθρου φάσματος με πρωταρχικό σκοπό να συλλέξει ένα συμβολογράφημα (interferogram) ενός συγκεκριμένου δείγματος χρησιμοποιώντας ένα συμβολόμετρο (interferometer), και εκτελώντας έπειτα ένα μετασχηματισμό Fourier (FT) στο συμβολογράφημα για την λήψη όλου του φάσματος. Ένα FT-IR φασματόμετρο συλλέγει και ψηφιοποιεί το συμβολογράφημα, εκτελεί το μετασχηματισμό Fourier και δίνει το φάσμα, δηλαδή το διάγραμμα της εκατοστιαίας διαπερατότητας του δείγματος (%T) συναρτήσει του μήκους κύματος (λ) ή του κυματάριθμου ($1/\lambda$).

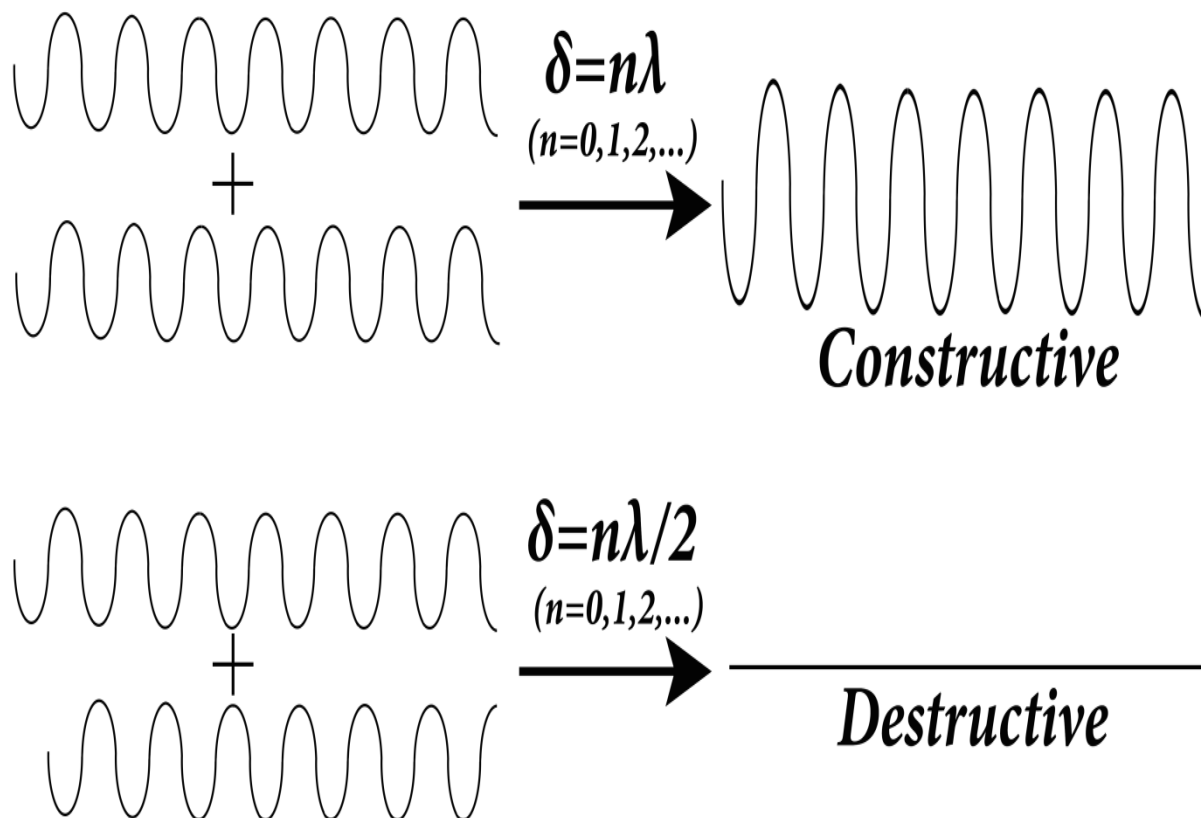
2.4.1 Διάταξη φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) – Συμβολόμετρο Michelson

Το βασικό μέρος της διάταξης φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) είναι ένα συμβολόμετρο Michelson. Όλα τα φασματοφωτόμετρα μετασχηματισμού Fourier χρησιμοποιούν ένα συμβολόμετρο τύπου Michelson. Η υπέρυθρη ακτινοβολία, που εκπέμπεται από την πηγή, φθάνει στο διαχωριστή δέσμης (beam splitter) όπου είναι φτιαγμένος από ημιδιαφανές υλικό, συνήθως KBr και το 50% της ακτινοβολίας ανακλάται και το υπόλοιπο 50% περνά από το διαχωριστή. Ο διαχωριστής είναι τοποθετημένος σε γωνία 45° , ως προς την προσπίπτουσα δέσμη, ώστε να είναι μέγιστες οι εντάσεις τόσο του μέρους της δέσμης που ανακλάται, όσο και εκείνου που διαπερνά. Η ακτινοβολία που παράγεται από την υπέρυθρη πηγή προσπίπτει στον διαχωριστή δέσμης, ο οποίος διαιρεί την ακτινοβολία σε δύο ίσα μέρη αποστέλλοντας το ένα τμήμα στο κάτοπτρο M_1 και το άλλο μισό στο M_2 . Η ανακλώμενη ακτινοβολία προσπίπτει πάνω στο σταθερό καθρέπτη, ο οποίος βρίσκεται σε απόσταση L από το διαχωριστή. Η δέσμη ανακλάται και επιστρέφει στο διαχωριστή. Το δεύτερο κλάσμα της IR ακτινοβολίας που διαπερνά τον διαχωριστή, αφού διανύσει απόσταση $(L+d)$, ανακλάται από τον κινούμενο καθρέπτη και επανέρχεται στον διαχωριστή. Έτσι, η διαφορά των δύο οπτικών διαδρομών είναι $\delta=2d$. Οι δύο ανακλώμενες δέσμες, όταν επιστρέψουν στο διαχωριστή, συμβάλλουν έχοντας διανύσει διαφορετικό οπτικό δρόμο. Με την διαδικασία αυτή, δημιουργούνται οι κροσσοί συμβολής μέσω των οποίων γίνεται η κατάλληλη επιλογή των μηκών κύματος.



Εικόνα 17. Διαγραμματική απεικόνιση συμβολόμετρου Michelson.

Η υπέρυθη ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή και συνενώνεται στον διαχωριστή δέσμης, υπόκειται σε ενισχυτική ή καταστροφική συμβολή ανάλογα με τις αποστάσεις του διαχωριστή δέσμης από τα κάτοπτρα M_1 και M_2 . Εάν οι αποστάσεις αυτές είναι ίσες ή διαφέρουν κατά ένα ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της μονοχρωματικής δέσμης, τότε δημιουργείται ενισχυτική συμβολή με αποτέλεσμα να τετραπλασιάζεται η ένταση. Εάν, όμως οι αποστάσεις του διαχωριστή δέσμης από τα M_1 και M_2 δεν είναι ακέραια πολλαπλάσια του μήκους κύματος, τότε οι δέσμες φωτός ανακλώνται στα κάτοπτρα και επανέρχονται στον διαχωριστή δέσμης, όπου και αλληλοεξουδετερώνονται. Έτσι δημιουργούνται οι ενισχυτικοί ή καταστροφικοί κροσσοί συμβολής που αποτελούν το συμβολογράφημα (interferogram) όπως φαίνεται και στην πιο κάτω εικόνα.



Εικόνα 18. Δημιουργία ενισχυτικών και καταστροφικών κροσσών συμβολής ως αποτέλεσμα της απόστασης του διαχωριστή δέσμης από τα κάτοπτρα του συμβολόμετρου Michelson.

2.4.2 Το συμβολογράφημα – Μετασχηματισμοί Fourier

Το συμβολογράφημα που λαμβάνεται από ένα φασματόμετρο υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) παρέχει πληροφορίες για κάθε υπέρυθη συχνότητα που προέρχεται από την πηγή. Το μετρούμενο σήμα, επειδή δεν μπορεί να ερμηνευτεί απευθείας, ολοκληρώνεται μέσω του μετασχηματισμού Fourier. Αυτός ο μετασχηματισμός εκτελείται από υπολογιστή που παρουσιάζει τις τελικές επιθυμητές φασματικές πληροφορίες για ανάλυση. Πιο συγκεκριμένα ένα συμβολογράφημα λαμβάνεται ως εξής: αρχικά η υπέρυθη ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή, προσπίπτει πάνω στο δείγμα. Στη συνέχεια η ακτίνα εισάγεται στο συμβολόμετρο όπου πραγματοποιείται η κωδικοποίηση του φάσματος και έτσι προκύπτει το συμβολογράφημα. Ανάλογα με το δείγμα ένα μέρος της ακτίνας διαπερνά το δείγμα, ένα άλλο μέρος ανακλάται από την εξωτερική του επιφάνεια και ένα τρίτο απορροφάται από αυτό. Τελικά η ακτίνα που διαπερνά το δείγμα, περνά στον

ανιχνευτή. Το συμβολογράφημα λαμβάνεται μετρώντας την ένταση στον ανιχνευτή ως συνάρτηση της διαφοράς πορείας (δ).

Ανάλογα με την διαφορά διαδρομής οι δύο δέσμες συνεισφέρουν δημιουργικά ή καταστροφικά. Η ένταση που φτάνει στον ανιχνευτή, ως συνάρτηση της διαφοράς διαδρομής δ και του μήκους κύματος της πηγής λ , δίνεται από την σχέση:

$$I'(\delta) = 0.5 I(\lambda) \left[1 + \cos \left(\frac{2\pi\delta}{\lambda} \right) \right] \quad (2.1)$$

Η πιο πάνω εξίσωση αποτελείται από δυο όρους, ένα σταθερό και ένα μεταβαλλόμενο. Ο σταθερός όρος εκφράζει το DC σήμα και είναι ο $0.5I(\lambda)$ και ο μεταβαλλόμενος όρος εκφράζει το AC σήμα, το οποίο είναι υπεύθυνο για να καταγράφει όλες τις μεταβολές που συμβαίνουν στο δείγμα κατά τη διάρκεια της μέτρησης. Ο μεταβαλλόμενος όρος είναι αυτός που δίνει το συμβολογράφημα και είναι ο εξής:

$$I(\delta) = 0.5 I(\lambda) \cos \left(\frac{2\pi\delta}{\lambda} \right) \quad (2.2)$$

Αρκετοί είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος του σήματος που φτάνει στον ανιχνευτή, οπότε η πιο πάνω εξίσωση τροποποιείται στη μορφή:

$$I(\delta) = B(\lambda) \cos \left(\frac{2\pi\delta}{\lambda} \right) \quad (2.3)$$

όπου $B(\lambda)$ μια παράμετρος που δίνει την ένταση της πηγής όπως αυτή μεταβάλλεται από τα διάφορα χαρακτηριστικά των οργάνων. Η ένταση $I(\delta)$ είναι ο συνημιτονοειδής μετασχηματισμός Fourier του όρου $B(\lambda)$.

Εάν ο κινητός καθρέπτης κινείται με σταθερή ταχύτητα τότε η ένταση αποκτάται σαν συνάρτηση του χρόνου και όχι της διαφοράς διαδρομής και η εξίσωση 2.3 λαμβάνει τη μορφή:

$$I(t) = B(\lambda) \cos \left[\left(\frac{2\pi}{\lambda} \right) \cdot (2vt) \right] \quad (2.4)$$

Όταν η πηγή είναι πολυχρωματική και δεν αποτελείται από ένα μήκος κύματος, τότε το συμβολογράφημα μπορεί να αναπαρασταθεί με το ολοκλήρωμα:

$$I(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} B(\lambda) \cos \left(\frac{2\pi\delta}{\lambda} \right) d\lambda \quad (2.5)$$

το οποίο αποτελείται από 2 όρους, από τον συνημιτονοειδή μετασχηματισμό Fourier και ο άλλος όρος είναι ο

$$B(\lambda) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) \cos\left(\frac{2\pi\delta}{\lambda}\right) d\delta \quad (2.6)$$

Όταν η πηγή είναι συνεχής, το συμβολογράφημα μπορεί να εκφραστεί με το ολοκλήρωμα :

$$S(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} B(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\tilde{\nu}\delta) d\tilde{\nu} \quad (2.7)$$

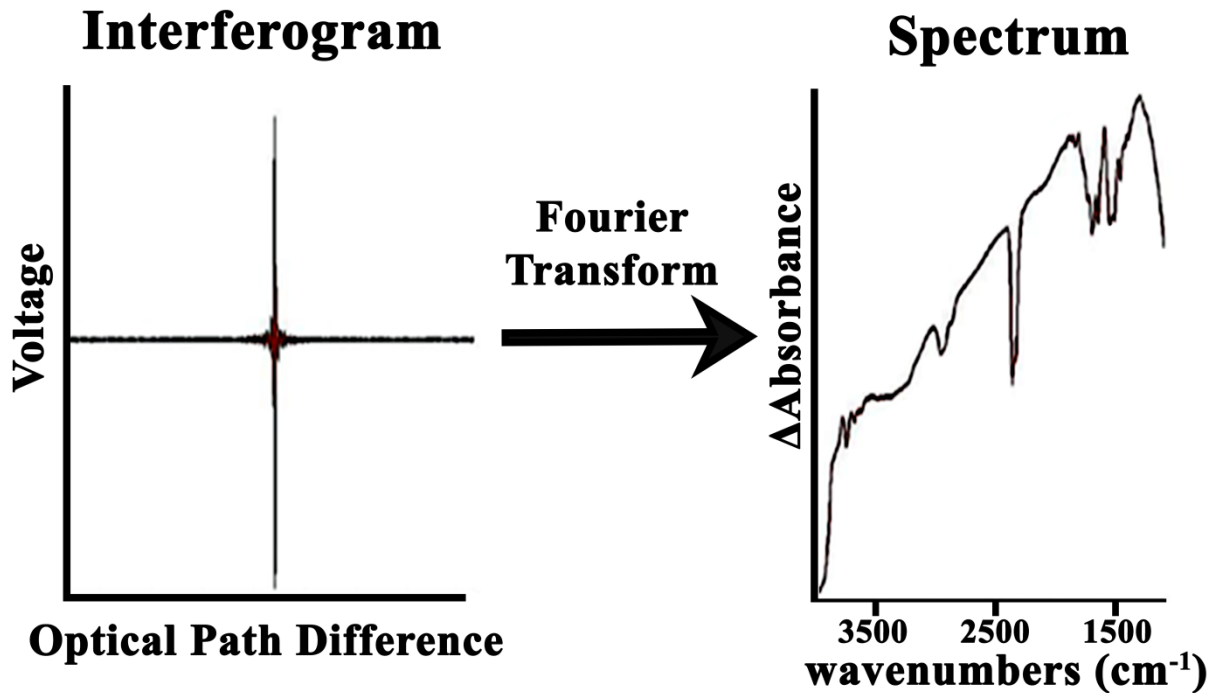
του οποίου το ήμισυ του είναι ένας συνημιτονοειδής μετασχηματισμός Fourier ενώ το άλλο είναι το ολοκλήρωμα :

$$B(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} S(\delta) \cos(2\pi\tilde{\nu}\delta) d\delta \quad (2.8)$$

που μπορεί να εκφραστεί και ως :

$$B(\tilde{\nu}) = 2 \int_0^{+\infty} S(\delta) \cos(2\pi\tilde{\nu}\delta) d\delta \quad (2.9)$$

Η εξίσωση 2.9 δείχνει ότι στη θεωρία μπορεί να μετρηθεί ολόκληρο το φάσμα από 0 μέχρι $+\infty$ (σε cm^{-1}) σε απείρως υψηλή ανάλυση. Ωστόσο η εξίσωση 2.9 δείχνει ότι για να επιτευχθεί αυτό πρέπει ο κινούμενος καθρέπτης του συμβολόμετρου να σκανάρει σε απείρως μεγάλη απόσταση με τις τιμές του δ να κυμαίνονται ανάμεσα στο 0 και στο $+\infty$. Το αποτέλεσμα της μέτρησης του σήματος με περιορισμένη καθυστέρηση δ , είναι ότι προκαλεί στο φάσμα περιορισμένη ανάλυση. Το συνολικό σήμα που είναι το τελικό συμβολογράφημα που εξέρχεται από το συμβολόμετρο, στέλνεται στον H/Y όπου και πραγματοποιείται ο μετασχηματισμός Fourier και προκύπτει το συνολικό υπέρυθρο φάσμα.



Εικόνα 19. Μετασχηματισμός Fourier του συμβολογραφήματος σε φάσμα.

2.4.3 Συναρτήσεις αποδισμού (Apodization functions) – Φαινόμενα φάσεων

Δυο κύματα βρίσκονται σε φάση για πρώτη φορά μετά το σημείο μηδενικής καθυστέρησης ($\delta=0$), όταν $\delta=(\Delta\tilde{\nu})^{-1}$. Επομένως αν η μέγιστη καθυστέρηση για ένα συμβολόμετρο είναι Δ_{max} , η καλύτερη ανάλυση που μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας αυτό το συμβολόμετρο ($\Delta\tilde{\nu}$), εκφράζεται από τη σχέση:

$$(\Delta\tilde{\nu}) = (\Delta_{max})^{-1} \quad (2.10)$$

Περιορίζοντας τη μέγιστη καθυστέρηση του συμβολόμετρου σε Δ εκατοστόμετρα, πολλαπλασιάζεται αποτελεσματικά το ολοκληρωμένο συμβολογράφημα (μεταξύ $\delta=+\infty$ και $\delta=-\infty$) επί μια συνάρτηση αποκοπής, $D(\delta)$, η οποία είναι συνεχής μεταξύ $\delta=-\Delta$ και $\delta=+\Delta$ και μηδενική στα υπόλοιπα σημεία.

$$D(\delta) = \begin{cases} 1 & \text{if } -\Delta \leq \delta \leq +\Delta \\ 0 & \text{if } \Delta > |\delta| \end{cases} \quad (2.11)$$

Αυτή η συνάρτηση συχνά ονομάζεται *Boxcar truncation function* λόγω του σχήματος της. Σε αυτή την περίπτωση το φάσμα δίνεται από την εξίσωση:

$$B(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} S(\delta)D(\delta) \cos(2\pi\tilde{\nu}\delta)d\delta \quad (2.12)$$

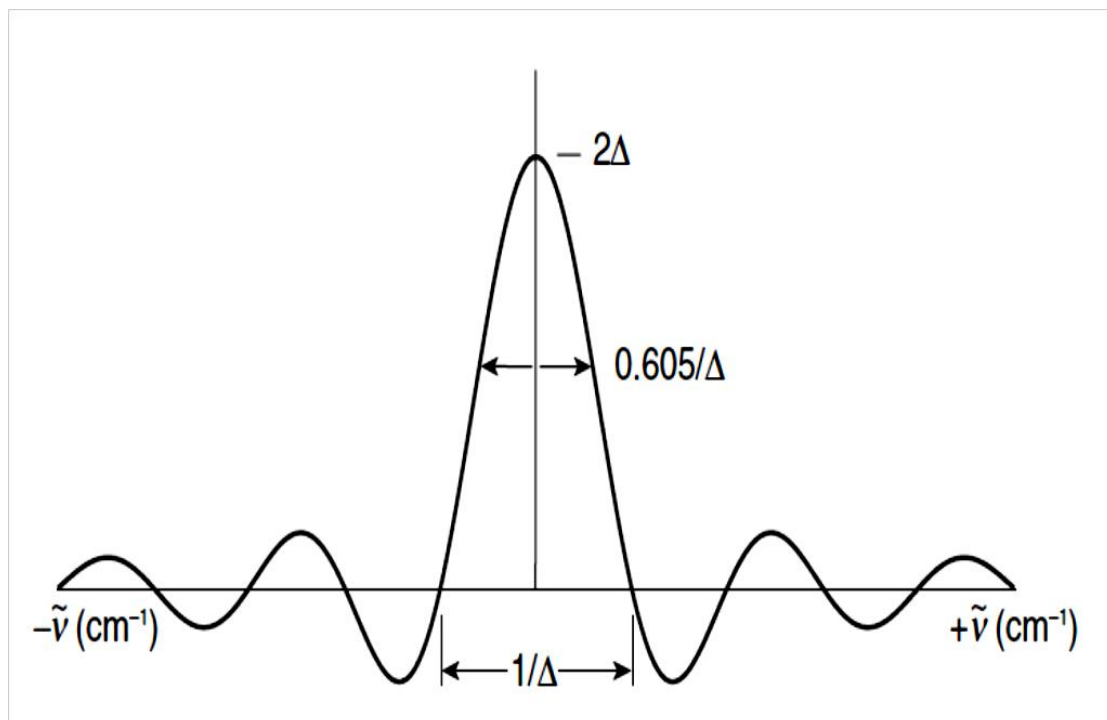
Φαίνεται ότι ο μετασχηματισμός Fourier (FT) του προϊόντος των δυο συναρτήσεων είναι η σύζευξη του μετασχηματισμού Fourier (FT) της κάθε συνάρτησης. Το αποτέλεσμα πολλαπλασιασμού του $S(\delta)$ επί την συνάρτηση Boxcar $D(\delta)$ αποδίδει ένα φάσμα με τον μετασχηματισμό Fourier που είναι η σύζευξη του μετασχηματισμού Fourier του $S(\delta)$ που μετρήθηκε με μια πολύ μεγάλη καθυστέρηση και τον μετασχηματισμό Fourier του $D(\delta)$. Ο FT του $S(\delta)$ είναι το πραγματικό φάσμα, $B(\tilde{\nu})$, όταν ο FT του $D(\delta)$, $f(\tilde{\nu})$ δίνεται από την εξίσωση:

$$f(\tilde{\nu}) = 2\Delta \frac{\sin(2\pi\tilde{\nu}\Delta)}{2\pi\tilde{\nu}\Delta} \equiv 2\Delta \operatorname{sinc}(2\pi\tilde{\nu}\Delta) \quad (2.13)$$

Η συνάρτηση αυτή παρουσιάζεται στο σχήμα 16. Το κέντρο της είναι στο $\tilde{\nu}=0$ και τέμνει τον άξονα του $\tilde{\nu}$ στο $\tilde{\nu} = \frac{n}{2\Delta}$, όπου $n=1,2,3,\dots$, έτσι η πρώτη τομή συμβαίνει στον κυματάρημο $(2\Delta)^{-1}$. Μαθηματικά η σύζευξη του $B(\tilde{\nu})$ και $f(\tilde{\nu})$ περιγράφεται ως εξής :

$$G(\tilde{\nu}) = B(\tilde{\nu}) * f(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} B(\tilde{\nu}')f(\tilde{\nu} - \tilde{\nu}')d\tilde{\nu}' \quad (2.14)$$

Η συνάρτηση $f(\tilde{\nu})$ ονομάζεται συνάρτηση ILS (Instrument Line Shape function).

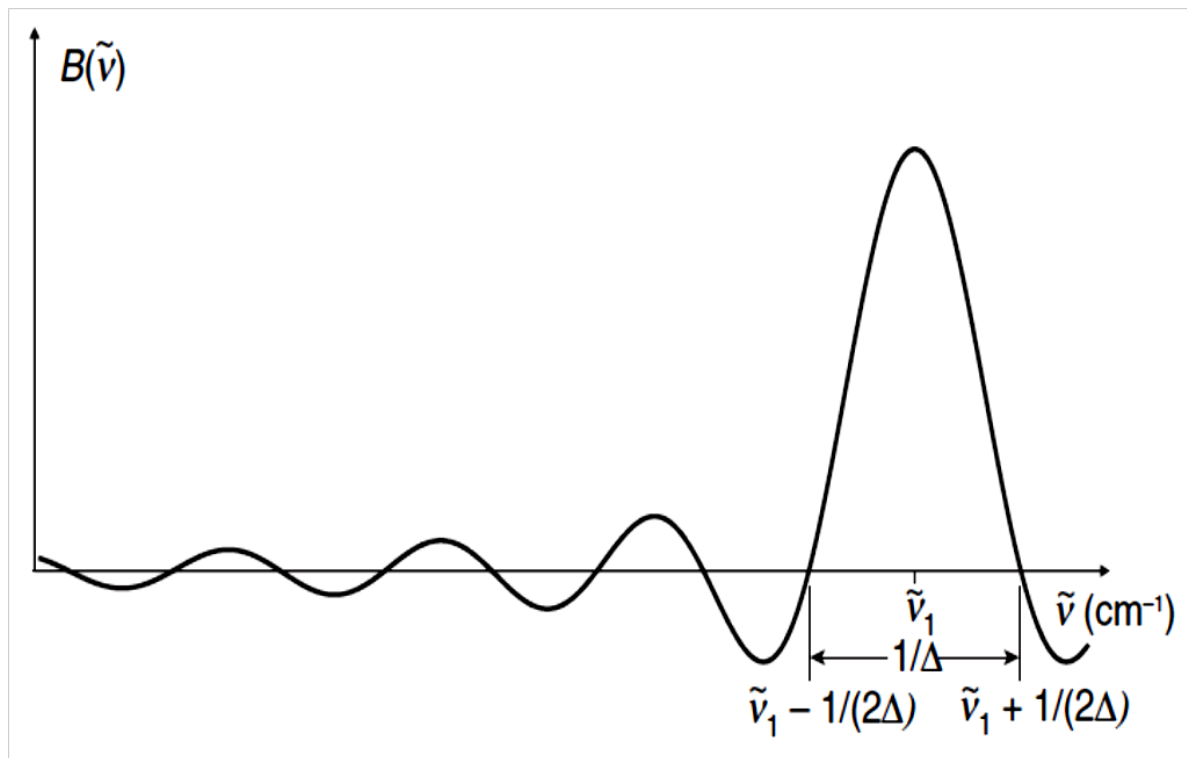


Εικόνα 20. Ο μετασχηματισμός Fourier μιας συνάρτησης Boxcar μονάδας πλάτους που εκτείνεται από το $-\Delta$ στο $+\Delta$. Αυτή η συνάρτηση έχει τη μορφή της ημιτονοειδούς συνάρτησης $\sin x/x$.

Όταν η ημιτονοειδής συνάρτηση συζεύετε με μια φασματική γραμμή ενός κυματάριθμου $\tilde{\nu}_1$, η καμπύλη που προκύπτει δίνεται από την εξίσωση :

$$B(\tilde{\nu}) = 2\Delta B(\tilde{\nu}_1) \sin c2\pi(\tilde{\nu}_1 - \tilde{\nu})\Delta \quad (2.15)$$

Η καμπύλη παρουσιάζεται στο σχήμα 17 και αναπαριστά την εμφάνιση μιας απότομης γραμμής μετρημένης συμβολομετρικά σε μια ανάλυση σχετικά φαρδύτερη από το half-width της γραμμής.



Εικόνα 21. Μετασχηματισμός Fourier ενός αστάθμιστου ημιτονοειδούς συμβολογραφήματος δημιουργημένου από μια μονοχρωματική γραμμή σε κυματάριθμο $\tilde{\nu}_1$. Η μέγιστη καθυστέρηση αυτού του συμβολογραφήματος είναι Δ εκατοστόμετρα.

Εφόσον η καμπύλη τέμνει τον άξονα των κυματάριθμων στο $(2\Delta)^{-1} \text{ cm}^{-1}$ και στις 2 πλευρές του $\tilde{\nu}_1$, φαίνεται ότι οι 2 γραμμές χωρίζονται με το διπλάσιο αυτό ποσό, δηλ. 2 φορές το Δ^{-1}

cm^{-1} . Όταν οι 2 αυτές γραμμές που χωρίζονται με Δ^{-1} είναι εντελώς αναλυμένες, η πρακτική ανάλυση είναι καλύτερη από αυτή την τιμή.

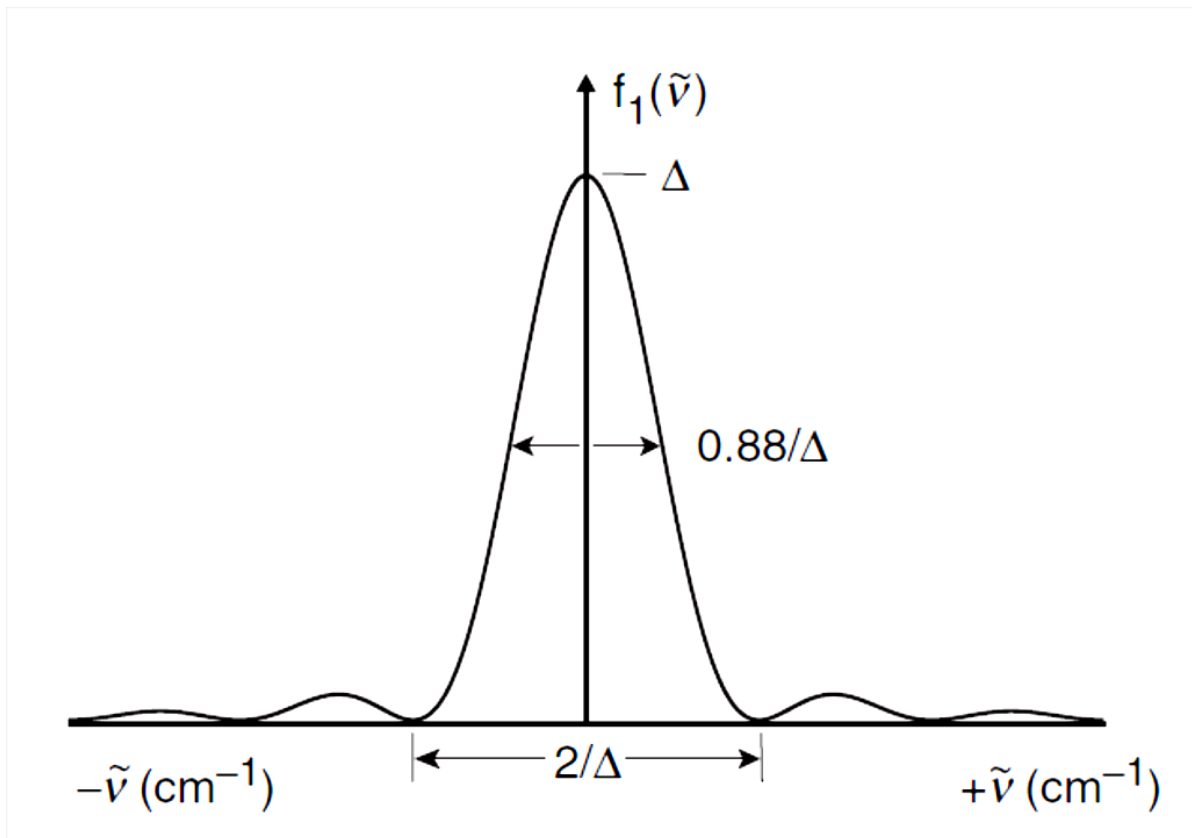
Αν αντί της συνάρτησης Boxcar χρησιμοποιηθεί μια απλή τριγωνική συνάρτηση της μορφής :

$$A_1(\delta) = \begin{cases} 1 - \frac{|\delta|}{\Delta} & \text{for } -\Delta \leq \delta \leq \Delta \\ 0 & \text{for } \delta > |\Delta| \end{cases} \quad (2.16)$$

Το πραγματικό φάσμα θα συζευχθεί με τον μετασχηματισμό Fourier του $A_1(\delta)$ και αυτή η συνάρτηση θα ερμηνεύσει το ILS. Ο μετασχηματισμός Fourier του $A_1(\delta)$ έχει τη μορφή :

$$f_1(\tilde{\nu}) = \Delta \frac{\sin^2 \pi \tilde{\nu} \Delta}{(\pi \tilde{\nu} \Delta)^2} = \text{sinc}^2 \pi \tilde{\nu} \Delta \quad (2.17)$$

Αυτή η συνάρτηση απεικονίζεται στο σχήμα 18. Συναρτήσεις σαν την $A_1(\delta)$ που ζυγίζουν το συμβολογράφημα ονομάζονται αποδισμικές συναρτήσεις (apodization functions).



Εικόνα 22. Η συνάρτηση sinc^2 σχήματος γραμμής του οργάνου, υπολογισμένη για τριγωνικά αποδισμικά συμβολογραφήματα.

Η συνάρτηση $A_1(\delta)$, ονομαζόμενη και ως τριγωνική αποδισμική συνάρτηση (triangular apodization function), είναι μια κοινώς διαδεδομένη αποδισμική συνάρτηση που χρησιμοποιείται στην φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier. Εξαιτίας των μικρών διαφορών στην ανάλυση του συμβολογραφήματος που τυγχάνει αποδισμό, η συγκεκριμένη συνάρτηση αποδισμού και το κριτήριο ανάλυσης που εφαρμόζεται, το $1/\Delta$, ονομάζεται η νενομισμένη ανάλυση.

Υπάρχουν αρκετές συναρτήσεις αποδισμού. Μερικές από αυτές είναι η Norton-Beer που συναντάται με τρεις μορφές, strong, medium και weak και έχει τη γενική μορφή :

$$A(\delta) = \sum_{i=0}^n C_i \left[1 - \left(\frac{\delta}{\Delta} \right)^2 \right]^i \quad (2.18)$$

$$\text{Happ - Genzel: } A(\delta) = 0.54 + 0.46 \cos \pi \frac{\delta}{\Delta} \quad (2.19)$$

Blackman – Harris:

$$A(\delta) = 0.35875 - 0.48829 \cos \left(2\pi \frac{\delta}{\Delta} \right) + 0.14128 \cos \left(4\pi \frac{\delta}{\Delta} \right) - 0.01168 \cos \left(6\pi \frac{\delta}{\Delta} \right) \quad (2.20)$$

Η συνάρτηση Happ-Genzel είναι παρόμοια με την Norton-Beer strong. Γενικά συνιστάται η χρησιμοποίηση της συνάρτησης αποδισμού για την φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier, όταν το φάσμα περιέχει κορυφές που είναι στενότερες από νενομισμένη ανάλυση. Όταν τα εύρη ζωνών (bandwidths) των φασματοσκοπικών γραμμών είναι φαρδύτερα από την φασματοσκοπική ανάλυση, ο αποδισμός χρησιμεύει ως συνάρτηση εξομάλυνσης, αλλιώς υποβαθμίζει την ποιότητα του φάσματος επειδή υπάρχει απώλεια στην ανάλυση. Η συνάρτηση που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για μια εφαρμογή, εξαρτάται από τη φύση του πειράματος. Αν χρειάζεται ποσοτική ακρίβεια, τότε συστήνονται οι συναρτήσεις αποδισμού Norton-Beer medium ή η συνάρτηση αποδισμού Happ-Genzel. Αυτή που υπακούει πιστά τον νόμο του Beer και δεν έχει αποκλίσεις είναι η συνάρτηση αποδισμού Norton-Beer medium.

Μέχρι τώρα επικρατούσε η υπόθεση ότι οι εξισώσεις 2.7 και 2.9 έδιναν μια ακριβή αναπαράσταση του συμβολογραφήματος. Στην πράξη προστίθεται ένας ακόμη όρος, ο όρος της γωνίας φάσης (phase angle), $2\pi\tilde{\nu}\delta$, για να περιγράψει το ακριβές συμβολογράφημα που

έχει μετρηθεί πειραματικά. Διορθώσεις στη γωνία φάσης μπορούν να προκύψουν από οπτικά, ηλεκτρονικά ή δειγματοληπτικά αποτελέσματα. Δύο κοινά παραδείγματα που μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγές στον συνημιτονοειδή όρο αυτών των εξισώσεων είναι :

- 1) Αν υποθεθεί ότι το συμβολογράφημα της 2.7 είναι συμμετρικό περίπου $\delta=0$ αλλά το πρώτο σημείο δεδομένων είναι πραγματικά μετρημένο πριν το σημείο μηδενικής καθυστέρησης στο $\delta=-\varepsilon$, τότε το συμβολογράφημα παίρνει τη μορφή :

$$S(\delta) = \int_0^{+\infty} B(\tilde{\nu}) \cos 2\pi\tilde{\nu}(\delta - \varepsilon) d\tilde{\nu} \quad (2.21)$$

- 2) Ηλεκτρονικά φίλτρα σχεδιασμένα να απομακρύνουν το θόρυβο υψηλής συχνότητας από το συμβολογράφημα μπορούν να προσθέσουν μια καθυστέρηση φάσης, $\theta_{\tilde{\nu}}$, που είναι εξαρτώμενη από τους κυματαριθμούς σε κάθε συνημιτονοειδή στοιχείο του συμβολογραφήματος και το σήμα που προκύπτει δίνεται από την εξίσωση :

$$S(\delta) = \int_0^{+\infty} B(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\tilde{\nu}\delta - \theta_{\tilde{\nu}}) d\tilde{\nu} \quad (2.22)$$

Εφόσον κάθε συνημιτονοειδής κύμα $\cos(\alpha - \beta)$ μπορεί να γραφτεί και ως $\cos(\alpha - \beta) = \cos \alpha \cos \beta + \sin \alpha \sin \beta$, η προσθήκη ενός δεύτερου όρου στη γωνία φάσης, $2\pi\tilde{\nu}\delta$, έχει το αποτέλεσμα να προσθέτει ημιτόνια στοιχεία του συνημιτονοειδή κύματος του συμβολογραφήματος. Δύο ιδιότητες του ημιτόνου και συνημίτονου είναι σημαντικές σε αυτό το σημείο:

- i) Τα $\cos \varphi$ και $\sin \varphi$ είναι ορθογώνια.
- ii) $\cos \varphi - i \sin \varphi = \exp(i\varphi)$

όπου i είναι ο φανταστικός αριθμός $\sqrt{-1}$. Βάση αυτής της σχέσης, η εξίσωση 2.22 μπορεί να γραφτεί ως:

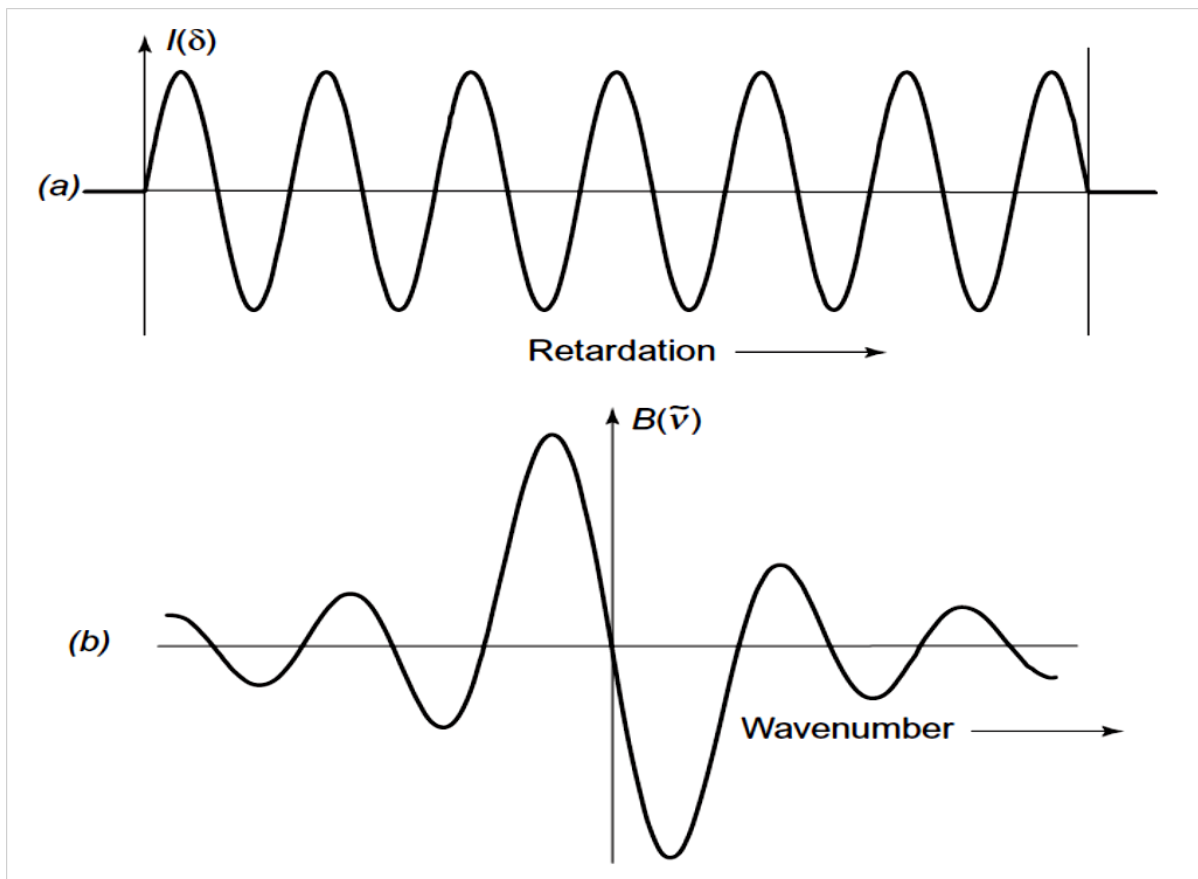
$$S(\delta) = \int_0^{+\infty} B(\tilde{\nu}) \exp(-2\pi i\tilde{\nu}\delta) d\tilde{\nu} \quad (2.23)$$

Το $S(\delta)$ και $B(\tilde{\nu})$ είναι συνδεδεμένα μέσω του σύνθετου μετασχηματισμού Fourier. Για να επανακτηθεί το $B(\tilde{\nu})$ από το $S(\delta)$, πρέπει να εφαρμοστεί ο αντίστροφος μετασχηματισμός:

$$B(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} S(\delta) \exp(2\pi i\tilde{\nu}\delta) d\delta \quad (2.24)$$

Οι βασικές ιδιότητες του i είναι: $i^2 = -1$ και $i^{-1} = -i$. Αυτές οι ιδιότητες επιτρέπουν τη συμμετρία της ημιτονοειδής και συνημιτονοειδής συνάρτησης καθώς και τη διατήρηση της ορθογωνιότητας τους. Αυτή η σύμπτυξη βοηθά επίσης στην εξήγηση γιατί το στοιχείο του φάσματος που υπολογίστηκε με χρήση του συνημιτονοειδή μετασχηματισμού Fourier συχνά καλείται *Πραγματικό Μέρος* του φάσματος, $\text{Re}(\tilde{\nu})$, και το στοιχείο που υπολογίστηκε με χρήση του ημιτονοειδές μετασχηματισμού Fourier καλείται *Φανταστικό Μέρος*, $\text{Im}(\tilde{\nu})$.

Ο συνημιτονοειδής μετασχηματισμός Fourier ενός αποκομμένου ημιτονοειδούς κύματος φαίνεται στην εικόνα 20. Γενικότερα στο σχήμα του ILS είναι ενδιάμεσο μεταξύ αυτής της συνάρτησης και της ημιτονοειδούς συνάρτησης που προκύπτει από τον συνημιτονοειδή μετασχηματισμό ενός αποκομμένου συνημιτονοειδούς κύματος. Η διαδικασία της αφαίρεσης αυτών των ημιτονοειδών στοιχείων από το συμβολογράφημα ή της αφαίρεσης των επιπτώσεών τους από το φάσμα ονομάζεται *διόρθωση φάσης (phase correction)*.



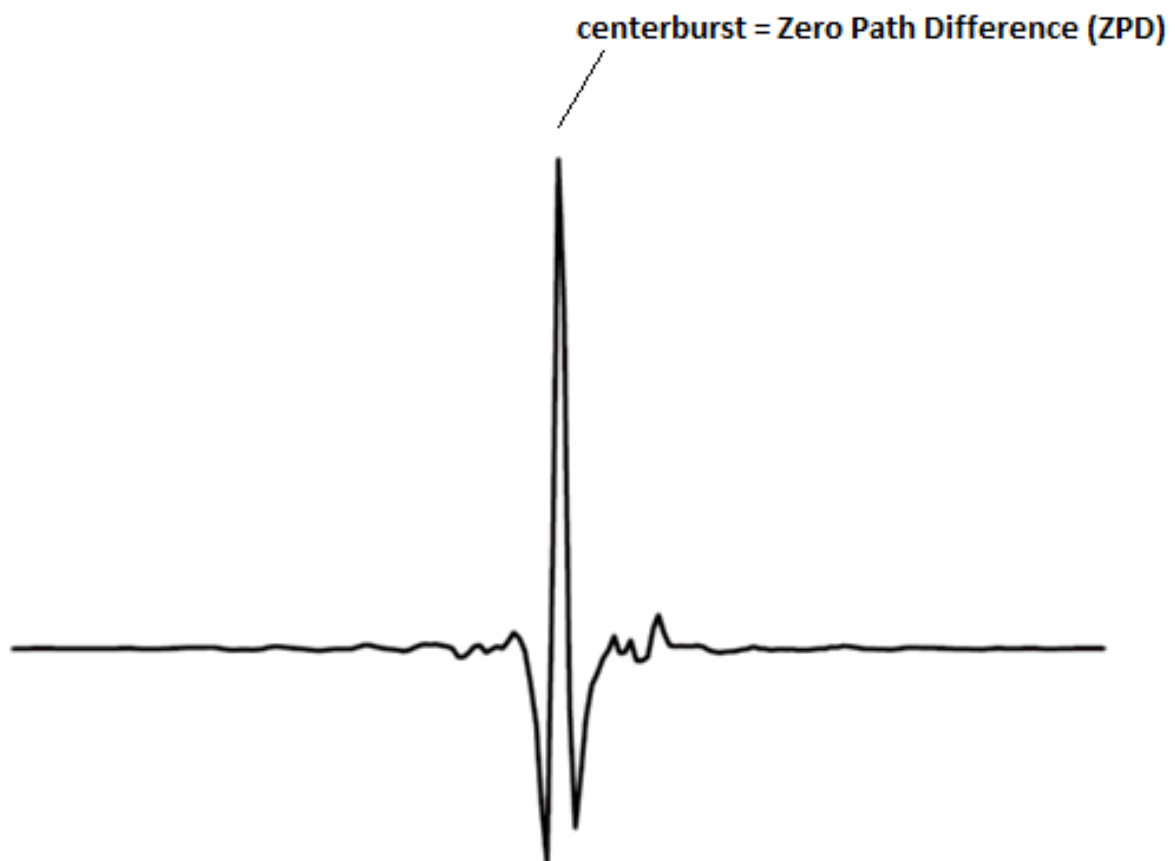
Εικόνα 23. α) Συμβολογράφημα μορφής ημιτονοειδούς κύματος. β) Αποτέλεσμα που προκύπτει εφαρμόζοντας συνημιτονοειδή μετασχηματισμό Fourier σε αυτό το συμβολογράφημα.

Αν το φάσμα φάσης ήταν απλό, τότε ένα λάθος δειγματοληψίας στην περισυλλογή του συμβολογραφήματος, το φάσμα φάσης θα ήταν γραμμικό, αλλά γενικά στο φάσμα φάσης περιέχονται όροι ανώτερης δύναμης, π.χ:

$$\theta_{\tilde{\nu}} = A + B\tilde{\nu} + C\tilde{\nu}^2 + \dots$$

Σε αυτή την περίπτωση δεν υπάρχει όπου όλα τα μήκη κύματος είναι ακριβώς σε φάση και το συμβολογράφημα λέγεται ότι είναι τερετισμένο (chirped), παράδειγμα αυτής της περίπτωσης απεικονίζεται στο σχήμα 21. Στα περισσότερα συμβολογραφήματα το ποσοστό του τερετισμού είναι μικρό, αλλά σε μερικές ασυνήθιστες περιπτώσεις, το θ_v μπορεί να διαφέρει κατά πολύ.

Αν η γωνία φάσης, θ_v , σε ένα συμβολογράφημα μετριέται με μια συνεχής ευρυζωνική πηγή διαφέρει ανά κυματάριθμο, τότε το φάσμα φάσης μπορεί να υπολογιστεί από μια περιοχή του συμβολογραφήματος που μετριέται συμμετρικά στην άλλη πλευρά του σημείου μηδενικής καθυστέρησης ή centerburst.



Εικόνα 24. Τυπικό συμβολογράφημα μιας μελανής πηγής στην περιοχή του σημείου μηδενικής καθυστέρησης (centerburst) μετρημένης με ένα ταχείας σάρωσης (rapid-scanning) συμβολόμετρο. Η ελαφρά ασυμμετρία που υπάρχει υποδεικνύει ένα μικρό ποσοστό τερετισμού.

Συμβολογραφήματα μετρημένα με ίσες περίπου καθυστερήσεις και στις δύο πλευρές του ZPD συνήθως αποκαλούνται *double-sided* συμβολογραφήματα. Για μετρήσεις υψηλής ανάλυσης ωστόσο είναι σπανίως κατορθωτό να μετρηθούν ολοκληρωμένα *double-sided* συμβολογραφήματα. Σε αυτή την περίπτωση, η $\theta_{\tilde{\nu}}$ υπολογίζεται μόνο σε πολύ χαμηλή ανάλυση, αρχίζοντας τη συλλογή δεδομένων σε μικρή απόσταση από αριστερά του σημείου μηδενικής καθυστέρησης (centerburst), στο $-\Delta_1$ και συνεχίζοντας μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή ανάλυση, η οποία είναι στο σημείο όπου $\delta=+\Delta_2$, όπου $(\Delta_2)^{-1}$ είναι η επιθυμητή ανάλυση για το φάσμα φάσης. Τα συμβολογραφήματα που μετρούνται με μικρή καθυστέρηση σε μια πλευρά του ZPD και με μια πολύ μεγάλη καθυστέρηση στην άλλη πλευρά είναι γνωστά ως *single-sided* συμβολογραφήματα. Η μικρή *double-sided* περιοχή του συμβολογραφήματος από $-\Delta_1$ στο $+\Delta_1$ χρησιμοποιείται για να υπολογίσει το φάσμα φάσης υπολογίζοντας τις ημιτονοειδής και συνημιτονοειδής μετασχηματισμούς Fourier και εφαρμόζοντας τη σχέση:

$$\theta_{\tilde{\nu}} = \arctan \frac{\text{Im}(\tilde{\nu})}{\text{Re}(\tilde{\nu})} \quad (2.25)$$

Τα περισσότερα σύγχρονα FT-IR φασματοφωτόμετρα που λειτουργούν σε ανάλυση 1cm^{-1} και κάτω, συλλέγουν ολόκληρα *double-sided* συμβολογραφήματα (π.χ μετρούν από $-\Delta_2$ μέχρι $+\Delta_2$). Σε αυτή την περίπτωση, το φάσμα φάσης υπολογίζεται από ολόκληρο το συμβολογράφημα. Το πλεονέκτημα αυτής της συλλογής του *double-sided* συμβολογραφήματος είναι η ακρίβεια στην οποία υπολογίζεται το φάσμα φάσης, αλλά το πιο σημαντικό είναι ότι βελτιώνεται το signal-to-noise ratio (SNR) σε σχέση με τις *single-sided* μετρήσεις, επειδή τα δεδομένα και στις δύο πλευρές του σημείου μηδενικής καθυστέρησης (centerburst) είναι περιττά εκτός από το θόρυβο και η συλλογή αυτών των δεδομένων δεύτερη φορά οδηγεί σε μια βελτίωση του SNR $\sqrt{2}$.

2.4.3.1 Συμβολογράφημα DC και διόρθωση φάσης

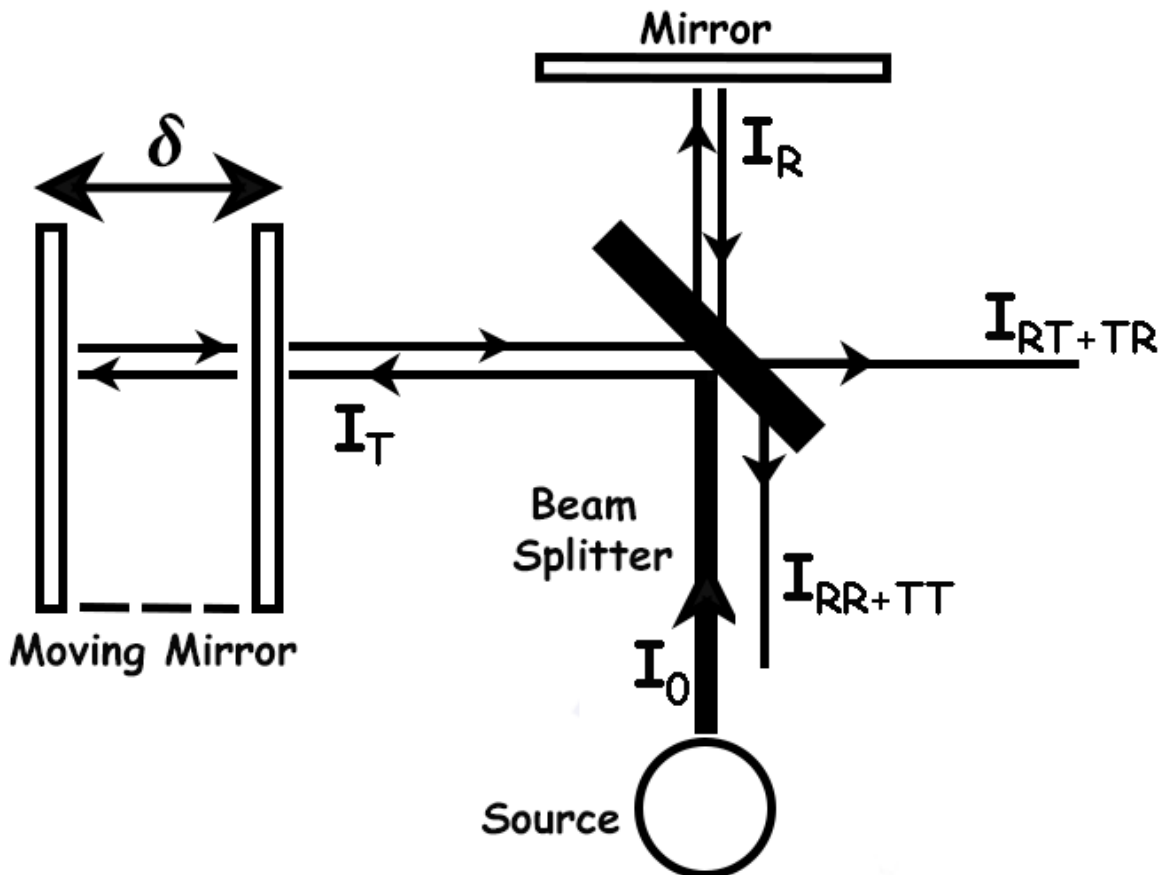
Το DC σήμα του ανιχνευτή είναι ένα συμβολογράφημα που προκύπτει με τον συνδυασμό των δύο δεσμών υπέρυθρης ακτινοβολίας όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 25. Η υπέρυθρη ακτινοβολία οδηγείται από την πηγή στο διαχωριστή δέσμης δημιουργώντας δύο νέες δέσμες, μια που αντανακλάται από το διαχωριστή δέσμης και προκύπτει η I_R μια που περνά δια μέσω του και προκύπτει η I_T . Μετά την ανάκλαση τους στα κάτοπτρα, οι δύο δέσμες

επανασυνδέονται στο διαχωριστή δέσμης, όπου παρεμβαίνει η μεταξύ τους σχετική διαφορά οπτικής διαδρομής. Δύο επανασυνδεόμενες δέσμες προκύπτουν από τον διαχωριστή δέσμης, η μια επιστρέφει στην πηγή και δεν χρησιμοποιείται. Αυτή προκύπτει από τις δέσμες που είτε αντανάκλαστηκαν δύο φορές στον διαχωριστή δέσμης, είτε πέρασαν δια μέσω του δύο φορές και ονομάζεται I_{RR+TT} . Η άλλη δέσμη είναι ο συνδυασμός των δύο δεσμών που είχαν η μια αντανάκλαση και η άλλη μετάδοση στον διαχωριστή δέσμης και ονομάζεται I_{RT+TR} . Αυτές οι δύο συνδυαζόμενες δέσμες είναι συμβολογραφήματα που η πρόσθεση τους δίνει την αρχική δέσμη της πηγής, I_0 και εκφράζεται από τη σχέση :

$$I_0 = I_{RR+TT} + I_{RT+TR} \quad (2.26)$$

Η δέσμη I_{RT+TR} είναι αυτή που περνά μέσα από το δείγμα και ονομάζεται DC συμβολογράφημα και εκφράζεται από τη σχέση :

$$I_{DC}(\delta) = I_{RT+TR}(\delta) \quad (2.27)$$



Εικόνα 25. Λειτουργία ενός τυπικού FT-IR φασματοφωτόμετρου. Η δέσμη από την πηγή χωρίζεται με ένα διαχωριστή δέσμης, στη συνέχεια οι δύο νέες δέσμες που προκύπτουν χτυπούν σε καθρέπτες και

επιστρέφουν πίσω στο διαχωριστή δέσμης όπου και ενώνονται εκ νέου. Οι εκθέτες **R** και **T** εκφράζουν την αντανάκλαση (Reflection) και την μετάδοση (Transmission).

Η μαθηματική έκφραση του συμβολογραφήματος DC είναι :

$$I_{DC}(\delta) = I_{RT+TR}(\delta) = \int_0^{+\infty} I_{DC}(\delta) \cos[2\pi\delta\tilde{\nu} + \theta_{DC}(\tilde{\nu})] d\tilde{\nu} \quad (2.28)$$

Για ένα rapid-scan συμβολόμετρο που λειτουργεί με μια σταθερή ταχύτητα του κινητού καθρέπτη V_M σε cm.s^{-1} , η οπτική καθυστέρηση σχετίζεται με την συχνότητα Fourier, $f_{F,\tilde{\nu}} = \omega/2\pi$, σε κύκλους ανά δευτερόλεπτο ή Hertz (Hz) για κάθε κυματάριθμο με τη σχέση:

$$2\pi\delta\tilde{\nu} = 2\pi(2V_M t)\tilde{\nu} = 2\pi(2V_M \tilde{\nu})t = 2\pi f_{F,\tilde{\nu}} t = \omega_F t \quad (2.29)$$

Στην εξίσωση 2.28, η συνάρτηση $\theta_{DC}(\tilde{\nu})$ είναι η διαφορά φάσης που μπορεί να προκύψει μεταξύ των συνημιτονοειδές κυμάτων Fourier διαφορετικών συχνοτήτων κυματάριθμων. Αυτή η διαφορά φάσης προκύπτει από τις διάφορες ταχύτητες στις οποίες τα ηλεκτρονικά σήματα των διαφόρων συχνοτήτων Fourier περνούν μέσω των ηλεκτρονικών επεξεργασίας όπως είναι τα φίλτρα και οι ενισχυτές.

Μια τυπική συχνότητα Fourier είναι 16kHz για τη συχνότητα του αναφορικού HeNe laser. Από την εξίσωση 2.29, αυτή η συχνότητα Fourier αντιστοιχεί σε μια ταχύτητα καθυστέρησης $2V_M = 1\text{cm.s}^{-1}$, καθώς η συχνότητα $\tilde{\nu}$ του HeNe laser στα 623.8nm είναι περίπου 16000cm^{-1} .

Για να προκύψει το transmission φάσμα του $I_{DC}(\tilde{\nu})$ στο ολοκλήρωμα της εξίσωσης 2.28, το συμβολογράφημα πρέπει να υποστεί μετασχηματισμό Fourier. Αυτό απεικονίζεται από την πιο κάτω σχέση:

$$I_{DC}(\tilde{\nu}) = FT[I_{DC}(\delta)] = \frac{1}{2\pi} \int_0^{+\infty} I_{DC}(\delta) \cos(2\pi\delta\tilde{\nu}) d\delta \quad (2.30)$$

Πριν να γίνει ο μετασχηματισμός Fourier, το φάσμα διόρθωσης φάσης, $\theta_{DC}(\tilde{\nu})$, πρέπει να μετρηθεί και να αφαιρεθεί από την έκφραση του $I_{DC}(\delta)$ της εξίσωσης 2.28. αυτή είναι μια λειτουργία που εφαρμόζεται με το λογισμικό που ελέγχει την λειτουργία του FT-IR φασματοφωτόμετρου και υπάρχουν αρκετοί αλγόριθμοι διόρθωσης φάσης όπως προαναφέρθηκαν.

2.4.3.2 Συμβολογράφημα AC και διόρθωση φάσης

Εκτός από το DC συμβολογράφημα υπάρχει και το AC συμβολογράφημα στον ανιχνευτή, το οποίο μεταφέρει τις πληροφορίες του φάσματος. Αυτό το συμβολογράφημα έχει δύο διαφορετικές συχνότητες, τη συχνότητα Fourier για κάθε κυματάριθμο όπως και στο DC και επιπρόσθετα μια υψηλότερη συχνότητα πόλωσης δεκάδων kHz. Το AC συμβολογράφημα δίνεται από την εξίσωση :

$$I_{AC}(\delta) = \int_0^{+\infty} I_{AC}(\tilde{\nu}) \cos[2\pi\delta\tilde{\nu} + \theta_{AC}(\tilde{\nu})] d\tilde{\nu} \quad (2.31)$$

Αυτό το συμβολογράφημα είναι της ίδιας μορφής με το DC συμβολογράφημα, εντούτοις διαφέρει η συνάρτηση φάσης, $\theta_{AC}(\tilde{\nu})$ από την συνάρτηση φάσης $\theta_{DC}(\tilde{\nu})$. Ο λόγος είναι ότι τα δύο αυτά συμβολογραφήματα περνούν μέσω διαφορετικών ηλεκτρονικών διαδρομών, όπου τα στοιχεία Fourier των δύο συμβολογραφημάτων βιώνουν διαφορετικές αλλαγές φάσης για την ίδια συχνότητα Fourier. Ο αλγόριθμος που προσδιορίζει την συνάρτηση διόρθωσης φάσης υποθέτει αυτόματα ότι όλες οι εντάσεις στον ανιχνευτή είναι θετικές. Αυτή είναι η περίπτωση του $I_{DC}(\tilde{\nu})$, αλλά οι εντάσεις του $I_{AC}(\tilde{\nu})$ μπορούν να είναι είτε θετικές είτε αρνητικές σε όλο το φάσμα. Συνεπώς χρειάζεται μια μέθοδος μέτρησης του $I_{AC}(\tilde{\nu})$ όταν υπάρχουν μόνο θετικές εντάσεις στην οποία μια συνάρτηση διόρθωσης φάσης μπορεί να μεταφερθεί σε μια μέτρηση του $I_{AC}(\tilde{\nu})$ όταν υπάρχουν και θετικές και αρνητικές εντάσεις.

2.4.4 Μειονεκτήματα – Πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας υπερύθρου

Η μεγάλη ευαισθησία που χαρακτηρίζει την φασματοσκοπία υπερύθρου μετατρέπεται σε μειονέκτημα στην περίπτωση που η ατμόσφαιρα του φασματοφωτόμετρου δεν έχει πλήρως εκκενωθεί, ή αντικατασταθεί με άζωτο. Τότε, το φάσμα υπερύθρου παρουσιάζει έντονες απορροφήσεις που οφείλονται στο H_2O και το CO_2 του χώρου του φωτόμετρου. Το σοβαρότερο όμως μειονέκτημα της φασματοσκοπίας υπερύθρου είναι η απαιτούμενη ακριβής ρύθμιση των οπτικών του οργάνου, κυρίως του συμβολόμετρου Michelson. Σε αντίθεση με τα συμβατικά φασματοφωτόμετρα, που δίνουν κακής ποιότητας αλλά χρησιμοποιήσιμα φάσματα όταν δεν είναι καλά ρυθμισμένα, τα φασματοφωτόμετρα υπερύθρου δεν παρέχουν καμία πληροφορία όταν δεν έχουν καλή ρύθμιση.

Σε σύγκριση με τα συμβατικά IR φασματοφωτόμετρα με διαβαθμισμένο πλέγμα, τα φασματοφωτόμετρα με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) υπερέχουν σημαντικά, καθώς ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο (S/N) είναι πολύ μεγαλύτερος. Η υπεροχή των FTIR φασματοφωτόμετρων οφείλεται στα βασικά χαρακτηριστικά κατασκευής και λειτουργίας τους, που έχουν ως αποτέλεσμα: 1) όλες οι συχνότητες που εκπέμπονται από την πηγή να φθάνουν ταυτόχρονα στον ανιχνευτή 2) ένα μεγάλο εμβαδόν της δέσμης να περνά μέσα από το δείγμα και 3) η θέση του κινούμενου καθρέπτη να προσδιορίζεται με μεγάλη ακρίβεια.

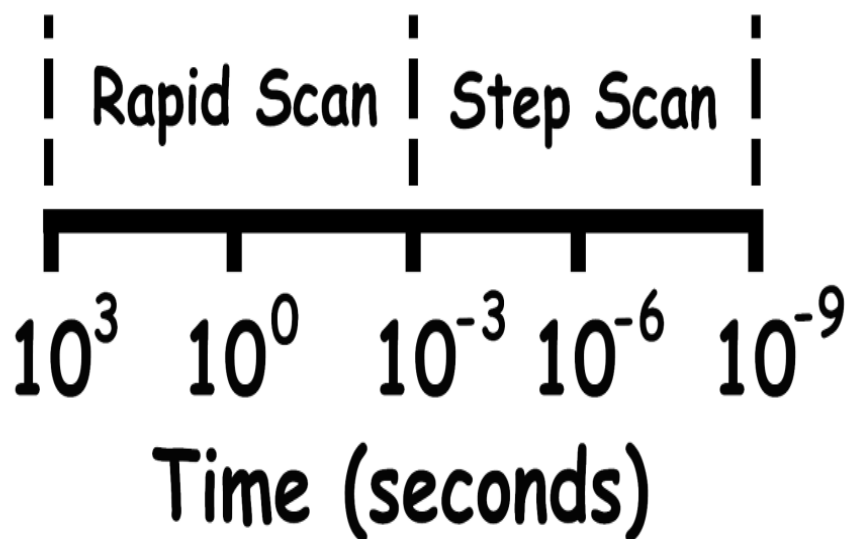
2.5 Παραπομπές

- 1) C.-P. Sherman Hsu, Ph.D., *Infrared spectroscopy, Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*.
- 2) John Coates, *Interpretation of Infrared spectra, A practical approach*, Wiley 2000.
- 3) Barbara Stuart, *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*.
- 4) R. P. Griffith, J. A. de Haseth, *Fourier Transform Infrared Spectrometry*, Wiley 1986.
- 5) V. G. Georgiou, M. S. Braiman, *Vibrational Spectroscopy of Biological and Polymeric Materials*, 2006.
- 6) L. A. Nafie, *Vibrational Optical Activity: Principles and Applications*.
- 7) A. Valavanidis, *Fundamental Principles of Molecular Spectroscopy and applications in Organic chemistry*, 2008.
- 8) P. Larkin, *IR and Raman Spectroscopy: Principles and spectral interpretation*, 2011.
- 9) D. Harris, *Quantative chemical analysis*, 8th edition, 2010.

3 Πειραματικό Μέρος – Πειραματικές διαδικασίες

Τα πειράματα που διενεργήθηκαν για την ενδεδειγμένη μελέτη της ba_3 κυτοχρωμικής οξειδοαναγωγής με υποκαταστάτη το CO έγιναν χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο υπερύθρου Vertex 70V της Bruker, εφαρμόζοντας τις τεχνικές χρονική ανάλυση νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns Time-Resolved Step-Scan FTIR) και χρονική ανάλυση ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) για κάλυψη ενός μεγάλου χρονικά φάσματος για να αποκτηθεί μια ολοκληρωμένη εικόνα της συμπεριφοράς του συμπλόκου ba_3 -CO μετά τη φωτόλυση του.

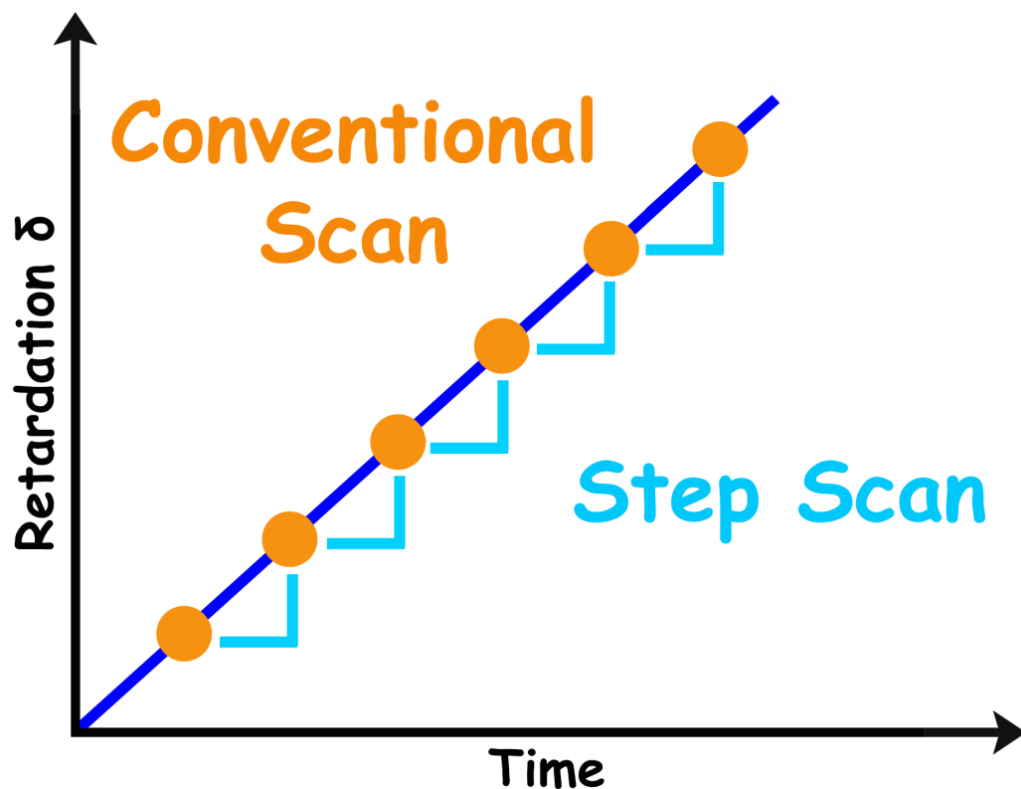
Timescale of FTIR Experiments



Εικόνα 26. Διαγραμματική απεικόνιση της χρονικής κλίμακας των πειραματικών τεχνικών χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns Time-Resolved Step-Scan FTIR) και χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR).

3.1 Τεχνική χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns Time-Resolved Step-Scan FTIR)

Τα πειράματα όλα διενεργήθηκαν με την τεχνική χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns Time-Resolved Step-Scan FTIR) στο μηχάνημα Vertex 70n, το οποίο εμπεριέχει ένα συμβολόμετρο Michelson. Κατά την τεχνική αυτή ο κινούμενος καθρέπτης κρατείται σταθερός σε κάθε σημείο για ορισμένο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια μετακινείται γρήγορα στο επόμενο σημείο μέχρις ότου τελειώσει η μέτρηση. Τα σημεία αυτά αποκαλούνται zero-crossing points (ZCP) και καθορίζονται από το μήκος κύματος του αναφορικού He-Ne laser. Όταν ο κινούμενος καθρέπτης σταματήσει στο πρώτο σημείο (zero-crossing point) και σταθεροποιηθεί, δηλαδή πραγματοποιήσει το πρώτο βήμα (step), προκύπτει απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας από το δείγμα. Ο ανιχνευτής λαμβάνει το τροποποιημένο φως και το σήμα μετατρέπεται από αναλογικό σε ψηφιακό με ένα μετατροπέα. Ο κινούμενος καθρέπτης μεταβαίνει στο επόμενο βήμα και καταγράφεται η απορρόφηση. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρις ότου ο κινούμενος καθρέπτης φτάσει στο τελευταίο σημείο.

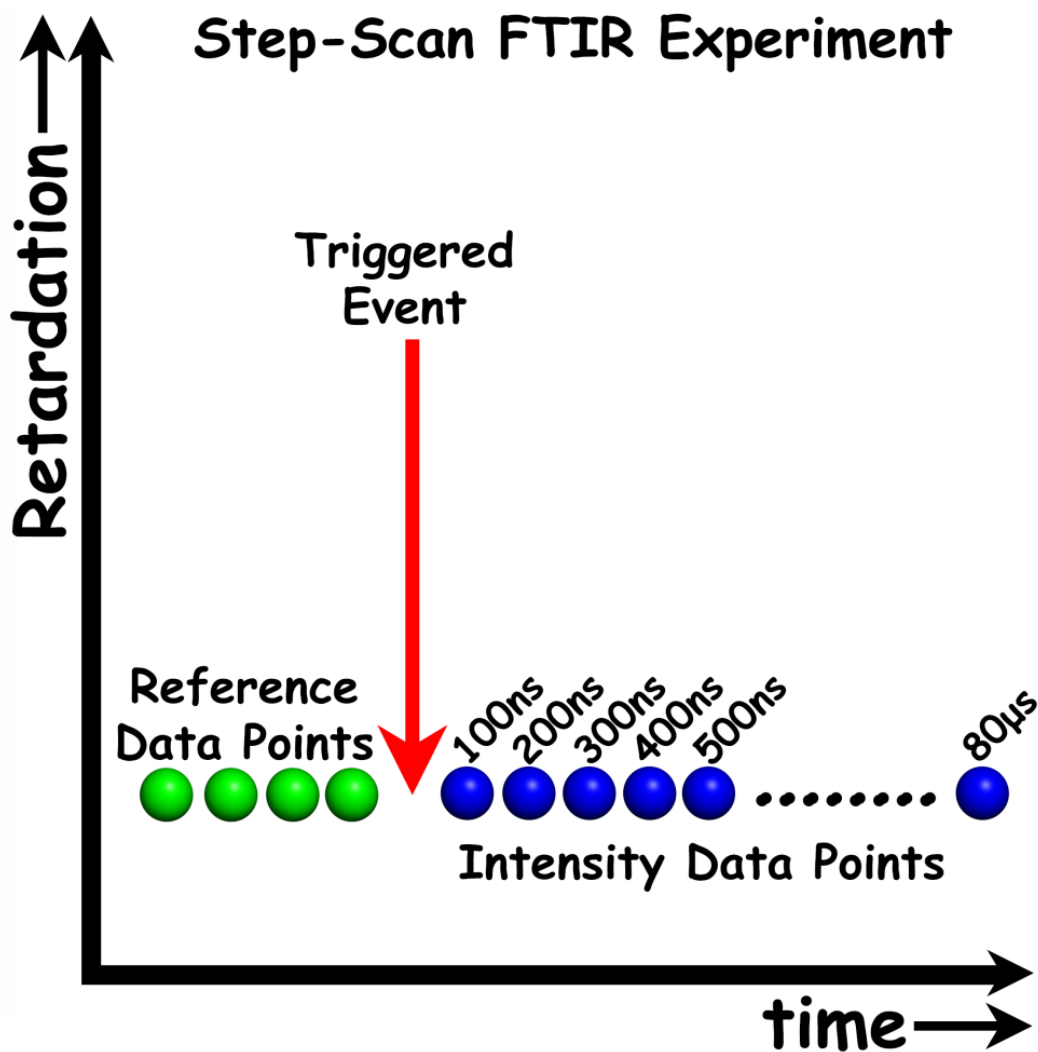


Εικόνα 27. Διαγραμματική σύγκριση της τεχνικής χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns Time-Resolved Step-Scan FTIR) σε σχέση με τη συμβατική μέθοδο.

Η μέθοδος AC/DC χρησιμοποιείται για τη συλλογή των πειραματικών δεδομένων. Τα σήματα AC παρέχουν τα συμβολογραφήματα χρονικής ανάλυσης (Time-Resolved) και τα DC σήματα χρησιμοποιούνται για τη διόρθωση φάσης του AC σήματος. Το σήμα του συμβολογραφήματος παράγεται με την ολοκλήρωση του σήματος του ανιχνευτή κατά τη διάρκεια του χρόνου στον οποίο ο ανιχνευτής παραμένει ακίνητος. Χρησιμοποιώντας την τεχνική χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns Time-Resolved Step-Scan FTIR) μπορούν να παρατηρηθούν οποιεσδήποτε μεταβολές συμβαίνουν σε πολύ μικρούς χρόνους, μέχρι και της τάξης των 10^{-9} seconds στο δείγμα.

Στο πιο κάτω σχήμα απεικονίζεται η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns Time-Resolved Step-Scan FTIR). Η πειραματική διάταξη αποτελείται από 2 κύρια μέρη, τα οποία είναι το φασματοφωτόμετρο υπερύθρου και το laser. Το φασματοφωτόμετρο περιέχει την πηγή υπερύθρου (Globar), ένα συμβολόμετρο Michelson και ένα φωτοβολταϊκό ανιχνευτή MCT (Mercury Cadmium Telluride). Ιδιότητα του ανιχνευτή MCT είναι να μετατρέπει τα φωτόνια σε ηλεκτρικό ρεύμα, το οποίο στη συνέχεια στέλνεται στον υπολογιστή, ψηφιοποιείται και απεικονίζεται στην οθόνη του υπολογιστή, επιτρέποντας έτσι τη μελέτη και περαιτέρω επεξεργασία των πειραματικών μετρήσεων. Η επιλογή του συγκεκριμένου ανιχνευτή έγινε λόγω της υψηλής ευαισθησίας του (λόγω ψύξης του με υγρό άζωτο) και της μεγάλης ταχύτητας με την οποία μπορεί να ανιχνεύει και τις πιο μικρές μεταβολές που προκύπτουν στο δείγμα. Το laser που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων είναι ένα παλμικό laser Nd:YAG κλάσης 4, ρυθμισμένο στη δεύτερη αρμονική συχνότητα ακτινοβολίας των 532nm. Η ρύθμιση της ενέργειας του laser γίνεται με τη χρήση διαφόρων οπτικών και ιρίδων. Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε το laser είναι για τη φωτόλυση του δεσμού Fe-CO του συμπλόκου $ba_3 - CO$. Το κανάλι Q-Switch του Nd:YAG laser έχει μια καθυστέρηση της τάξης των 150 μs , χρόνος ο οποίος επιτρέπει την συλλογή δεδομένων προτού χτυπήσει ο πρώτος παλμός το δείγμα έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν τα δεδομένα αυτά ως φάσμα αναφοράς όπως

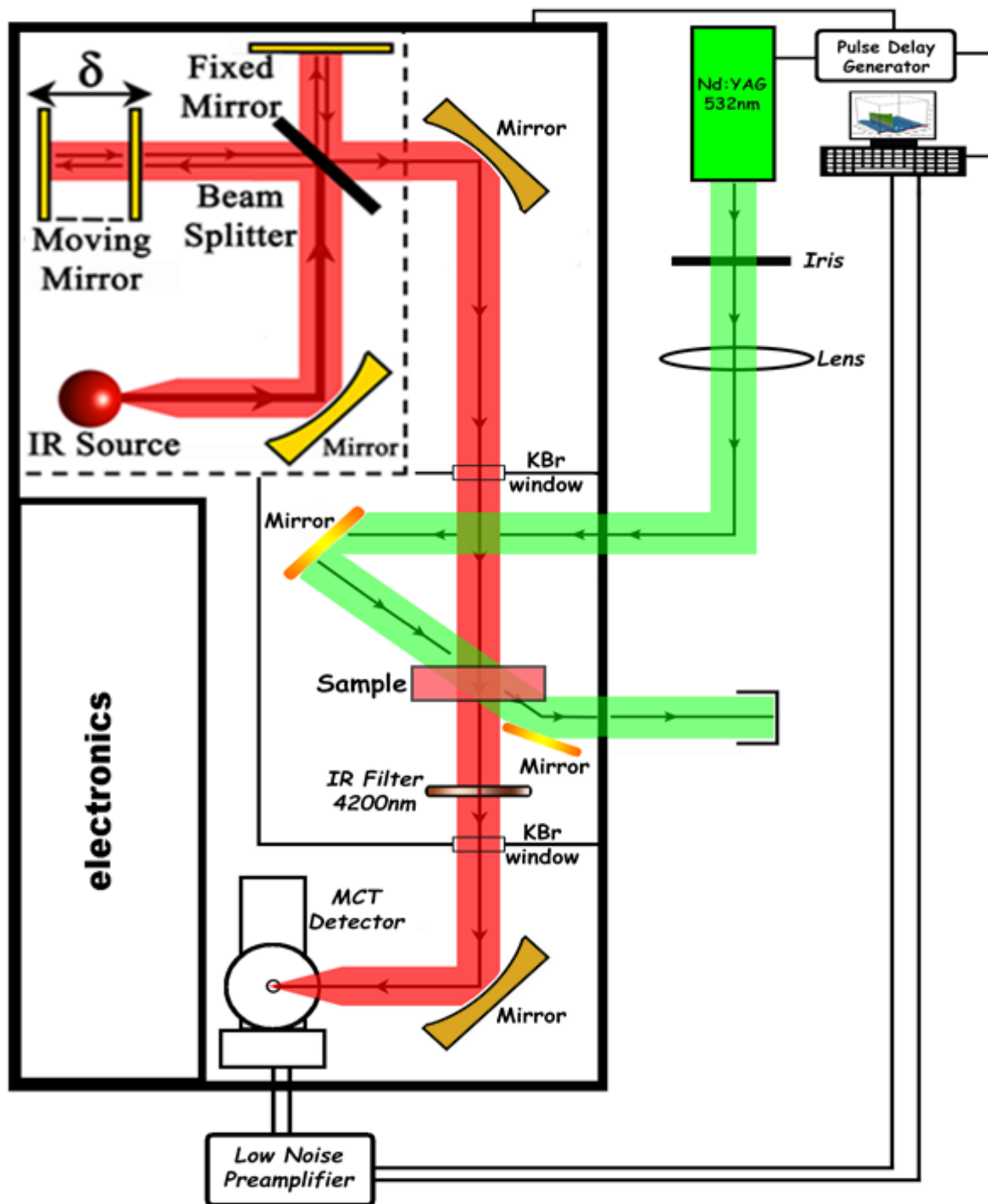
απεικονίζεται και στο πιο κάτω σχήμα. Το πλάτος του κάθε παλμού είναι 7ns. Ο χρόνος διεξαγωγής των πειραμάτων καθορίζεται από τη συχνότητα των παλμών του laser, την περιοχή σάρωσης του υπέρυθρου φάσματος, την διακριτική ικανότητα του συστήματος και τον αριθμό επαναλήψεων που πραγματοποιούνται για την βελτιστοποίηση της ποιότητας του σήματος. Το Nd:YAG laser και το φασματοφωτόμετρο ήταν συνδεδεμένα με μια γεννήτρια παλμών (Quantum pulse delay generator), μέσω της οποίας έγινε ο χρονικός συντονισμός των δύο οργάνων, καθώς προσφέρει ρυθμιζόμενη πυροδότηση του Nd:YAG laser και ανάλογο προγραμματισμό του χρόνου καταγραφής των FTIR δεδομένων. Η όλη πειραματική διάταξη ήταν τοποθετημένη σε τραπέζι δονητικής απομόνωσης (Newport, S2000) έτσι ώστε να υπάρχει αποφυγή των μηχανικών δονήσεων και κραδασμών, οι οποίοι θα είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση του θορύβου στις μετρήσεις χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns Time-Resolved Step-Scan FTIR). Για την ενίσχυση του AC σήματος, ούτως ώστε να γίνουν αντιληπτές και οι παραμικρές μεταβολές στο δείγμα κατά τη διάρκεια της φωτόλυσης, χρησιμοποιήθηκε ενισχυτής σήματος (Low-Noise Preamplifier SR560, Stanford Research Systems). Στο παράρτημα είναι καταγεγραμμένες όλες οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρονικής ανάλυσης φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns Time-Resolved Step-Scan FTIR).



Εικόνα 28. Διάγραμμα διαδικασίας που λαμβάνει χώρα ανά βήμα του κινητού καθρέπτη του συμβολόμετρου κατά τη διάρκεια της χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns Time-Resolved Step-Scan FTIR). Τα σημεία της χρονικής εξέλιξης του συστήματος είναι με μπλε χρώμα ενώ με κίτρινο χρώμα είναι τα σημεία αναφοράς.

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν οπτικά φίλτρα παρεμβολής με σκοπό να μειώσουν την ελεύθερη φασματοσκοπική περιοχή. Στα πιο κάτω πειράματα χρησιμοποιήθηκε οπτικό φίλτρο παρεμβολής (Spectrogon LP-4200nm) με ανώτατο όριο απόκρισης τα 4.2µm που αποσκοπεί στη μείωση της περιοχής που προκύπτει από το μήκος κύματος εκπομπής του αναφορικού He-Ne laser από 15798cm^{-1} σε 2633cm^{-1} . Οι μετρήσεις λήφθηκαν με φασματική ανάλυση 4cm^{-1} και 100ns χρονική ανάλυση, με 10 επαναλήψεις σε κάθε σημείο οπτικής καθυστέρησης. Τα τελικά φάσματα διαφοράς προέκυψαν με διόρθωση φάσης από το DC

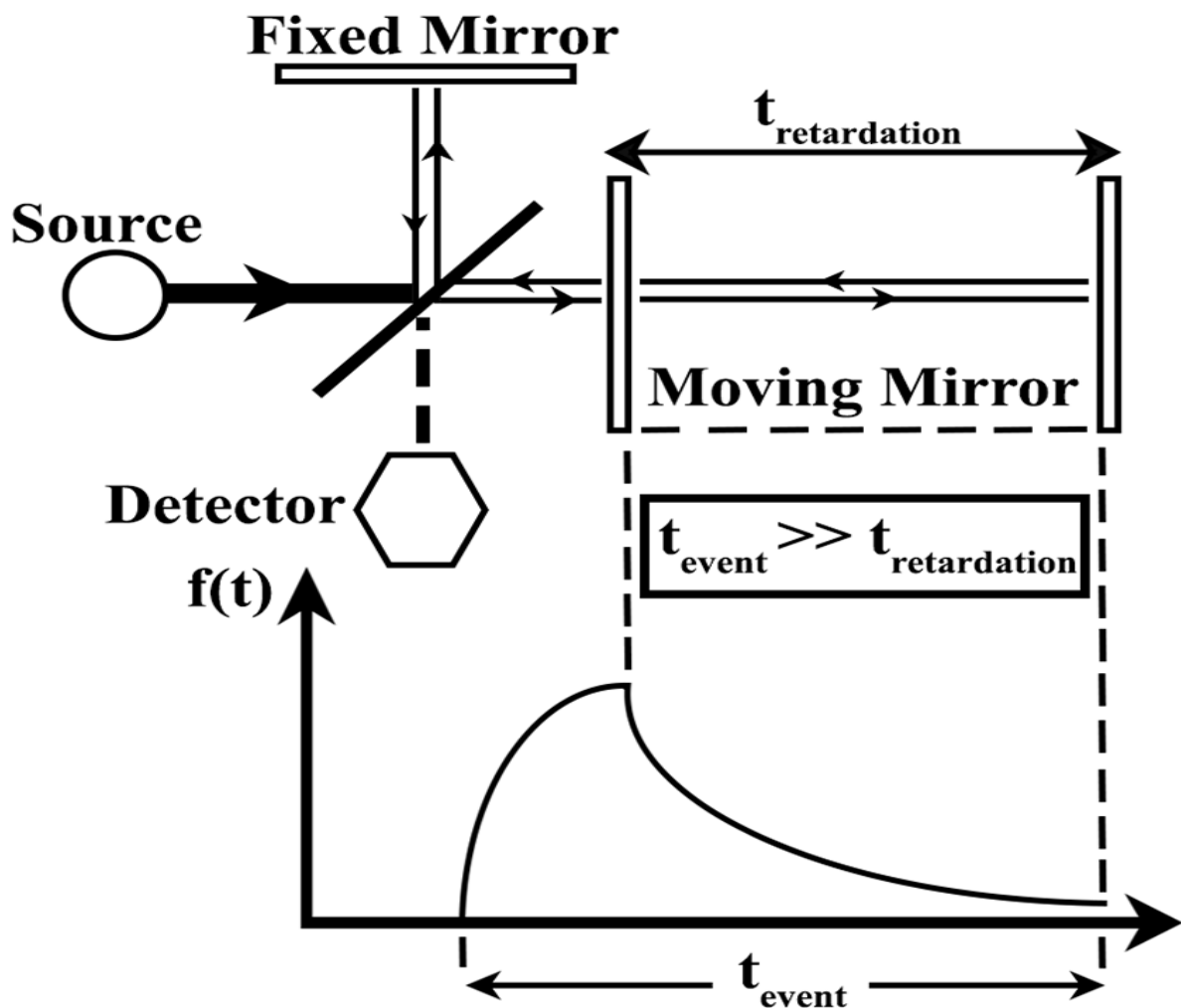
σήμα στο AC και με αφαίρεση των φασμάτων αναφοράς (φάσματα πριν την εκτυρσοκρότηση του laser) από τα φάσματα μετά την φωτόλυση του δεσμού Fe-CO του συμπλόκου ba_3CO .



Εικόνα 29. Πειραματική διάταξη για τα πειράματα χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπίας υπερόθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns Time-Resolved Step-Scan FTIR).

3.2 Τεχνική χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπία υπερόθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR)

Η αρχή της τεχνικής της φασματοσκοπίας υπερόθρου με μετασχηματισμό Fourier ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα (Rapid Scan FTIR) είναι ότι με την έναρξη του φαινομένου γίνεται μια ταχεία σάρωση της επιλεγμένης φασματικής περιοχής με τη συνεχή κίνηση με σταθερή ταχύτητα του κινητού καθρέπτη κατά την οποία συλλέγονται πειραματικά δεδομένα. Η αρχή της τεχνικής αυτής απεικονίζεται στην εικόνα 30. Με το πέρας της πρώτης σάρωσης γίνεται η δεύτερη και ούτω καθεξής, μέχρι να τελειώσει η πρώτη μέτρηση. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρις ότου συλλεχθούν οι απαραίτητες μετρήσεις.

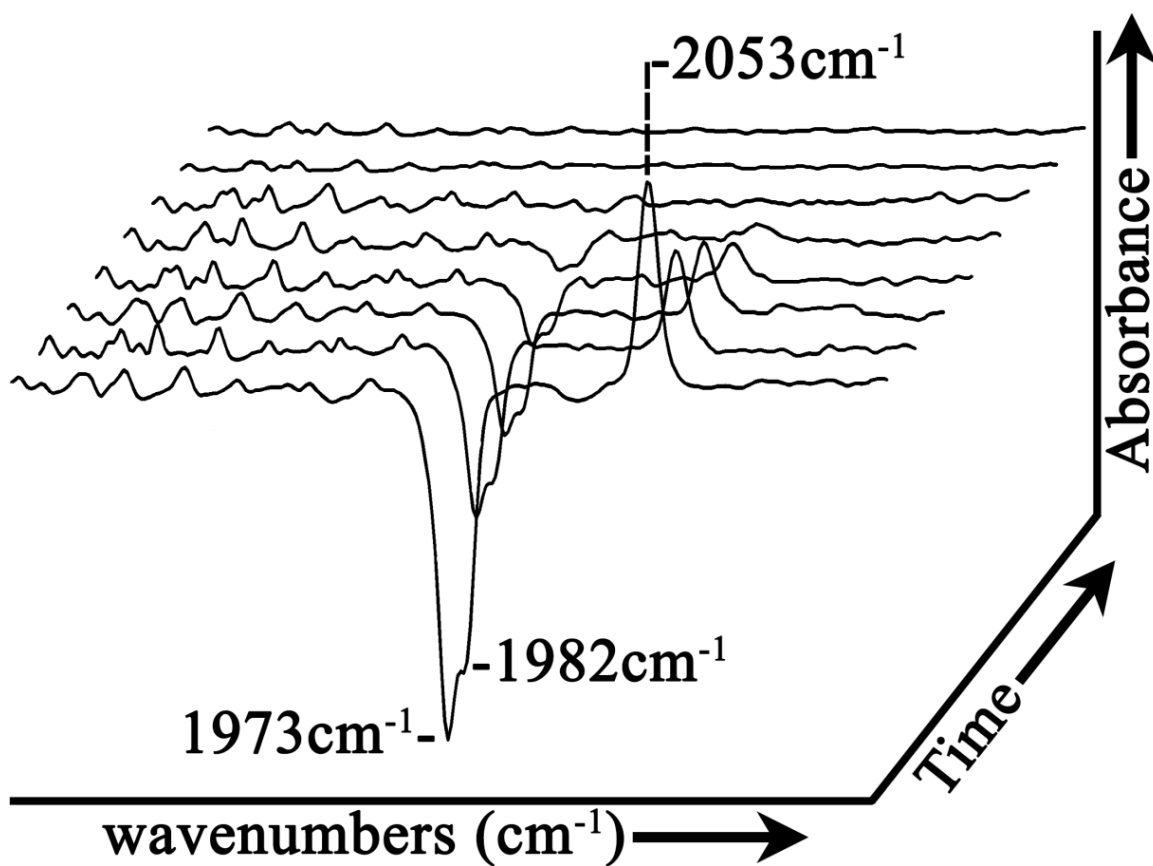


Εικόνα 30. Αρχή τεχνικής χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπία υπερόθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR).

Τα πειράματα χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερέθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) διενεργήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο υπερέθρου Vertex 70ν που αποκτήθηκε από την εταιρεία Bruker, εξοπλισμένο με ένα φωτοβολταϊκό ανιχνευτή τριών μετάλλων MCT. Για τον καθορισμό των επαναλήψεων καθώς και της χρονικής ανάλυσης των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ένας αλγόριθμος ως μέθοδος, οι παράμετροι του οποίου αναγράφονται στο Παράρτημα. Η μέθοδος – αλγόριθμος μηδενίζει το εσωτερικό ρολόι του λογισμικού και ρυθμίζει το ρυθμό σάρωσης του φασματοφωτόμετρου και τις επαναλήψεις. Το φασματοφωτόμετρο, ο υπολογιστής και το Nd:YAG laser συγχρονίστηκαν από τη γεννήτρια παλμών (Quantum pulse delay generator) έτσι κατέστη δυνατή η εκπομπή ενός παλμού TTL από την παλμογεννήτρια που σηματοδοτεί την έναρξη της πρώτης μέτρησης και ταυτόχρονα τη φωτόλυση του δεσμού Fe-CO του συμπλόκου $ba_3 - CO$ που προέκυψε από Nd:YAG laser μήκους κύματος 532nm και με πλάτος παλμού 7ns. Με το πέρας της πρώτης επανάληψης γίνεται εκπομπή ενός δεύτερου παλμού και ούτω καθεξής και με το πέρας όλων των επαναλήψεων γίνεται η καταγραφή των αποτελεσμάτων στον υπολογιστή όπου και προκύπτει το τρισδιάστατο φάσμα της εικόνας 31. Για βελτιστοποίηση του θορύβου έγινε η συλλογή ~60 «φωτεινών» μετρήσεων καθώς και η συλλογή ~30 «σκοτεινών» μετρήσεων, δηλαδή χωρίς τη χρήση laser, οι οποίες στη συνέχεια αφαιρέθηκαν από τις προηγούμενες μετρήσεις και έτσι ήταν δυνατή η παρατήρηση αλλαγών στις οποίες συμβαίνουν στο δείγμα έπειτα από τη σχάση του δεσμού Fe-CO του συμπλόκου $ba_3 - CO$. Οι μετρήσεις λήφθηκαν με φασματική ανάλυση 4cm^{-1} που αποδίδεται σε ~27 φάσματα/δευτερόλεπτο και με μέγιστη ταχύτητα σάρωσης του κινητού καθρέπτη (maximum scanner velocity) τα 160 kHz. Πιο κάτω στον πίνακα 1 αναγράφεται η φασματοσκοπική ανάλυση σε σχέση με το ρυθμό σάρωσης. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε οπτικό φίλτρο παρεμβολής (Spectrogon LP-4200nm) με ανώτατο όριο απόκρισης τα 4.2 μm , που στόχος του ήταν να μειώσει τη φασματοσκοπική περιοχή. Χρησιμοποιώντας την τεχνική ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερέθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) μπορούν να παρατηρηθούν μεταβολές που συμβαίνουν σε χρόνους της τάξης των $10^{-3} - 10^3$ s στο δείγμα. Η όλη πειραματική διάταξη ήταν τοποθετημένη σε τραπέζι δονητικής απομόνωσης (Newport, S2000) έτσι ώστε να υπάρχει αποφυγή των μηχανικών δονήσεων και κραδασμών, οι οποίοι θα είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση του θορύβου στις πειραματικές μετρήσεις. Όλες οι μετρήσεις λήφθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού OPUS της εταιρείας Bruker.

Πίνακας 2. Φασματοσκοπική ανάλυση σε σχέση με το ρυθμό σάρωσης του φασματοφωτόμετρου υπερύθρου Vertex 70n με μέγιστη ταχύτητα σάρωσης 160 kHz.

Φασματοσκοπική ανάλυση	Ρυθμός Σάρωσης
16 cm^{-1}	58 φάσματα / δευτερόλεπτο
12 cm^{-1}	52 φάσματα / δευτερόλεπτο
8 cm^{-1}	42 φάσματα / δευτερόλεπτο
4 cm^{-1}	27 φάσματα / δευτερόλεπτο
2 cm^{-1}	16 φάσματα / δευτερόλεπτο



Εικόνα 31. Διαγραμματική απεικόνιση των πειραματικών μετρήσεων φωτόλυσης του συμπλόκου $ba_3\text{-CO}$ με την τεχνική χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR).

Με το πέρας του πειράματος μπορεί να γίνει περαιτέρω επεξεργασία στις μετρήσεις με σκοπό την επιπλέον ενίσχυση της χρονικής ανάλυσης των μετρήσεων. Από τις μετρήσεις χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) προκύπτει το συμβολογράφημα. Γίνεται διαίρεση του συμβολογραφήματος (Split interferogram) και προκύπτουν τα συμβολογραφήματα του δείγματος (Sample Interferogram) και το συμβολογράφημα αναφοράς (Reference Interferogram). Η διαίρεση του συμβολογραφήματος είναι επιτρεπτή γιατί ο τρόπος με τον οποίο συλλέγονται τα δεδομένα είναι από μια πλευρά μπρός και πίσω (Single Sided, Forward-Backward). Έπειτα γίνεται η μετατροπή των συμβολογραφημάτων σε φάσματα (Interferogram to Spectrum) χρησιμοποιώντας ως αλγόριθμο διόρθωσης φάσης (Phase Correction Mode) τον Mertz/No Peak Search και ως συνάρτηση αποδισμού (Apodization Function) την Blackman-Harris 3-Term. Ακολούθως γίνεται η διαίρεση του φάσματος του δείγματος (Sample Spectrum) με το φάσμα αναφοράς (Reference Spectrum) με την υπολογιστική μηχανή του λογισμικού OPUS και προκύπτει το φάσμα ως συνάρτηση της διαπερατότητας (Transmittance Spectrum). Για να προκύψει το τελικό φάσμα απορρόφησης (Absorbance Spectrum) γίνεται με τη βοήθεια του λογισμικού OPUS η μετατροπή του φάσματος διαπερατότητας σε φάσμα απορρόφησης (Transmittance to Absorbance).

3.3 Παραπομπές

1. Gregory D. Smith, Richard A. Palmer, Fast Time-Resolved Mid-Infrared Spectroscopy using an interferometer.
2. Xuehua Hu, Heinz Frei, and Thomas G. Spiro, *Biochemistry* 1996, **35**, 13001-13005.
3. Griffith P. R.; de Haseth J. A. *Fourier Transform Infrared Spectrometry*, Wiley, NY U.S.A. 1986.
4. M. Diem, *Modern Vibrational Spectroscopy*, Wiley, New York, 1993.
5. T. J. Johnson, G. Zachmann, *Introduction to Step-Scan FTIR*, Bruker Optics Inc, 2008.
6. Option for Rapid Scan, Time-Resolved Spectroscopy (TRS) using a FT-IR Spectrometer of the Vertex series, Bruker Optics Inc, 2008.

7. C. Koutsoupakis, E. Pinakoulaki, S. Stavrakis, V. Daskalakis and C. Varotsis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, **1655**, 347-352.
8. D. Heitbrink, H. Sigurdson, C. Bolwien, P. Brzezinski and J. Heberle, *Biophysical Journal*, 2002, **82**, 1-10.
9. M. Torwie, *et al.*, *Applied Spectroscopy*, 2005, **59**, 467-473.
10. C. J. Manning and P. R. Griffiths, *Applied Spectroscopy*, 1997, **51**, 1092-1101.
11. M. W. George, *Applied Spectroscopy*, 2002, **56**, 31-39.
12. R.A. Palmer, G. D. Smith and P. Chen, *Vibrational Spectroscopy*, 1999, 19, 131–141.

4 Εντοπισμός μορίων νερού με λειτουργικό ρόλο, δεσμευμένων με δεσμούς υδρογόνου με πρωτονιωμένες / αποπρωτονιωμένες καρβοξυλικές πλευρικές αλυσίδες κλειδιά του αναπνευστικού ενζύμου *ba₃* οξειδοαναγωγή

4.1 Περίληψη

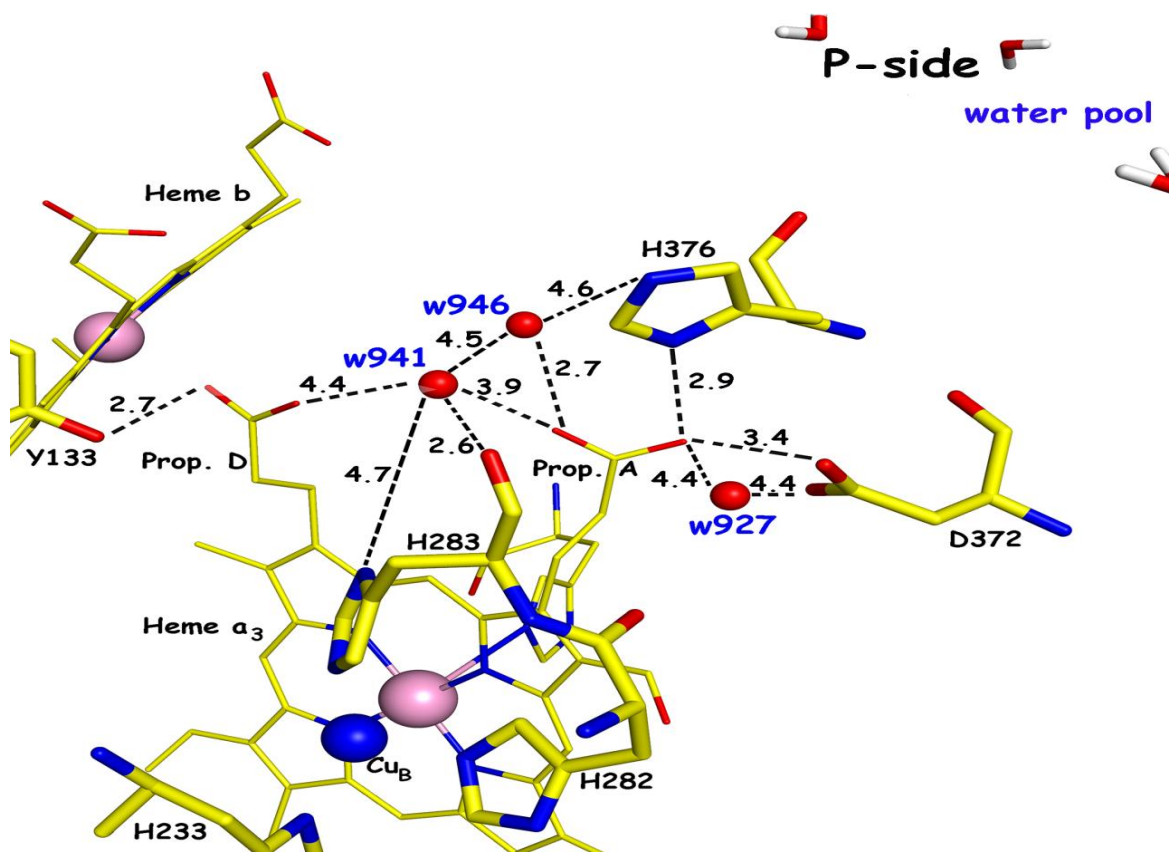
Η πρωτονίωση / αποπρωτονίωση των ενεργών καρβοξυλικών πλευρικών αλυσίδων από δίκτυα νερών που σχηματίζουν τα κανάλια εισόδου των πρωτονίων και εξόδου στις πρωτεΐνες είναι σημαντικά βήματα για την πρωτεϊνική κατάλυση. Ένα εξαιρετικό σύστημα για τη μελέτη τέτοιων βασικών αρχών είναι η αιμοχαλκοπρωτεΐνη *ba₃* από το βακτήριο *Thermus thermophilus* επειδή χρησιμοποιεί ένα κανάλι εισόδου πρωτονίων για τη μεταφορά των πρωτονίων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και για τη χημεία οξυγόνου αλλά και για άντληση πρωτονίων. Αναφέρουμε την αλληλεπίδραση της προπιονικής ομάδας A της αίμης *a₃* και του ζευγαριού Asp372–His376 που σχηματίζουν τη βαλβίδα του καναλιού εξόδου των πρωτονίων με τα εσωτερικά μόρια νερού στην *ba₃* οξειδοαναγωγή, όπως ανιχνεύθηκε με τη χρήση της *light minus dark* φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier και με την ανταλλαγή H₂¹⁶O/H₂¹⁸O/D₂¹⁶O. Το κανάλι εισόδου των πρωτονίων αποτελείται από αρκετά μόρια νερού, συμπεριλαμβανομένων και των w941/w946 που είναι ενωμένα με δεσμούς υδρογόνου με την πρωτονιωμένη μορφή της προπιονικής ομάδας A-H⁺, λειτουργώντας ως κατιόν Zundel. Ο εντοπισμός των δύο ευαίσθητων στο H₂¹⁸O ταινιών απορρόφησης στους 3640 και 3634 cm⁻¹ δείχνει την ύπαρξη μορίων νερού ασθενώς δεσμευμένων με δεσμούς υδρογόνου.

4.2 Εισαγωγή

Οι αιμοχαλκοξειδοαναγωγάσες είναι αντλίες πρωτονίων που προκύπτουν από οξειδοαναγωγές για την αερόβια αναπνευστική αλυσίδα των αερόβιων βακτηρίων και των μιτοχονδρίων των ευκαρυωτικών οργανισμών.¹⁻⁷ Ο έλεγχος της μεταφοράς των πρωτονίων επιτρέπει στα πρωτόνια να φορτωθούν σε περιοχές άντλησης πρωτονίων πριν από την μεταφορά των πρωτονίων του υποστρώματος και των ηλεκτρονίων στα ενδιάμεσα του

οξυγόνου των οποίων η αναγωγή οδηγεί την αντλία.⁸ Η ενδομοριακή κίνηση των πρωτονίων μπορεί να προσδώσει μια λογική όσον αφορά τις διαδικασίες πρωτονίωσης / αποπρωτονίωσης και μπορεί να οδηγείται από τη χημεία του υποστρώματος, τη δραστηριότητα άντλησης πρωτονίων και τις διαδικασίες των φαινομένων Bohr.^{9,10} Επιπλέον η περιορισμένη ταχύτητα πρόσβαση του οξυγόνου μέσω των καναλιών είναι απαραίτητη για μια ενσωματωμένη δεξαμενή οξυγόνου καθότι η μετάβαση του προϊόντος νερού ελέγχεται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του καταλυτικού κέντρου.¹¹

Η *ba₃* οξειδοαναγωγή από το βακτήριο *Thermus thermophilus* είναι μέλος των δομικά συσχετισμένων αιμοχαλκοξειδοαναγωγάσεων που συνίσταται από μια ομάδα ενζύμων που μπορούν να χαρακτηριστούν ως μέλη της Α-, Β- ή Γ-οικογένειας οξειδοαναγωγάσεων.^{4,12} Είναι αντιπρόσωπος της Β-οικογένειας και χρησιμοποιεί ένα κανάλι εισόδου πρωτονίων ανάλογο με το κανάλι Κ της Α-οικογένειας και μεταφέρει πρωτόνια στο ενεργό κέντρο τόσο για τη χημεία του οξυγόνου όσο και για άντληση πρωτονίων (Εικόνα 32).⁴



Εικόνα 32. Δομή του διπυρηνικού κέντρου αίμη a_3 - Cu_B της ba_3 οξειδοαναγωγάσης του κυτοχρώματος c από το βακτήριο *Thermus thermophilus* (PDB κωδικός 1EHK). Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα PyMOL και η κρυσταλλική δομή της ba_3 οξειδοαναγωγάσης λήφθηκε από την τράπεζα δεδομένων πρωτεϊνών (Protein Data Bank) με κωδικό αρχείου 1EHK¹².

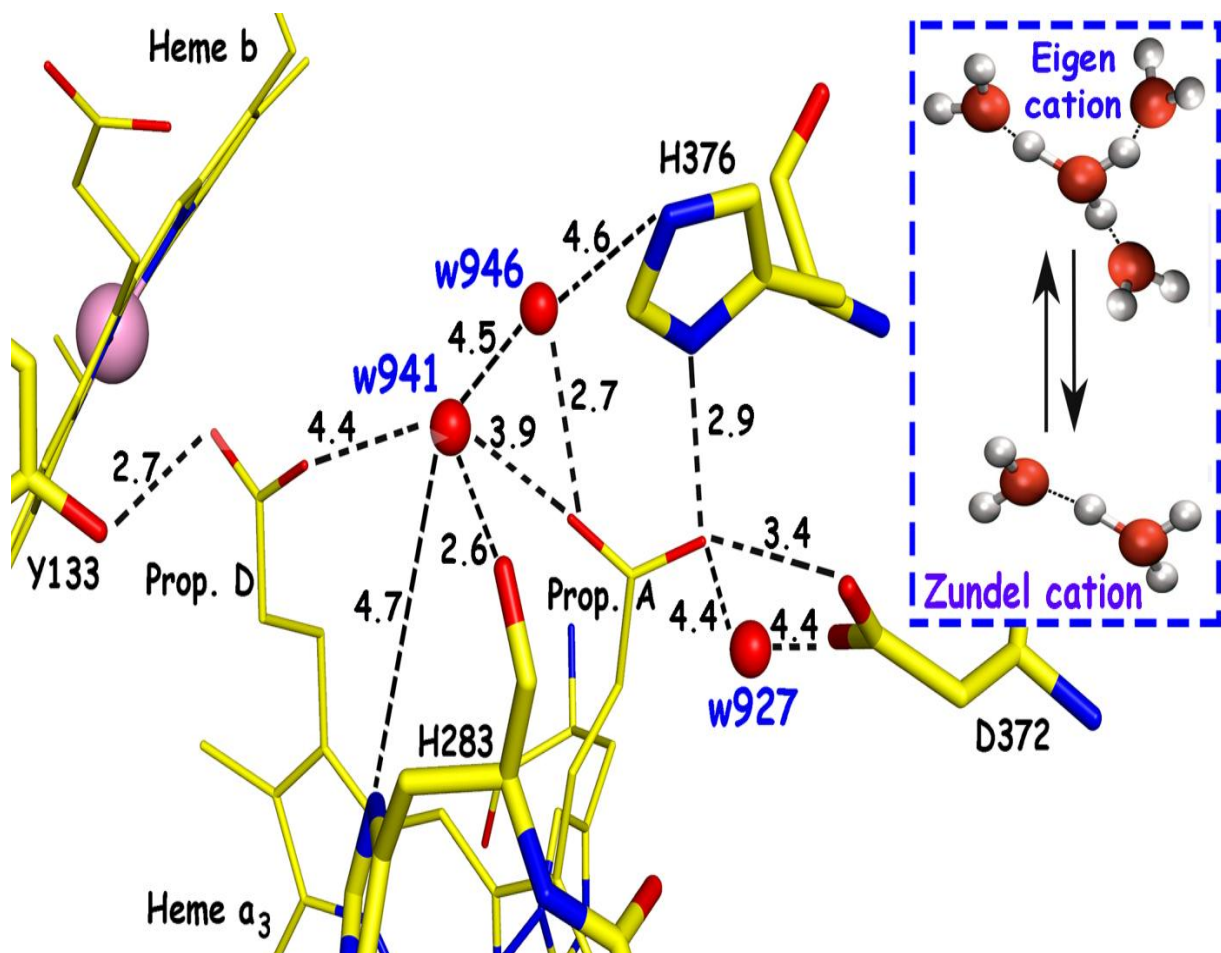
Το ένζυμο περιέχει ένα ομο-διπυρηνικό κέντρο με δύο άτομα χαλκού Cu_A , μια χαμηλού spin αίμη b και ένα διπυρηνικό κέντρο αίμης $a_3 - Cu_B$. Καταλύει την τεσσάρων ηλεκτρονίων αναγωγή του οξυγόνου σε νερό, μετατρέποντας την ενέργεια αυτής της αντίδρασης σε μια δύναμη κίνησης διαμεμβρανικών πρωτονίων, την δύο ηλεκτρονίων αναγωγή του NO σε N_2O και την οξείδωση του CO σε CO_2 .¹³⁻¹⁵ Η παρουσία της Pe235 στην ba_3 οξειδοαναγωγή, συμβάλει στη δημιουργία ενός υδροφοβικού πόρου που ξεκινά από τη μέση της μεμβράνης και εκτείνεται μέχρι το διπυρηνικό κέντρο, ο οποίος είναι εξαιρετικά σημαντικός επειδή το ένζυμο λειτουργεί σε συνθήκες περιορισμένης συγκέντρωσης οξυγόνου.¹² Η συμμετοχή των ενεργών ομάδων που είτε συμμετέχουν στους μηχανισμούς μεταφοράς πρωτονίων, είτε είναι εξαρτώμενες από την οξειδοαναγωγική τους κατάσταση είναι ύψιστης σημασίας γιατί μπορεί να έχουν σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς μεταφοράς πρωτονίων ή προϊόντων από το διπυρηνικό κέντρο στο διάλυμα έξω από το διπυρηνικό κέντρο.¹⁴⁻¹⁵

Πειράματα που έχουν γίνει με τις φασματοσκοπικές τεχνικές Resonance Raman και FTIR έχουν δείξει τις μοναδικές αλληλεπιδράσεις του διπυρηνικού κέντρου της κυτοχρωμικής οξειδοαναγωγής ba_3 με διάφορους υποκαταστάτες όπως O_2 , CO, NO και CN.¹⁶⁻¹⁸ Η κυτοχρωμική οξειδοαναγωγή ba_3 είναι η μοναδική καταγεγραμμένη οξειδοαναγωγή κατά οποία η δέσμευση του CO στον Cu_B παράγει έργο και υπολογίζεται στο 25-30% της συνολικής συγκέντρωσης του ενζύμου.¹⁹⁻²² Η αναλλοίωτη τιμή της συχνότητας της δόνησης $\nu(CO)$ του Cu_B στην ανταλλαγή H_2O/D_2O και σε εύρος τιμών pD 5.5-9.7 υποδεικνύει ότι η προσφορά της ηλεκτρονιακής πυκνότητας από τα d τροχιακά στα αντιδεσμικά π^* τροχιακά παραμένει αναλλοίωτη υπό αυτές τις συνθήκες. Εάν κάποιος από τους υποκαταστάτες Cu_B -His είναι ικανός να εναλλάσσεται κυκλικά σε μία διαδικασία μεταξύ των καταστάσεων imidazolate, imidazole και imidazolium, τότε η συχνότητα $\nu(CO)$ αναμένεται να μεταβάλλεται. Μία αλλαγή στην κατάσταση πρωτονίωσης ενός από τους υποκαταστάτες ιστιδίνης, θα είχε σημαντική αλλαγή στην επιπλέον προσφορά της ηλεκτρονιακής πυκνότητας και στην συχνότητα της δόνησης $\nu(CO)$. Έτσι τα φάσματα διαφοράς που λήφθηκαν από τη φωτόλυση του CO, μπορούν να δώσουν πληροφορίες σχετικά με τις διαδικασίες μεταφοράς πρωτονίων που προέρχονται από τους υποκαταστάτες του Cu_B .

Τα μόρια νερού στις υδρόφοβες κοιλότητες του ενζύμου παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά πρωτονίων στο διπυρηνικό κέντρο αίμης $a_3 - Cu_B$ όπου θα χρησιμοποιηθούν στην αντίδραση κατά την οποία το O_2 θα μετατραπεί σε H_2O .²³⁻²⁵ Το προϊόν νερό που θα παραχθεί

στο διπυρηνικό κέντρο αίμης $a_3 - \text{Cu}_B$ βρέθηκε ότι είναι συναρμοσμένο στο ιόν Mg στις αιμοχαλκοξειδοαναγωγάσες πριν από τη διαλυτοποίηση του στο υδατικό μέρος του ενζύμου.³ Η διαδρομή από το διπυρηνικό κέντρο μέχρι το ιόν Mg παραμένει άγνωστη. Time Resolved πειράματα δημιουργίας διαμεμβρανικού δυναμικού έχουν δείξει ότι η περιοχή φόρτωσης πρωτονίων είναι η προπιονική ομάδα A της αίμης a_3 .⁸ Έχει αποδειχθεί ότι το pK_a της προπιονικής ομάδας A είναι ευαίσθητο στην αναγωγή της αίμης a_3 και στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του διπυρηνικού κέντρου αίμης – χαλκού. Πειράματα τοποκατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης (Site-directed mutagenesis) στην ba_3 οξειδοαναγωγή εισηγούνται ότι κατάλοιπα που δεν είναι δεσμευμένα με δεσμούς υδρογόνου μπορούν να αντικατασταθούν με την Y133 που είναι δεσμευμένη με δεσμό υδρογόνου με την προπιονική ομάδα D, με την H376 που είναι δεσμευμένη με δεσμό υδρογόνου με την προπιονική ομάδα A και τέλος με το D372 που είναι επίσης δεσμευμένο με δεσμό υδρογόνου με την προπιονική ομάδα A χωρίς σημαντικές απώλειες όσο αφορά τη δραστηριότητα της οξειδάσης ή την άντληση πρωτονίων.⁴ Αν και τα μεταλλαγμένα ένζυμα D372I και H376N παρουσιάζουν υψηλή δραστηριότητα, έχουν αποτύχει στην άντληση πρωτονίων, γεγονός που αποδεικνύει ότι η προπιονική ομάδα A ή ομάδες κοντά στην προπιονική ομάδα A, είναι σημαντικές για την άντληση πρωτονίων. Ένα εξαιρετικά σταθερό μόριο νερού, σε διάφορα κυτοχρωμικά ένζυμα, βρίσκεται μεταξύ των δύο προπιονικών ομάδων της αίμης a_3 .⁴ Προσομοιώσεις που έγιναν με τη μέθοδο Quantum Mechanical / Molecular Mechanical (QM/MM) έχουν δείξει ότι το μόριο νερού που απαντάται στις περισσότερες πρωτεΐνες (highly conserved water molecule) (w941 στην ba_3), μπορεί να μεταφέρει το πρωτόνιο του στην προπιονική ομάδα A. Η His403 (His376 στην ba_3), που βρίσκεται κοντά την αποκαλούμενη «δεξαμενή νερού» (water pool), παρακείμενα στην προπιονική ομάδα A της αίμης a_3 παίζει το ρόλο της βαλβίδας που ελέγχει την κατάσταση πρωτονίωσης του ζευγαριού προπιονική ομάδα A – D372.²⁶ Αυτό, εν συνεχεία, ελέγχει την οξειδωτική κατάσταση του σιδήρου της αίμης a_3 .¹⁰ Οι προσομοιώσεις βρήκαν υποστήριξη από πρόσφατα αποτελέσματα που πάρθηκαν από την ba_3 οξειδοαναγωγή από τα οποία βγήκε το συμπέρασμα ότι οι μοναδικές δομικές διαταραχές από τις μεταλλάξεις D372I και H376N αλλάζουν τη συνδεσμολογία με δεσμούς υδρογόνου του w941.⁴ Το συμπέρασμα ήταν ότι η περιοχή φόρτωσης πρωτονίων (proton loading site), δεν είναι η προπιονική ομάδα A αλλά ένα σύμπλεγμα από κατάλοιπα που βρίσκονται γύρω από το μόριο νερού (w941) που είναι δεσμευμένο με δεσμό υδρογόνου και με τις δύο προπιονικές ομάδες A και D, αλλά και με την His283, που είναι ένας από τους υποκαταστάτες του Cu_B (Εικόνα 31).⁴

Στην παρούσα δουλειά, η ακριβείς διατάξεις και αλληλεπιδράσεις των μορίων του νερού με τις πρωτονιωμένες / αποπρωτονιωμένες καρβοξυλικές πλευρικές αλυσίδες κλειδιά μέσα στην ba_3 οξειδοαναγωγάση, μας επέτρεψαν να ανιχνεύσουμε μόρια νερού ασθενώς συνδεδεμένα με δεσμούς υδρογόνου που δεν βρίσκονται στο καταλυτικό κέντρο αίμης $a_3 - Cu_B$ καθώς και να παρακολουθήσουμε τις αλληλεπιδράσεις τους με το πρωτεϊνικό περιβάλλον. Τα προτεινόμενα κατάλοιπα που είναι δεσμευμένα με δεσμούς υδρογόνου είτε με την προπιονική ομάδα A και/είτε με τα γειτονικά κατάλοιπα D372 και H376 των καναλιών άντλησης πρωτονίων και εξόδου των προϊόντων, έχουν διερευνηθεί με την τεχνική *light minus dark* FTIR στην παρουσία $H_2^{16}O$, $H_2^{18}O$ και $D_2^{16}O$ (Εικόνα 33).



Εικόνα 33. Περιοχή των προπιονικών ομάδων της αίμης a_3 της ba_3 οξειδοαναγωγάσης από το βακτήριο *Thermus thermophilus* που επιδεικνύει τα κατάλοιπα που παρουσιάζουν ενδιαφέρον. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα PyMOL και η κρυσταλλική δομή της ba_3 οξειδοαναγωγάσης λήφθηκε από την τράπεζα δεδομένων πρωτεϊνών (Protein Data Bank) με κωδικό αρχείου 1EHK.¹²

Η τεχνική αυτή είναι ιδανική για τη μελέτη αλλαγών στο επίπεδο των επιμέρους αμινοξέων και αλληλεπιδράσεων που έχουν οι δεσμοί υδρογόνου κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνικής δραστηριότητας. Τα δεδομένα δείχνουν ξεκάθαρα την απουσία μορίων νερού στο καταλυτικό κέντρο αίμης $a_3 - Cu_B$, αλλά και απουσία αλληλεπιδράσεων των $Cu_B - His$ υποκαταστατών με τα ανταλλάξιμα μόρια νερού. Τα δεδομένα αντικατοπτρίζουν την ύπαρξη και των δύο, πρωτονιωμένων / αποπρωτονιωμένων μορφών του D372 με την ύπαρξη θετικού-αρνητικού (peak/trough) της $\nu(COOH)$ στους $1752/1743\text{ cm}^{-1}$, κορυφές που δεν είχαν παλαιότερα ανιχνευτεί από τα πειράματα Time-Resolved Step-Scan (TRS²-FTIR),²⁶ και με την ύπαρξη αρνητικής κορυφής στους 1728 cm^{-1} , όπως παρατηρήθηκε και παλαιότερα, από τη φωτόλυση του CO. Η απουσία της κορυφής 1752 cm^{-1} στα φάσματα της ba_3 οξειδοαναγωγής σε $H_2^{18}O$ και $D_2^{16}O$ αποδίδεται στην αλλαγή της δύναμης της συνδεσιμότητας των δεσμών υδρογόνου με το w927. Επίσης, η παρουσία της αρνητικής κορυφής στους 1744 cm^{-1} αποδίδεται στην απώλεια συνδεσιμότητας με δεσμούς υδρογόνου του περιβάλλοντος w941-w946-προπιονικής ομάδας A-D372-w927 με την ανταλλαγή H/D. Οι παρατηρούμενες συχνότητες των ομάδων OH των μορίων του νερού, οι οποίες είναι στους 3640 και 3634 cm^{-1} και κατεβαίνουν στους 3630 και 3624 cm^{-1} στην παρουσία του $H_2^{18}O$ και είναι απών στην παρουσία $D_2^{16}O$, αποδίδονται στις ασθενώς δεσμευμένες με δεσμούς υδρογόνου δομές που σχηματίζονται με άλλα μόρια νερού και παρακείμενα αμινοξέα.

4.3 Πειραματικές διαδικασίες

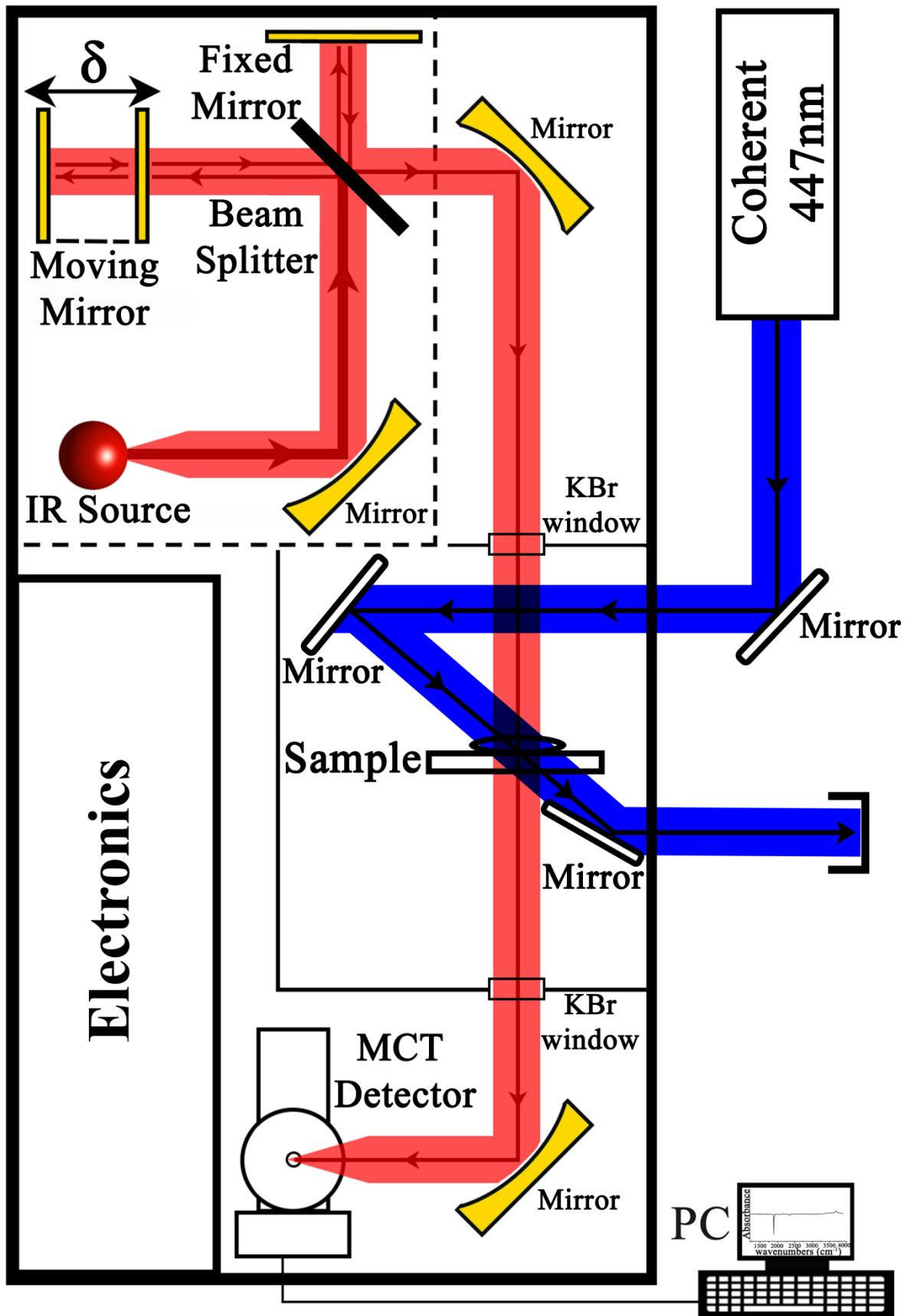
4.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Η κυτοχρωμική οξειδοαναγωγής ba_3 απομονώθηκε από τα κύτταρα του *Thermus thermophilus* HB8 σύμφωνα με τις παλαιότερες δημοσιευμένες διαδικασίες. Τα δείγματα της ba_3 τοποθετήθηκαν στο επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα HEPES [4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid] συγκέντρωσης 0.1 M , pH/pD 6.5-8.5. Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος που ετοιμάστηκε σε $D_2^{16}O$ μετρήθηκε, υποθέτοντας ότι $pD = pH(\text{observed}) + 0.4$. Για την ανταλλαγή H/D και $H_2^{16}O/H_2^{18}O$, διαλύματα του οξειδωμένου ενζύμου από 3 φορές σε 99.9% D_2O και 97% $H_2^{18}O$ αντίστοιχα. Η συγκέντρωση των προς εξέταση δειγμάτων μετρήθηκε με μετρήσεις ορατού-υπεριώδους που πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους Perkin Elmer Lambda 25, χρησιμοποιώντας $\epsilon_{416,ox} = 152\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ και ήταν $\sim 1\text{ mM}$. Η πλήρως ανηγμένη και

δεσμευμένη με CO μορφή του ενζύμου (ba_3 -CO) ετοιμάστηκε χρησιμοποιώντας ποσότητα αναγωγικού μέσου sodium dithionite ($Na_2S_2O_4$) και εκθέτοντας τα σε 1atm CO υπό αναερόβιες συνθήκες. Στη συνέχεια τα προς εξέταση δείγματα μεταφέρθηκαν σε σφραγισμένη κυψελίδα FTIR, αποτελούμενη από δύο παράθυρα CaF_2 . Η οπτική διαδρομή ήταν 6μm για τα δείγματα σε $H_2^{16}O$ και $H_2^{18}O$ και 15μm για τα δείγματα σε D_2O . Το αέριο $^{12}C^{16}O$ αποκτήθηκε από την Messer και τα D_2O και $H_2^{18}O$ από την Sigma-Aldrich.

4.3.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

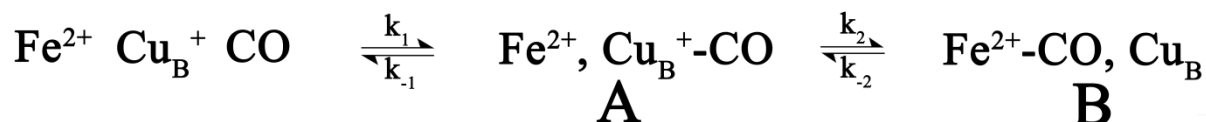
Οι FTIR μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο Bruker Vertex 70n φασματοφωτόμετρο υπερύθρου εξοπλισμένο με φωτοβολταϊκό ανιχνευτή MCT παγωμένο με υγρό άζωτο. Το συμβολόμετρο ήταν υπό κενό και ο χώρος που τοποθετήθηκαν τα δείγματα, καθαρίστηκε από τον ατμοσφαιρικό αέρα με αέριο άζωτο. Η φασματοσκοπική ανάλυση ήταν 4 cm^{-1} και η φασματική περιοχή ήταν από $1200\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε για τη διόρθωση φάσης ήταν ο Power Spectrum και η συνάρτηση αποδισμού (apodization function) ήταν η Four Point, με 32 cm^{-1} ανάλυση φάσης. Η ακτίνα φωτόλυσης στα 447 nm παραχωρήθηκε από ένα diode c.w. Coherent (CUBE) laser. Η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ήταν 40mW, που αποδίδεται σε ποσοστό φωτόλυσης 57%. Όλα τα φάσματα που θα παρουσιαστούν πιο κάτω είναι αποτέλεσμα του μέσου όρου ~3000 φωτεινών μείον σκοτεινών (*light minus dark*) μετρήσεων που λήφθηκαν στους 293K ως ακολούθως: Λήφθηκε ο μέσος όρος από 100 συμβολογραφήματα και χρησιμοποιήθηκαν ως φάσμα αναφοράς. Στη συνέχεια αφήνεται το laser να περάσει μέσα από το δείγμα και καταγράφεται ένα φωτεινό φάσμα του δείγματος (*light*) αποτελούμενο από 100 συμβολογραφήματα. Ακολούθως κλείνει το laser και καταγράφεται ένα «σκοτεινό» φάσμα δείγματος (*dark*) που χρησιμοποιήθηκε ως φάσμα βασικής γραμμής το οποίο και αφαιρέθηκε από το «φωτεινό» φάσμα (*light*). Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για 3000 φορές με σκοπό την επίτευξη μεγάλου λόγου S/N. Η συνολική χρονική διάρκεια για τη λήψη ενός τελικού φάσματος ήταν 3000 λεπτά. Στην πιο κάτω εικόνα που ακολουθεί, απεικονίζεται διαγραμματικά η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τα εν λόγω πειράματα.



Εικόνα 34. Πειραματική διάταξη πειραμάτων φωτόλυσης με laser συνεχούς κύματος (CW).

4.4 Αποτελέσματα – Συζήτηση

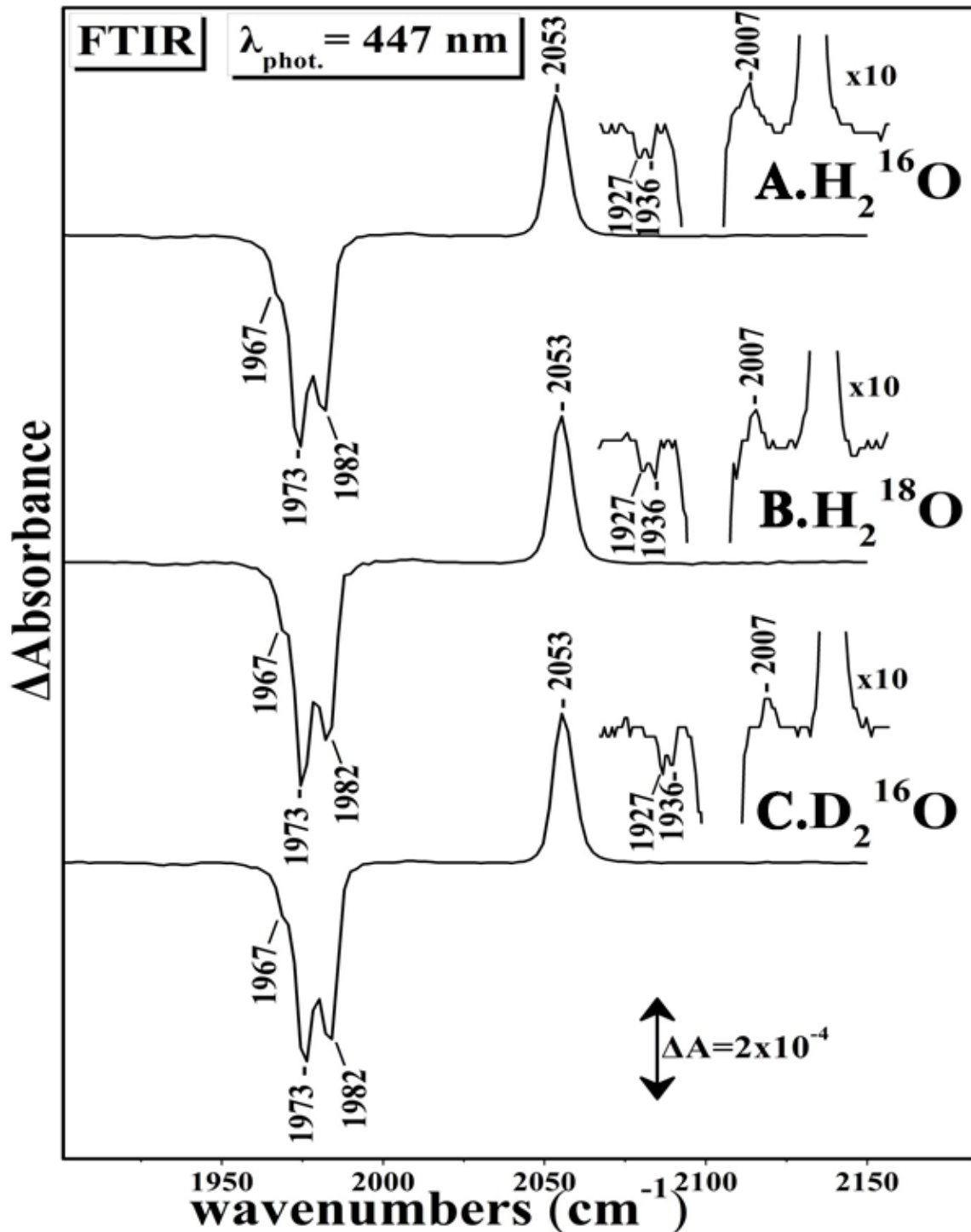
Ο μηχανισμός συναρμογής του CO στην κυτοχρωμική οξειδοαναγωγή ba_3 ακολουθεί την πορεία που απεικονίζεται στην εικόνα 35. Ο χαλκός Cu_B του κυτοχρώματος ba_3 έχει σχετικά υψηλή συγγένεια για το CO ($K_1 > 10^4$), ενώ η μεταφορά του CO στην αίμη α_3^{2+} χαρακτηρίζεται από μία μικρή σταθερά ταχύτητας $k_2 = 24.8 \text{ s}^{-1}$ ²⁹ και μία μεγάλη $k_{-2} = 0.8 \text{ s}^{-1}$. Πρέπει να αναφερθεί ότι το σύμπλοκο Cu_B^{1+} -CO (σύμπλοκο **A**) δεν είναι φωτοευαίσθητο και έτσι παραμένει απλώς θεατής στα φωτοδυναμικά γεγονότα που συμβαίνουν στο σύμπλοκο **B**.²⁰ Το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) δεσμεύεται στο πλήρως ανηγμένο κυτόχρωμα ba_3 με τρόπο που περιγράφηκε προηγουμένως, οδηγώντας σε μια αναλογία 7:3 των συμπλόκων της αίμης α_3 -CO (σύμπλοκο **B**) και του Cu_B -CO (σύμπλοκο **A**).^{19,20} Έχουμε δείξει πρόσφατα ότι οι δομικές αλλαγές που ρυθμίζουν τη θέση της αίμης α_3 -CO σε σχέση με το χαλκό δεν υφίστανται σε φαινόμενα πρωτονίωσης/αποπρωτονίωσης σε ένα ή και περισσότερα κατάλοιπα του διπυρηνικού κέντρου, έτσι συμπεραίνουμε ότι δεν υφίσταται καμία τοπική δομική αλλαγή εξαρτώμενη από το pH, αλλά μόνο δομικές αλλαγές κοντά στο διπυρηνικό κέντρο οι οποίες επηρεάζουν είτε τη θέση της αίμης α_3 -CO σε σχέση με το χαλκό, είτε τη θέση του χαλκού σε σχέση με την αίμη α_3 -CO.²⁰



Εικόνα 35. Μηχανισμός συναρμογής του CO στο κυτόχρωμα ba_3 .

Το φάσμα διαφοράς *light minus dark* FTIR του συμπλόκου ba_3 -¹²CO που απεικονίζεται στην εικόνα 33 (A) αποτελείται από τρεις κύριες αρνητικές κορυφές στους 1967, 1973 και 1982 cm^{-1} και μια θετική κορυφή στους 2053 cm^{-1} . Οι τρεις αρνητικές κορυφές προκύπτουν από τις διαφορετικές φωτολύμενες διαμορφώσεις της αίμης α_3^{2+} -CO και η θετική κορυφή αποδίδεται στο σύμπλοκο Cu_B^{1+} -CO που βρίσκεται σε μια φωτολυτικά σταθερή κατάσταση (photosteady state). Οι μικρές αρνητικές κορυφές στους 1927 και 1936 cm^{-1} (αίμης α_3) και η μικρή θετική κορυφή στους 2007 cm^{-1} (Cu_B) αποδίδονται στα σύμπλοκα αίμης Fe -¹³CO και Cu_B -¹³CO που σχηματίζονται εξαιτίας της παρουσίας του 1.1% ¹³CO που περιέχεται στην μπουκάλια του CO λόγω της φυσικής αφθονίας (natural abundance). Τα φάσματα B και C

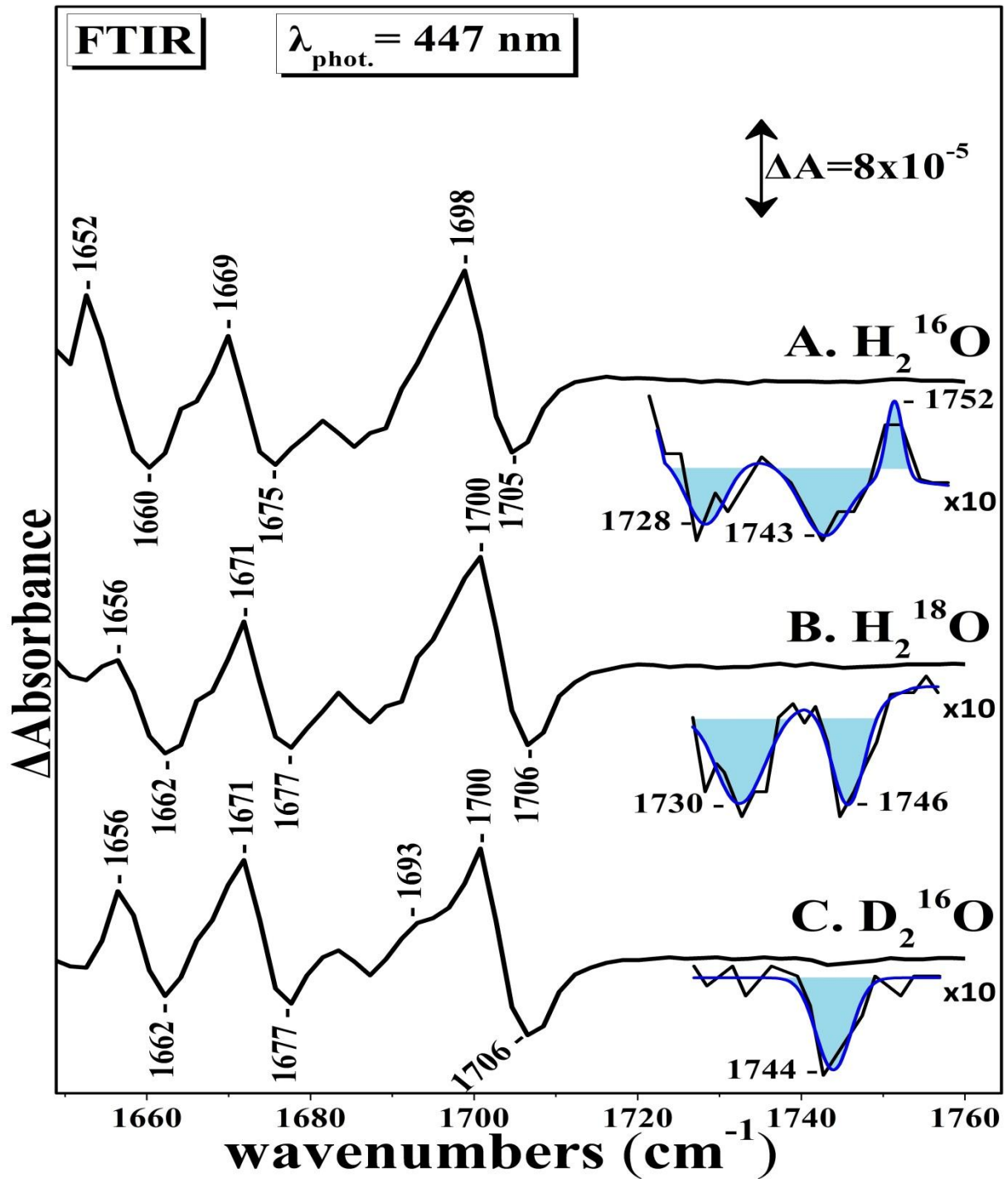
δείχνουν ότι καμία από τις παρατηρούμενες συχνότητες των Fe-CO και Cu_B-CO δεν επηρεάζονται από την παρουσία H₂¹⁸O και D₂O. Σε πολλές περιπτώσεις, όταν το σύμπλοκο μέταλλο-C-O είναι δεσμευμένο με δεσμό υδρογόνου, το εναιώρημα (suspension) σε δευτεριωμένα ρυθμιστικά διαλύματα οδηγεί σε μια αύξηση της συχνότητας του Cu_B-CO. Αυτό αποδόθηκε στη διαφορά της δύναμης του δεσμού υδρογόνου στο D₂O σε σχέση με το H₂O. Επικείμενη αλλαγή στην κατάσταση πρωτονίωσης και/ή αλληλεπίδραση δεσμού υδρογόνου μιας εκ των His υποκαταστατών θα είχε σημαντικές αλλαγές στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα και ως εκ τούτου και στη συχνότητα του ν(CO). Απεναντίας δεν παρατηρούμε καμία αλλαγή στη συχνότητα και το εύρος της κορυφής του CO και καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το περιβάλλον Cu_B-His είναι πολύ σταθερό και δεν υπόκειται σε διαμορφωτικές μεταβάσεις που να σχετίζονται με πρωτονίωση/αποπρωτονίωση και/ή απώλεια αλληλεπιδράσεων δεσμών υδρογόνου των υποκαταστατών His του Cu_B.



Εικόνα 36. «Φωτεινά» μείον «σκοτεινά» φάσματα (*light minus dark*) FTIR των δεσμευμένων με CO μορφών της πλήρως ανηγμένης ba_3 οξειδοαναγωγάσης στην φασματική περιοχή $1900\text{-}2200 \text{ cm}^{-1}$ στον ενδεδειγμένο διαλύτη. Κάθε φάσμα είναι ο μέσος όρος 3000 επιμέρους φασμάτων. Η φασματική ανάλυση είναι 4 cm^{-1} . Το μήκος κύματος της φωτόλυσης ήταν 447 nm . Τα ένθετα δείχνουν τα σύμπλοκα αίμης $\text{Fe-}^{13}\text{CO}$ και $\text{Cu}_B\text{-}^{13}\text{CO}$ της φυσικής αφθονίας.

Αλλαγές στην ένταση και τη συχνότητα των πλευρικών αλυσίδων και τη δομή του σκελετού έχουν παρατηρηθεί στα FTIR φάσματα διαφοράς της ba_3 οξειδοαναγωγής, ως αποτέλεσμα της διαταραχής που δημιουργείται από τη φωτοδιάσπαση του CO που βρίσκεται δεσμευμένο στο σίδηρο της αίμης και την απευθείας προσαρμογής του στον Cu_B .²⁰ Στα FTIR φάσματα διαφοράς της φωτόλυσης του CO από το σίδηρο της αίμης, η εμφάνιση μιας αρνητικής κορυφής στην περιοχή 1700 cm^{-1} (πρωτονιωμένο καρβοξυλικό οξύ), έχει ερμηνευτεί ως εξαιτίας της αποπρωτονίωσης μιας καρβοξυλομάδας.²⁶ Βασιζόμενοι στα TRS²-FTIR πειράματα, η ανίχνευση της πρωτονιωμένης και της αποπρωτονιωμένης μορφής της προπιονικής ομάδας A της αίμης a_3 και του D372 και η εξάρτηση των πρωτονιωμένων μορφών τους από το τοπικό περιβάλλον, υποδεικνύει μια πρωτονική συνδεσιμότητα μεταξύ της προπιονικής ομάδας A της αίμης a_3 , του D372 και του w941 που παρουσιάζεται σε όλες τις γνωστές δομικά αιμο-χαλκο-οξειδάσες.²⁶ Η βελτιστοποιημένη αναλογία σήματος – θορύβου στη φασματική ανάλυση 4 cm^{-1} της παρούσας δουλειάς αποκάλυψε την παρουσία των $1752/1743\text{ cm}^{-1}$ και 1728 cm^{-1} που αποδίδονται στη $\nu(\text{COO}(\text{H}))$ των δύο διαμορφώσεων του πρωτονιωμένου D372. Μια αλλαγή στο τοπικό περιβάλλον που επηρεάζει το ζευγάρι $1752/1743\text{ cm}^{-1}$, παρατηρείται στο φάσμα διαφοράς ως διπλός λοβός με ίσα θετικά και αρνητικά συστατικά. Η 1728 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί σε διαταράξεις του τοπικού περιβάλλοντος που έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή στην ένταση της πρωτονιωμένης μορφής ή της αποπρωτονιωμένης μορφής αν μια θετική κορυφή γύρω στους 1450 cm^{-1} παρατηρηθεί ταυτόχρονα με την αρνητική κορυφή στους 1728 cm^{-1} . Απεναντίας, δεν είναι σίγουρο ότι οι θετικές κορυφές που παρατηρούνται γύρω στους 1450 cm^{-1} είναι εξαιτίας της αποπρωτονιωμένης μορφής του D372. Η απουσία της κορυφής 1752 cm^{-1} στο φάσμα του H_2^{18}O είναι δυνατή ένδειξη ότι το w927 είναι ανταλλάξιμο και η ανταλλαγή από H_2^{16}O σε H_2^{18}O προκάλεσε διαταραχή στην σύνδεση με δεσμούς υδρογόνου της περιοχής D372-Προπιονικής ομάδας A-His376 προκαλώντας αποπρωτονίωση, όπως υποδεικνύεται από την παρουσία της αρνητικής κορυφής του D372 στους 1746 cm^{-1} . Η αποπρωτονιωμένη μορφή που παρατηρείται στους 1730 cm^{-1} στο φάσμα H_2^{18}O διαταράσσεται ελαφρώς από την ανταλλαγή H_2^{16}O σε H_2^{18}O . Η αύξηση ή μείωση της συχνότητας του C=O εξαρτάται από το τοπικό περιβάλλον. Αν η αλληλεπίδραση του δεσμού υδρογόνου του καρβονυλίου του D372 αντικατασταθεί από το C=O \cdots D-A χωρίς αλλαγή στην απόσταση του C-A, η συχνότητα έκτασης του C=O θα ήταν μεγαλύτερη στο D_2O από ότι στο H_2^{16}O εξαιτίας των ασθενέστερων δεσμών υδρογόνου στη δευτεριωμένη μορφή λόγω της ενέργειας zero-point του δεσμού H(D)-A. Τουναντίον, η συνεισφορά της ομάδας του OH του COOH μειώνει τη

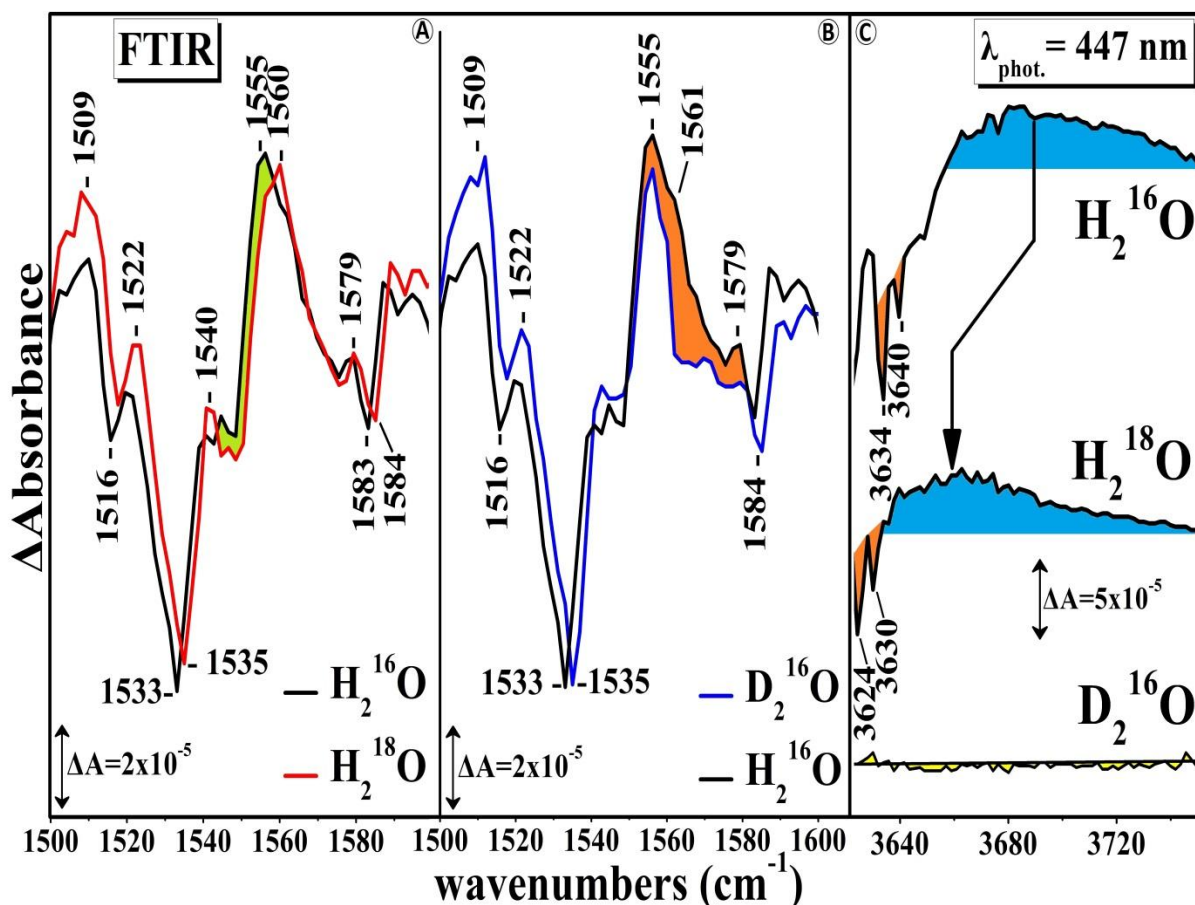
συχνότητα έκτασης του C=O στο D₂O σε σύγκριση με το H₂O. Στα δείγματα D₂O η απώλεια της συνδεσιμότητας με δεσμούς υδρογόνου στο τοπικό περιβάλλον του w941-w946-προπιονική ομάδα A-D372-w927 με την ανταλλαγή H/D, υποδεικνύει ισχυρά ότι η θέση στην οποία βρίσκεται το D372 επηρεάζεται από την ανταλλαγή του διαλύτη H₂¹⁶O/H₂¹⁸O/D₂O. Από την άλλη, η εμφάνιση των κορυφών 1698/1705 cm⁻¹ ως θετική/αρνητική και η επακόλουθη μείωση του εύρους της αρνητικής κορυφής, όπως και η εμφάνιση ενός ώμου στους 1693 cm⁻¹ από την ανταλλαγή H/D είναι παρόμοια σε αυτά που παρατηρήθηκαν στα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (TRS²-FTIR) από τα οποία βγήκε το συμπέρασμα ότι οι προπιονικές ομάδες της αίμης είναι ουσιαστικά πρωτονιωμένες.²⁶ Οι ισοτοπικές ευαισθησίες των δονήσεων της προπιονικής ομάδας A, αποδίδονται στα ανταλλάξιμα πρωτόνια που βρίσκονται στην καρβοξυλομάδα της προπιονικής ομάδας A και στα μόρια νερού w941, w946 και /ή στο D372 που σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με αυτά. Στην κυτοχρωμική οξειδοαναγωγή *ba₃*, η προπιονική ομάδα A είναι δεσμευμένη με δεσμούς με την His376, το D372 καθώς και τα μόρια w941 και w946. Στην οικογένεια B των χαλκοξειδοαναγωγάσεων που συμπεριλαμβάνεται και η κυτοχρωμική οξειδοαναγωγή *ba₃* από το βακτήριο *Thermus thermophilus*, απαντάται η H376. Τα κατάλοιπα H376 και D372, απαντώνται επίσης και στις οξειδοαναγωγάσεις της οικογένειας A, όπως η *aa₃* από το βακτήριο *P. denitrificans* (Εικόνα 37).⁴



Εικόνα 37. Φωτεινά μείον σκοτεινά (*Light minus dark*) FTIR φάσματα της δεσμευμένης με CO πλήρως ανηγμένης μορφής της κυτοχρωμικής οξειδοαναγωγάσης ba_3 στην φασματική περιοχή $1600\text{-}1700\text{cm}^{-1}$ στον αντίστοιχο διαλύτη. Κάθε φάσμα είναι ο μέσος όρος 3000 επιμέρους φασμάτων. Η φασματική ανάλυση είναι 4 cm^{-1} . Το μήκος κύματος της φωτόλυσης ήταν 447 nm . Τα ένθετα δείχνουν την περιοχή των δονήσεων έκτασης των καρβοξυλίων (μαύρο) προσαρμοσμένων με εξίσωση Gaussian (μπλέ).

Στην εικόνα 38A απεικονίζεται μια σύγκριση των φασμάτων με διαλύτη H₂O με αυτών με διαλύτη H₂¹⁸O στην οποία φαίνεται ξεκάθαρα μια αύξηση των 5 cm⁻¹ της προσδιορισμένης από τα TRS²-FTIR φάσματα της αποπρωτονιωμένης μορφής της προπιονικής ομάδας A της αίμης a₃, ν(COO⁻)^{asym}, που βρίσκεται στους 1555 cm⁻¹. Οι υπόλοιπες κορυφές, θετικές και αρνητικές, στα φάσματα H₂O/ H₂¹⁸O είναι παρόμοιες μεταξύ τους και δεν παρουσιάζουν καμία ευαισθησία στην αλλαγή του διαλύτη. Η εικόνα 38B δείχνει ότι η ν(COO⁻)^{asym} έχει μειωμένη φασματική συνεισφορά σε κυματάρθιμους μεγαλύτερους από τους 1555 cm⁻¹ στην παρουσία του D₂O ενώ οι υπόλοιπες κορυφές, θετικές και αρνητικές, στην περιοχή των 1500-1600 cm⁻¹ παραμένουν ανεπηρέαστες από την ανταλλαγή H₂O/ D₂O. Στην εικόνα 38C απεικονίζονται τα αντίστοιχα δεδομένα στην περιοχή 3600-3740 cm⁻¹. Οι υδροξυλομάδες των μορίων νερού που δεν συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου, παρουσιάζουν δονήσεις έκτασης υδροξυλίου μιας κινούμενης ομάδας (dangling group), παρουσιάζοντας δονήσεις σε υψηλότερες συχνότητες από τις παρατηρούμενες στην υγρή μορφή του νερού, εξαιτίας του απών ή ασθενή δεσμού υδρογόνου. Η ασύμμετρη δόνηση έκτασης, ν_{as}(OH), των ελευθέρων ή δεσμευμένων με ασθενείς δεσμούς υδρογόνου μορίων νερού, είναι στενότερη (narrowed) και η ν_{as} βρίσκεται στην περιοχή των 3550-3650 cm⁻¹, περιοχή που βρίσκεται εκτός της περιοχής 3200-3500 cm⁻¹ του νερού. Υπάρχουν δύο δονήσεις έκτασης των ελεύθερων υδροξυλίων στην ba₃ οξειδοαναγωγή στους 3640 και 3634 cm⁻¹. Αυτές οι κορυφές μετατοπίζονται στους 3630 και 3624 cm⁻¹ στα light minus dark FTIR φάσματα της ανταλλαγής H₂¹⁶O/ H₂¹⁸O και είναι απών, όπως αναμενόταν, στο φάσμα του D₂O. Η ιστοτοπική μετατόπιση των 10 cm⁻¹ είναι πλησίον της αναμενόμενης της ν_{as} για το OH μιας κινούμενης ομάδας νερού (dangling water group). Μόρια νερού δεσμευμένα με ασθενείς δεσμούς υδρογόνου με ν(OH) στην φασματική περιοχή 3600-3670 cm⁻¹, έχουν παρατηρηθεί και στη βοδινή αλλά και στη βακτηριακή (*P. denitrificans*) αιμοχαλκοξειδάση.²⁷ Τα ιόντα υδρογόνου (H⁺) κινούνται μέσω του νερού βάση του μηχανισμού Grotthuss, κατά τον οποίο οι δεσμοί υδρογόνου και οι ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ των μορίων του νερού, σπάζουν και επαναδημιουργούνται.²⁸ Μόρια νερού μαζί με καρβοξυλικά οξυγόνα των αμινοξικών κατάλοιπων μπορούν να αποτελέσουν μια πενταγωνική δομή, η οποία είναι μια τυπική, χαμηλότερης ενέργειας διαμόρφωση του νερού, γνωστή και ως κυκλικό πενταμερές του νερού. Αν η διαμόρφωση των μορίων νερού με τις πλευρικές αλυσίδες στις εσωτερικές κοιλότητες νερού στην ba₃ οξειδάση ακολουθούν τη διαμετατροπή μεταξύ του ιόντος hydronium (H₃O)⁺ δεσμευμένο με τρία μόρια νερού, γνωστό ως σύμπλοκο Eigen,²⁸ και τη διακύμανση ενός πρωτονίου μεταξύ δύο μορίων νερού (H₂O...H⁺...OH₂), γνωστό και ως

κατιόν Zundel,²⁸ που έχει ως αποτέλεσμα την δικτυωμένη μετακίνηση των πρωτονίων, παραμένει άγνωστο. Η διαδρομή που ακολουθεί ένας υποκαταστάτης από την περιοχή του διπυρηνικού κέντρου σε μια περιοχή στην οποία προσδένει ο υποκαταστάτης κοντά στο σύμπλεγμα προπιονική ομάδα A-D372 έχει εντοπιστεί από τα πειράματα χρονικής ανάλυσης φασματοσκοπίας υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier (TRIS²-FTIR) και από τα πειράματα ανταλλαγής H₂¹⁶O/ H₂¹⁸O/D₂O που παρουσιάζονται εδώ, δείχνοντας ότι το νερό μπορεί να έχει πρόσβαση στην περιοχή w941-w946-προπιονική ομάδα A-D372-w927-H376 από την εξωτερική, θετική πλευρά της μεμβράνης, την οφθαλμοφανή ισορροπία μεταξύ του διαλύτη και της «δεξαμενής» νερού, τη διαδρομή για την ανταλλαγή, καθώς και η διαδρομή εξόδου των προϊόντων, μπορούν να προσδιοριστούν με περισσότερη σιγουριά. Επίσης είναι κατανοητό ότι η διαδρομή του νερού λαμβάνει μέρος και στην μεταφορά πρωτονίων.



Εικόνα 38. «Φωτεινά» μείον «σκοτεινά» (*Light minus dark*) FTIR φάσματα της δεσμευμένης με CO πλήρως ανηγμένης μορφής της κυτοχρωμικής οξειδοαναγωγάσης *ba₃* στις φασματικές περιοχές 1500-1600 cm⁻¹ και 3600-3760 cm⁻¹ στον αντίστοιχο διαλύτη. Κάθε φάσμα είναι ο μέσος όρος 3000 επιμέρους φασμάτων. Η φασματική ανάλυση είναι 4 cm⁻¹. Το μήκος κύματος της φωτόλυσης ήταν 447 nm.

Το πρώτο βήμα στην εύρεση πιθανών περιοχών της κίνησης πρωτονίων απαιτεί την ταυτοποίηση των ασταθών πρωτονίων που μπορούν είτε να έχουν σχέση με την κατάσταση οξείδωσης, είτε να διαταράσσονται από την κίνηση του υποκαταστάτη, που σε αυτή την περίπτωση είναι το CO που δεσμεύεται από την αίμη a_3 στο Cu_B. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται εδώ, υποδεικνύουν την ύπαρξη τέτοιων πρωτονίων. Κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου των αιμοχαλκοξειδάσεων, τέσσερα χημικά πρωτόνια λαμβάνονται από την αρνητική πλευρά (**N**-side) της μεμβράνης και χρησιμοποιούνται για την αναγωγή του οξυγόνου σε νερό και ταυτόχρονα τέσσερα πρωτόνια (pumped protons) αντλούνται από κατά μήκος της μεμβράνης από την αρνητική της πλευρά στη θετική της πλευρά (**P**-side). Η ανίχνευση του H₂¹⁷O ως προϊόν της αντίδρασης κυτοχρωμικής οξειδάσης/O₂ κοντά στην περιοχή της H376 που περιλαμβάνει αρκετά, ανιχνευμένα κρυσταλλογραφικά, μόρια νερού που βρίσκονται πάνω από το διπυρηνικό κέντρο αίμης a_3 -Cu_B, υποδεικνύει ένα συγκεκριμένο κανάλι εξόδου των H⁺/H₂O. Πρέπει να σημειωθεί ότι μέσα σε υδρόφοβες κοιλότητες, η κινητικότητα των μορίων νερού τα καθιστά μη ανιχνεύσιμα με την X-ray κρυσταλλογραφία. Η ικανότητα του διαλύτη H₂¹⁸O και D₂O να εισέλθει στην περιοχή προπιονικής ομάδας A-D372 επιδεικνύεται από την επαγόμενη διαταραχή των συχνοτήτων της προπιονικής ομάδας A και του D372. Έτσι οποιοδήποτε ασταθές μόριο νερού που δεσμεύεται στην περιοχή προπιονικής ομάδας A-D372 πρέπει να έχει εισέλθει άμεσα από την επιφάνεια που έχει πρόσβαση στο διαλύτη. Αν τα νερά είχαν ακολουθήσει εναλλακτικές διαδρομές που δεν περνούν από την περιοχή D372-w927-H376, όπως το κανάλι οξυγόνου που περνά μέσω των υποκαταστατών του χαλκού, Cu_B-His, θα παρατηρούσαμε μια ευαισθησία στη συχνότητα ν(CO) του Cu_B. Αντιθέτως, τέτοιο φαινόμενο δεν υφίσταται. Παρατηρήθηκε ότι παρόλο που η H283 είναι συνδεδεμένη με δεσμό υδρογόνου με το w941, η ανταλλαγή H₂¹⁶O/H₂¹⁸O/D₂O δεν επηρέασε την αλληλεπίδραση της H283 με το w941. Η ba_3 αιμοχαλκοξειδάση δεν έχει την περιοχή του Mg, όπως πολλά άλλα μέλη της οικογένειας των αιμοχαλκοξειδάσεων, στην οποία η H376 συναρμόζεται με το μέταλλο, πράγμα που υποδεικνύει ότι το μέταλλο δεν είναι απαραίτητο για τη λειτουργία των αιμοχαλκοξειδάσεων. Η πρόσβαση του H₂¹⁸O από τη θετική εξωτερική επιφάνεια (**P**-side) εγείρει την πιθανότητα μιας διαρροής πρωτονίων προς τα πίσω, από την εξωτερική πλευρά στο ενεργό κέντρο, παρακάμπτοντας αποτελεσματικά την αντλία. Στην απουσία του Mg, η H376 μπορεί να παρεμποδίσει την προς τα πίσω διαρροή των πρωτονίων, λειτουργώντας ως βαλβίδα που διευκολύνει ή παρεμποδίζει τη μεταφορά πρωτονίων. Επιπρόσθετα, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το κανάλι εξόδου νερού/διαρροής προς τα πίσω δεν απαιτεί συντονισμό του υποκαταστάτη (H₂O) με μέταλλο

πριν από την ελευθέρωση του. Μια τέτοια εμπλοκή της H376 που λειτουργεί ως ρυθμιστική βαλβίδα του pK_a υποστηρίζεται από πρόσφατες QM/MM προσομοιώσεις. Το κανάλι από την H376 στο διαλύτη (bulk phase) είναι μέσω μιας πιο υδρόφιλης περιοχής της πρωτεΐνης. Εισηγείται ότι τα w941/w946 συνδεδεμένα με την πρωτονιωμένη προπιονική ομάδα A-H⁺ μπορούν να λειτουργήσουν ως ένα κατιόν Zundel που σχηματίζει την περιοχή φόρτωσης των πρωτονίων (εικόνα 33). Στην υδρόφιλη περιοχή απόθεσης πρωτονίου/νερού που ελέγχεται από τη δυναμική της H376, το πρωτόνιο μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ των μορφών Zundel και Eigen (n=3).²⁸

Μια από τις ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων ομάδων στις αιμοχαλκοξειδάσες είναι αυτή μεταξύ της προπιονικής ομάδας A και του D372 αφού τα δύο καρβοξύλια βρίσκονται μόνο 3.3Å μακριά.²⁶ Σε μια φωτοσταθερή κατάσταση (photosteady state) με CW laser 447 nm, η δόνηση έκτασης του C-O εξαιτίας της αίμης a_3^{2+} CO και του $Cu_B^{1+}CO$, είναι σταθερές σε H₂¹⁶O, H₂¹⁸O και D₂O επιδεικνύοντας έτσι την έλλειψη αλληλεπιδράσεων μεταξύ του διπυρηνικού κέντρου και των ιστιδίνων υποκαταστατών του Cu_B με τα μόρια νερού. Στην απουσία των μορίων νερού από το διπυρηνικό κέντρο συμπεραίνουμε ότι δεν είναι απαραίτητο το διπυρηνικό κέντρο να είναι φορτωμένο με πρωτόνια πριν από την αναγωγή του O₂ και από την παρουσία μορίων νερού στην προπιονική ομάδα της αίμης μπορούμε να πούμε ότι η περιοχή φόρτωσης των πρωτονίων βρίσκεται στην περιοχή προπιονικής ομάδας A της αίμης a_3 -w946-w941-D372-H376. Στην παρουσία H₂¹⁸O, η συνδεσιμότητα με δεσμούς υδρογόνου του D372 διαταράσσεται και αποπρωτονιώνεται. Στο D₂O οι αρνητικές κορυφές συγχωνεύονται σε μια κορυφή στους 1744 cm⁻¹, δείχνοντας έτσι την επίδραση που έχει η ανταλλαγή του D₂O στις δονητικές ιδιότητες του D372. Η πρωτονιωμένη προπιονική ομάδα A της αίμης a_3 που παρατηρείται ως θετική/αρνητική κορυφή στους 1698/1705 cm⁻¹ δεν επηρεάζεται από την παρουσία του H₂¹⁸O αλλά μετατοπίζεται προς τα κάτω, στους 1693/1706 cm⁻¹ στην παρουσία D₂O. Η διαδοχική ή συντονισμένη συνδεσιμότητα μεταξύ των περιβαλλόντων που ανιχνεύεται από το D372, την προπιονική ομάδα A της αίμης a_3 και τα μόρια νερού w941, w946 και w927 εξηγείται ικανοποιητικά από τις φασματικές αλλαγές που γίνονται στην $\nu(COO)^{asym}$ στην παρουσία H₂¹⁸O και D₂O. Παρόλο που ο μηχανισμός με τον οποίο γίνεται η κίνηση των πρωτονίων και η άντληση τους παραμένει άγνωστος εξαιτίας της δυσκολίας που παρουσιάζεται στην ανίχνευση της κίνησης των πρωτονίων μέσα στη μεμβρανική πρωτεϊνική μήτρα, η ανίχνευση των δύο ευαίσθητων στο H₂¹⁸O κορυφών στους 3640 και 3634 cm⁻¹ είναι

μια πειραματική απόδειξη της ύπαρξης μορίων νερού δεσμευμένων με ασθενείς δεσμούς υδρογόνου.

4.5 Συμπεράσματα

Η πειραματική παρατήρηση της υποτιθέμενης περιοχής δέσμησης των υποκαταστατών στην οποία το CO ήταν «εγκλωβισμένο» (docked) κοντά στην περιοχή της προπιονικής ομάδας A-w941-w946-D372 χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των καναλιών εισόδου και εξόδου των υποκαταστατών.²² Η επαναδέσμηση του CO από την περιοχή εγκλωβισμού (docking site) στην αίμη a_3 , ερμηνεύτηκε ως έλλειψη μεγάλης κλίμακας διακυμάνσεις στις χρονικές κλίμακες από νανοδευτερόλεπτα (ns) σε μικροδευτερόλεπτα (μ s) που ανοίγει τα κανάλια εξόδου από τα οποία μεταναστεύουν οι υποκαταστάτες σε άλλες εσωτερικές κοιλότητες από τις οποίες τελικά διαφεύγουν από την πρωτεΐνη. Προφανώς, στην κυτοχρωμική οξειδοαναγωγή ba_3 οι πρωτεϊνικές διακυμάνσεις δεν ακολουθούνται από τη δημιουργία νέων δευτερευόντων περιοχών δέσμησης και/ή κανάλια από τα οποία οι υποκαταστάτες απομακρύνονται χωρίς την παρουσία κατάλοιπων κλειδιά κοντά στην περιοχή της προπιονικής ομάδας A-w941-w946-D372 που λειτουργεί ως βαλβίδα επιτρέποντας στους υποκαταστάτες από την δευτερεύουσα περιοχή δέσμησης ή την περιοχή φόρτωσης να διαφύγουν.¹⁰ Η ταυτοποίηση του καναλιού πρωτονίων που αναφέρεται εδώ, υποδεικνύει τη διαδρομή που ενώνει την περιοχή δέσμησης και την δευτερεύουσα περιοχή δέσμησης. Προτείνεται ότι το κανάλι αυτό οδηγεί στη διαφυγή των πρωτονίων και των μορίων νερού. Σε συμφωνία με τις υπολογιστικές μελέτες, προτείνεται ότι η His376 μπορεί να λειτουργεί ως ένα κατάλοιπο κλειδί που συνδέει την περιοχή φόρτωσης με την περιοχή απελευθέρωσης⁴ (Εικόνα 32).

4.6 Παραπομπές

1. P. Brzezinski and R. B. Gennis, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2008, **40**, 521.
2. M. Wikstrom, C. Ribacka, M. Molin, L. Laakkonen, M. Verkhovsky and A. Puustinen, 2005, **102**, 10478.
3. B. Schmidt, J. McCracken and S. Ferguson-Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, **100**, 15539.

4. H.-Y. Chang, S. Choi, A. S. Vakkasoglou, Y. Chen, J. Hemp, J. A. Fee and R. B. Gennis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, **109**, 5259–5264.
5. F. L. Sousa, A. F. Verissimo, A. M. Baptista, T. Soulimane, M. Teixeira and M. M. Pereira, *Biophys. J.*, 2008, **94**, 2434.
6. A. Giuffre, G. Stubauer, P. Sarti, M. Brunori, W. G. Zumft, G. Buse and T. Soulimane, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, **96**, 14718.
7. J. A. Fee, D. A. Case and L. Noodleman, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 15002.
8. M. Wikstrom and M. I. Verkhovsky, *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, **1767**, 1200.
9. E. Pinakoulaki, V. Daskalakis and C. Varotsis, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, 2012, **1817**, 552.
10. V. Daskalakis, S. C. Farantos, V. Guallar and C. Varotsis, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 3648.
11. K. Koutsoupakis, S. Stavrakis, T. Soulimane and C. Varotsis, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 14893.
12. T. Soulimane G. Buse, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, R. Huber and M. E. Than, *EMBO J.*, 2000, **19**, 1766.
13. E. Pinakoulaki, T. Ohta, T. Soulimane, T. Kitagawa and C. Varotsis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 15161.
14. C. Varotsis, T. Ohta, T. Kitagawa, T. Soulimane and E. Pinakoulaki, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 2210.
15. C. Koutsoupakis, O. Kolaj-Robin, T. Soulimane and C. Varotsis, *J. Biol. Chem.*, 2011, **286**, 30600.
16. T. Ohta, E. Pinakoulaki, T. Soulimane, T. Kitagawa and C. Varotsis, *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 5489.
17. E. Pinakoulaki, T. Ohta, T. Soulimane, T. Kitagawa and C. Varotsis, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 22791.
18. A. Loullis, M. R. Noor, T. Soulimane and E. Pinakoulaki, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 8955.
19. R. A. Goldbeck, O. Einarsdo'tirr, T. D. Dawes, D. B. O'Connor, K. K. Surerus, J. A. Fee and D. S. Kliger, *Biochemistry*, 1992, **31**, 9376.
20. K. Koutsoupakis, S. Stavrakis, E. Pinakoulaki, T. Soulimane and C. Varotsis, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 32860.
21. C. Koutsoupakis, T. Soulimane and C. Varotsis, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 36806.

22. C. Koutsoupakis, T. Soulimane and C. Varotsis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 14728.
23. V. R. Kaila, V. Sharma and M. Wikstrom, *Biochim. Biophys. Acta*, 2011, **1807**, 80.
24. P. E. M. Siegbagn, M. R. A. Blomberg and M. L. Blomberg, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 10946.
25. D. Heibrink, H. Sigurdson, C. Bolwien, P. Brzezinski and J. Heberle, *J. Transient Biophys. J.*, 2002, **82**, 1–10.
26. C. Koutsoupakis, T. Soulimane and C. Varotsis, *Biophys. J.*, 2004, **86**, 2438.
27. A. Marechal and P. A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, **108**, 8634.
28. S. Xantheas, *Nature*, 2009, **457**, 673.
29. C. Koutsoupakis, T. Soulimane and C. Varotsis, *J. Biol. Chem.*, 2012, **287**, 37495-37507.

5 Παρακολουθώντας την νανοδευτερολέπτων πορεία μετανάστευσης των υποκαταστατών και τη δομική ανάπαυση της πρωτεΐνης: Δομές των B₀, B₁ και B₂ ενδιάμεσων καταστάσεων

5.1 Περίληψη

Η τεχνική χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) έχει εφαρμοστεί για την παρακολούθηση του ενεργού κέντρου της δεσμευμένης με μονοξείδιο του άνθρακα, θερμόφιλης *ba₃* οξειδοαναγωγάσης καθώς αυτή εκτελεί τη λειτουργία της. Τα ns TRS²-FTIR στιγμιότυπα των φωτολυμένων αίμη *a₃* Fe-CO/Cu_B ειδών, συνέλαβαν ένα «μεταβατικό στάδιο» του οποίου οι πλευρικές αλυσίδες εμποδίζουν το φωτολυμένο CO να εισέλθει στην κοιλότητα εγκλωβισμού (docking site). Υπάρχουν τρία σετ κορυφών του «παγιδευμένου» CO που προκύπτουν από το φωτοπροϊόν του *ba₃*, με διαφορετικό προσανατολισμό και παρουσιάζουν διαφορετική κινητική. Οι τροχιές του «παγιδευμένου» CO στους 2122, 2129 και 2137 cm⁻¹ αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως B₂, B₁ και B₀ ενδιάμεσα στάδια, αντίστοιχα. Τα παρών δεδομένα υπογραμμίζουν την αναδυόμενη γενική στρατηγική των αιμοπρωτεϊνών, που λειτουργούν είτε ως καταλυτικά ένζυμα, είτε ως μεταφορείς υποκαταστατών και επίσης τη σημασία των νερών και των μηχανισμών μεταφοράς πρωτονίων στην κοιλότητα εγκλωβισμού (docking site) που είναι απαραίτητα στο αναπνευστικό ένζυμο για τη λειτουργία του ως ο κύριος ενεργειακός μετατροπέας στη βιολογία.

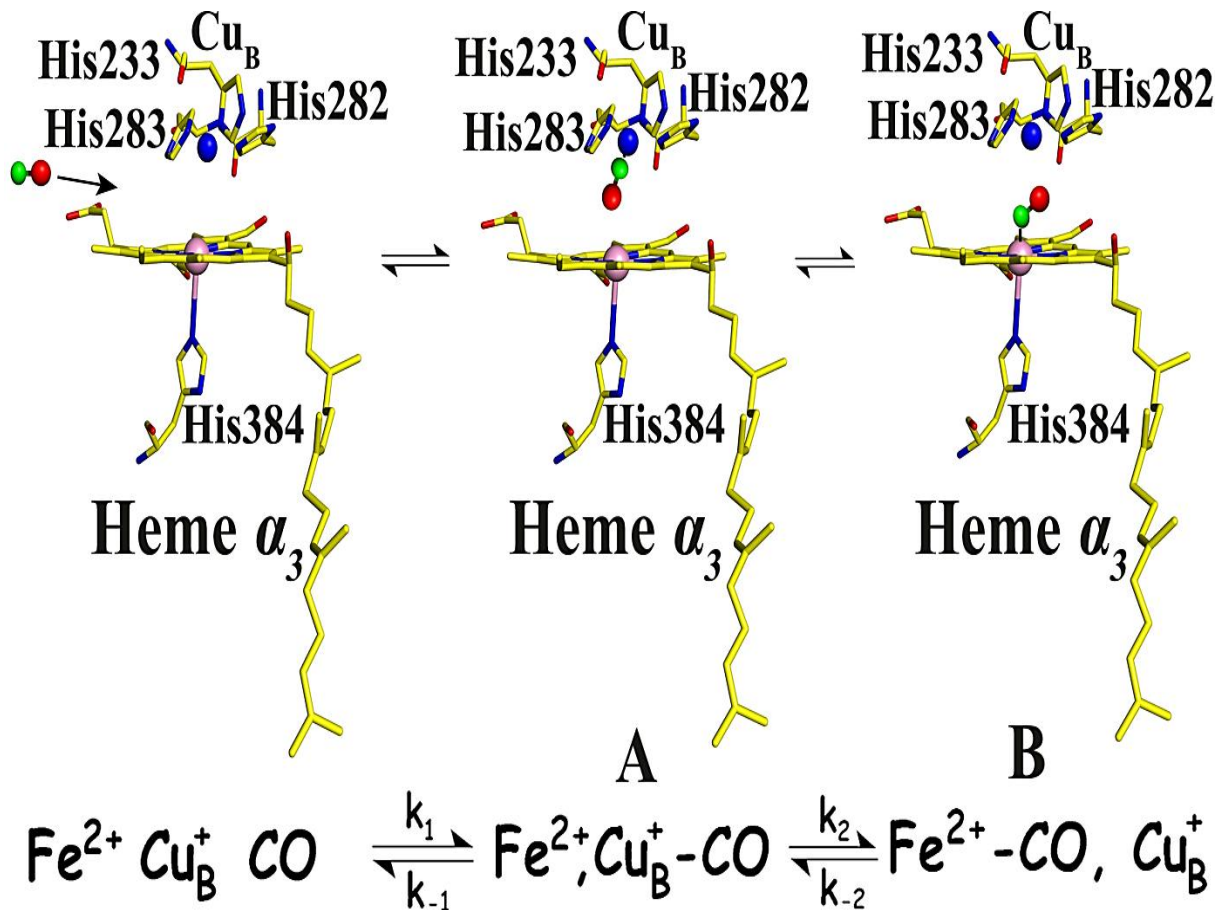
5.2 Εισαγωγή

Η χρονική εξέλιξη και οι τροχιές των ενδιάμεσων δεσμευμένων υποκαταστατών στις πρωτεΐνες και ένζυμα των οποίων η δραστηριότητα απαιτεί τη μετακίνηση των προσανατολισμένων υποκαταστατών, παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τις ιδιότητες των

περιοχών δέσμευσης και αποθήκευσης των υποκαταστατών και τη δυναμική που χρησιμοποιούν για τη διάκριση των υποκαταστατών όπως O₂, NO, NO₂ και CO. ¹⁻⁵ Η φασματοσκοπία Time-resolved FTIR παρέχει πληροφορίες για το αν οι υποκαταστάτες έχουν πρόσβαση στο ενεργό κέντρο μέσω συγκεκριμένων καναλιών/αποθηκευτικών χώρων ή με τυχαία διάχυση διαμέσου της πρωτεϊνικής μήτρας. Με αυτή την υπόθεση, μια διεισδυτική άποψη για την κίνηση των υποκαταστατών σε μυοσφαιρίνη (Mb) και αιμοσφαιρίνη (Hb) έχει δείξει απερίφραστα το σχηματισμό των ενδιάμεσων σταδίων B₁, B₂ και B₀. Η subpicosecond δυναμική του CO σε θερμοκρασία δωματίου έχει αποκαλύψει την παρουσία των φασματοσκοπικά διακριμένων ενδιάμεσων εξαιτίας του δονητικού φαινομένου Stark¹. Η διαμετατροπή μεταξύ των B₁ και B₂ σταδίων που βρίσκονται στην ίδια αποθηκευτική περιοχή απαιτεί την end-to-end περιστροφή του CO. ¹ Η διάρκεια ζωής των B-σταδίων στην Mb εξακολουθεί να υφίσταται στην χρονική κλίμακα νανοδευτερολέπτων και αποσυντίθεται ταυτόχρονα με χρόνο ημιζωής 150 ns σε θερμοκρασία δωματίου. ¹ Πειράματα χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) που να παρουσιάζουν τις τροχιές των ενδιάμεσων των δεσμευμένων υποκαταστατών στα ένζυμα δεν έχουν δημοσιευτεί ούτε σε φυσιολογικές συνθήκες αλλά ούτε και σε κρυογονικές θερμοκρασίες.

Το κυτόχρωμα *ba₃* από το βακτήριο *Thermus thermophilus* είναι ένα μέλος της μεγάλης οικογένειας των δομικά συγγενικών αιμοχαλκοξειδάσεων που κατατάσσονται στα μέλη των A-, B-, ή C- οικογενειών των οξειδοαναγωγάσεων. Είναι ένας αντιπρόσωπος της οικογένειας B και χρησιμοποιεί ένα κανάλι εισόδου πρωτονίων, ανάλογο με το κανάλι K της οικογένειας A και μεταφέρει πρωτόνια στο ενεργό κέντρο για τη χημεία του O₂ και την άντληση πρωτονίων. ⁴ Το ένζυμο περιέχει ένα ομοδιπυρηνικό κέντρο με δύο άτομα χαλκού (Cu_A), μία χαμηλού-spin αίμη *b* και ένα διπυρηνικό κέντρο που αποτελείται από την αίμη *a₃* και ένα άτομο χαλκού Cu_B. ¹² Καταλύει την 4 ηλεκτρονίων αναγωγή του O₂ σε H₂O, μετατρέποντας την ενέργεια αυτής της αντίδρασης σε μια διαμεμβρανική πρωτονιακή κινητήρια δύναμη, την 2 ηλεκτρονίων αναγωγή του NO σε N₂O και τελικά την 2 ηλεκτρονίων οξείδωση του CO σε CO₂. ⁶⁻¹⁰ Ο μηχανισμός δέσμευσης/αποδέσμευσης του CO στο κυτόχρωμα *ba₃* ακολουθεί την πορεία του διαγράμματος και απεικονίζεται στην εικόνα 39. Ο Cu_B του κυτοχρώματος *ba₃* έχει μια σχετικά υψηλή συγγένεια ως προς το CO (K₁ > 10⁴), ενώ η μεταφορά του CO στην αίμη *a₃*²⁺ χαρακτηρίζεται από μια μικρή σταθερά k₂ = 24.8 s⁻¹ ³⁰ και από την k₂ = 0.8 s⁻¹. ⁶ Το σύμπλοκο **A** δεν είναι φωτοασταθές και για το λόγο αυτό δε συμμετέχει στα φωτοδυναμικά γεγονότα, τα οποία συμβαίνουν στο σύμπλοκο **B**. ⁹⁻¹⁰ Στο τελευταίο γεγονός,

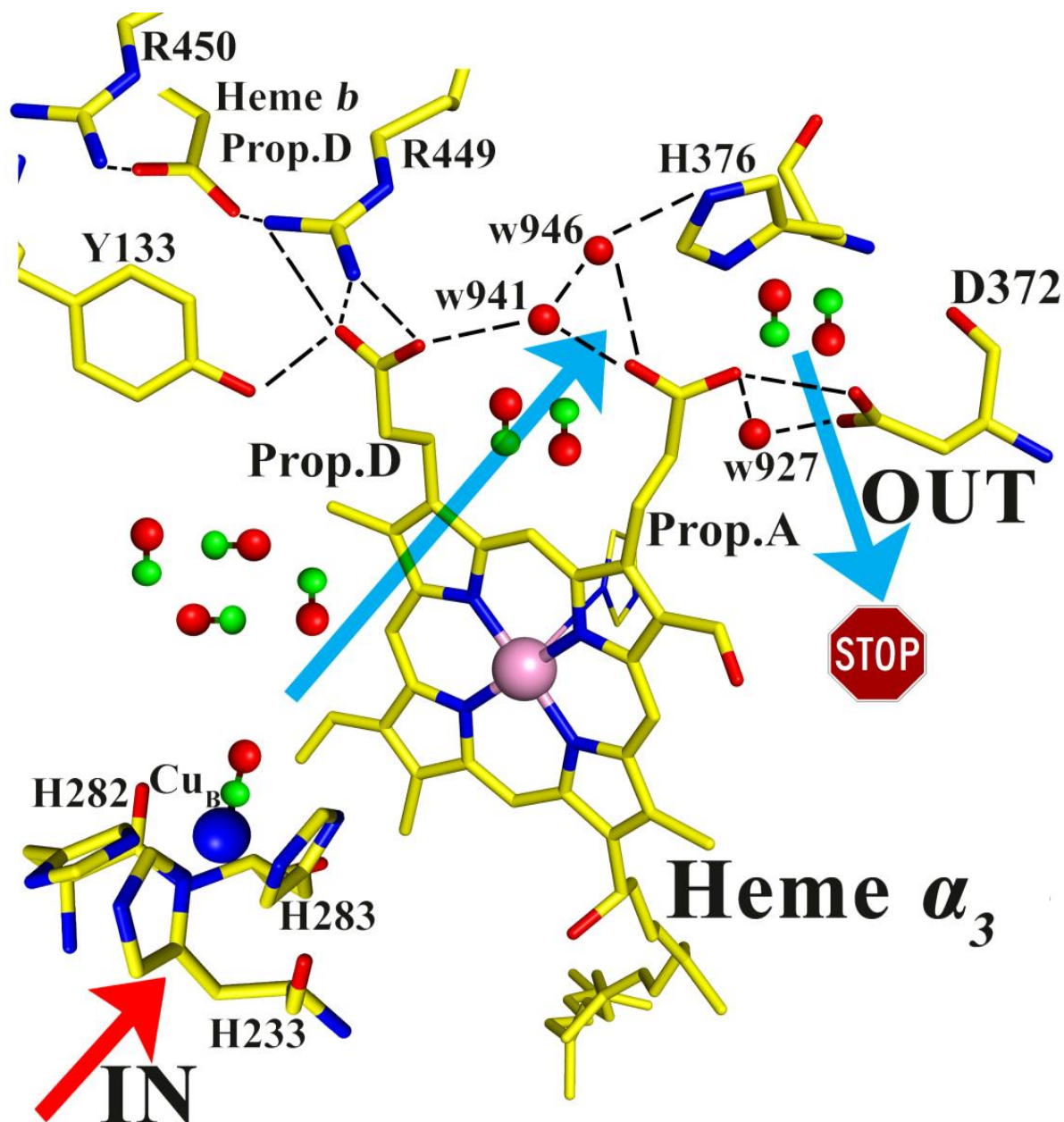
80-85 % του φωτολυμένου CO δεσμεύεται στον Cu_B ενώ το υπόλοιπο 15-20 % μεταναστεύει σε μια εξειδικευμένη αποθηκευτική κοιλότητα και ακολούθως διαχέεται στα πρωτεϊνικά κανάλια μέχρι την επαναδέσμευση του στην αίμη α₃. Ο ρυθμός διάσπασης του μεταβατικού συμπλόκου Cu_B¹⁺-CO είναι 34.3 s⁻¹ (t_{1/2} = 20.2 ms) και ο παρατηρημένος ρυθμός επαναδέσμευσης στην αίμη α₃ είναι 29.5 s⁻¹ (t_{1/2} = 23.5 ms).¹¹



Εικόνα 39. Το ενεργό κέντρο της ba₃ οξειδάσης του κυτοχρώματος c μετά τη δέσμευση του CO. Η εικόνα δείχνει το σχηματισμό του συμπλόκου A και συμπλόκου B του συμπλόκου ba₃-CO.

Το πλήρως ανηγμένο ba₃-CO σύμπλοκο **B** είναι σταθερό και ευκόλως φωτολυόμενο, πράγμα που το κάνει ένα ιδανικό μοντέλο για time-resolved φασματοσκοπικές έρευνες. Σε προηγούμενη δουλειά, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική TRS²-FTIR σε χρονική κλίμακα 10-10000 μs του πλήρως ανηγμένου ba₃-CO και ταυτοποιήθηκαν φασματοσκοπικά και κινητικά οι δύο τροχιές του CO (ν_{CO}=2131 cm⁻¹, t_d=10-35 μs και ν_{CO} =2146 cm⁻¹, t_d=85 μs).^{12,13} Η μορφή της 2131 cm⁻¹ συχνότητας του «αποθηκευμένου» CO που είναι παγιδευμένο μέσα σε

μια κοιλότητα που βρίσκεται κοντά στην προπιονική ομάδα A (Εικόνα 40) της αίμης a_3 , αντιστοιχεί στο στάδιο B_1 της Mb και η μορφή 2146 cm^{-1} στο στάδιο B_0 που παρατηρήθηκε στη Mb μόνο στους 5.5 K.¹ Η ανάλυση των δεδομένων δείχνει ξεκάθαρα την ικανότητα της περιοχής αποθήκευσης να περιορίζει τον προσανατολισμό του υποκαταστάτη και το ότι η αποδέσμευση του CO από την περιοχή αποθήκευσης δεν ακολουθείται από επαναδέσμευση στο σίδηρο της αίμης a_3 , υποδεικνύει ότι το περιβάλλον των προπιονικών ομάδων της αίμης a_3 δημιουργεί ένα μεταβατικό φράγμα το οποίο παρεμποδίζει τη διεργασία επαναδέσμευσης. Οι υπολογισμοί Quantum Mechanics/Molecular mechanics έχουν δείξει ότι σε 10 ps μετά τη φωτόλυση του συμπλόκου **B** του ba_3 -CO, το φωτολυμένο CO που δεν είναι ομοιοπολικά δεσμευμένο στο Cu_B , βρίσκεται σε μια εσωτερική κοιλότητα πάνω από την προπιονική ομάδα D της αίμης heme a_3 όταν η προπιονική ομάδα βρίσκεται στη διαμόρφωση *trans* (αποπρωτονιωμένη).¹⁴ Σε μια διαμόρφωση *cis* (πρωτονιωμένη) της προπιονικής ομάδας D, το φωτολυμένο CO βρίσκεται μεταξύ των προπιονικών ομάδων A και D και πιο κοντά στο διπυρηνικό κέντρο επιδεικνύοντας ότι από *trans* σε *cis* ισομέρεια ελέγχει τη θέση στην οποία βρίσκεται ο υποκαταστάτης μετά τη φωτόλυση από το σίδηρο της αίμης a_3 .¹⁴ Η ταυτοποίηση των ιονιζόμενων ομάδων των οποίων οι τιμές pK_a είναι κοντά στο φυσιολογικό pH είναι εξαιρετικά βοηθητική επειδή η διαμορφωτική μετάβαση με τέτοια φαινόμενα πρωτονίωσης/αποπρωτονίωσης είναι κρίσιμη για την κατανόηση της κίνησης των πρωτονίων, η οποία με τη σειρά της είναι πολύ σημαντική για τη λειτουργία των αιμοχαλκοξειδασών. Εξερευνώντας το ρόλο των εσωτερικών κοιλοτήτων στον έλεγχο της μετανάστευσης των υποκαταστατών στο σίδηρο της αίμης και/ή στο Cu_B και υπαγορεύοντας εσωτερικές διαδρομές μεταξύ των κατειλημμένων μεταβατικών αποθηκευτικών χώρων και των περιοχών δέσμευσης είναι το κλειδί για την κατανόηση της δέσμευσης και διάκρισης των υποκαταστατών. Για να απαντήσουμε σε αυτά τα ερωτήματα, χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο φωτόλυσης του CO με χρονική ανάλυση νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) για να προσδιορίσουμε τις σχετικές μορφές από την ba_3 οξειδοαναγωγή του *Thermus thermophilus*. Το ένζυμο ba_3 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για τη δυναμική των υποκαταστατών σε ένζυμο που εμπεριέχουν μέταλλα, όπως η Mb χρησιμοποιήθηκε για τις πρωτεΐνες που εμπεριέχουν αιμικό Fe εξαιτίας των πολυλειτουργικών ιδιοτήτων της.



Εικόνα 40. Η περιοχή των προπιονικών ομάδων της αίμης a_3 της ba_3 οξειδοαναγωγής από το *Thermus thermophilus* απεικονίζει τα κατάλοιπα ενδιαφέροντος. Το κόκκινο βέλος (IN) δείχνει το κανάλι της αρχικής δέσμευσης του CO στον Cu_B πριν και ακολούθως τη δέσμευση του στο σίδηρο της αίμης a_3 . Τα μπλε βέλη δείχνουν τη διαδρομή που ακολουθεί το φωτολυόμενο CO από την αίμη a_3 που βρίσκεται κοντά στην περιοχή του Cu_B (20%) στην περιοχή(ες) εγκλωβισμού (docking site(s)) στις περιοχές w941w946-H376 και προπιονική ομάδα A-w927. Το σήμα stop υποδεικνύει ότι το εγκλωβισμένο (docked) CO δε διαφεύγει στο πρωτεϊνικό περιβάλλον. Τα διατομικά μόρια που απεικονίζονται με κόκκινες και πράσινες σφαίρες απεικονίζουν τα μόρια του CO. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα PyMOL και η κρυσταλλική δομή της ba_3 οξειδοαναγωγής λήφθηκε από την τράπεζα δεδομένων πρωτεϊνών (Protein Data Bank) με κωδικό 1EHK.

5.3 Υλικά και μέθοδοι

5.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Το κυτόχρωμα ba_3 απομονώθηκε από τα κύτταρα του βακτηρίου *Thermus thermophilus* HB8 σύμφωνα με προηγούμενες δημοσιευμένες διαδικασίες. Τα προς εξέταση δείγματα ba_3 τοποθετήθηκαν σε ένα επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M pH/pD 7.0, HEPES [4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid]. Το ρυθμιστικό διάλυμα που ετοιμάστηκε σε D_2O , μετρήθηκε υποθέτοντας ότι $pD=pH(\text{observed})+0.4$. Η συγκέντρωση των δειγμάτων προσδιορίστηκε με UV-visible μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer Lambda 25 UV-Vis spectrometer, χρησιμοποιώντας $\epsilon_{416,ox}=152 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και ήταν $\sim 1.0 \text{ mM}$. Η πλήρως ανηγμένη και δεσμευμένη με CO μορφή του ενζύμου ($ba_3\text{-CO}$) ετοιμάστηκε χρησιμοποιώντας sodium dithionite ως αναγωγικό παράγοντα και εν συνεχεία εκτέθηκε σε 1atm CO κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε μια αεροστεγώς σφραγισμένη FTIR κυψελίδα αποτελούμενη από δυο παράθυρα CaF_2 . Το μήκος διαδρομής ήταν 6mm για τα δείγματα σε $H_2^{16}O$ και 15 μm για τα δείγματα σε $D_2^{16}O$. Ο συνολικός όγκος ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα ήταν $\sim 100\mu\text{l}$. Το αέριο ^{12}CO αποκτήθηκε από την Messer και τα ^{13}CO και $D_2^{16}O$ αγοράστηκαν από τη Sigma-Aldrich.

5.3.2 Τεχνική χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR)

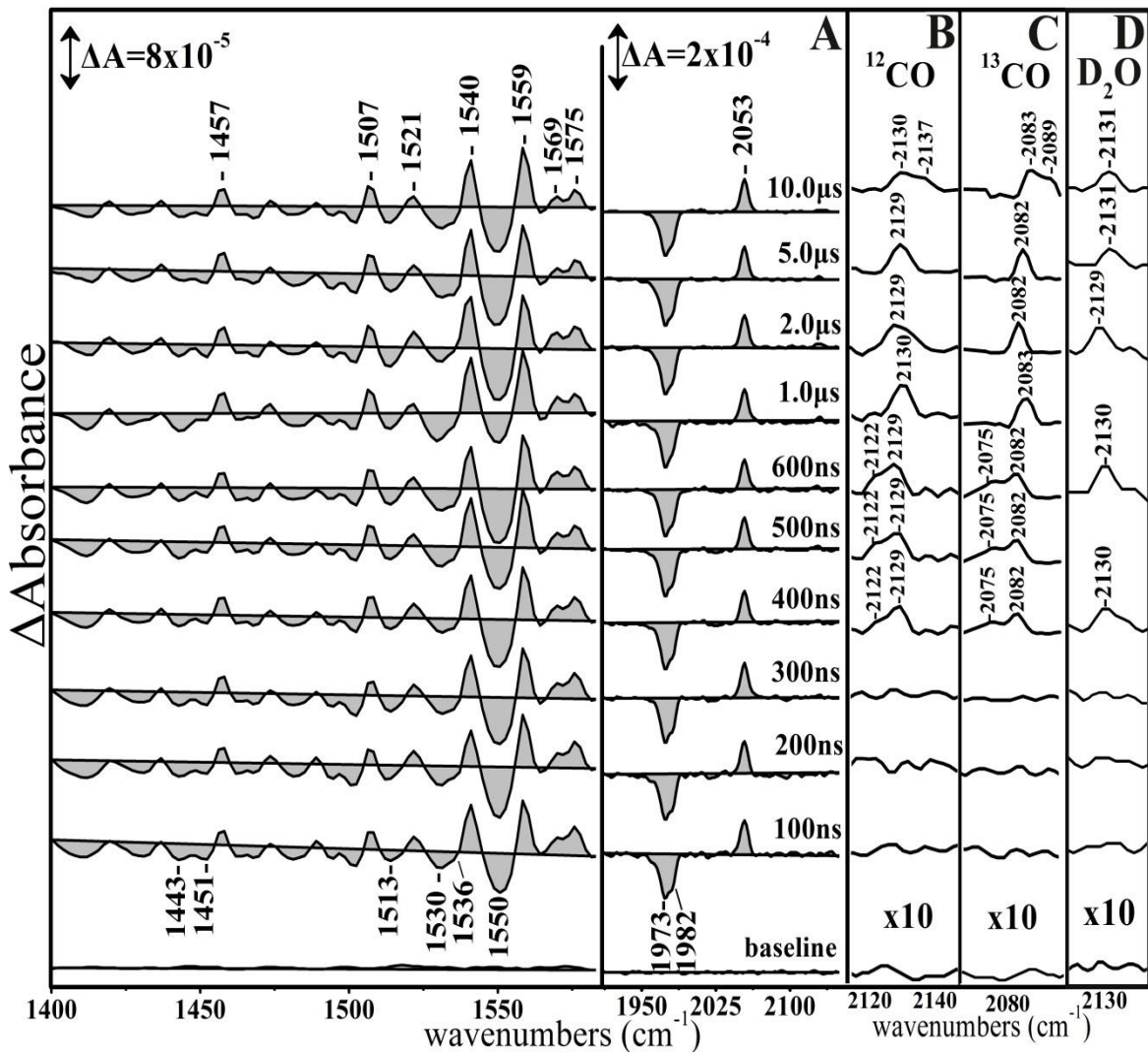
Οι μετρήσεις χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) πραγματοποιήθηκαν σε ένα φασματοφωτόμετρο Vertex 70v FTIR που αποκτήθηκε από την Bruker, εφοδιασμένο με ένα γρήγορο φωτοβολταϊκό MCT ανιχνευτή με κατώτερο όριο απόκρισης 600 cm^{-1} . Ο οπτικός πάγκος ήταν υπό κενό και ο θάλαμος δείγματος καθαρίστηκε με αέριο N_2 . Η φασματοσκοπική ανάλυση ήταν 4cm^{-1} και η χρονική ανάλυση ήταν 100ns. Η φασματική περιοχή ήταν 1200–2400 cm^{-1} και χρησιμοποιήθηκε ένα IR φίλτρο 4200nm. Ο συνολικός αριθμός των χρονικών σημείων ήταν 900, 50 από αυτά λήφθηκαν πριν την εκπυρσοκρότηση του laser και χρησιμοποιήθηκαν ως σημείο αναφοράς για την ανάλυση των δεδομένων και τα υπόλοιπα 850 χρονικά σημεία λήφθηκαν αφότου εκπυρσοκρότησε το laser. Για τη φωτόλυση του συμπλόκου της αίμης $a_3\text{-CO}$ χρησιμοποιήθηκε ένα παλμικό 532nm laser (2^η αρμονική) από ένα Continuum Minilite Nd-YAG laser (7ns πλάτος, 5-8mJ/pulse, 8Hz). Για τη μείωση της

αρχικής ενέργειας του laser (100mJ), χρησιμοποιήθηκε μια ίριδα και για την επίτευξη συνολικής διαμέτρου της ακτίνας laser 8mm πάνω στο δείγμα, χρησιμοποιήθηκε ένας συγκλίνοντας φακός (20 cm) κατά μήκος της διαδρομής της ακτίνας laser πριν αυτή εισέλθει στο θάλαμο δείγματος του φασματοφωτόμετρου. Δυο καθρέπτες (T=IR, R=532nm) χρησιμοποιήθηκαν για να κατευθύνουν την 532nm laser ακτίνα μέσα στο φασματοφωτόμετρο και διαμέσου του δείγματος. Μια γεννήτρια παλμών (Quantum composers plus Pulse delay generator, Model 9514) χρησιμοποιήθηκε για το συγχρονισμό τους φασματοφωτόμετρου υπερύθρου με το laser. Συνολικά 10 coadditions ανά σημείο καθυστέρησης έχουν πραγματοποιηθεί και συλλέχθηκαν και πάρθηκε ο μέσος όρος 35 μετρήσεων με συμβολογραφήματα single sided για τη βελτιστοποίηση της αναλογίας σήματος/θορύβου. Οι μετρήσεις AC και DC λήφθηκαν ξεχωριστά αλλά χρησιμοποιώντας το ίδιο δείγμα. Το AC σήμα πολλαπλασιάστηκε επί 2 χρησιμοποιώντας ένα ενισχυτή σήματος Model SR560 Low-Noise preamplifier (Stanford research systems). Η φάση από τις DC μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε για τη διόρθωση φάσης των AC μετρήσεων. Οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό Fourier και τη διόρθωση φάσης ήταν οι Blackman–Harris three-term apodization function με 32-cm^{-1} phase resolution και ο Mertz/No Peak search phase correction algorithm αντίστοιχα. Τα τελικά φάσματα διαφοράς προέκυψαν χρησιμοποιώντας την εξίσωση $\Delta A = -\log(I_S/I_R)$. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τα προγράμματα OriginPro 8 (OriginLab) και OPUS 7.0.

5.4 Αποτελέσματα

Η εικόνα 41A δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) ($t_d = 100\text{-}10000$ ns, 4 cm^{-1} φασματική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου $ba_3\text{-CO}$ που υπόκειται σε CO φωτόλυση από ένα 7 nanosecond 532 nm παλμό laser. Σε $t_d = 100\text{-}300$ ns οι αρνητικές κορυφές στους 1973 και 1982 cm^{-1} προκύπτουν από το φωτολυμένο σύμπλοκο αίμης $a_3\text{-CO}$ και η θετική κορυφή που εμφανίζεται στους 2053 cm^{-1} είναι αποτέλεσμα του φωτολυμένου CO που σταδιακά δεσμεύεται στο Cu_B . Δεν ανιχνεύτηκαν αλλαγές στην ένταση των κορυφών 2053 και $1973/1982\text{ cm}^{-1}$ στη χρονική κλίμακα $t_d = 100\text{-}10000$ ns υποδεικνύοντας έτσι ότι το διπυρηνικό κέντρο (αίμη $a_3/\text{Cu}_B\text{-CO}$) παραμένει θεατής στο γεγονός της φωτόλυσης που συμβαίνει σε αυτή τη χρονική κλίμακα και εφόσον η αναλογία εντάσεων $\text{Fe-CO}/\text{Cu}_B\text{-CO}$

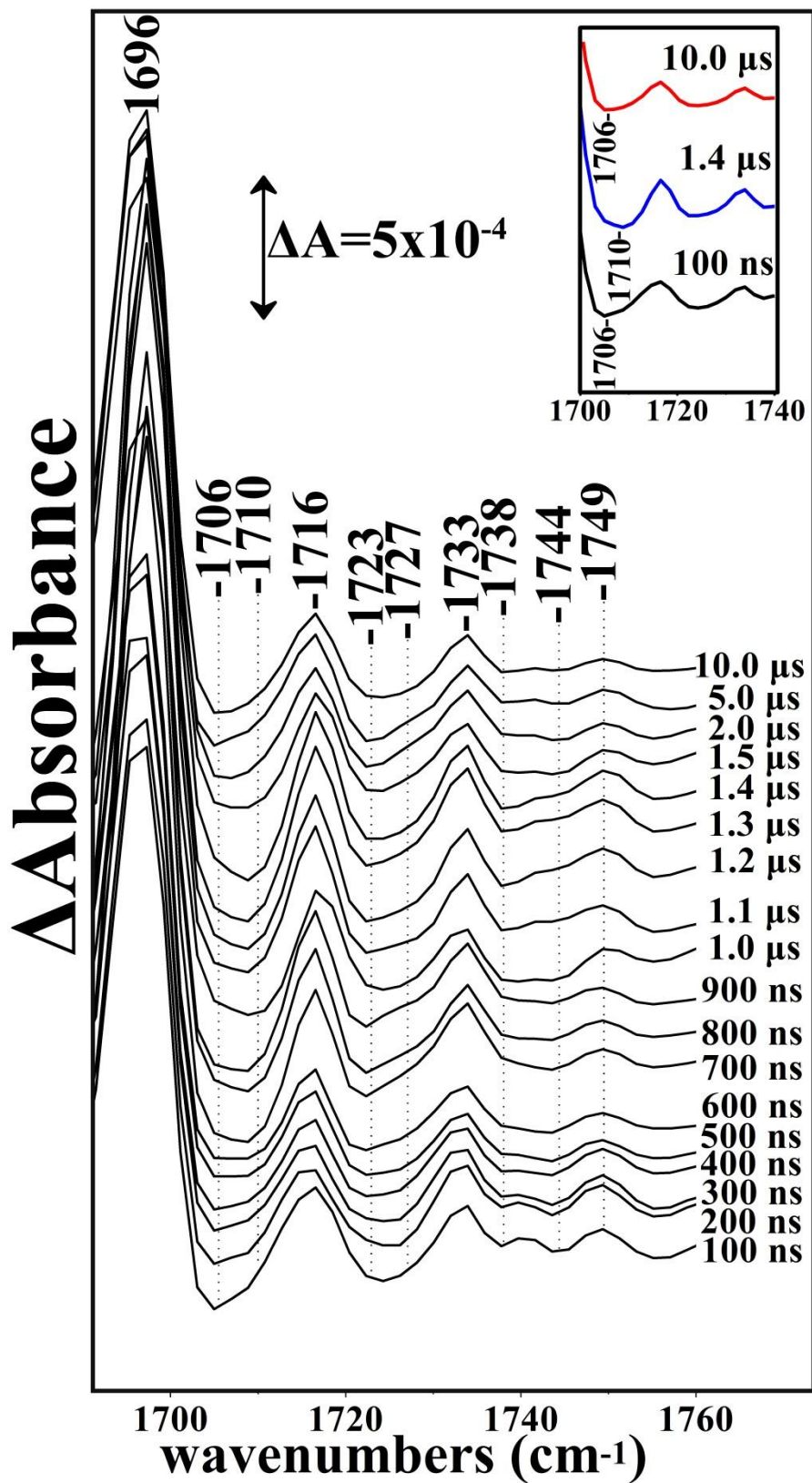
παραμένει σταθερή, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι κανένα ποσοστό του CO που ήταν δεσμευμένο στο Cu_B δεν δραπετεύει από το διπυρηνικό κέντρο στους 293 K. Σε t_d= 400 ns μετά τη φωτόλυση του CO από το Fe της αίμης a₃ (σύμπλοκο **B**) και το σχηματισμό του μεταβατικού συμπλόκου Cu_B¹⁺-CO, δύο θετικές κορυφές που απεικονίζονται στην εικόνα 41B, εμφανίζονται στους 2129 και 2122 cm⁻¹ και εμφανίζουν ευαισθησία στο ¹³CO καθώς μετατοπίζονται στους 2082 και 2075 cm⁻¹ (Εικόνα 41C), αντίστοιχα. Η συχνότητα των 2129 και 2122 cm⁻¹ κορυφών είναι η ίδια με αυτές που βρέθηκαν στη Mb χαρακτηρίζοντας τα B₁ και B₂ ενδιάμεσα στάδια, αντίστοιχα. Επομένως, αποδίδουμε τις 2129 και 2122 cm⁻¹ κορυφές που παρατηρήσαμε στο φωτολυμένο ba₃ στα B₁ και B₂ ενδιάμεσα στάδια, στα οποία το CO διοχετεύεται σε μια περιοχή εγκλωβισμού (docking site). Η 2122 cm⁻¹ κορυφή απουσιάζει από τα φάσματα όταν το πείραμα επαναλαμβάνεται σε D₂O, υποδεικνύοντας ότι είναι ευαίσθητη στις αλλαγές υδρογόνου-δευτερίου (Εικόνα 41D). Αντίθετα, η 2129 cm⁻¹ δεν είναι ευαίσθητη στην εναλλαγή υδρογόνου-δευτερίου.



Εικόνα 41. (Α) Φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) της δεσμευμένης με ¹²CO μορφής του πλήρες ανηγμένου κυτοχρώματος *ba*₃-CO (pH 7.0) στους ενδεδειγμένους χρόνους. Η περιοχή του εγκλωβισμένου (docked) ¹²CO απεικονίζεται στην εικόνα 38B και το αντίστοιχο σε ¹³CO στην εικόνα 38C. Τα φάσματα της περιοχής του εγκλωβισμένου (docked) ¹²CO σε D₂O απεικονίζονται στην εικόνα 38D.

Το στάδιο B₁ ανιχνεύτηκε προηγουμένως στα t_d=10 μs και αναφέρουμε ότι το CO διοχετεύεται σε μια docking περιοχή κοντά στην προπιονική ομάδα A της αίμης a₃ χωρίς να αποκλείουμε την πιθανότητα και τα δυο στάδια, B₁ (2129 cm⁻¹) και B₂ (2122 cm⁻¹), να σχηματίζονται αρχικά με τη φωτόλυση του CO από την αίμη a₃ και ότι το στάδιο B₁ γίνεται κυρίαρχο στο χρόνο που προκύπτει λόγω του περιορισμού στη χρονική μας ανάλυση (t_d=10 μs). Σε χρόνο t_d=10 μs, μαζί με την 2130 cm⁻¹, μια δεύτερη κορυφή ευαίσθητη στο CO εμφανίζεται στους 2137 cm⁻¹ και στους 2089 cm⁻¹ όταν το πείραμα επαναλαμβάνεται σε ¹³CO, επιβεβαιώνοντας έτσι την ισοτοπική του ευαισθησία. Η συχνότητα της κορυφής που παρατηρήσαμε στους 2137 cm⁻¹ είναι κοντά στην τιμή της κορυφής του ελεύθερου αερίου CO (ν_{CO})=2143 cm⁻¹ και χάνεται στο φόντο ως ελεύθερο διαλυτοποιημένο CO σε χρόνους μεγαλύτερους των 10 μs. Τα B₂, B₁ και B₀ στάδια έχουν Δν_{1/2} ~10-12 cm⁻¹ υποδεικνύοντας ότι το στάδιο B₀ προκύπτει από το CO που παραμένει στην περιοχή εγκλωβισμού (docking site). Αν ο υποκαταστάτης CO που αντιστοιχεί στο στάδιο B₀ έβγαине έξω από την docking περιοχή ως διαλυτοποιημένο, η ανίχνευση του θα ήταν εξαιρετικά δύσκολη επειδή το φάσμα του CO στο H₂O είναι τόσο διάχυτο για να παρατηρηθεί. Θετικά φορτία γύρω από το CO αυξάνουν την ν(CO), ενώ τα αρνητικά φορτία τη μειώνουν. Ο Straub και ο Karplus²⁴ έχουν δείξει ότι στα διμερή σύμπλοκα CO-Imidazole, η ν(CO) ποικίλει μεταξύ -17 cm⁻¹ (H bonding C-O...H-N) και +36 cm⁻¹ (N-H...C-O). Επιπρόσθετα, ο Nutt και ο Meuwly²⁵ έχουν πραγματοποιήσει προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής σε φωτοδιασπώμενα στάδια της carboxymyoglobin (Mb-CO) για να δείξουν ότι οι 7 cm⁻¹ διαφορά των υπολογισμένων B₂ και B₁ σταδίων που είναι σε ποσοτική συμφωνία με τα πειραματικά αποτελέσματα μπορεί να αποδοθεί άμεσα στην ενεργειακή διαφορά μεταξύ των Fe⁺CO και Fe⁻OC. Τα παρών αποτελέσματα στην *ba*₃ οξειδοαναγωγή επιδεικνύουν ότι η *trans/cis* ισομέρεια επιτρέπει και στους δυο προσανατολισμούς του CO να τοποθετηθούν μεταξύ των προπιονικών ομάδων A και D και το πρωτεϊνικό περιβάλλον απομακρύνει το φραγμό των δυο προσανατολισμών του CO. Οι εγκλωβισμένοι (docked), φωτοδιασπώμενοι υποκαταστάτες CO στην πρωτεϊνική μήτρα, παρουσιάζουν κορυφές στο IR φάσμα, προσδίδοντας έτσι ισχυρές αποδείξεις για την

παρουσία των δομικά καλό-προσδιορισμένων περιοχών εγκλωβισμού (docking sites). Αναλογικά με τις δεσμευμένες με μονοξείδιο του άνθρακα (CO) μορφές, η $\nu(\text{CO})$ του εγκλωβισμένου (docked) CO επηρεάζεται από το τοπικό περιβάλλον μέσω των φαινομένων Stark του τοπικού ηλεκτρικού πεδίου που ενεργεί στο δίπολο CO. Στο μοντέλο μας, έχουμε δομήσει ένα εμπειρικό διάγραμμα της $\nu(\text{CO})$ για να μελετήσουμε την επίδραση θετικών ή αρνητικών φορτίων και επίσης των αλληλεπιδράσεων που έχουν οι δεσμοί υδρογόνου στους διάφορους προσανατολισμούς του CO. Το εμπειρικό διάγραμμα δείχνει μια σημαντική μεταβλητότητα στην $\nu(\text{CO})$ με εύρος που αρχίζει από τους 2047 cm^{-1} (αλληλεπίδραση με μόνο μια αρνητικά φορτισμένη ομάδα COO^-) μέχρι τους 2216 cm^{-1} (αλληλεπίδραση με μόνο ένα θετικά φορτίο). Οι υπολογισμοί δείχνουν επίσης ότι η $\nu(\text{CO})$ εμφανίζεται στην ευρύτερη περιοχή $2047\text{--}2131 \text{ cm}^{-1}$ σε βήματα 10 cm^{-1} όταν η απόσταση του μονοξειδίου του άνθρακα (CO) από μια αρνητικά φορτισμένη καρβοξυλομάδα ποικίλει. Η συνδυαζόμενη αλληλεπίδραση των καρβοξυλομάδων και των αμινομάδων στο CO έχει μια ισχυρή επίδραση στην $\nu(\text{CO})$, όπως φαίνεται από την μεταβολή των 88 cm^{-1} προς τα κάτω από τους 2143 cm^{-1} που έχει το αέριο μονοξείδιο του άνθρακα (CO), και παρόλο που το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) δεν αλληλεπιδρά άμεσα με το αποπρωτονιωμένο καρβοξύλιο (COO^-).



Εικόνα 42. Μεγεθυμένη εικόνα των φασμάτων διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερόυθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1690-1760 cm^{-1} . Οι συνθήκες είναι οι ίδιες όπως και στην εικόνα 37.

Στην εικόνα 42, τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1690-1760 cm⁻¹ δείχνουν μια παραγωγικής μορφής εικόνα με ένα θετικό/αρνητικό στους 1696/1706 cm⁻¹, χαρακτηριστικό της διατάραξης της δόνησης έκτασης του C=O που έχουμε αναθέσει στην προπιονική ομάδα A της αίμης *a*₃. Σε *t*_d=600-1400 ns εμφανίζεται ως διπλή με ένταση στους 1706 και 1710 cm⁻¹ και σε *t*_d=10 μs εμφανίζεται ως μονή στους 1706 cm⁻¹. Οι 1749/1744 και 1723 cm⁻¹ μορφές, που έχουν ανατεθεί στην ν(COO(H)) των δυο διαμορφώσεων των πρωτονιωμένων μορφών του D372, παρουσιάζουν μετατοπίσεις έντασης και συχνότητας αντίστοιχα.

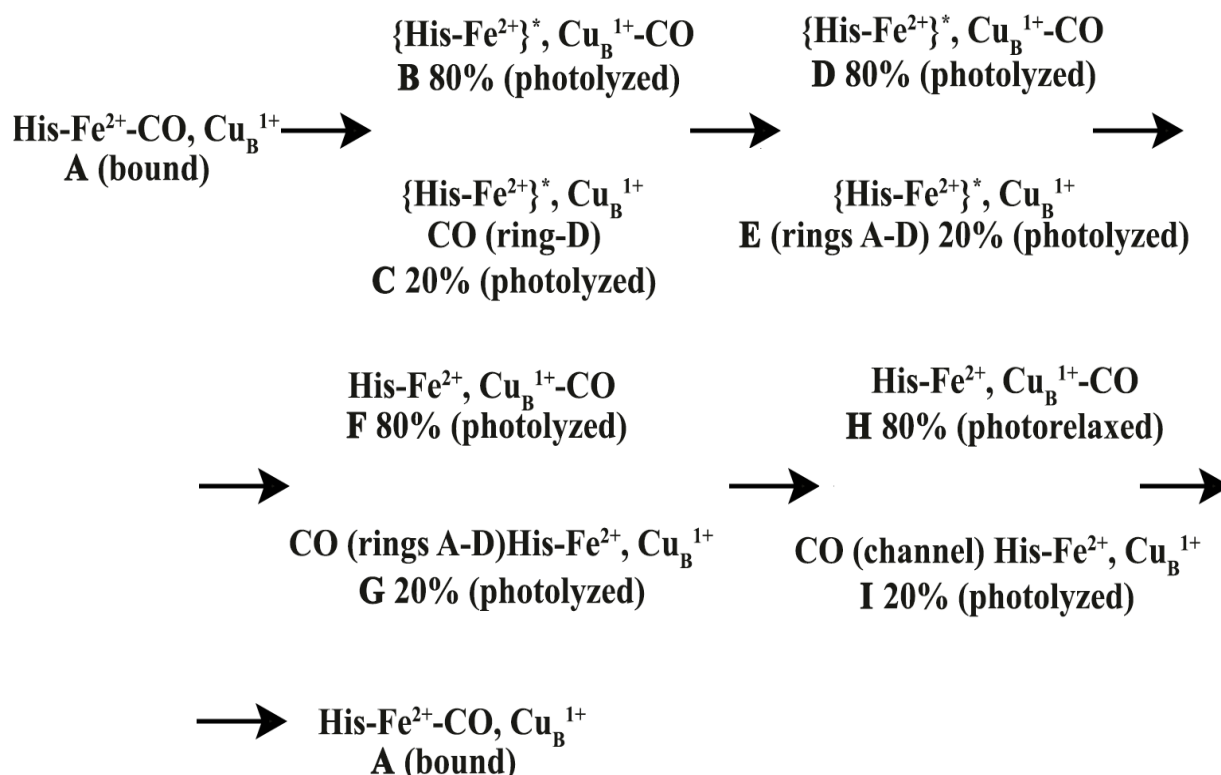
Η μορφή 1723 cm⁻¹ αποδίδεται σε μια διατάραξη του τοπικού περιβάλλοντος που επιφέρει την αλλαγή στην ένταση της πρωτονιωμένης μορφής ή την αποπρωτονίωση αν μια θετική κορυφή γύρω στους 1450 cm⁻¹ παρατηρείται ταυτόχρονα με την αρνητική κορυφή στους 1723 cm⁻¹. Σε *t*_d=100-400 ns η C=O μορφή του D372 εμφανίζεται ως διπλή κορυφή στους 1723 και 1727 cm⁻¹, και ταυτόχρονα με την εμφάνιση των 2122 και 2129 cm⁻¹ μορφών των B₂ και B₁ σταδίων, σε *t*_d=600-900 ns παρουσιάζεται ως μονή κορυφή στους 1723 cm⁻¹ και σε *t*_d=10 μs, όταν το στάδιο B₂ είναι απών, παρουσιάζεται ως διπλή κορυφή στους 1723 και 1727 cm⁻¹. Οι μετατοπίσεις των συχνοτήτων των σταδίων B και της προπιονικής ομάδας A της αίμης *a*₃ όπως επίσης και του D372 σε παρόμοιους χρόνους, υποδεικνύουν ισχυρά ότι υπάρχει μια ισχυρή σύνδεση του ζευγαριού D372-Προπιονική ομάδα A με τα ενδιάμεσα στάδια B.

Η μορφή 1733 cm⁻¹ που δεν παρουσιάζει μετατόπιση στη συχνότητα ή αλλαγή στην ένταση της σε *t*_d=100-10000 ns υποδεικνύει ότι δεν είναι συνδεδεμένη με τα ενδιάμεσα στάδια B, μπορεί να αποδοθεί στην C=O μορφή είτε ενός πρωτονιωμένου γλουταμινικού ή ασπαραγινικού κατάλοιπου. Μεταβολές έντασης και/ή μετατοπίσεις της συχνότητας των δονήσεων που έχουν αποδοθεί στις πρωτονιωμένες και αποπρωτονιωμένες μορφές των προπιονικών ομάδων της αίμης και του D372 του *ba*₃, έχουν παρατηρηθεί.¹⁵ Αυτά συμπεριλαμβάνουν την 1457 cm⁻¹ (ν(COO⁻)^{sym}) του D372 και την 1530 cm⁻¹ ν(COO⁻)^{asym} της προπιονικής ομάδας A, σε συνδυασμό με τις πρωτονιωμένες μορφές της προπιονικής ομάδας A, την ταυτόχρονη παρουσία τόσο των αποπρωτονιωμένων, όσο και των αποπρωτονιωμένων μορφών του D372 και της προπιονικής ομάδας A.

Η εικόνα 40 δείχνει ότι οι προσανατολισμοί του μονοξειδίου του άνθρακα (CO) που προκύπτουν αμέσως μετά τη φωτόλυση, οδηγούν είτε στο Cu_B, είτε σε μια περιοχή εγκλωβισμού (docking site). Τα δεδομένα χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) δείχνουν ότι το ποσοστό μεταξύ των δύο περιοχών εξαρτάται από το χρόνο. Το φωτολυμένο CO από την το σίδηρο της αίμης *a*₃ δεσμεύεται στο Cu_B (80-85%) στα 100 ns, ενώ το εγκλωβισμένο (docked) CO δεν ανιχνεύεται στην περίοδο *t*_d=0-300 ns υποδεικνύοντας την παρουσία ενός ενεργειακού φραγμού στη μεταφορά του CO στην περιοχή εγκλωβισμού (docking site). Σε συνδυασμό με τους υπολογισμούς QM/MM προτείνουμε ότι ο ενεργειακός φραγμός είναι η μετάβαση της προπιονικής ομάδας D της αίμης *a*₃ από *trans* σε *cis* και λαμβάνει χώρα μετά από 300 ns επιτρέποντας στο CO να εισέλθει στην κοιλότητα μεταξύ των προπιονικών ομάδων D και A της αίμης *a*₃. Αυτή η παρατήρηση, που δεν μπορούσε να γίνει απερίφραστα μόνο από τα πειράματα χρονικής ανάλυσης με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (TRS²-FTIR), απεικονίζει πως οι μέτριες διακυμάνσεις στην πρωτεϊνική δομή που συμβαίνουν σε μικρό χρονικό διάστημα τονίζουν μια δομική αλλαγή που ελέγχει τις διαδρομές μετανάστευσης των υποκαταστατών. Χωρίς τις ps προσομοιώσεις, οι αδύναμες κορυφές του εγκλωβισμένου (docked) μονοξειδίου του άνθρακα (CO) στα πειράματα χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) θα ήταν πολύ δύσκολο να ερμηνευτούν. Ο μοναδικός συνδυασμός των QM/MM και χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) αποκαλύπτει πληροφορίες που μας επιτρέπουν να χαρακτηρίσουμε τη δομή μιας διαμορφωτικής πύλης που καθοδηγεί τη διαδρομή μετανάστευσης του υποκαταστάτη στο χρόνο της απόσπασης.

Τα δεδομένα χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου *ba*₃-CO στη χρονική κλίμακα των μs επιδεικνύουν ότι οι προπιονικές ομάδες της αίμης *a*₃ υπάρχουν και στην πρωτονιωμένη τους μορφή αλλά και στην αποπρωτονιωμένη και προφανώς υπάρχει μια ισορροπία COO⁻ ↔ COOH. Έχει αναφερθεί από αρκετές ερευνητικές ομάδες ότι στο υψηλά διατηρημένο σε πολλές πρωτεΐνες της οικογένειας των αιμοχαλκοξειδάσεων περιβάλλον (highly conserved environment), υπάρχει μια ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ της προπιονικής ομάδας A και του D372 επειδή η απόσταση μεταξύ των δύο καρβοξυλικών ομάδων είναι μόλις 3.3 Å.¹⁶ Έχει επιπλέον επιδειχτεί ότι η πρωτονίωση του συζευγμένου συστήματος εξαρτάται από την αλληλεπίδραση τους με το εγγύς περιβάλλον και ότι μοιράζονται ένα

πρωτόνιο σε pH 4-11.5. Η μετανάστευση του υποκαταστάτη από την προπιονική ομάδα D, η οποία είναι ενωμένη με δεσμούς υδρογόνου με την Y133 και την R449, χρειάζεται μια πρωτεϊνική διακύμανση για να της επιτραπεί η είσοδος γύρω από την αίμη, γεγονός που συμβαίνει εντός 300 ns. Επειδή στα 400 ns το ενδιάμεσο στάδιο B₂ δεν παρατηρείται στα D₂O πειράματα, εισηγούμαστε ότι οι H₂O/D₂O εναλλαγές επιφέρουν αποσταθεροποίηση του CO είτε προς την *trans* σε *cis* ισομέρεια, είτε στην περιοχή προπιονικής ομάδας A-w941-w946-D372-w927. Αν το συμβαίνει το τελευταίο σενάριο τότε η απουσία των δυο προσανατολισμών του CO στα 400-600 ns στο D₂O επιδεικνύει ότι τα ανταλλάξιμα w946 και w927 μόρια H₂O με D₂O αλληλεπιδρούν με το εγκλωβισμένο (docked) CO εμποδίζοντας την εμφάνιση και των δυο προσανατολισμών. Αυτό είναι η πρώτη άμεση απόδειξη που αναφέρει ότι το πρωτεϊνικό περιβάλλον εντός της κοιλότητας (intracavity protein environment) ελέγχει τον προσανατολισμό των υποκαταστατών.



Εικόνα 43. Ένα μοντέλο για την κινητική του CO, χαλάρωσης της αίμης και χημείας συντονισμού στο διτυρηνικό κέντρο αίμης $a_3\text{-Cu}_B$ και δυναμικής των προπιονικών ομάδων A και D. Μετά τη φωτόλυση του CO από την αίμη a_3 , 80-85 % του CO δεσμεύεται στο Cu_B (κατάσταση B) και το υπόλοιπο 15-20 % βρίσκεται αρχικά πάνω από την προπιονική ομάδα D (κατάσταση C) και στη συνέχεια μεταβαίνει στην περιοχή μεταξύ των προπιονικών ομάδων A και D της αίμης a_3 (κατάσταση E). Οι καταστάσεις B-E που

έχουν αστερίσκο είναι τεταμένες, μη ισορροπημένες καταστάσεις της αίμης a_3 εξαιτίας της τεταμένης δόνησης (unrelaxed vibration) Fe^{2+} -His. Στην κατάσταση **F** (80%) της αίμης a_3 είναι σε μια χαλαρή κατάσταση με το CO δεσμευμένο στο Cu_B όπου το υπόλοιπο 20% (κατάσταση **G**) της αίμης a_3 βρίσκεται σε μια χαλαρή κατάσταση και το CO βρίσκεται σε μια περιοχή εγκλωβισμού (docking site) μεταξύ των προπιονικών ομάδων **A** και **D** της αίμης a_3 . Στην κατάσταση **H** (80%), της αίμης a_3 είναι φωτο-χαλαρή με το CO δεσμευμένο στο Cu_B όπου στο υπόλοιπο 20% (κατάσταση **I**) το CO έχει φύγει από την θέση στην οποία βρισκόταν προηγουμένως στην κατάσταση **G**. Τέλος, στην κατάσταση **A** το διαλυτοποιημένο CO και το δεσμευμένο στο Cu_B , επαναδεσμεύονται στην αίμη a_3 .

Στα D_2O διαλύματα η απώλεια της συνδεσιμότητας με δεσμούς υδρογόνου στο τοπικό περιβάλλον w941-w946-προπιονική ομάδα A-D372-w927 με την εναλλαγή H/D, υποδεικνύει ισχυρά ότι ο προσανατολισμός του εγκλωβισμένου (docked) CO επηρεάζεται από την $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ αλλαγή του διαλύτη. Οι ισοτοπικές ευαισθησίες των δονήσεων της προπιονικής ομάδας **A** της αίμης a_3 αποδίδονται στα ανταλλάξιμα πρωτόνια που υπάρχουν στην καρβοξυλομάδα της προπιονικής ομάδας και των w946 και w927, και/ή του D372 που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με αυτά. Στην ba_3 οξειδοαναγωγή, η προπιονική ομάδα **A** είναι ενωμένη με δεσμούς υδρογόνου με την H376 και το D372, όπως επίσης και με τα w941 και w946 μόρια.¹⁷

Το σύμπλοκο Cu_B^{1+} σχηματίζεται εντός 1 ps ακολούθως από τη φωτόλυση του CO αφήνοντας την αίμη σε τεταμένες και μη ισορροπημένες καταστάσεις που σημειώνονται με αστερίσκο (καταστάσεις **B** μέχρι **E**). Στην κατάσταση **B** το φωτολυμένο CO και η αίμη κατέχουν περίσσεια ενέργειας ως επακόλουθο της φωτόλυσης. Η παραγόμενη θερμότητα από την ενέργεια των φωτονίων των 532 nm, εμφανίζεται ως επιπλέον ενέργεια περιστροφική (rotational) και μεταφραστική (translational) του CO, χωρίς να διεγείρεται δονητικά, όπως επίσης και σαν περίσσεια ενέργειας στο διπυρηνικό κέντρο. Το ενεργοποιημένο CO (80-85%) δεσμεύεται στο Cu_B και το υπόλοιπο 15-20 % βρίσκεται αρχικά πάνω από την προπιονική ομάδα **D** (state **C**) και αργότερα μεταξύ των προπιονικών ομάδων **A** και **D** (state **E**) πριν να θερμανθεί το διπυρηνικό κέντρο. Η μεταφορά του CO από την αρχική του θέση σε μια μετέπειτα θέση ελέγχεται από την αλλαγή στην ισομέρεια της προπιονικής ομάδας **D**, από την *trans* (αποπρωτονιωμένη) σε *cis* (πρωτονιωμένη). Στην κατάσταση **C** (state **C**) εξαιτίας των ευρέων διανομών του CO πάνω από την προπιονική ομάδα **D**, δεν κατέστη δυνατή η παρατήρηση καθαρής δόνησης CO. Στην κατάσταση **E** (state **E**) όπου το διπυρηνικό κέντρο δεν έχει θερμανθεί ακόμα, παρατηρήσαμε δύο

ευδιάκριτους προσανατολισμούς του εγκλωβισμένου (docked) CO. Στην κατάσταση **G** (state **G**) η αίμη βρίσκεται σε ισορροπία και εξαιτίας των δομικών αλλαγών λόγω θέρμανσης υπάρχει μια μετάβαση από τη B_2 στη B_1 κατάσταση και παρατηρούμε μόνο τη μορφή 2129 cm^{-1} . Οι B_2 και B_1 καταστάσεις παρουσιάζονται ως τις δύο ταχέως εμφανιζόμενες κορυφές που ερμηνεύονται ως το CO σε αντίθετους προσανατολισμούς. Η B_0 κατάσταση που ανιχνεύσαμε στους 2137 cm^{-1} στο ^{12}CO και επιβεβαιώθηκε από την ισοτοπική ^{13}CO αλλαγή συχνότητας παρατηρούμενη στους 2089 cm^{-1} αποδίδεται στην διαλυτοποιημένη μορφή του CO. Στην κατάσταση **I** (state **I**), έχουμε δείξει ότι το εγκλωβισμένο (docked) CO έχει ξεφύγει από την αρχική του θέση και εν τέλει στην κατάσταση **A** (state **A**) και το διαλυτοποιημένο CO αλλά και αυτό που ήταν δεσμευμένο στο Cu_B , επαναδεσμεύονται στην αίμη a_3 . Κανένα από το θερμικά διασπασμένο από τον Cu_B , CO δεν είναι παγιδευμένο από την περιοχή εγκλωβισμού (docking site), ένα φαινόμενο που συμβαίνει σε $t_{1/2} = 20.2\text{ ms}$, και μας προκαλεί να προτείνουμε ότι η *cis* σε *trans* ισομέρεια δεν είναι ενεργή κατά τη διάρκεια της θερμικής διαδικασίας επαναδέσμευσης.¹⁸

Η απουσία ανασυνδυασμού του CO όταν είναι πάνω από την προπιονική ομάδα **D** της αίμης a_3 σε συνδυασμό με την απουσία του CO να διαφύγει από το διπυρηνικό κέντρο υποδεικνύει ότι το αρχικό εμπόδιο (0-300 ns) του ανασυνδυασμού, που σχηματίζεται με την φωτοδιάσπαση του CO, ακολουθείται από μια *trans* (αποπρωτονίωση) σε *cis* (πρωτονίωση) μετάβαση (400 ns-3 ms) που επιτρέπει στο CO να εγκλωβιστεί μεταξύ των προπιονικών ομάδων **D** και **A** της αίμης a_3 και της περιοχής D372-προπιονική ομάδα A-His376. Αυτή η μετάβαση ακολουθείται από ένα δεύτερο μεταβατικό εμπόδιο που παρεμποδίζει τη διαδικασία ανασυνδυασμού στον Fe της αίμης a_3 για μερικά milliseconds. Η μεγάλη διάρκεια ζωής του εγκλωβισμένου (docked) CO προκαλεί μεγάλες πρωτεϊνικές διαταραχές δημιουργώντας πρωτεϊνικά κανάλια κοντά στο διπυρηνικό κέντρο. Αυτό υποστηρίζεται πλήρως από την παρατήρηση της κατάστασης B_0 στους 2137 cm^{-1} όπου το CO διαλυτοποιείται και παραμένει παγιδευμένο στο μεταβατικό κανάλι, επιτρέποντας σε ένα μεγάλο ποσοστό υποκαταστατών να αποφύγουν την επαναδέσμευση τους για αρκετό διάστημα. Συνεπώς, η δυναμική της περιοχής εγκλωβισμού (docking site) και του μεταβατικού καναλιού είναι τα στάδια που ρυθμίζουν την ταχύτητα του ανασυνδυασμού.

Τα ήδη δημοσιευμένα αποτελέσματα QM/MM και τα αποτελέσματα της χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερέθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR), προσδίδουν μια λογική εκτίμηση της δυναμικής του συστήματος όπου

θερμικά προκαλούμενες δομικές διαταραχές οδηγούν σε ταχεία αλληλομετατροπή μεταξύ των δομικών υποστρωμάτων.²³ Τα αποτελέσματα των υπολογισμών QM/MM έδειξαν ότι και στις δυο δομές, *trans* και *cis*, περίπου το 62% των μορίων του CO έχουν προσανατολισμένο το άτομο του οξυγόνου προς τον σίδηρο της αίμης, αποτέλεσμα που συνάδει με αυτό που βρέθηκε για την κατάσταση B₁ της Mb. Η θερμική μετατροπή του B₂ σε B₁ υποδεικνύει ότι η περιοχή εγκλωβισμού (docking site) στην οποία βρίσκεται εγκλωβισμένο το CO βιώνει μια διαμορφωτική χαλάρωση (conformational relaxation) που διευκολύνει την αλληλομετατροπή (interconversion) και κατά συνέπεια την απελευθέρωση του CO στο πρωτεϊνικό περιβάλλον. Η μεγάλη διάρκεια ζωής των καταστάσεων B στην *ba*₃ οξειδοαναγωγή, συγκρινόμενες με τις καταστάσεις B της Mb, όπου οι B₁ και B₂ καταστάσεις υπάρχουν στην κλίμακα των nanosecond και φθίνουν ταυτόχρονα με χρόνο ημιζωής 150 ns σε θερμοκρασία δωματίου, υποδεικνύουν έντονα την αργή διάρκεια διαμορφωτικής χαλάρωσης (conformational relaxation time) στο *ba*₃. Μια επιπλέον διαφορά είναι ότι εκτός από τις ιδιότητες των περιοχών εγκλωβισμού της Mb και της *ba*₃, είναι ο χρόνος ημιζωής των καταστάσεων B στο D₂O. Και οι δύο καταστάσεις, B₂ και B₀, είναι απύσες στο D₂O σε περίοδο t_d=100-10000 ns. Είναι προφανές ότι στο D₂O υπάρχει μια θερμική μετατροπή της B₂ στην B₀ κατάσταση, υποδεικνύοντας ότι η περιοχή εγκλωβισμού (docking site) που περιέχει το CO βιώνει διαμορφωτική χαλάρωση (conformational relaxation) που διευκολύνει την αλληλομετατροπή (interconversion) και κατά συνέπεια την απελευθέρωση του CO στο πρωτεϊνικό περιβάλλον. Αναμένουμε ότι οι ιδιότητες της περιοχής εγκλωβισμού (docking site) που παγιδεύει το φωτολυμένο CO από την αίμη *a*₃ να είναι υπεύθυνες για τον κινητικό έλεγχο της δέσμησης και αποδέσμησης των υποκαταστατών. Οι προφανείς διαφορές στη δυναμική της περιοχής εγκλωβισμού με την εναλλαγή H₂O/D₂O και ο μικρός χρόνος της κατάστασης B₂ στο H₂O και η απουσία της στο D₂O υποδεικνύουν ισχυρά ότι το περιβάλλον της περιοχής εγκλωβισμού (docking site) ελέγχει τη δυναμική των υποκαταστατών. Επίσης αναμένουμε ότι η ίδια περιοχή εγκλωβισμού να παρουσιάζει παρόμοιο κινητικό έλεγχο σε υποκαταστάτες με παρεμφερές μέγεθος με το CO, όπως είναι το NO και το O₂. Τα δεδομένα μας επιδεικνύουν ότι οι πολύ καλά χαρακτηρισμένες καταστάσεις B₂, B₁ και B₀ στην Mb και την Hb ανιχνεύονται επίσης σε μεγάλα πολυλειτουργικά ένζυμα που καταλύουν υποκαταστάτες όπως το O₂, το NO και το CO.

Τα δυναμικά πεδία καθορίζουν την διάκριση υπέρ ή κατά της δέσμησης του υποκαταστάτη και οι τις κινητικές ιδιότητες της περιοχής εγκλωβισμού όσο αφορά την απελευθέρωση των καταλυτικών προϊόντων. Η μετανάστευση των υποκαταστατών στις περιοχές εγκλωβισμού

(docking sites) αναμένεται να επηρεάζει τις χημικές αντιδράσεις στο καταλυτικό κέντρο, όπως έχει υποδειχθεί στους μηχανισμούς αντίδρασης των Mb-O₂ και Hb-O₂ με NO και NO₂.¹⁹ Ο φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της αργής διαμορφωτικής χαλάρωσης της περιοχής εγκλωβισμού που φιλοξενεί υποκαταστάτες όπως το CO κοντά στην περιοχή εγκλωβισμού στην *ba*₃ οξειδοαναγωγή που είναι 3-5 Å μακριά από το καταλυτικό διπυρηνικό κέντρο, προσδίδει ένα πλαίσιο για την κατανόηση των καναλιών των καταλυτικών αντιδράσεων των O₂, CO, NO και NO₂.^{20,21} Κατά τον ίδιο τρόπο, σημαντική συμβολή στις διακυμάνσεις στη δέσμευση του NO₂⁻ έχει η αποπρωτονίωση του συναρμοσμένου μορίου H₂O στο σίδηρο της αίμης στην metMb (pK_a=8.93) και η αποπρωτονίωση/πρωτονίωση του νιτρώδους υποκαταστάτη (pK_a=3.15). Είναι ενδιαφέρον να σημειώσουμε ότι ο νιτρώδης υποκαταστάτης μπορεί να υιοθετήσει είτε την N-(*nitro*, -NO₂) είτε την O-binding (*nitrite*, -ONO) μορφή και πρόσφατα η μορφή διάκρισης υποκαταστάτη επιδείχτηκε ωραιότατα στην Mb όπου η δεσμευμένη με δεσμό υδρογόνου His64(E), εγγύς αμινοξικό κατάλοιπο, και δύο μόρια νερού στην περιοχή δέσμευσης, καθοδήγησαν τον νιτρώδης υποκαταστάτη προς την *trans* O-nitrito κατάσταση δέσμευσης, ενώ στην *ba*₃ οξειδοαναγωγή ο νιτρώδης υποκαταστάτης υιοθετεί την nitro-NO₂ μορφή δέσμευσης.^{22,23}

Φυσιολογία της περιοχής εγκλωβισμού (Docking site)

Τα κατάλοιπα στις υδροφοβικές κοιλότητες παίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταφορά πρωτονίων στο διπυρηνικό κέντρο αίμης *a*₃/Cu_B όπου θα χρησιμοποιηθούν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης με το O₂ για να παραχθεί H₂O, με το NO για να παραχθεί N₂O και μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά τη διάρκεια της οξείδωσης του CO σε CO₂.^{23,24} Κατάλοιπα κοντά στην κοιλότητα που φιλοξενεί το φωτολυμένο CO συμπεριλαμβανομένης και της Y133 που είναι δεσμευμένη με δεσμό υδρογόνου με την προπιονική ομάδα D, της H376 που είναι δεσμευμένη με δεσμό υδρογόνου με την προπιονική ομάδα A και τέλος το D372 που επίσης είναι δεσμευμένο με δεσμό υδρογόνου με την προπιονική ομάδα A. Ένα μόριο νερού (w941 στην *ba*₃ οξειδοαναγωγή), που απαντάται στα διάφορα CcO ένζυμα, βρίσκεται μεταξύ των προπιονικών ομάδων της αίμης *a*₃.⁴ Οι προσομοιώσεις που έγιναν με τη μέθοδο Quantum Mechanical/Molecular Mechanical (QM/MM) έδειξαν ότι η His376 παίζει ένα σημαντικό ρόλο λειτουργώντας ως βαλβίδα που ελέγχει την κατάσταση πρωτονίωσης του ζευγαριού Προπιονική ομάδα A/D372.²⁵ Κατά παρόμοιο τρόπο, η Y133 που είναι δεσμευμένη με δεσμό

υδρογόνου με την προπιονική ομάδα D μπορεί να προσδώσει το απαραίτητο πρωτόνιο για την *trans* σε *cis* μετάβαση. Εναλλακτικά, δότης πρωτονίου μπορεί να γίνει η R449 που απαντάται στις CcO και προτείνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο λειτουργώντας ως αντιστρεπτό θερμικό άνοιγμα που διέπεται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση και τα μόρια νερού που βρίσκονται μέσα στην κοιλότητα. Μια από τις ερωτήσεις για το μηχανισμό της άντλησης πρωτονίων από την κυτοχρωμική οξειδάση c είναι η ταυτοποίηση του δέκτη των αντλούμενων πρωτονίων και τι ελέγχει τη μεταφορά από το δότη στο δέκτη. Αποτελέσματα από διάφορες ομάδες έχουν υποδείξει ότι ο δέκτης βρίσκεται κοντά στην προπιονική ομάδα D της αίμης a_3 και η κατάσταση πρωτονίωσης του καθορίζει το ρυθμό της μεταφοράς ηλεκτρονίων στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Συνδυάζοντας τα, η His376 και η Y133 μπορούν να είναι οι ισχυροί παράγοντες που ελέγχουν τη μεταφορά πρωτονίων στις προπιονικές ομάδες A και D, αντίστοιχα. Οι προσομοιώσεις βρίσκουν υποστήριξη από τα πρόσφατα αποτελέσματα στην ba_3 οξειδοαναγωγή όπου κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι μοναδικές δομικές διαταραχές από τις μεταλλάξεις D372I ή H376N άλλαξαν το μοτίβο των δεσμών υδρογόνου του w941.⁴ Συμπέραναν ότι η περιοχή εισδοχής των πρωτονίων (proton loading site) δεν είναι η προπιονική ομάδα A καθεαυτή αλλά ένα σύμπλεγμα από κατάλοιπα που βρίσκονται γύρω από το μόριο νερού (w946) που είναι δεσμευμένο με δεσμούς υδρογόνου με τις δύο προπιονικές ομάδες A και D αλλά και με την His283, έναν από τους υποκαταστάτες του Cu_B.⁴ Στις υδροφοβικές κοιλότητες, η κινητικότητα των μορίων νερού τα κάνει δύσκολο να ανιχνευτούν με την κρυσταλλογραφία x-ray. Η ιδιότητα του διαλύτη H₂¹⁸O και D₂O να εισέρχεται στην περιοχή προπιονικής ομάδας A-D372 επιδείχτηκε πρόσφατα και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα σεσημασμένα νερά που είναι δεσμευμένα με την περιοχή προπιονικής ομάδας A-D372 πρέπει να έχουν εισέλθει κατευθείαν από την επιφάνεια από την οποία μπορεί να εισέλθει ο διαλύτης. Βασισμένοι σε πειράματα τοποκατευθυνόμενης μετάλλαξης (site directed mutagenesis) στην ba_3 οξειδοαναγωγάσης, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η προπιονική ομάδα A ή ομάδες που βρίσκονται κοντά στην προπιονική ομάδα είναι σημαντικής για την άντληση πρωτονίων. Η 1749 cm⁻¹ δόνηση του D372 είναι απύσα στο D₂O και επίσης είναι ευαίσθητη στην αλλαγή του pH, υποδεικνύοντας την παρουσία ανταλλάξιμων πρωτονίων στην περιοχή D372-προπιονική ομάδα A-His376 που ελέγχει τον προσανατολισμό/συχνότητα του εγκλωβισμένου CO. Τέλος, η ίδια περιοχή εμποδίζει την έξοδο του εγκλωβισμένου (docked) CO στο πρωτεϊνικό περιβάλλον αναγκάζοντας το να περάσει διαμέσου της προπιονικής ομάδας A και να επαναδεσμευτεί στο σίδηρο αίμης. Τα φαινόμενα πρωτονίωσης στην περιοχή εγκλωβισμού

(docking site) που περιγράφηκαν εδώ είναι βασικά για τη λειτουργία της κυτοχρωμικής οξειδοαναγωγής c επειδή τα μόρια νερού σε αυτή την κοιλότητα, όπως έχουμε εισηγηθεί, παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά νερού και στον μηχανισμό άντλησης πρωτονίων (proton-pumping mechanism) στην υπέρ-οικογένεια των αιμοχαλκοξειδάσεων.

5.5 Συμπεράσματα

Έχουμε προσδιορίσει τη δυναμική της μετατόπισης του υποκαταστάτη στο πλήρες ανηγμένο ba_3 -CO χρησιμοποιώντας την τεχνική χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (nanosecond TRS²-FTIR). Τα φάσματα διαφοράς του φωτολυμένου μονοξειδίου του άνθρακα (CO) αποκάλυψαν δυο εμφανείς κορυφές που αποδόθηκαν ως μονοξείδιο του άνθρακα (CO) σε αντίθετους προσανατολισμούς εντός της κύριας περιοχής εγκλωβισμού (primary docking site). Οι δύο κορυφές υπάρχουν μόνο για μερικές εκατοντάδες nanoseconds, όπου στο 1 μ s μόνο η 2130 cm^{-1} κορυφή είναι εμφανής εξαιτίας της ενδιάμεσης κατάστασης B_1 και στα 10 μ s είναι εμφανείς οι 2130 (B_2 state) και 2137 (B_0 state) cm^{-1} . Η μετάβαση του προσανατολισμένου υποκαταστάτη CO από και προς το ενεργό κέντρο αίμη Fe-Cu_B ελέγχεται από τις αλληλεπιδράσεις με το πρωτεϊνικό περιβάλλον μέσα στην περιοχή εγκλωβισμού (docking site). Η *trans* (αποπρωτονιωμένη) σε *cis* (πρωτονιωμένη) μετάβαση της προπιονικής ομάδας D επιτρέπει στο CO να εισέλθει στην περιοχή εγκλωβισμού. Ο γρήγορος ανασυνδυασμός της περιοχής εγκλωβισμού έχει ως αποτέλεσμα τη B_2 σε B_1 μετάβαση και τις χρονικά εξαρτώμενες B_1 και B_0 ενδιάμεσες καταστάσεις στη δομική κίνηση της περιοχής εγκλωβισμού. Η αργή διαμορφωτική χαλάρωση (slow conformational relaxation) της B_1 κατάστασης και ο σχηματισμός της B_0 κατάστασης, σηματοδοτεί την απελευθέρωση του CO από την περιοχή εγκλωβισμού. Η μετανάστευση του υποκαταστάτη μεταξύ του αιμικού Fe/Cu_B και του περιβάλλοντος διαλύτη αποκαλύπτει ένα κανάλι προφανώς αρκετά μεγάλο για να διευκολύνει το πέρασμα των υποκαταστατών. Συμπερασματικά, η μετανάστευση των υποκαταστατών (ligand migration) συμπεριλαμβανομένων των CO, NO, O₂, CN και NO₂, απαιτεί διαμορφωτικές αλλαγές που ανοίγουν και κλείνουν κανάλια από τα οποία οι υποκαταστάτες μπορούν να εισέλθουν/διαφύγουν. Σε όλες τις αιμο-χαλκοξειδάσεις το ενεργό κέντρο συμπεριλαμβάνει τους υποκαταστάτες του Cu_B υποδεικνύοντας ότι η διαμορφωτική ευελιξία των κατάλοιπων είναι συντονισμένη να βελτιστοποιεί την επαναδέσμευση του CO. Τα αποτελέσματα από την παρούσα μελέτη δείχνουν τη δυναμική σύνδεση μεταξύ της δέσμευσης του υποκαταστάτη στο Cu_B και τις δομικές αλλαγές στις προπιονικές ομάδες A

και D της αίμης a_3 και της περιοχής D372-προπιονική ομάδα A-His376 που σχηματίζει τη βαλβίδα για το κανάλι εξόδου των πρωτονίων και συμπεριλαμβάνεται στην αντλία πρωτονίων. Τα παρών δεδομένα περιγράφουν την πρωτονιακή συνδεσιμότητα των προπιονικών ομάδων A και D της αίμης a_3 με τα μόρια νερού w941, w946, w927 και τα κατάλοιπα Y133 και D372 παρέχουν σε συνδυασμό με τους θεωρητικούς υπολογισμούς ισχυρή απόδειξη για το ρόλο τους στους μηχανισμούς μεταφοράς νερού και άντλησης πρωτονίων.

5.6 Παραπομπές

1. Lim M., Jackson T. A., Anfinrud P. A., *Science*, 1995, **269**, 962-966.
2. Srajer, V. *et al.*, *Science*, 1996, **274**, 1726-1729.
3. Elber R., Karplus M., *Science*, 1987, **235**, 318-321.
4. Frauenfelder H., Sligar S. G., Wolynes P. G., *Science*, 1991, **254**, 1598-1603.
5. Ostermann A., Waschipky R., Parak F. G., Nienhaus G. U., *Nature*, 2000, **404**, 205-208.
6. Goldbeck, R. A. *et al.*, *Biochemistry*, 1992, **31**, 9376-9387.
7. Chang H-Y, Choi S., Vakkasoglou A. S., Chen Y. Hemp. J., Fee J.A. & Gennis R. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, **109**, 5259-5264.
8. Koutsoupakis C., Pinakoulaki E., Stavrakis S., Daskalakis V. & Varotsis C., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 2004, **1655**, 347–352.
9. Pinakoulaki E., Ohta T., Soulimane T., Kitagawa T., Varotsis, C., *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 15161-15167.
10. Koutsoupakis C., Kolaj-Robin O., Soulimane T. & Varotsis C., *J. Biol. Chem.*, **2011**, 285, 30600-30605.
11. Koutsoupakis K., Stavrakis S., Pinakoulaki E., Soulimane T. & Varotsis C., *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 32860-32866.
12. Koutsoupakis C., Soulimane T. and Varotsis C., *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 36806-36809.
13. Koutsoupakis C., Soulimane T. and Varotsis C., *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 14728-14732.
14. Porrini M., Daskalakis V., Farantos S. & Varotsis C., *Phys. Chem. B*, 2009, **112**, 12129-12135.

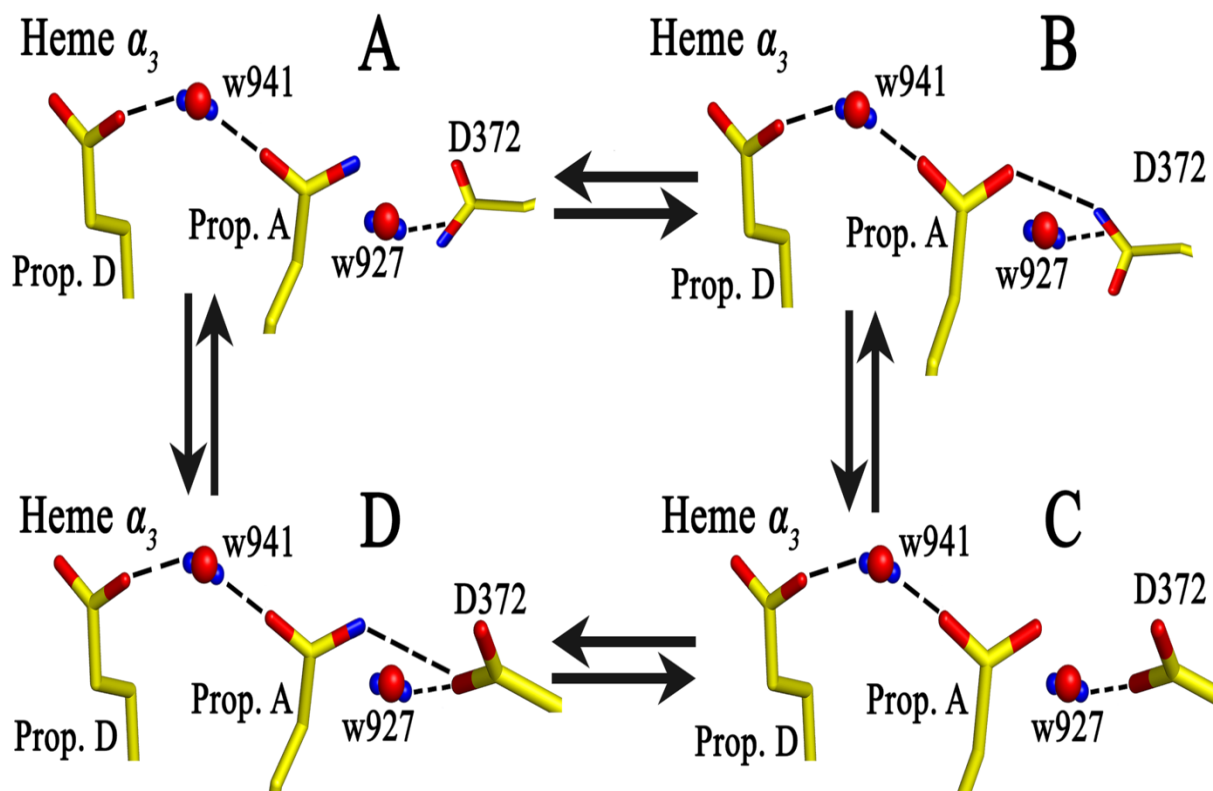
15. Koutsoupakis C., Soulimane T. & Varotsis C., *Biophys. J.*, 2004, **86**, 2438-2444.
16. Daskalakis V., Farantos S. C., Guallar V. & Varotsis C., *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 3648-3655.
17. Nicolaides A., Soulimane T. & Varotsis C., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, **17**, 813-8119.
18. Koutsoupakis K., Stavrakis S., Soulimane T. & Varotsis C., *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 14893-14896.
19. Loullis A., Noor M. R., Soulimane T. and Pinakoulaki E., *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 8955-8960.
20. Koutsoupakis C., Soulimane T. & Varotsis C., *Chem. Eur. J.*, 2015, **21**, 4958-4961.
21. Lambrou A., Pinakoulaki E., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, **17**, 3841-3849.
22. Loullis A., Noor M. R., Soulimane T., Pinakoulaki E., *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 286-289.
23. Daskalakis V. and Varotsis C., *Int. J. Mol. Sci.*, 2009, **10**, 4137-4156.
24. Straub J.E. and Karplus M. *Chemical Physics*, 1991, **158**, 221-248 (1991).
25. Nutt D.R. and Meuwly M., *Biophys J.*, 2003, **85**, 3612-3623.
26. Blomberg L.M., Blomberg M.R.A. and Siegbahn P.E.M., *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2005, **99**, 949-958.
27. Nienhaus K. *et al.*, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127**, 40-41.
28. Branden G., Branden M., Schmidt B., Mills D.A., Ferguson-Miller S. and Brzezinski P., *Biochemistry*, 2005, **44**, 10466–10474.
29. Wikstrom M., Ribacka C., Molin M., Laakkonen L., Verkhovsky M. and Puustinen A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, **102**, 10478-10481.
30. C. Koutsoupakis, T. Soulimane and C. Varotsis, *J. Biol. Chem.*, 2012, **287**, 37495-37507.

6 Μελέτη της πρωτεϊνικής δυναμικής της κυτοχρωμικής οξειδοαναγωγής ba_3 χρησιμοποιώντας την τεχνική χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns Time-Resolved Step-Scan FTIR)

6.1 Εισαγωγή

Η κυτοχρωμική οξειδάση ba_3 από το βακτήριο *Thermus thermophilus* είναι ένα μέλος της μεγάλης οικογένειας των δομικά συγγενικών αιμοχαλκοξειδάσεων που κατατάσσονται στα μέλη των A-, B-, ή C- οικογενειών των οξειδοαναγωγάσεων. Είναι ένας αντιπρόσωπος της οικογένειας B και χρησιμοποιεί ένα κανάλι εισόδου πρωτονίων, ανάλογο με το κανάλι K της οικογένειας A και μεταφέρει πρωτόνια στο ενεργό κέντρο για τη χημεία του O_2 και την άντληση πρωτονίων. Το ένζυμο περιέχει ένα ομοδιπυρηνικό κέντρο με δύο άτομα χαλκού (Cu_A), μία χαμηλού-spin αίμη b και ένα διπυρηνικό κέντρο που αποτελείται από την αίμη a_3 και ένα άτομο χαλκού Cu_B . Καταλύει την 4 ηλεκτρονίων αναγωγή του O_2 σε H_2O , μετατρέποντας την ενέργεια αυτής της αντίδρασης σε μια διαμεμβρανική πρωτονιακή κινητήρια δύναμη, την 2 ηλεκτρονίων αναγωγή του NO σε N_2O και τελικά την 2 ηλεκτρονίων οξείδωση του CO σε CO_2 .

Στην παρούσα μελέτη έγινε μια εκτενής μελέτη της συμπεριφοράς και λειτουργίας της πρωτεΐνης όταν αυτή βρίσκεται σε διαφορετικό περιβάλλον από το φυσιολογικό. Αυτό επιτεύχθηκε με την αλλαγή του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος μέσω φυγοκεντρήσεων με ρυθμιστικά διαλύματα με διαφορετικές τιμές pH και pD και με τη χρήση της φασματοσκοπικής τεχνικής χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR). Με την τεχνική αυτή λήφθηκαν τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή $1500-1760\text{ cm}^{-1}$ σε χρόνο, $t_d = 100-80000\text{ ns}$, του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου ba_3 -CO που υπέστη φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm.



Εικόνα 44. Μοντέλο της πρωτονιακής συσχέτισης της προπιονικής ομάδας A της αίμης α_3 , του D372 και του μορίου νερού w927.

6.2 Πειραματικές διαδικασίες

6.2.1 Προετοιμασία Δειγμάτων

Η κυτοχρωμική οξειδοαναγωγή ba_3 απομονώθηκε σύμφωνα με προηγούμενες δημοσιευμένες διαδικασίες από τα κύτταρα του βακτηρίου *Thermus thermophilus* HB8. Τα δείγματα της ba_3 οξειδοαναγωγής τοποθετήθηκαν στα επιθυμητά ρυθμιστικά διαλύματα 0.1M pH/pD 7.0, HEPES [4-(2-Hydroxyethyl piperazine-1-ethanesulfonic acid)], pH/pD6.0, MES hydrate [2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid hydrate, 4-Morpholineethanesulfonic acid] και pH/pD9.0, CHES [2-(Cyclohexylamino)ethanesulfonic acid]. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που ετοιμάστηκαν σε D_2O , μετρήθηκαν υποθέτοντας ότι $pD=pH(\text{observed})+0.4$. Η συγκέντρωση των δειγμάτων προσδιορίστηκε με UV-visible μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer Lambda 25 UV-Vis spectrometer, χρησιμοποιώντας $\epsilon_{416,ox}=152 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και ήταν $\sim 1.0 \text{ mM}$. Η πλήρες ανηγμένη και δεσμευμένη με μονοξείδιο

του άνθρακα (CO) μορφή του ενζύμου (ba_3 -CO) ετοιμάστηκε χρησιμοποιώντας sodium dithionite ($Na_2S_2O_4$) ως αναγωγικό και στη συνέχεια προστέθηκε 1atm CO κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε μια αεροστεγώς σφραγισμένη κυψελίδα ειδική για φασματοσκοπία υπερύθρου αποτελούμενη από δυο παράθυρα φθοριούχου ασβεστίου, CaF_2 . Το οπτικό μήκος διαδρομής ήταν 6μm για τα δείγματα σε H_2O και 15μm για τα δείγματα σε D_2O . Ο συνολικός όγκος ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα ήταν ~100μl. Το αέριο ^{12}CO αποκτήθηκε από την Messer και το D_2O αγοράστηκε από τη Sigma-Aldrich.

6.2.2 Τεχνική χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασηματισμό Fourier (nanosecond TRS²-FTIR)

Οι μετρήσεις χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) πραγματοποιήθηκαν σε ένα φασματοφωτόμετρο Vertex 70v FTIR που αποκτήθηκε από την Bruker, εφοδιασμένο με ένα γρήγορο φωτοβολταϊκό MCT ανιχνευτή με κατώτερο όριο απόκρισης 600 cm^{-1} . Ο οπτικός πάγκος ήταν υπό κενό και ο θάλαμος δείγματος καθαρίστηκε με αέριο N_2 . Η φασματοσκοπική ανάλυση ήταν 4 cm^{-1} και η χρονική ανάλυση ήταν 100ns. Η φασματική περιοχή ήταν $1200\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$ και χρησιμοποιήθηκε ένα IR φίλτρο 4200nm. Ο συνολικός αριθμός των χρονικών σημείων ήταν 900, 50 από αυτά λήφθηκαν πριν την εκपुरσοκρότηση του laser και χρησιμοποιήθηκαν ως σημείο αναφοράς για την ανάλυση των δεδομένων και τα υπόλοιπα 850 χρονικά σημεία λήφθηκαν αφότου εκपुरσοκρότησε το laser. Για τη φωτόλυση του συμπλόκου της αίμης a_3 -CO χρησιμοποιήθηκε ένα παλμικό 532nm laser (2^η αρμονική) από ένα Continuum Minilite Nd-YAG laser (7ns πλάτος, 5-8mJ/pulse, 8Hz). Για τη μείωση της αρχικής ενέργειας του laser (100mJ), χρησιμοποιήθηκε μια ίριδα και για την επίτευξη συνολικής διαμέτρου της ακτίνας laser 8mm πάνω στο δείγμα, χρησιμοποιήθηκε ένας συγκλίνοντας φακός (20 cm) κατά μήκος της διαδρομής της ακτίνας laser πριν αυτή εισέλθει στο θάλαμο δείγματος του φασματοφωτόμετρου. Δυο καθρέπτες (T=IR, R=532nm) χρησιμοποιήθηκαν για να κατευθύνουν την 532nm laser ακτίνα μέσα στο φασματοφωτόμετρο και διαμέσου του δείγματος. Μια γεννήτρια παλμών (Quantum compositors plus Pulse delay generator, Model 9514) χρησιμοποιήθηκε για το συγχρονισμό τους φασματοφωτόμετρου υπερύθρου με το laser. Συνολικά 10 επαναλήψεις (coadditions)

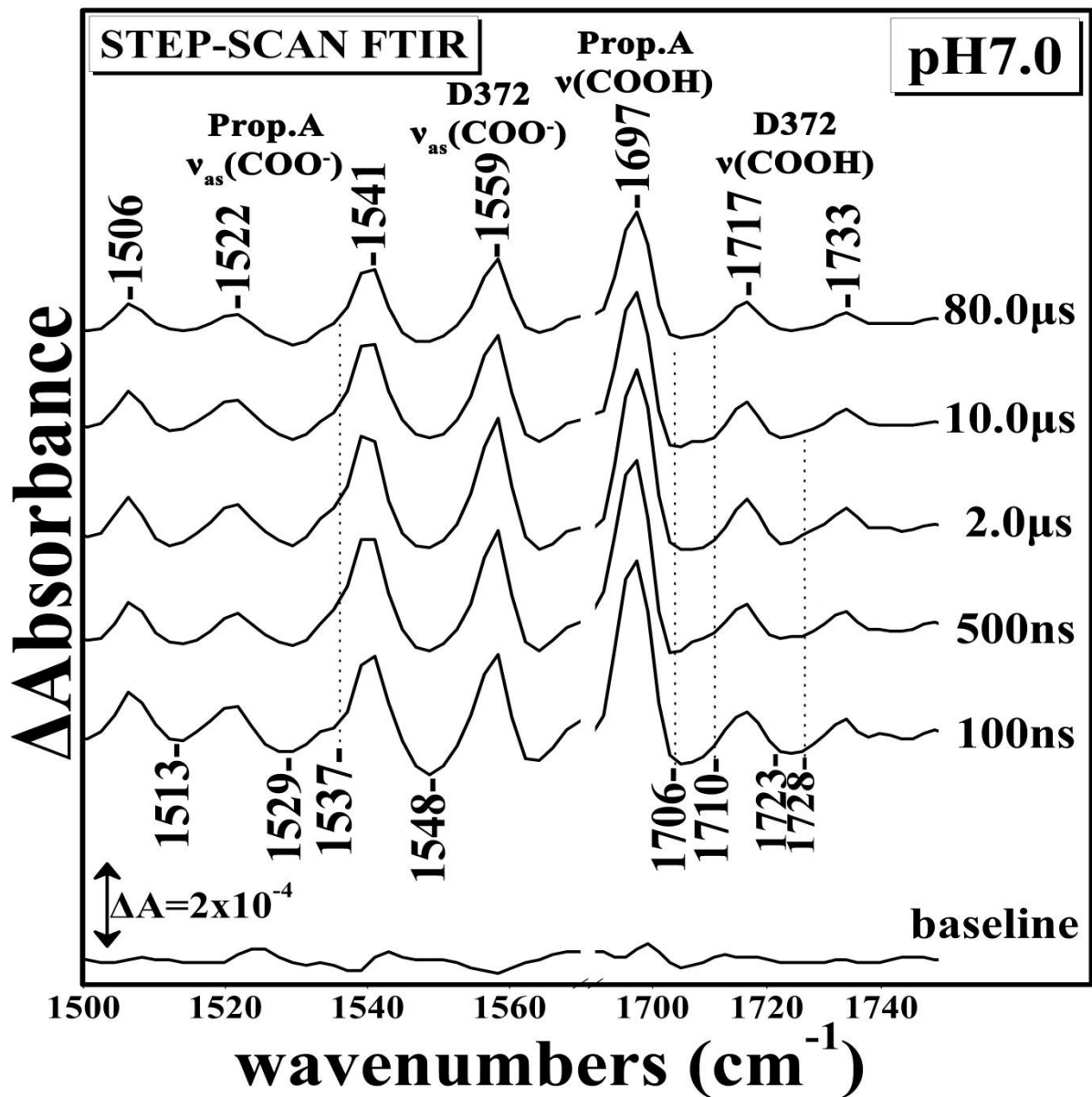
ανά σημείο καθυστέρησης έχουν πραγματοποιηθεί και συλλεχθεί και πάρθηκε ο μέσος όρος 35 μετρήσεων με συμβολογραφήματα μονής κατεύθυνσης (single sided) για τη βελτιστοποίηση της αναλογίας σήματος/θορύβου. Οι μετρήσεις AC και DC λήφθηκαν ξεχωριστά αλλά χρησιμοποιώντας το ίδιο δείγμα. Το AC σήμα πολλαπλασιάστηκε επί 2 χρησιμοποιώντας ένα ενισχυτή σήματος Model SR560 Low-Noise preamplifier (Stanford research systems). Η φάση από τις DC μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε για τη διόρθωση φάσης των AC μετρήσεων. Οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό Fourier και τη διόρθωση φάσης ήταν οι Blackman–Harris three-term apodization function με 32-cm^{-1} phase resolution και ο Mertz/No Peak search phase correction algorithm αντίστοιχα. Τα τελικά φάσματα διαφοράς προέκυψαν χρησιμοποιώντας την εξίσωση $\Delta A = -\log(I_S/I_R)$. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τα προγράμματα OriginPro 8 (OriginLab) και OPUS 7.0.

6.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση

Οι εικόνες 45-47 απεικονίζουν τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή $1500\text{-}1760\text{ cm}^{-1}$ του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου *ba*₃-CO σε pH6, 7 και 9 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm, διάρκεια πειράματος $t_d = 100\text{-}80000\text{ ns}$ και φασματοσκοπική ανάλυση 4 cm^{-1} . Σκοπός των εν λόγω πειραμάτων ήταν η μελέτη της συμπεριφοράς της πρωτεΐνης με την αλλαγή της τιμής του pH του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος.

Η εικόνα 45 δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή $1500\text{-}1760\text{ cm}^{-1}$ ($t_d = 100\text{-}80000\text{ ns}$, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου *ba*₃-CO σε pH7.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm. Τα φάσματα δείχνουν ένα σύμπλεγμα δονήσεων με μια κορυφή στους 1697 cm^{-1} και ένα διπλό αρνητικό μορφής “W” στους 1706 και 1710 cm^{-1} , χαρακτηριστικό της διατάραξης στις δόνησης έκτασης του C=O που έχουμε αναθέσει προηγουμένως στην προπιονική ομάδα A της αίμης *a*₃.⁷ Ολόκληρο το σύμπλεγμα δονήσεων έχει απώλεια έντασης κατά τη χρονική διάρκεια του πειράματος, $t_d = 100\text{-}80000\text{ ns}$. Ένα σύμπλεγμα δονήσεων αποτελείται από κορυφές θετικές/αρνητικές στους $1717(+)$, $1723(-)$, $1728(-)$ και $1733(+)\text{ cm}^{-1}$ έχει αποδοθεί στις δυο διαμορφώσεις των πρωτονιωμένων μορφών του ασπαραγινικού οξέως D372, ν(COO(H)).^{7,15-21} Επίσης το σύμπλεγμα αυτό χάνει ένταση

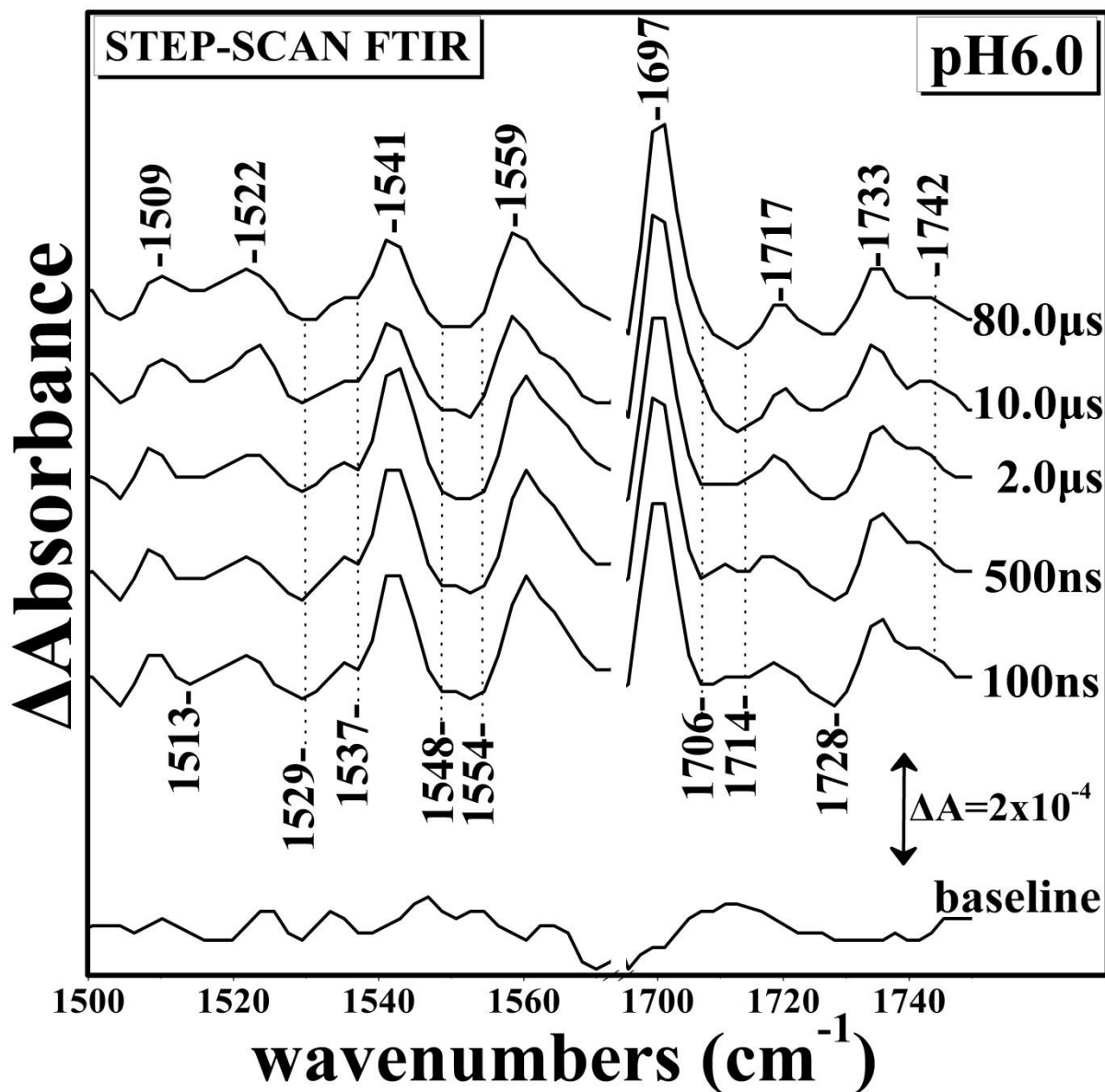
κατά τη διάρκεια του φαινομένου της φωτόλυσης. Παρατηρείται μια θετική κορυφή στους 1559 cm^{-1} , που έχει αποδοθεί στην αποπρωτονιωμένη μορφή του ασπαραγινικού οξέως D372, $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$,¹⁵ παραμένει αμετάβλητη κατά τη διάρκεια του πειράματος. Αυτό υποδεικνύει ότι κατά τη διάρκεια και μέχρι το πέρας του πειράματος συνυπάρχουν οι δύο μορφές του ασπαραγινικού οξέως D372, πρωτονιωμένη και αποπρωτονιωμένη. Μια ευρεία αρνητική κορυφή στους 1548 cm^{-1} παρουσιάζεται στα φάσματα η οποία παρουσιάζει μερική απώλεια έντασης και αποδίδεται στο αποτέλεσμα της σύνδεσης His-Tyr με μεγάλη συμβολή από τον ομοιοπολικό δεσμό C-N μεταξύ των δακτυλίων των δυο συστημάτων.²²⁻²³ Μια ακόμη θετική κορυφή στους 1541 cm^{-1} εμφανίζεται στα φάσματα διαφοράς και αποδίδεται στις δονήσεις του amide II.²⁴ Αυτή η κορυφή παραμένει αμετάβλητη σε $t_d=100-80000\text{ ns}$. Εμφανίζεται στα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) ένα σήμα διαφοράς (θετικό/αρνητικό) στους $1522/1529\text{ cm}^{-1}$ αντίστοιχα και έχει προηγουμένως αποδοθεί στην αποπρωτονιωμένη μορφή, $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$,⁷ της προπιονικής ομάδας A της αίμης α_3 και δεν φαίνεται να υπόκειται σε διακυμάνσεις όσο αφορά τη συχνότητα και την ένταση της. Αυτό σημαίνει ότι η αποπρωτονιωμένη μορφή της προπιονικής ομάδας A βρίσκεται σε ισορροπία με την πρωτονιωμένη μορφή σε χρόνο $t_d=100-80000\text{ ns}$. Τέλος, ένα σύμπλεγμα δονήσεων που παρουσιάζεται ως σήμα διαφοράς, $1506/1513\text{ cm}^{-1}$ αντίστοιχα, αποδίδεται στις δονήσεις της τυροσίνης και παραμένει αναλλοίωτο καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.²²⁻²³



Εικόνα 45. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm^{-1} ($t_d = 100\text{-}80000$ ns, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου $ba_3\text{-CO}$ σε pH7.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm.

Η εικόνα 46 δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm^{-1} ($t_d = 100\text{-}80000$ ns, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου $ba_3\text{-CO}$ σε pH6.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm. Σε αυτή την εικόνα, τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης

νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1690-1760 cm⁻¹ δείχνουν ένα σύμπλεγμα δονήσεων με μια κορυφή στους 1697 cm⁻¹ και ένα διπλό αρνητικό μορφής “W” στους 1706 και 1714 cm⁻¹. Η κορυφή στους 1697 cm⁻¹ δεν υπόκειται σε οποιεσδήποτε αλλαγές, ενώ οι δυο αρνητικές κορυφές στους 1706 και 1714 cm⁻¹ κατά τη διάρκεια του πειράματος συγχωνεύονται και επικρατεί η κορυφή στους 1714 cm⁻¹. Συγκρίνοντας με τις αντίστοιχες κορυφές στα φάσματα διαφοράς στο pH7 παρατηρείται ότι η κορυφή στους 1710 cm⁻¹ μετατοπίζεται κατά 4 cm⁻¹ στο pH6, ένδειξη ότι η πρωτονιωμένη μορφή της προπιονικής ομάδας A της αίμης α₃ επηρεάζεται από την αλλαγή του pH από ουδέτερο σε όξινο. Ένα σύμπλεγμα δονήσεων αποτελείται από κορυφές θετικές/αρνητικές στους 1717(+), 1728(-), 1733(+) και 1742(+) cm⁻¹ κάνει την εμφάνιση του στα TRS²-FTIR φάσματα διαφοράς σε pH6.0. Η κορυφή στους 1742 cm⁻¹ εμφανίζεται υπό τη μορφή ώμου στην 1733 cm⁻¹. Το σύμπλεγμα αυτό στο σύνολο του παραμένει αναλλοίωτο μέχρι το τέλος του πειράματος. Συγκρίνοντας με τα φάσματα στο pH7, στο pH6 η αρνητική κορυφή στους 1723 cm⁻¹ μετατοπίζεται κατά 5 cm⁻¹ στους 1728 cm⁻¹. Οι αλλαγές σε αυτό το σύμπλεγμα δονήσεων δείχνει μια ευαισθησία της πρωτονιωμένης μορφής του ασπαραγινικού οξέως με την αλλαγή του pH από ουδέτερο σε όξινο. Όπως στο pH7, έτσι και στο pH6 εμφανίζονται οι κορυφές στους 1559 και 1541 cm⁻¹ και παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά με αυτές στο pH7. Αυτό υποδεικνύει ότι η ισορροπία μεταξύ πρωτονιωμένων/αποπρωτονιωμένων μορφών του ασπαραγινικού οξέως D372, COO⁻ ↔ COOH, επηρεάζεται από την εναλλαγή από pH7 σε pH6 και μετατοπίζεται προς τα δεξιά, δηλαδή ευνοούνται οι πρωτονιωμένες μορφές. Αντιθέτως η αρνητική κορυφή στους 1548 cm⁻¹ που παρατηρήθηκε στα φάσματα του pH7, στο pH6 γίνεται διπλή με την εμφάνιση μιας ακόμη αρνητικής κορυφής στους 1554 cm⁻¹. Επίσης το σήμα διαφοράς 1522/1529 cm⁻¹ που παρατηρήθηκε στα φάσματα του pH7 και έχει προηγουμένως αποδοθεί στην αποπρωτονιωμένη μορφή, ν_{as}(COO⁻),⁷ της προπιονικής ομάδας A της αίμης α₃, στο pH6 εμφανίζεται μια ακόμη αρνητική κορυφή στους 1537 cm⁻¹. Το σήμα διαφοράς 1506/1513 cm⁻¹ που αποδίδεται στις δονήσεις της τυροσίνης στο pH6 υφίσταται μια μικρή μεταβολή στη συχνότητα και γίνεται 1509/1513 cm⁻¹ χωρίς μεταβολή στην ένταση τους. Αυτό αποδεικνύει μια ευαισθησία της τυροσίνης με τη μεταβολή του pH και η ισορροπία Tyr-O⁻ ↔ Tyr-OH μετατοπίζεται προς τα δεξιά.

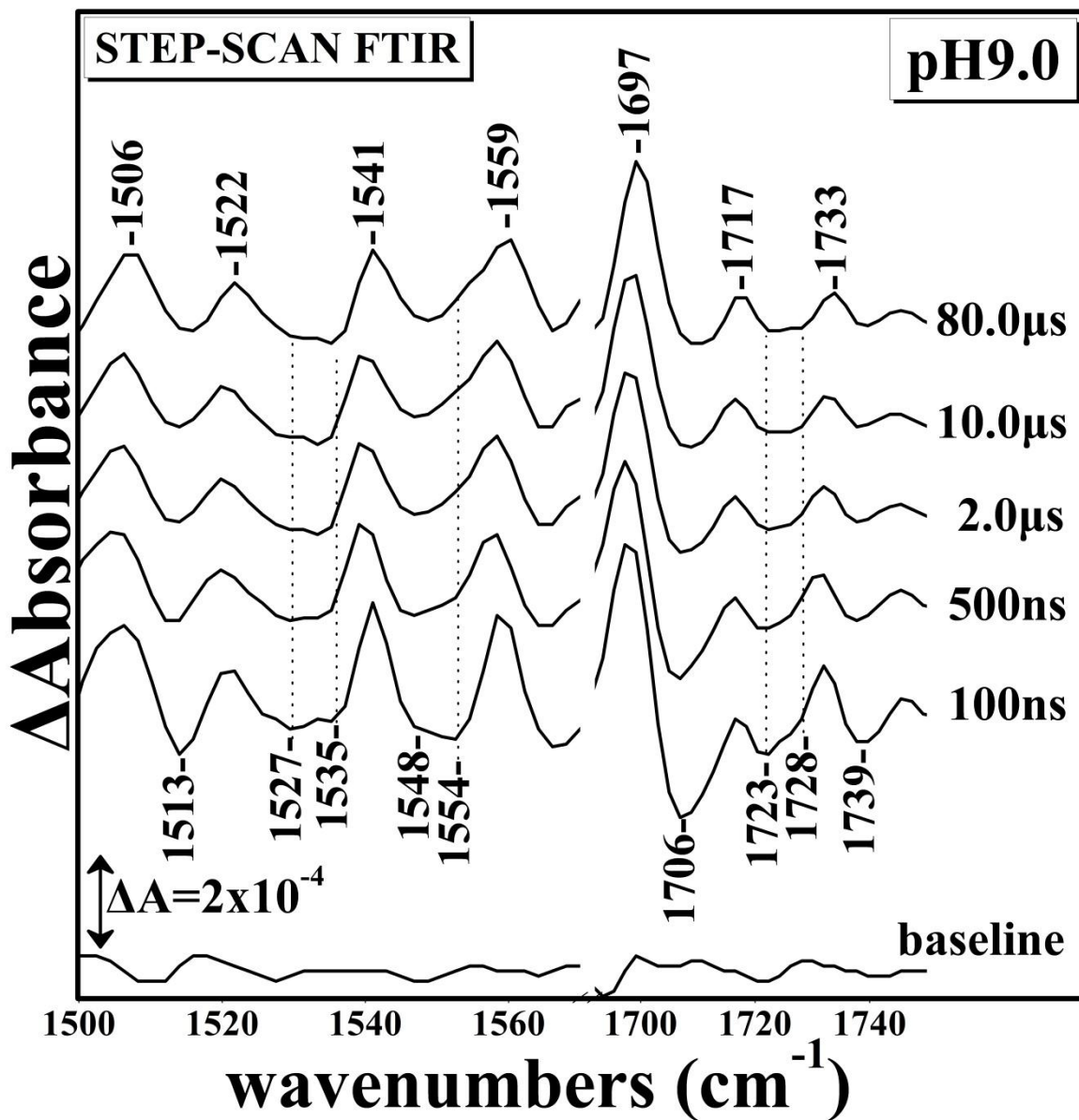


Εικόνα 46. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm⁻¹ ($t_d = 100\text{-}80000$ ns, 4 cm⁻¹ φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου *ba*₃-CO σε pH6.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm.

Η εικόνα 47 δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm⁻¹ ($t_d = 100\text{-}80000$ ns, 4 cm⁻¹ φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου *ba*₃-CO σε pH9.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm. Σε αυτή την εικόνα, τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης

νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1690-1760 cm⁻¹ δείχνουν ένα σήμα διαφοράς με μια θετική κορυφή στους 1697 cm⁻¹ και μια αρνητική στους 1706 cm⁻¹. Σε αντίθεση με τις αντίστοιχες κορυφές στα αντίστοιχα φάσματα διαφοράς στο pH7, παρατηρείται ότι η αρνητική κορυφή στους 1710 cm⁻¹ δεν υπάρχει στο pH9. Ένα σύμπλεγμα δονήσεων που αποτελείται από κορυφές θετικές/αρνητικές στους 1717 (+), 1723 (-), 1728 (-), 1733 (+), και 1739 (-) cm⁻¹ κάνει την εμφάνιση του στα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (TRS²-FTIR) σε pH9.0. Η διαφορά με τα αντίστοιχα φάσματα στο pH7 είναι ότι η αρνητική κορυφή στους 1739 cm⁻¹ δεν υπάρχει στο pH7, ενώ συγκρινόμενα με τα φάσματα διαφοράς στο pH6 παρατηρείται ότι η θετική κορυφή στους 1742 cm⁻¹ δεν υπάρχει στα φάσματα διαφοράς του pH9. Το συμπέρασμα που απορρέει από αυτές τις παρατηρήσεις είναι ότι η αλλαγή της τιμής του pH του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος επηρεάζει τις δυο διαμορφώσεις της πρωτονιωμένης μορφής του ασπαραγινικού οξέως D372. Όπως στα pH6 και pH7, έτσι και στο pH9 παρατηρούνται οι θετικές κορυφές στους 1559 και 1541 cm⁻¹ οι οποίες δεν υφίστανται οποιεσδήποτε μεταβολές που σημαίνει ότι το πρωτεϊνικό περιβάλλον δεν επηρεάζει αυτές τις δονήσεις σε οποιαδήποτε αλλαγή της τιμής του pH. Από την άλλη, ευαισθησία στην αλλαγή του pH από ουδέτερο σε βασικό παρουσιάζει η αρνητική κορυφή στους 1548 cm⁻¹ (pH7) που σε pH9 δημιουργείται μια νέα αρνητική κορυφή στους 1554 cm⁻¹ η οποία με την πάροδο του χρόνου χάνεται και κυρίαρχη κορυφή στην περιοχή αυτή γίνεται η κορυφή στους 1548 cm⁻¹. Συγκρίνοντας τώρα τα φάσματα διαφοράς στο pH6 στην αντίστοιχη περιοχή παρατηρείται ότι και στο pH6 παρατηρούνται αυτές οι δυο αρνητικές κορυφές με τη διαφορά όμως ότι παραμένουν και οι δύο μέχρι το πέρας του πειράματος. Το σήμα διαφοράς 1522/1529 cm⁻¹ που παρατηρήθηκε στα φάσματα του pH7, στα φάσματα του pH9 εμφανίζει μια ακόμη αρνητική κορυφή στους 1535 cm⁻¹ και η 1529 cm⁻¹ μετατοπίζεται στους 1526 cm⁻¹. Κάνοντας και την αντίστοιχη σύγκριση με τα φάσματα στο pH6, παρατηρείται μεγάλη διαφορά με το pH9. Οι αρνητικές κορυφές στους 1529 και 1537 cm⁻¹ (pH6) μετατοπίζονται στους 1526 και 1535 cm⁻¹ στο pH9. Αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η αποπρωτονιωμένη μορφή της προπιονικής ομάδας A της αίμης α₃ επηρεάζεται από την αλλαγή του pH του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος και κατά συνέπεια επηρεάζεται η ισορροπία COO⁻ ↔ COOH. Ένα ακόμη σήμα διαφοράς κοινό με το pH7 εμφανίζεται στα φάσματα του pH9 είναι το 1506/1513 cm⁻¹, ενώ υπάρχει διαφορά με τα αντίστοιχα φάσματα στο pH6, πράγμα που σημαίνει ότι και η

τυροσίνη επηρεάζεται από την αλλαγή στο pH από όξινο σε βασικό και αλλάζει η ισορροπία $\text{Tyr-O}^- \leftrightarrow \text{Tyr-OH}$.

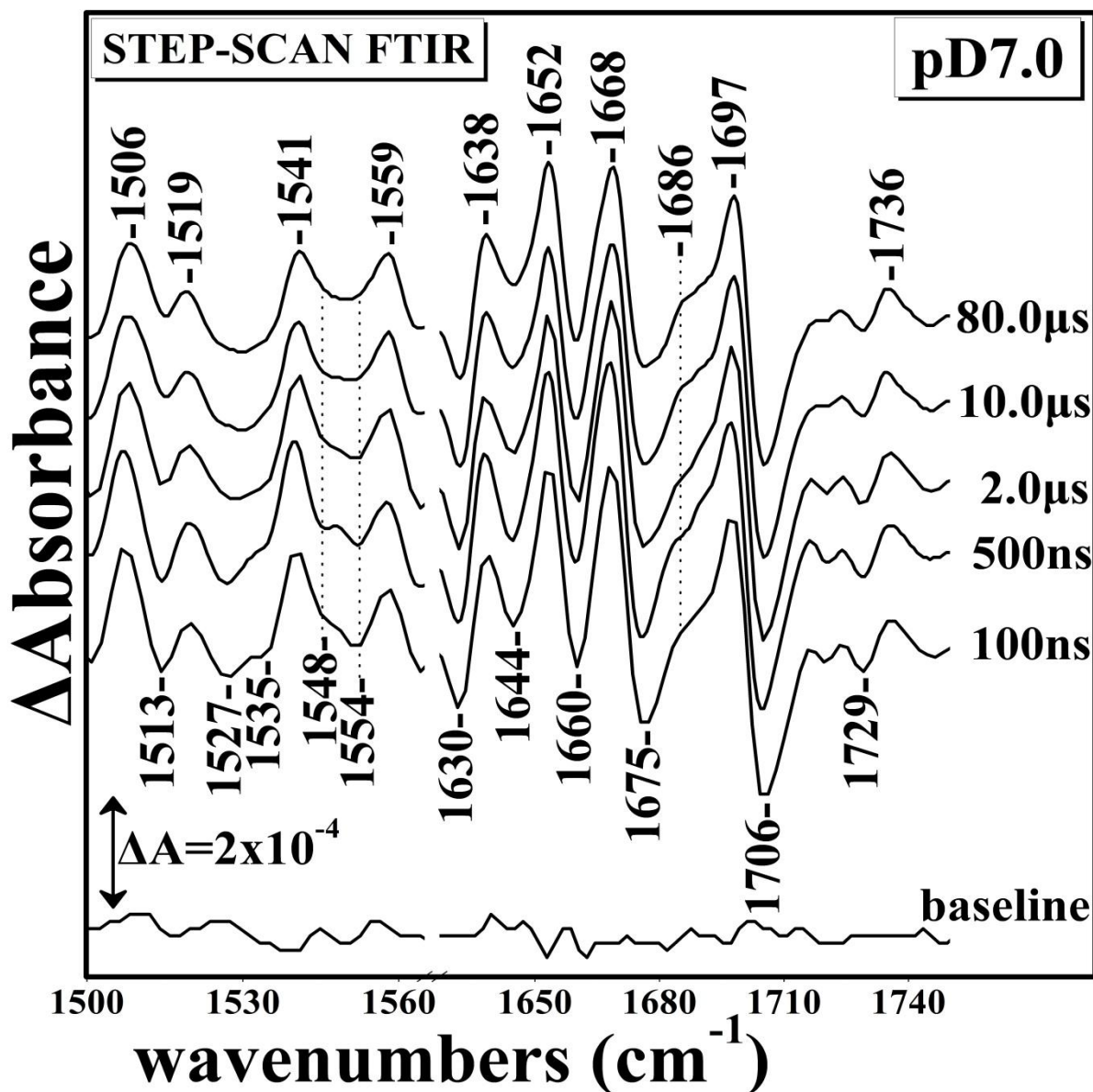


Εικόνα 47. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm⁻¹ ($t_d = 100\text{-}80000$ ns, 4 cm⁻¹ φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου $ba_3\text{-CO}$ σε pH9.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm.

Οι εικόνες 48-50 παρουσιάζουν τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου *ba*₃-CO χρησιμοποιώντας ως διαλύτη D₂O για να ελαχιστοποιηθεί η ισχυρή απορρόφηση της δόνησης κάμψης H-O-H του νερού, για τη μελέτη της επίδρασης που έχει το pH στη δευτερεύουσα δομή της πρωτεΐνης που προκύπτει από τη δόνηση του Amide I και επίσης για τη μελέτη της επίδρασης που έχει στην πρωτεΐνη η ανταλλαγή H/D. Η δόνηση του amide I προκύπτει 80% από τη δόνηση έκτασης του C=O της αμιδικής λειτουργικής ομάδας (amide functional group) και 20% από τη δόνηση έκτασης του δεσμού C-N.⁸⁻¹³ Η δευτερεύουσα δομή της πρωτεΐνης αποτελείται από τις δονήσεις *α*-helix (1648-1660 cm⁻¹), *β*-sheet (1625-1640 και 1672-1694 cm⁻¹), turns (1660-1685 cm⁻¹) και ακαθόριστες δομές (unordered structures) (1640-1650 cm⁻¹).⁸⁻¹³

Η εικόνα 48 δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm⁻¹ ($t_d = 100-80000$ ns, 4 cm⁻¹ φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου *ba*₃-CO σε pD7.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm. Ένα σήμα διαφοράς αποτελούμενο από τις κορυφές στους 1736/1729 cm⁻¹ εμφανίζεται στα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (TRS²-FTIR) σε pD7.0. Συγκρίνοντας το με τις αντίστοιχες κορυφές στο pH7 παρατηρείται ότι η 1717 cm⁻¹ χάνεται στο pD7 και οι υπόλοιπες κορυφές μετατοπίζονται, η 1723 cm⁻¹ (pH7) στους 1729 cm⁻¹ και η 1733 cm⁻¹ (pH7) στους 1736 cm⁻¹. Η ερμηνεία που δίνεται είναι ότι με την ανταλλαγή H/D επηρεάζεται η πρωτονική συνδεσιμότητα του ασπαραγινικού οξέως D372. Το σύμπλεγμα κορυφών που αποδόθηκε στη διατάραξη της δόνησης έκτασης του δεσμού C=O της προπιονικής ομάδας A της αίμης *a*₃, στα φάσματα διαφοράς με διαλύτη pD7, φαίνεται να αποτελείται από το σήμα διαφοράς θετικό/αρνητικό στους 1697/1706 cm⁻¹ αντίστοιχα. Το σύμπλεγμα αυτό παραμένει αμετάβλητο σε $t_d=100-80000$ ns. Συγκρίνοντας το με το αντίστοιχο στο pH7, παρατηρούμε ότι η διπλή αρνητική κορυφή, 1706 και 1710 cm⁻¹ στο pH7, γίνεται μια στο pD7 στους 1706 cm⁻¹. Επίσης ένα άλλο αξιοσημείωτο είναι ο λόγος της 1697 με την 1706 cm⁻¹. Στο pH7 η θετική κορυφή στους 1697 cm⁻¹ έχει μεγαλύτερη ένταση από την αρνητική κορυφή στους 1706 cm⁻¹, ενώ στο pD7 είναι περίπου ίσες σε ένταση. Όλα τα πιο πάνω μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η πρωτονιωμένη μορφή της προπιονικής ομάδας A της αίμης *a*₃ επηρεάζεται άμεσα από την ανταλλαγή H/D. Πιο κάτω παρατηρείται πληθώρα κορυφών που αντιστοιχούν στη δευτερεύουσα πρωτεϊνική δομή και έχουν αποδοθεί

στα συμπλέγματα δονήσεων του β -sheet, α -helical και turns. Οι κορυφές που αποδίδονται στο β -sheet σύμπλεγμα δονήσεων είναι οι 1630 (-), 1638 (+), και 1644 (-) cm^{-1} . Οι κορυφές αυτές παραμένουν αναλλοίωτες καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Το σήμα διαφοράς που αποτελείται από τις κορυφές 1686/1675 cm^{-1} οι οποίες παραμένουν αναλλοίωτες και αποδίδεται σε δονήσεις στροφής (turns) της πρωτεΐνης. Το σύμπλεγμα κορυφών που αποδίδεται στο α -helical σύμπλεγμα δονήσεων αποτελείται από τις 1652 (+), 1660 (-) και 1668 (+) cm^{-1} και παραμένουν αναλλοίωτες σε $t_d=100-80000$ ns. Ευαισθησία στην ανταλλαγή H/D δεν φαίνεται να έχει η κορυφή στους 1559 cm^{-1} γιατί παραμένει αναλλοίωτη και στην ίδια συχνότητα με την αντίστοιχη στο pH7 καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Οι ίδιες παρατηρήσεις γίνονται και στη θετική κορυφή στους 1541 cm^{-1} . Η κορυφή που παρουσιάζει ευαισθησία με την ανταλλαγή H/D είναι η αρνητική κορυφή στους 1548 cm^{-1} . Στο pD7 εμφανίζεται και μια νέα αρνητική κορυφή στους 1554 cm^{-1} που κατά τη διάρκεια του πειράματος χάνει ένταση μέχρι οι δύο αρνητικές κορυφές να συγχωνευτούν σε μια ευρεία αρνητική κορυφή. Αυτό σημαίνει ότι ο δεσμός των αμινοξικών κατάλοιπων His-Tyr επηρεάζεται από την ανταλλαγή H/D. Το σήμα διαφοράς (peak/trough) 1522/1529 cm^{-1} (pH7) που αποδόθηκε στην αποπρωτονιωμένη μορφή, $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$,⁷ της προπιονικής ομάδας A της αίμης α_3 , μετατοπίζεται και επίσης εμφανίζεται μια νέα αρνητική κορυφή και το σήμα διαφοράς γίνεται ένα σύμπλεγμα δονήσεων αποτελούμενο από τις 1519 (+), 1527 (-) και 1535 (-) cm^{-1} στο pD7 αποδεικνύοντας έτσι μια ευαισθησία στην ανταλλαγή H/D. Τέλος, το σήμα διαφοράς 1506/1513 cm^{-1} παρατηρείται τόσο στα φάσματα διαφοράς σε pH7, όσο και σε αυτά σε pD7. Η διαφορά είναι ότι στο pH7 η αναλογία 1506:1513 cm^{-1} είναι περίπου ίδια, ενώ στο pD7 η 1506 cm^{-1} έχει περίπου διπλάσια ένταση από την 1513 cm^{-1} . Το σήμα αυτό αποδίδεται στις δονήσεις της τυροσίνης Tyr-OH/Tyr-O⁻ και με αυτή την παρατήρηση εξάγεται το συμπέρασμα ότι η τυροσίνη δεν επηρεάζεται από την ανταλλαγή H/D σε ουδέτερη τιμή pH/pD, αλλά επηρεάζεται η ισορροπία Tyr-OH \leftrightarrow Tyr-O⁻.

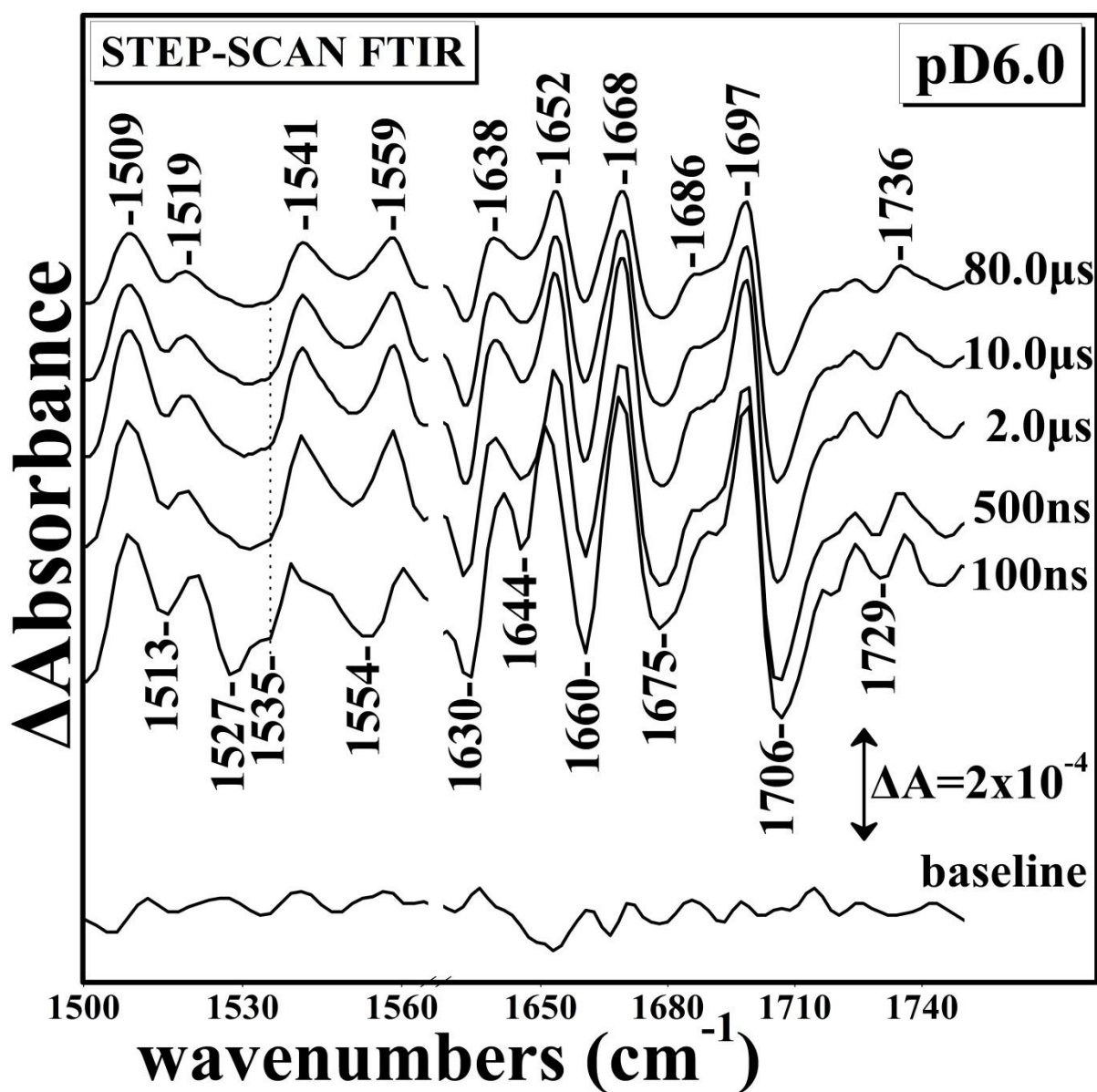


Εικόνα 48. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm^{-1} ($t_d = 100$ -80000 ns, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου ba_3 -CO σε $\text{pD}7.0$ που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm.

Η εικόνα 49 δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm^{-1} ($t_d = 100$ -80000 ns, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου ba_3 -CO σε $\text{pD}6.0$ που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm. Το σύμπλεγμα δονήσεων που αποδίδεται στην πρωτονιωμένη

μορφή του ασπαραγινικού οξέως D372 που παρατηρήθηκε στα αντίστοιχα φάσματα του pD7, εμφανίζεται και στα φάσματα του pD6 και αποτελείται από ένα σήμα διαφοράς 1736(+)/1729(-) cm^{-1} . Οι αλλαγές που υφίσταται το συγκεκριμένο σήμα, σημείο στο οποίο διαφέρει από το pD7, σε $t_d=100-80000$ ns είναι η ελάχιστη απώλεια έντασης της απορρόφησης των δονήσεων. Σε σύγκριση με το pH6, οι δυο θετικές κορυφές στους 1742 και 1733 cm^{-1} γίνονται μια στους 1736 cm^{-1} και η θετική κορυφή στους 1717 cm^{-1} δεν υπάρχει. Συμπερασματικά, οι δυο διαμορφώσεις της πρωτονιωμένης μορφής του D372 επηρεάζονται με την ανταλλαγή pH6/pD6. Ένα σήμα διαφοράς θετικό/αρνητικό στους 1697/1706 cm^{-1} παρατηρείται στα φάσματα διαφοράς σε pD6 το οποίο χάνει ένταση κατά τη διάρκεια του φαινομένου της φωτόλυσης. Οι συχνότητες των κορυφών είναι οι ίδιες με το pD7 αλλά και με το pH6 με τη διαφορά ότι στο pH6 παρατηρείται ακόμα μια αρνητική κορυφή στους 1714 cm^{-1} υποδεικνύοντας έτσι την ευαισθησία στην ανταλλαγή H/D που παρουσιάζει η προπιονική ομάδα A της αίμης α_3 . Οι κορυφές που αποδίδονται στο β -sheet σύμπλεγμα δονήσεων είναι οι 1630 (-), 1638 (+), και 1644 (-) cm^{-1} , οι οποίες χάνουν ένταση σε $t_d=100-80000$ ns δείχνοντας μια ευαισθησία στην αλλαγή pD7/pD6. Ένα σήμα διαφοράς στους 1686/1675 cm^{-1} παρουσιάζεται στα φάσματα διαφοράς σε pD6, ίδιο με αυτό που εμφανίζεται στα φάσματα διαφοράς σε pD7. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αλλαγή από pD7 σε pD6, δεν αλλάζει τη θέση στην οποία βρίσκεται η πρωτεΐνη. Το σύμπλεγμα κορυφών που αποδίδεται στο α -helical σύμπλεγμα δονήσεων αποτελείται από τις 1652(+), 1660(-) και 1668(+) cm^{-1} , κορυφές ίδιας συχνότητας όπως και στο pD7. Αυτές οι κορυφές υπόκεινται σε μείωση της έντασης τους σε $t_d=100-80000$ ns. Παρατηρείται η ύπαρξη κορυφής στους 1559 cm^{-1} όπως και στο pD7 αλλά και στο pH6, η οποία δεν υφίσταται οποιαδήποτε αλλαγή. Η αρνητική κορυφή στους 1554 cm^{-1} απαντάται και στα φάσματα διαφοράς σε pD6 αλλά επίσης και στα φάσματα διαφοράς σε pH6 και pD7. Η διαφορά σε pD6 σε σχέση με τα pD7 και pH6 είναι ότι στο pD6 δεν υπάρχει η αρνητική κορυφή στους 1548 cm^{-1} . Αυτό δείχνει ευαισθησία στην ανταλλαγή pD7/pD6 και στην ανταλλαγή pD6/pH6. Άλλη μια κορυφή στους 1541 cm^{-1} παρατηρείται στα φάσματα σε pD6, η οποία αντιστοιχεί σε δονήσεις του Amide II και απαντάται σε pD7 αλλά και σε pH6. Επίσης παρατηρείται ένα σύμπλεγμα δονήσεων, που απαντάται και στα φάσματα του pD7, και αποτελείται από τις κορυφές στους 1519 (+), 1527 (-) και 1535 (-) cm^{-1} . Υπάρχουν ορισμένες αλλαγές όσο αφορά τις αντίστοιχες κορυφές στα φάσματα διαφοράς σε pH6. Στο pH6 οι αντίστοιχες κορυφές είναι μετατοπισμένες στους 1522 (+), 1529 (-) και 1537 (-) cm^{-1} , γεγονός που υποδεικνύει την ευαισθησία της αποπρωτονιωμένης μορφής της προπιονικής

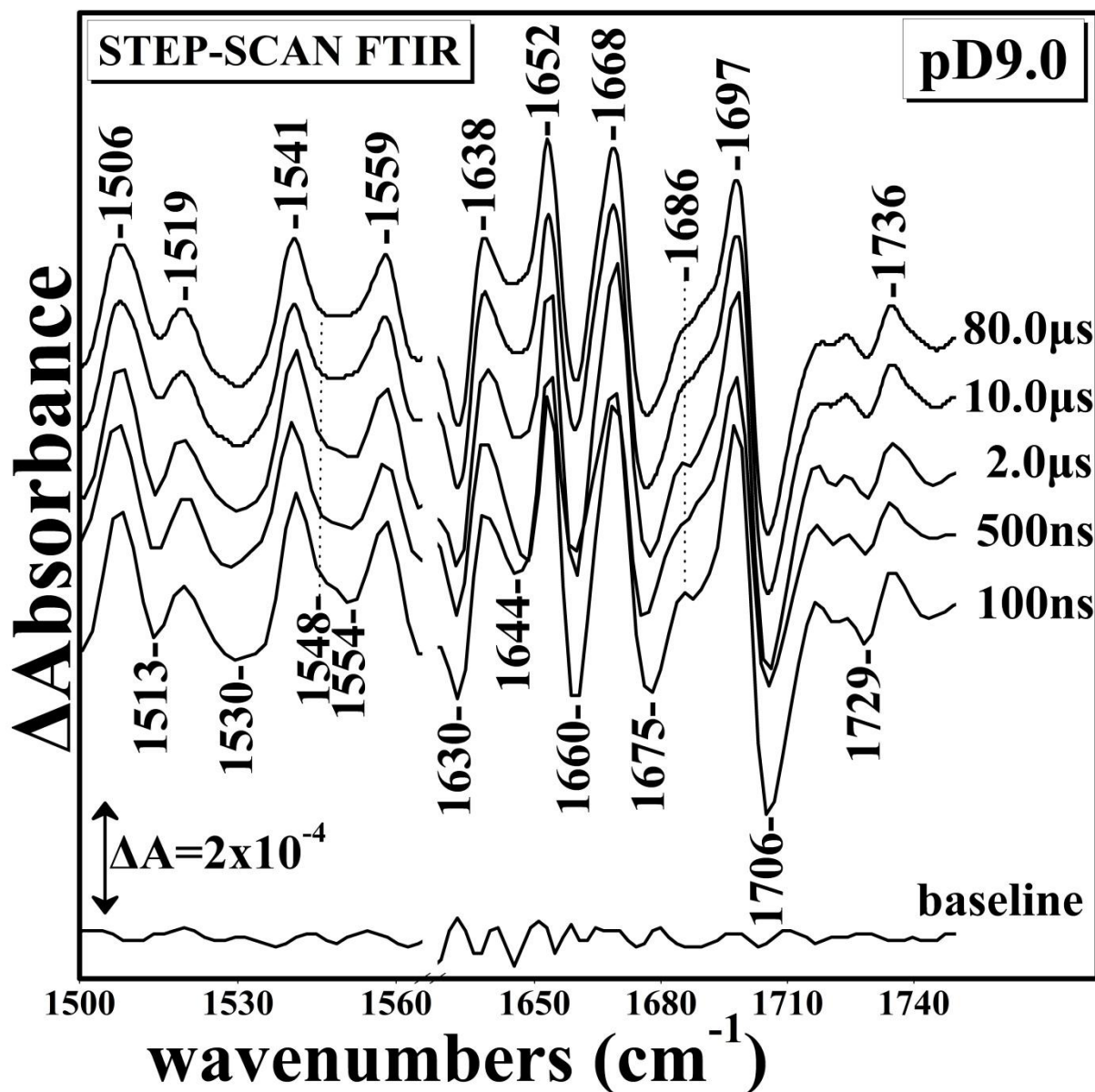
ομάδας A της αίμης α_3 στην ανταλλαγή H/D. Συγκρίνοντας και με τη συμπεριφορά της πρωτονιωμένης μορφής της προπιονικής ομάδας A της αίμης α_3 παρατηρείται ότι η ισορροπία $\text{COO}^- \leftrightarrow \text{COOH}$ επηρεάζεται από την ανταλλαγή H/D. Όπως στο pH6, έτσι και στο pD6 παρατηρείται ένα σήμα διαφοράς, που αντιστοιχεί στις δονήσεις της τυροσίνης, στους $1509/1513 \text{ cm}^{-1}$ υποδεικνύοντας ότι η τυροσίνη δεν επηρεάζεται από την ανταλλαγή pH6/pD6. Αντίθετα, στο pD7 το σήμα διαφοράς είναι μετατοπισμένο κατά το ήμισυ στους $1506/1513 \text{ cm}^{-1}$, δείχνοντας έτσι την επιρροή που ασκείται στις δονήσεις της τυροσίνης η ανταλλαγή pD7/pD6.



Εικόνα 49. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm⁻¹ ($t_d = 100-80000$ ns, 4 cm⁻¹ φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου *ba*₃-CO σε pD6.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm.

Η εικόνα 50 δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm⁻¹ ($t_d = 100-80000$ ns, 4 cm⁻¹ φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου *ba*₃-CO σε pD9.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm. Το σύμπλεγμα δονήσεων που αποδίδεται στην πρωτονιωμένη μορφή του ασπαραγινικού οξέως D372 που παρατηρήθηκε στα αντίστοιχα φάσματα του pD7, εμφανίζεται και στα φάσματα του pD9 και αποτελείται από ένα σήμα διαφοράς 1736(+)/1729(-) cm⁻¹. Σε σύγκριση με το pH9, οι δυο θετικές κορυφές στους 1717 και 1733 cm⁻¹ γίνονται μια στους 1736 cm⁻¹ και οι δυο αρνητικές κορυφές στους 1723 και 1739 cm⁻¹ γίνονται μια αρνητική κορυφή στους 1729 cm⁻¹. Συμπερασματικά, οι δυο διαμορφώσεις της πρωτονιωμένης μορφής του D372 επηρεάζονται με την ανταλλαγή pH9/pD9 αλλά όχι με την αλλαγή pD7/pD9. Ένα σήμα διαφοράς (peak/trough) αποτελούμενο από τις 1697/1706 cm⁻¹ αντίστοιχα, αποδόθηκε στη δόνηση ν(COOH) της προπιονικής ομάδας A της αίμης *a*₃ και εμφανίζεται στα φάσματα διαφοράς του pD9. Το σήμα διαφοράς 1697/1706 cm⁻¹ έχει τις ίδιες συχνότητες και εντάσεις κορυφών με αυτό στο pD7 αλλά στο pH9 είναι ίδιες οι συχνότητες, με διαφορετικό λόγο 1697:1706 cm⁻¹. Κάνοντας τις συγκρίσεις αυτές καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η δόνηση ν(COOH) της προπιονικής ομάδας A της αίμης *a*₃ δεν επηρεάζεται από την ανταλλαγή pD7/pD9 και επηρεάζεται ελάχιστα από την ανταλλαγή pH9/pD9. Οι κορυφές που αποδίδονται στο β-sheet σύμπλεγμα δονήσεων είναι οι 1630(-) 1638(+), και 1644(-) cm⁻¹, οι οποίες είναι ίδιας έντασης και συχνότητας με αυτές που παρατηρήθηκαν στο pD7 αλλά και στο pD6. Άλλο ένα σήμα διαφοράς στους 1686/1675 cm⁻¹ γίνεται αντιληπτό στο pD9 είναι ίδιο με αυτό που παρατηρήθηκε στα άλλα δυο pD7 και pD6 και δείχνει ότι η πρωτεΐνη η θέση της πρωτεΐνης δεν αλλάζει με την αλλαγή στην τιμή του pD. Παρατηρώντας τις δονήσεις σε pD9 που έχουν αποδοθεί στις α έλικες της πρωτεΐνης στους 1668(+), 1660(-) και 1652(+), παρατηρούμε ότι έχουν τις ίδιες συχνότητες και συμπεριφορά με τις αντίστοιχες στα pD6 και pD7. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι έλικες της πρωτεΐνης δεν επηρεάζονται με την αλλαγή του pD. Αναλλοίωτες στην αλλαγή pD7/pD9 αλλά και στην pH9/pD9 παραμένουν οι κορυφές στους 1559 και 1541 cm⁻¹, αλλά

και οι δυο αρνητικές κορυφές στους 1548 και 1554 cm^{-1} . Η διαφορά που προκύπτει συγκρίνοντας τις δυο πιο πάνω αρνητικές κορυφές σε pD6 και pD9 είναι ότι στο pD6 επικρατεί μόνο η 1554 cm^{-1} ενώ στο pD9 συνυπάρχουν και οι δυο. Το σήμα διαφοράς 1519/1530 cm^{-1} που εμφανίζεται στο pD9, επηρεάζεται από την αλλαγή pD7/pD9 γιατί η αρνητική κορυφή στους 1530 cm^{-1} (pD9) στο pD7 είναι διπλή με συχνότητες 1535 και 1527 cm^{-1} , ενώ η θετική κορυφή 1519 cm^{-1} παραμένει αναλλοίωτη. Συγκρίνοντας τώρα τις αντίστοιχες κορυφές στα φάσματα του pH9 παρατηρείται ότι οι κορυφές 1522 (+), 1526 (-) και 1535 (-) cm^{-1} (pH9), στο pD9 γίνονται 1519 (+), 1530 (-) cm^{-1} . Έτσι καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η αποπρωτονιωμένη μορφή της προπιονικής ομάδας A της αίμης α_3 επηρεάζεται από την ανταλλαγή H/D αλλά και την αλλαγή pD7/pD9. Τέλος παρατηρείται στα φάσματα διαφοράς στο pD9, το σήμα διαφοράς 1506/1513 cm^{-1} , σήμα τα οποίο απαντάται στις ίδιες συχνότητες σε pD7 και pH9 αλλά στο pD6 έχει μετατοπιστεί στις συχνότητες 1509/1513 cm^{-1} . Το συμπέρασμα που βγαίνει είναι ότι η τυροσίνη δεν επηρεάζεται από την ανταλλαγή pH9/pD9 αλλά ούτε και με την pD7/pD9 παρά μόνο ελάχιστα με την αλλαγή pD6/pD9.



Εικόνα 50. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm⁻¹ ($t_d = 100\text{-}80000$ ns, 4 cm⁻¹ φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου *ba*₃-CO σε pD9.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 ns από laser 532 nm.

Στους πιο κάτω πίνακες γίνεται σύνοψη των πιθανών αποδόσεων των κορυφών που ανιχνεύτηκαν στα φάσματα χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR).

Πίνακας 3. Πιθανές αποδόσεις των κορυφών που ανιχνεύτηκαν στα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερόθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR).

Συχνότητα (cm ⁻¹)	Πιθανή απόδοση κορυφής
1733 (+)	D372 ν(COOH)
1728 (-)	
1723 (-)	
1717 (+)	
1710 (-)	Prop. A ν(COOH)
1706 (-)	
1697 (+)	
1559 (+)	D372 ν _{asym} (COO ⁻)
1548 (-)	His-Tyr
1541 (+)	Amide II
1529 (-)	Prop. A ν _{asym} (COO ⁻)
1522 (+)	
1513 (-)	Tyr-O ⁻
1506 (+)	Tyr-OH

Πίνακας 4. Πιθανές αποδόσεις των κορυφών που αντιστοιχούν στη δευτερεύουσα δομή του Amide I και ανιχνεύθηκαν στα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) με διαλύτη D₂O.

Συχνότητα (cm ⁻¹)	Πιθανή απόδοση κορυφής	
1652 (+)	α-helical	Amide I Secondary Structure
1660 (-)		
1668 (+)		
1630 (-)	β-sheet	
1638 (+)		
1644 (-)		
1675 (-)	Turn	
1686 (+)		

6.4 Συμπεράσματα

Χρησιμοποιώντας την τεχνική χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR) στο πλήρως ανηγμένο σύμπλοκο *ba*₃-CO σε τρεις διαφορετικές τιμές pH και pD στο οποίο έγινε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm, έγινε εκτεταμένη μελέτη όσο αφορά την επίδραση που έχει η αλλαγή του pH και pD στην πρωτεΐνη. Οι μετατοπίσεις της συχνότητας και οι μεταβολές στην ένταση των δονήσεων των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξικών κατάλοιπων και της αίμης α_3 , που παρατηρούνται στα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR), είναι αποτελέσματα που προκύπτουν από τις δομικές διαταραχές που υφίσταται το ένζυμο κατά τη σχάση του δεσμού Fe-CO της αίμης α_3 από ένα παλμό 532 nm.

Η ανταλλαγή pH/pD του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος έχει επίδραση στο διπυρηνικό κέντρο και στο ασπαραγινικό οξύ D372, το οποίο βρίσκεται 3.4 Å από την προπιονική ομάδα A της αίμης α_3 με την οποία και δεσμεύεται με δεσμούς υδρογόνου. Παρατηρώντας τις πρωτονιωμένες/αποπρωτονιωμένες διαμορφώσεις του ασπαραγινικού οξέως D372 πως συμπεριφέρονται στην αλλαγή του pH, βλέπουμε ότι υπάρχει μια ισορροπία $\text{COO}^- \leftrightarrow \text{COOH}$, ενώ παρατηρώντας την ανταλλαγή H/D, δημιουργείται μια νέα ισορροπία $\text{COOH} \leftrightarrow \text{COOD}$. Επίσης η πρωτονική συνδεσιμότητα επηρεάζεται μόνο όταν το D372 βρίσκεται στην πρωτονιωμένη του μορφή. Συμπερασματικά η κατάσταση στην οποία βρίσκεται το ασπαραγινικό οξύ D372 επηρεάζεται άμεσα από την αλλαγή του διαλύτη.¹⁶

Επίσης η ανταλλαγή pH/pD του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος έχει επίδραση και στη συμπεριφορά της προπιονικής ομάδας A της αίμης α_3 . Παρακολουθώντας τις πρωτονιωμένες/αποπρωτονιωμένες διαμορφώσεις της προπιονικής ομάδας A της αίμης α_3 , παρατηρούμε ότι υπάρχει μια ισορροπία $\text{COO}^- \leftrightarrow \text{COOH}$ που όμως επηρεάζεται άμεσα με την ανταλλαγή H/D. Η παρατήρηση των πρωτονιωμένων και αποπρωτονιωμένων μορφών της προπιονικής ομάδας A της αίμης α_3 και του D372, καθώς και η εξάρτησή τους από το πρωτεϊνικό περιβάλλον οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μία πρωτονική συνδεσιμότητα μεταξύ τους καθώς και μεταξύ των μορίων νερού που απαντώνται σε αυτή την περιοχή όπως παρουσιάζονται στην εικόνα 41. Όταν η προπιονική ομάδα A της αίμης α_3 και η πλευρική αλυσίδα του D372 είναι πρωτονιωμένες (κατάσταση A) ή αποπρωτονιωμένες (κατάσταση C) τότε η απελευθέρωση πρωτονίων δεν είναι εφικτή ενώ όταν οι δυο αυτές ομάδες μοιράζονται ένα πρωτόνιο (καταστάσεις B και D) τότε έχουν τη δυνατότητα να απελευθερώσουν ένα πρωτόνιο και να δεχτούν ένα άλλο. Με αυτό τον τρόπο είναι κατανοητό ότι οι δυο ομάδες παίζουν σημαντικό ρόλο στην κίνηση των πρωτονίων μέσα στην πρωτεΐνη. Τα πρωτόνια αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις διάφορες λειτουργίες της πρωτεΐνης όπως είναι η αναγωγή του οξυγόνου σε νερό και της αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου σε οξείδιο του διαζώτου. Το συμπέρασμα που απορρέει από αυτή την παρατήρηση είναι ότι η προπιονική ομάδα A της αίμης α_3 και το D372 μπορούν να αλλάξουν τη δομική τους διαμόρφωση και να επιτρέψουν με αυτή τη μεταφορά πρωτονίων.

Ένα άλλο συμπέρασμα που απορρέει από την παρούσα μελέτη είναι ότι ο δεσμός His-Tyr που μάλλον είναι οι His233 και Tyr237 υποκαταστάτες του Cu_B , επηρεάζεται από την ανταλλαγή H/D αλλά και από τις αλλαγές στις τιμές pH και pD.

Παρακολουθώντας τη συμπεριφορά της τυροσίνης καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η τυροσίνη είναι αρκετά ευαίσθητη σε όξινο pH και αλλάζει η ισορροπία Tyrosine (Tyr-OH)/Tyrosinate (Tyr-O⁻). Όσο αφορά την ανταλλαγή H/D, η ισορροπία Tyr-OH↔Tyr-O⁻ δεν επηρεάζεται από την αλλαγή στην τιμή του pH του διαλύτη αλλά επηρεάζεται από την ανταλλαγή H/D και ευνοείται η πρωτονιωμένη μορφή της τυροσίνης.

Μια παρατήρηση που αφορά το Amide II είναι ότι δεν επηρεάζεται με την αλλαγή στην τιμή του pH ή την τιμή του pD αλλά και ούτε με την ανταλλαγή H/D. Μελετώντας την επίδραση που έχει η αλλαγή της τιμής του pD στη δευτερεύουσα δομή του Amide I και έχοντας ως φάσμα αναφοράς το φάσμα διαφοράς σε ουδέτερο pD, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι με την αλλαγή της τιμής του pD και κατά συνέπεια της αλλαγής στο πρωτεϊνικό περιβάλλον η πρωτεΐνη παραμένει στη θέση της, αναλλοίωτη και σε γρήγορους χρόνους δεν παρατηρούνται μεταβολές όσο αφορά τις έλικες (α -helical) και τις πτυχωτές (β -sheet) της πρωτεΐνης.

6.5 Παραπομπές

1. H. Frauenfelder, S. G. Sligar, P. G. Wolynes, *Science*, 1991, **254**, 1598-1603.
2. R.A. Goldbeck et al, *Biochemistry*, 1992, **31**, 9376-9387.
3. H. Y. Chang, S. Choi, A. S. Vakkasoglou, Y. Chen, J. Hemp, J. A. Fee and R. B. Gennis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, **109**, 5259-5264.
4. C. Koutsoupakis, E. Pinakoulaki, S. Stavrakis, V. Daskalakis and C. Varotsis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 2004, **1655**, 347–352
5. E. Pinakoulaki, T. Ohta, T. Soulimane, T. Kitagawa and C. Varotsis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 15161-15167.
6. C. Koutsoupakis, O. Kolaj-Robin, T. Soulimane and C. Varotsis, *J. Biol. Chem.*, 2011, **286**, 30600-30605.
7. C. Koutsoupakis, T. Soulimane and C. Varotsis, *Biophysical Journal*, 2004, **86**, 2438–2444.
8. S. Krimm and J. Bandekar, *Adv. Prot. Chem.*, 1986, **38**, 181-364.
9. J. Kong and YU Shaoning, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2007, **39**, 549-559.
10. M. Jackson and H. H. Mantsch, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, **30**, 95-120.

11. S. Susi and D. M. Byler, *Methods Enzymol*, 1986, **130**, 290-311.
12. F. Dousseau and M. Pezolet, *Biochemistry*, 1990, **29**, 8771–8779.
13. Iwaki *et al.*, *Biochemistry*, 2005, **44**, 4230-4237.
14. K. Hasegawa, T-A. Ono and T. Noguchi, *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 4253-4265.
15. K. Gerwert, B. Hess, J. Soppa and D. Oesterhelt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **86**, 4943-4947.
16. A. Nicolaidis, T. Soulimane and C. Varotsis, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, **17**, 8113-8119.
17. P. Rich and A. Maréchal, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, **1777**, 912–918.
18. J. Heberle, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1458**, 135-147.
19. A. Barth, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, **1767**, 1073-1101.
20. D. Heitbrink, H. Sigurdson, C. Bolwien, P. Brzezinski and J. Heberle, *Biophysical Journal*, 2002, **82**, 1-10.
21. Andreas Barth, *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 2000, **74**, 141–173.
22. H. Kandori, H. Nakamura, Y. Yamazaki and T. Mogi, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 32821-32826.
23. F. Tomson *et al.*, *Biochemistry*, 2002, **41**, 14383-14390.
24. P. Hellwig, T. Soulimane, G. Buse and W. Mantele, *Biochemistry*, 1999, **38**, 9648-9658.
25. P. Hellwig *et al.*, *Biochemistry* 2002, **41**, 9116-9125.
26. P. Hellwig *et al.*, *Biochemistry* 1998, **38**, 7390-7399.
27. C. Koutsoupakis, T. Soulimane and C. Varotsis, *J. Biol. Chem.*, 2012, **287**, 37495-37507.
28. A. Nicolaidis, T. Soulimane & C. Varotsis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 2016, **1857**, 1534–1540.

7 Μελέτη της πρωτεϊνικής χαλάρωσης της κυτοχρωμικής οξειδοαναγωγάσης ba_3 χρησιμοποιώντας την τεχνική χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR)

7.1 Εισαγωγή

Η κυτοχρωμική οξειδοαναγωγάση ba_3 που απομονώνεται από το βακτήριο *Thermus thermophilus* είναι ένα μέλος της οικογένειας B των οξειδοαναγωγάσεων και το ενεργό κέντρο της περιέχει μια αίμη a_3 και ένα άτομο χαλκού Cu_B . Καταλύει την 4 ηλεκτρονίων αναγωγή του O_2 σε H_2O , μετατρέποντας την ενέργεια αυτής της αντίδρασης σε μια διαμεμβρανική πρωτονιακή κινητήρια δύναμη, την 2 ηλεκτρονίων αναγωγή του NO σε N_2O και τελικά την 2 ηλεκτρονίων οξείδωση του CO σε CO_2 . Για την πραγματοποίηση αυτών των αντιδράσεων, η κυτοχρωμική οξειδοαναγωγάση ba_3 εισέρχεται σε μια τεταμένη κατάσταση και καθώς ολοκληρώνονται οι αντιδράσεις και απομακρύνονται τα προϊόντα τους από το ενεργό της κέντρο, αυτή τείνει να εισέλθει σε μια πιο χαλαρή διαμόρφωση.

Με την τεχνική χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) δίνεται η δυνατότητα για μελέτη της συμπεριφοράς της πρωτεΐνης μετά τη φωτόλυση του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου ba_3 -CO. Με τη φωτόλυση του δεσμού Fe-CO της αίμης a_3 από ένα παλμό 7 ns από ένα παλμικό laser μήκους κύματος 532 nm, προσδίδεται ένα τεράστιο ποσό ενέργειας σε ολόκληρη την πρωτεΐνη. Αυτή η ενέργεια ωθεί την πρωτεΐνη να αλλάξει την κατάσταση στην οποία βρίσκεται και μπει μια τεταμένη κατάσταση. Καθώς περνά ο χρόνος η ενέργεια του παλμού εξασθενεί και η πρωτεΐνη τείνει να πάρει μια πιο χαλαρή διαμόρφωση. Όλη αυτή η διαδικασία της πρωτεϊνικής χαλάρωσης (protein relaxation) μπορεί να παρατηρηθεί και να μελετηθεί με την τεχνική χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) όπως επίσης μπορεί να παρατηρηθεί και να μελετηθεί ο ρυθμός με τον οποίο χαλαρώνουν (relaxation rate) οι διάφορες μορφές των αμινοξικών κατάλοιπων κλειδιά για τη λειτουργία του ενζύμου.

7.2 Πειραματικές διαδικασίες

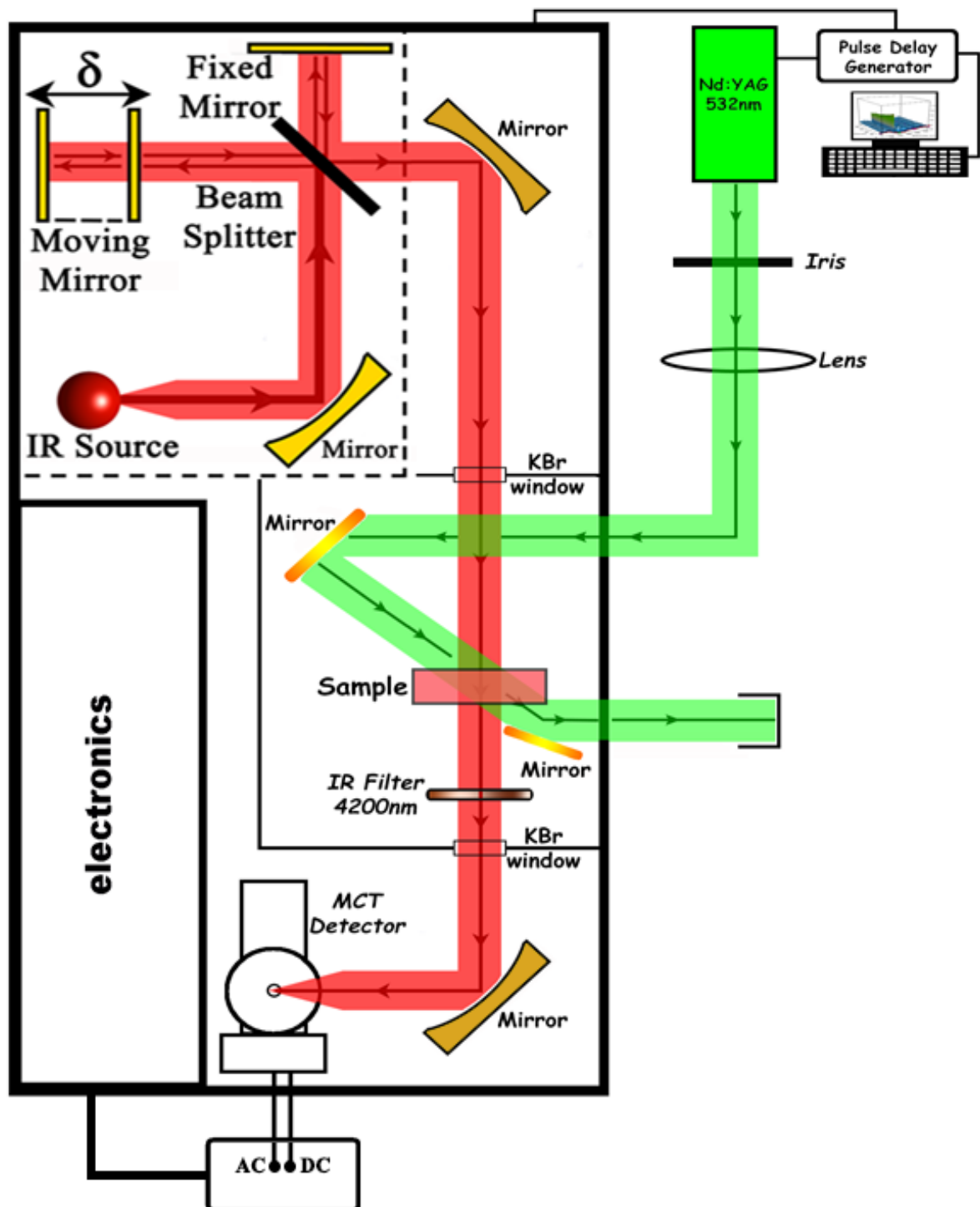
7.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Η κυτοχρωμική οξειδοαναγωγή ba_3 απομονώθηκε σύμφωνα με προηγούμενες δημοσιευμένες διαδικασίες από τα κύτταρα του βακτηρίου *Thermus thermophilus* HB8. Τα δείγματα της κυτοχρωμικής οξειδοαναγωγής ba_3 τοποθετήθηκαν στα επιθυμητά ρυθμιστικά διαλύματα 0.1M pH/pD 7.0, HEPES [4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid], pH5.6, MES hydrate [2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid hydrate, 4-Morpholineethanesulfonic acid] και pH9.0, CHES [2-(Cyclohexylamino)ethanesulfonic acid] και με διαδοχικές φυγοκετρήσεις έγινε η επίτευξη της επιθυμητής τιμής pH/pD. Το ρυθμιστικό διάλυμα που ετοιμάστηκε σε D_2O , μετρήθηκε υποθέτοντας ότι $pD = pH(\text{observed}) + 0.4$. Η συγκέντρωση των δειγμάτων προσδιορίστηκε με οπτικές μετρήσεις (UV-visible) στο φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους Perkin Elmer Lambda 25 UV-Vis spectrometer, χρησιμοποιώντας $\epsilon_{416,ox} = 152 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και ήταν $\sim 1.0 \text{ mM}$. Η πλήρως ανηγμένη και δεσμευμένη με CO μορφή του ενζύμου ($ba_3\text{-CO}$) ετοιμάστηκε χρησιμοποιώντας sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) ως αναγωγικό και στη συνέχεια προστέθηκε 1atm CO κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε μια αεροστεγώς σφραγισμένη FTIR κυψελίδα αποτελούμενη από δυο παράθυρα φθοριούχου ασβεστίου, CaF_2 . Το οπτικό μήκος διαδρομής ήταν 6μm για τα δείγματα σε H_2O και 15μm για τα δείγματα σε D_2O . Ο συνολικός όγκος ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα ήταν $\sim 100\mu\text{l}$. Το αέριο ^{12}CO αποκτήθηκε από την Messer και το D_2O αγοράστηκε από τη Sigma-Aldrich.

7.2.2 Τεχνική χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR)

Οι μετρήσεις χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) πραγματοποιήθηκαν σε ένα φασματοφωτόμετρο Vertex 70v FTIR που αποκτήθηκε από την

Bruker, εφοδιασμένο με ένα φωτοβολταϊκό MCT ανιχνευτή με κατώτερο όριο απόκρισης 600 cm^{-1} . Ο οπτικός πάγκος (optical bench) ήταν υπό κενό και ο θάλαμος δείγματος (sample compartment) καθαρίστηκε με αέριο N_2 για τη μείωση της επίδρασης του διοξειδίου του άνθρακα και των υδρατμών. Η φασματοσκοπική ανάλυση ήταν 4 cm^{-1} και η χρονική ανάλυση ήταν 20 ms . Η φασματική περιοχή ήταν $1200\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$ και χρησιμοποιήθηκε ένα IR φίλτρο 4200 nm . Η χρονική διάρκεια των πειραμάτων ήταν 780 ms . Για τη φωτόλυση του συμπλόκου της αίμης $a_3\text{-CO}$ χρησιμοποιήθηκε ένα παλμικό 532 nm laser ($2^{\text{η}}$ αρμονική) από ένα Continuum Minilite Nd-YAG laser (7 ns πλάτος, $5\text{--}8\text{ mJ/pulse}$, 0.25 Hz). Για τη μείωση της αρχικής ενέργειας του laser (100 mJ), χρησιμοποιήθηκε μια ίριδα και για την επίτευξη συνολικής διαμέτρου της ακτίνας laser 8 mm πάνω στο δείγμα, χρησιμοποιήθηκε ένας συγκλίνοντας φακός (20 cm) κατά μήκος της διαδρομής της ακτίνας laser πριν αυτή εισέλθει στο θάλαμο δείγματος του φασματοφωτόμετρου. Δυο καθρέπτες (Reflection= 532 nm) χρησιμοποιήθηκαν για να κατευθύνουν την 532 nm laser ακτίνα μέσα στο φασματοφωτόμετρο και διαμέσου του δείγματος. Μια γεννήτρια παλμών (Quantum composers plus Pulse delay generator, Model 9514) χρησιμοποιήθηκε για το συγχρονισμό τους φασματοφωτόμετρου υπερύθρου με το laser και τον υπολογιστή. Συνολικά συλλέχθηκαν περίπου 60 «φωτεινές» μετρήσεις με χρήση του laser (light) για τη βελτιστοποίηση της αναλογίας σήματος/θορύβου όπως και περίπου 30 «σκοτεινές» μετρήσεις χωρίς τη χρησιμοποίηση του laser (dark) με σκοπό την αφαίρεση τους από τις light μετρήσεις. Οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό Fourier και τη διόρθωση φάσης ήταν οι Blackman–Harris three-term ως συνάρτηση αποδισμού (apodization function) με ανάλυση φάσης 32 cm^{-1} και ο Mertz/No Peak search phase correction algorithm αντίστοιχα. Η ανάλυση και επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων έγινε με τα προγράμματα OriginPro 8 (OriginLab) και OPUS 7.0 (BRUKER). Για την επίτευξη των μετρήσεων χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) χρησιμοποιήθηκε ένας αλγόριθμος ως μέθοδος, ο οποίος περιγράφεται εκτενώς στο Παράρτημα.

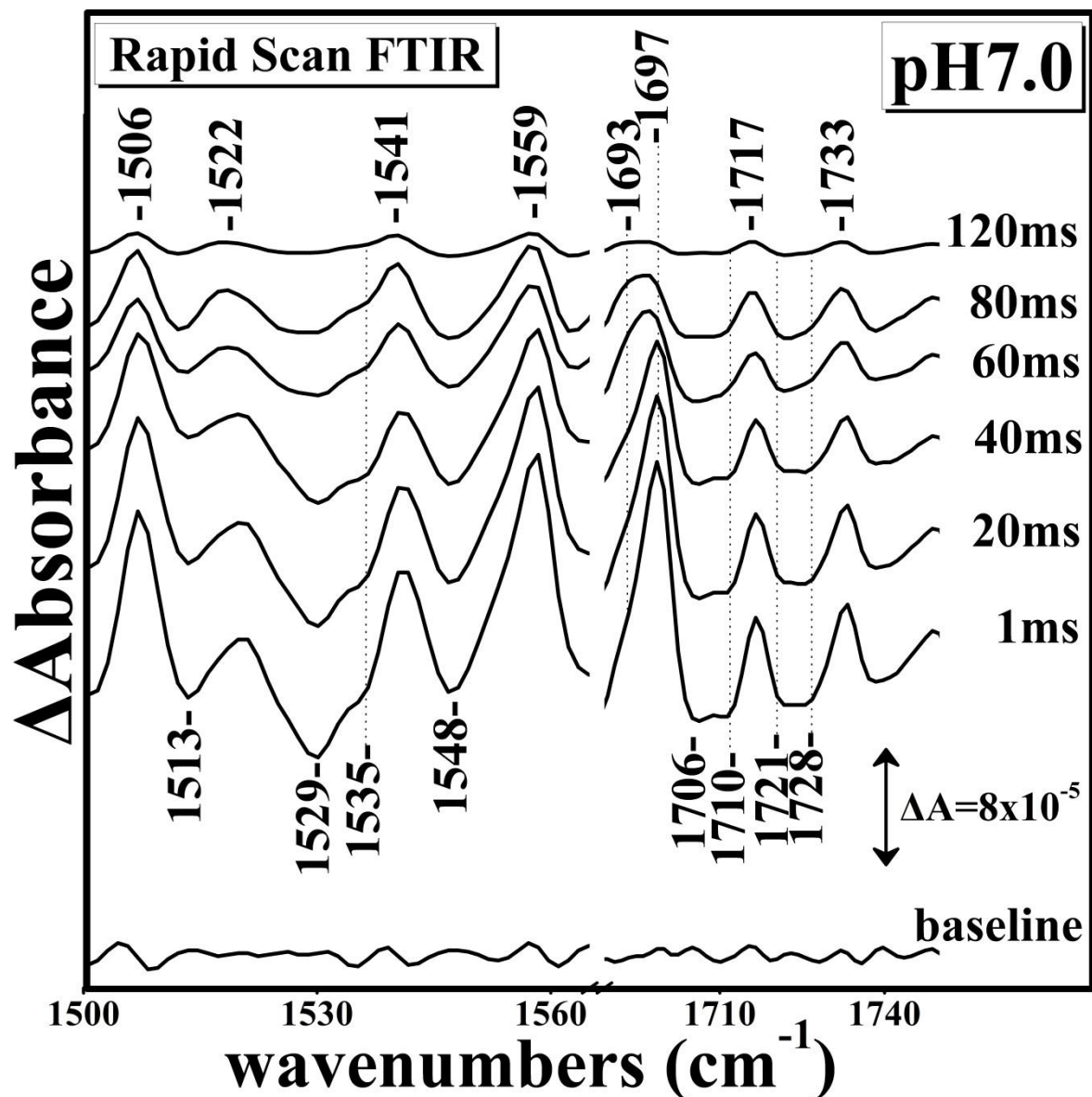


Εικόνα 51. Πειραματική διάταξη της τεχνικής χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) που χρησιμοποιήθηκε για τα εν λόγω πειράματα. Στην εικόνα φαίνεται η πορεία που ακολουθεί η υπέρυθρη ακτινοβολία καθώς και η πορεία που ακολουθεί ο παλμός 532nm του Nd:YAG laser, όπως επίσης και τα διάφορα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη των πειραμάτων.

7.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση

Η εικόνα 52 απεικονίζει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) στην περιοχή $1500-1760\text{ cm}^{-1}$ (χρονική ανάλυση, $t_d = 1-120\text{ ms}$ και 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου $ba_3\text{-CO}$ σε pH7.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 ns από ένα παλμικό laser μήκους κύματος 532 nm. Ένα σύμπλεγμα δονήσεων αποτελείται από κορυφές θετικές/αρνητικές στους 1717 (+), 1721 (-), 1728 (-) και 1733 (+) cm^{-1} έχει αποδοθεί στις δυο διαμορφώσεις των πρωτονιωμένων μορφών του ασπαραγινικού οξέως D372, $\nu(\text{COO}(\text{H}))$.⁸ Ολόκληρο το σύμπλεγμα δονήσεων χάνει ένταση κατά τη χρονική διάρκεια του πειράματος, $t_d=1-120\text{ ms}$, χωρίς να υπόκειται σε οποιαδήποτε μετατόπιση όσο αφορά τις συχνότητες των κορυφών και σε $t_d=120\text{ ms}$ η ένταση του φτάνει στα επίπεδα του θορύβου. Οι πιο πάνω παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι το ασπαραγινικό οξύ D372 ευρισκόμενο στην πρωτονιωμένη μορφή του, παύει να υφίσταται οποιεσδήποτε αλλαγές σε $t_d=120\text{ ms}$. Τα φάσματα δείχνουν ένα σύμπλεγμα δονήσεων με μια θετική κορυφή στους 1697 cm^{-1} και δυο αρνητικές κορυφές με τη μορφή «W» στους 1706 και 1710 cm^{-1} , χαρακτηριστικό της διατάραξης στις δόνησης έκτασης του C=O που έχει ανατεθεί προηγουμένως στην πρωτονιωμένη μορφή της προπιονικής ομάδας A της αίμης a_3 .⁸ Ολόκληρο το σύμπλεγμα αυτό χάνει ένταση και σε $t_d=120\text{ ms}$ φτάνει στα επίπεδα του θορύβου. Η θετική κορυφή χάνοντας ένταση δημιουργείται και μια δεύτερη θετική κορυφή στους 1693 cm^{-1} και συνυπάρχουν μέχρι που σε $t_d=120\text{ ms}$ χάνονται στο θόρυβο. Μια θετική κορυφή στους 1559 cm^{-1} παρατηρείται στα φάσματα διαφοράς Rapid scan FTIR και αποδίδεται στην ασύμμετρη αποπρωτονιωμένη μορφή, $\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$, του ασπαραγινικού οξέως D372. Η κορυφή χάνει ένταση κατά τη διάρκεια του πειράματος, αλλά μετά από 120 ms εξακολουθεί να είναι ευδιάκριτη. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το ασπαραγινικό οξύ D372 όντας στην αποπρωτονιωμένη του μορφή δεν χαλαρώνει τελείως σε αντίθεση με την πρωτονιωμένη του μορφή. Μια ευρεία αρνητική κορυφή παρατηρείται στους 1548 cm^{-1} . Αυτή έχει αποδοθεί στη σύνδεση His-Tyr με μεγάλη συμβολή από τον ομοιοπολικό δεσμό C-N μεταξύ των δακτυλίων των δυο συστημάτων.¹⁶⁻¹⁷ Η αρνητική αυτή κορυφή χάνει ένταση σε $t_d=1-120\text{ms}$ αλλά μετά από 120 ms και αυτή εξακολουθεί να είναι ευδιάκριτη. Αυτό σημαίνει ότι το πρωτεϊνικό σύστημα έχει αποθηκεύσει ποσότητα ενέργειας η οποία δε διαφεύγει στο περιβάλλον σε χρόνο 120 ms και ένα ποσοστό της ενέργειας αυτής παραμένει κοντά σε τυροσίνη δεσμευμένη ομοιοπολικά με

ιστιδίνη, πιθανότατα η Y237 που κάνει ομοιοπολικό δεσμό με την H233 ενός από τους υποκαταστάτες του Cu_B. Άλλη μια θετική κορυφή που παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με την 1559 cm⁻¹ είναι η κορυφή στους 1541 cm⁻¹ και έχει αποδοθεί στις δονήσεις του amide II.⁹ Παρατηρείται μια διπλή αρνητική κορυφή στους 1529 και 1535 cm⁻¹ συνοδευόμενη από μια θετική κορυφή στους 1522 cm⁻¹ και έχουν αποδοθεί στην ασύμμετρη αποπρωτονιωμένη μορφή, ν_{as}(COO)⁻,⁸ της προπιονικής ομάδας A της αίμης a₃. Αυτό το σύμπλεγμα κορυφών φαίνεται ότι χαλαρώνει τελείως και εξαφανίζεται σε t_d=120 ms. Συγκρίνοντας την πρωτονιωμένη με την αποπρωτονιωμένη μορφή της προπιονικής ομάδας A της αίμης a₃ σε pH7, φαίνεται ότι οι δύο μορφές χάνουν την ένταση τους και χαλαρώνουν με τον ίδιο ρυθμό και σε χρόνο 120 ms η προπιονική ομάδα A της αίμης a₃ είναι σε μια απόλυτα χαλαρή κατάσταση (relaxed mode). Δηλαδή υπάρχει μια ισορροπία COO⁻↔COOH όσο αφορά το ρυθμό με τον οποίο οι δύο διαμορφώσεις τείνουν να χαλαρώσουν (relaxing rate). Τέλος, ένα σήμα διαφοράς (peak/trough) στους 1506/1513 cm⁻¹ κάνει την εμφάνιση του στα Rapid Scan FTIR φάσματα διαφοράς και έχει αποδοθεί προηγουμένως στις δονήσεις των διαμορφώσεων της τυροσίνης (tyrosine/tyrosinate). Το σήμα διαφοράς αυτό φαίνεται να χάνει την ένταση του σε t_d =120 ms αλλά εξακολουθεί να φαίνεται αμυδρά. Αυτό σημαίνει ότι η περιοχή που βρίσκεται η τυροσίνη εξακολουθεί να περικλείει ένα ποσοστό ενέργειας.

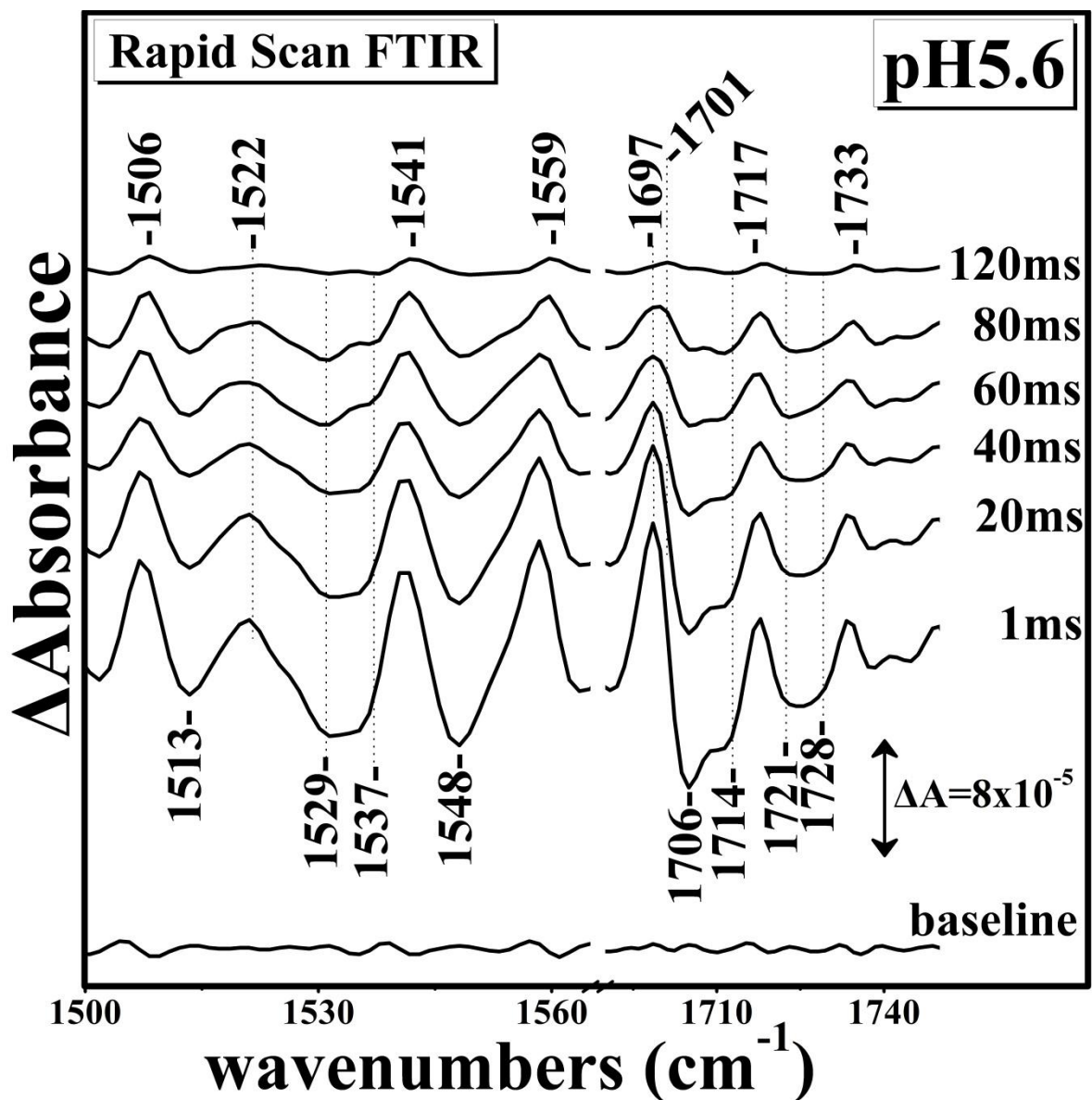


Εικόνα 52. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm^{-1} ($t_d = 1\text{-}120\text{ ms}$, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου $ba_3\text{-CO}$ σε $\text{pH}7.0$ που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm.

Η εικόνα 53 απεικονίζει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm^{-1} ($t_d = 1\text{-}120\text{ ms}$, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου $ba_3\text{-CO}$ σε $\text{pH}5.6$ που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 ns από ένα παλμικό laser μήκους κύματος 532 nm. Παρατηρείται

ένα σύμπλεγμα δονήσεων που αποτελείται από κορυφές, θετικές και αρνητικές, στους 1717 (+), 1721 (-), 1728 (-) και 1733 (+) cm^{-1} παρόμοιο με αυτό που παρατηρήθηκε στα φάσματα διαφοράς στο pH7. Οι κορυφές του συμπλέγματος παραμένουν με την ίδια μορφή και συχνότητα όπως και στο pH7 και σε 120 ms το σύμπλεγμα αυτό βρίσκεται σε απόλυτα χαλαρή μορφή (fully relaxed mode). Τα φάσματα παρουσιάζουν ένα σύμπλεγμα δονήσεων με μια θετική κορυφή στους 1697 cm^{-1} και δυο αρνητικές κορυφές με τη μορφή «W» στους 1706 και 1714 cm^{-1} . Συγκρίνοντας το με το αντίστοιχο στο pH7 παρατηρούνται μερικές αλλαγές. Η αρνητική κορυφή στους 1714 cm^{-1} είναι μετατοπισμένη κατά 4 cm^{-1} (1710 cm^{-1} στο pH7). Επίσης ο τρόπος και ο ρυθμός με τον οποίο αλλάζει η κατάσταση στην οποία βρίσκεται το σύμπλεγμα αυτό είναι διαφορετικός. Στο pH5.6, η αρνητική κορυφή στους 1706 cm^{-1} είναι μεγαλύτερης έντασης από αυτή στους 1714 cm^{-1} αλλά κατά τη διάρκεια του πειράματος η 1706 cm^{-1} χάνει ένταση με γρηγορότερο ρυθμό από την 1714 cm^{-1} με αποτέλεσμα σε 80 ms η 1714 cm^{-1} να είναι η κορυφή με μεγαλύτερη ένταση από την 1706 cm^{-1} , ενώ στο pH7 οι δυο αντίστοιχες αρνητικές κορυφές χάνουν την ένταση τους με τον ίδιο ρυθμό. Η άλλη διαφορά της συμπεριφοράς του συμπλέγματος του pH5.6 με το αντίστοιχο του pH7 είναι ότι η θετική κορυφή στους 1697 cm^{-1} χάνοντας την ένταση της μετατοπίζεται στους 1701 cm^{-1} , ενώ στο pH7 η αντίστοιχη κορυφή χάνοντας την ένταση της μετατοπίζεται στους 1694 cm^{-1} . Αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο ρυθμός με τον οποίο η πρωτονιωμένη μορφή της προπιονική ομάδας A της αίμης a_3 εισέρχεται από την τεταμένη στη χαλαρή κατάσταση επηρεάζεται από την αλλαγή του pH από ουδέτερο σε όξινο. Παρατηρείται μια θετική κορυφή στους 1559 cm^{-1} , στα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR). Η κορυφή χάνει ένταση κατά τη διάρκεια του πειράματος, αλλά μετά από 120 ms εξακολουθεί να είναι ευδιάκριτη. Η συμπεριφορά αυτή είναι ίδια με αυτό του ενζύμου σε pH7. Αυτό σημαίνει ότι ο ρυθμός και ο τρόπος με τον οποίο αλλάζει η κατάσταση της μιας διαμόρφωσης της $\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$ του ασπαραγινικού οξέως D372 δεν επηρεάζεται από την αλλαγή pH7/pH5.6. Μια αρνητική κορυφή στους 1548 cm^{-1} κάνει την εμφάνιση της στα φάσματα διαφοράς του pH5.6, ίδια με τα αντίστοιχα στο pH7 και επίσης χάνει εντελώς της έντασης της σε $t_d=120\text{ms}$. Αυτό σημαίνει ότι ο δεσμός His-Tyr δεν επηρεάζεται από το πρωτεϊνικό περιβάλλον όπως επίσης δεν επηρεάζεται και ο ρυθμός χαλάρωσης (relaxing rate). Όπως στο pH7, έτσι και στο pH5.6 παρατηρείται μια θετική κορυφή στους 1541 cm^{-1} , η οποία παρουσιάζεται να έχει ίδιο ρυθμό χαλάρωσης της με αυτόν στο pH7 σε $t_d=1-120\text{ms}$. Όπως και στο pH7, έτσι και στο pH5.6,

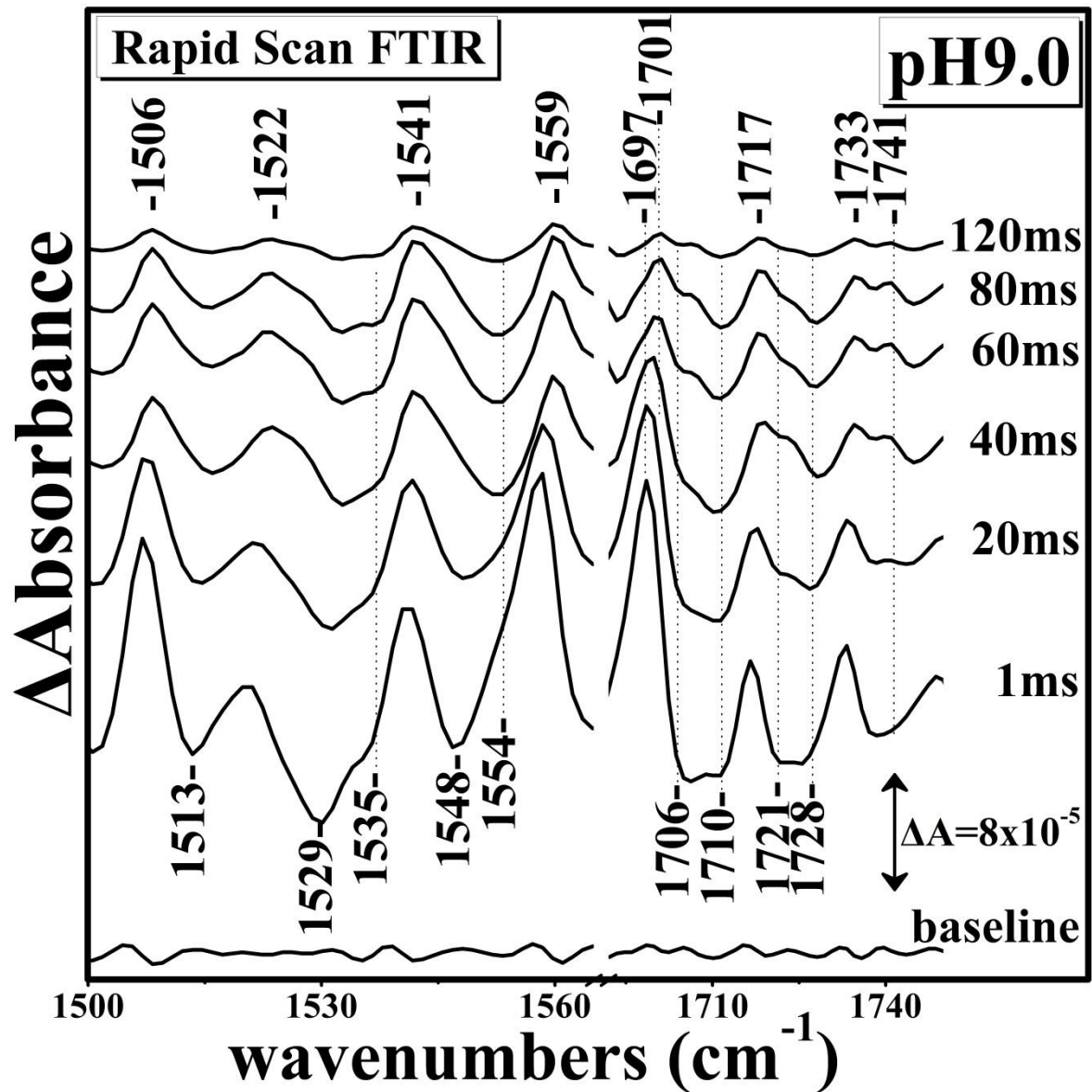
παρατηρείται μια διπλή αρνητική κορυφή στους 1529 και 1537 cm^{-1} συνοδευόμενη από μια θετική κορυφή στους 1522 cm^{-1} . Η διαφορά είναι ότι η αρνητική κορυφή στους 1535 cm^{-1} (pH7) μετατοπίζεται στους 1537 cm^{-1} στο pH5.6. Όμοια όμως με το pH7, όλο το σύμπλεγμα φαίνεται ότι χαλαρώνει τελείως και να εξαφανίζεται σε $t_d=120$ ms. Τέλος, όπως και στο pH7 έτσι και στο pH5.6, παρατηρείται ένα σήμα διαφοράς (peak/trough) αποτελούμενο από τις κορυφές στους 1506/1513 cm^{-1} και χαλαρώνει με παρόμοιο ρυθμό σε $t_d = 1-120$ ms. Αυτό σημαίνει ότι η μεταβίβαση της τυροσίνης από μια τεταμένη σε μια πιο χαλαρή κατάσταση δεν επηρεάζεται σε όξινο pH.



Εικόνα 53. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερέθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) στην περιοχή $1500-1760\text{ cm}^{-1}$ ($t_d = 1-120\text{ ms}$, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου $ba_3\text{-CO}$ σε pH5.6 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm.

Η εικόνα 54 απεικονίζει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερέθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) στην περιοχή $1500-1760\text{ cm}^{-1}$ ($t_d = 1-120\text{ ms}$, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου $ba_3\text{-CO}$ σε pH9.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 ns από ένα παλμικό laser μήκους κύματος 532 nm. Παρατηρείται ένα σύμπλεγμα κορυφών, αρνητικών και θετικών, στους 1717 (+), 1721 (-), 1728 (-), 1733 (+) και 1741 (+) cm^{-1} , παρόμοιο σύμπλεγμα με αυτό που παρατηρήθηκε στο pH7. Όλο το σύμπλεγμα εισέρχεται στην κατάσταση χαλάρωσης σε χρόνο 120 ms. Η διαφορά με το pH7 είναι ότι η θετική κορυφή στους 1733 cm^{-1} (pH7) γίνεται διπλή στους 1733 και 1741 cm^{-1} μετά από 20 ms στα φάσματα διαφοράς στο pH9. Οι δυο αρνητικές κορυφές έχουν διαφορετικό ρυθμό χαλάρωσης. η αρνητική κορυφή στους 1721 cm^{-1} έχει γρηγορότερο ρυθμό χαλάρωσης από την η αρνητική κορυφή στους 1728 cm^{-1} και σε 40 ms χάνεται και κυρίαρχη κορυφή παραμένει αυτή στους 1728 cm^{-1} μέχρι τα 120 ms όπου και χάνεται στο θόρυβο. Όλες οι πιο πάνω παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο τρόπος με τον οποίο εισέρχονται στην κατάσταση χαλάρωσης οι πρωτονιωμένες διαμορφώσεις του ασπαραγινικού οξέως D372 είναι διαφορετικός στο pH9 από ότι στο pH7. Ένα σύμπλεγμα δονήσεων που αποτελείται από τις κορυφές 1697 (+), 1706 (-) και 1710 (-) cm^{-1} , εμφανίζεται στα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερέθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) του ενζύμου σε pH9. Η κορυφή στους 1706 cm^{-1} έχει ρυθμό χαλάρωσης πολύ πιο γρήγορο από την κορυφή στους 1710 cm^{-1} με αποτέλεσμα η κορυφή στους 1710 cm^{-1} να γίνει η κυρίαρχη κορυφή μέχρι το τέλος του πειράματος σε αντίθεση με το pH7 όπου και οι δύο κορυφές έχουν τον ίδιο ρυθμό χαλάρωσης. Το άλλο κομμάτι του συμπλέγματος, η θετική κορυφή στους 1697 cm^{-1} χάνει την ένταση της με πολύ γρήγορο ρυθμό και μετατοπίζεται στους 1701 cm^{-1} μέχρι $t_d=120\text{ ms}$. Συμπερασματικά σε pH9 η πρωτονιωμένη μορφή της προπιονικής ομάδας A της αίμης a_3 τείνει να εισέλθει σε μια πιο χαλαρή κατάσταση με παρόμοιο τρόπο και ρυθμό με το pH7. Παρατηρήθηκε στα φάσματα διαφοράς μια θετική

κορυφή στους 1559 cm^{-1} , η οποία εμφανίστηκε και σε αυτά του pH7. Η κορυφή αυτή έχει παρόμοια συμπεριφορά και παρόμοιο ρυθμό χαλάρωσης με την αντίστοιχη σε pH7 και pH5.6 μόνο που σε pH9 χάνει πλήρως την ένταση της σε $t_d=120\text{ ms}$. Το αποτέλεσμα που προκύπτει από τη σύγκριση με τα άλλα δυο pH είναι ότι η αλλαγή στο pH, από ουδέτερο σε βασικό, επηρεάζει το ρυθμό χαλάρωσης της αποπρωτονιωμένης μορφής, $v_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$, του ασπαραγινικού οξέως D372. Δύο αρνητικές κορυφές στους 1554 και 1548 cm^{-1} κάνουν την εμφάνιση τους στα φάσματα διαφοράς του pH9, σε σχέση με αυτά του pH5.6 και pH7 που εμφανίζεται μόνο μια αρνητική στους 1548 cm^{-1} . Μπορεί οι δύο αρνητικές κορυφές στους 1554 και 1548 cm^{-1} να εμφανίζονται στα φάσματα των δυο ακραίων pH, pH5.6 και pH9, όμως η διαδικασία χαλάρωσης τους ακολουθεί διαφορετική πορεία. Η αρνητική κορυφή στους 1548 cm^{-1} χάνει ένταση με πολύ πιο γρήγορο ρυθμό από ότι η 1554 cm^{-1} και σε $t_d=40\text{ms}$ εξαφανίζεται ενώ η εναπομένουσα κορυφή στους 1554 cm^{-1} χάνει ένταση αλλά δεν εισέρχεται σε πλήρη χαλάρωση σε $t_d=120\text{ ms}$. Αυτό σημαίνει ότι ο δεσμός His-Tyr επηρεάζεται από το πρωτεϊνικό περιβάλλον όπως επίσης επηρεάζεται και ο ρυθμός χαλάρωσης. Η θετική κορυφή στους 1541 cm^{-1} απαντάται σε όλες τις υπό εξέταση τιμές του pH και στο pH9 ακολουθεί την ίδια πορεία χαλάρωσης όπως και στο pH7. Εφόσον αυτή η κορυφή αποδόθηκε στη δόνηση του Amide II, μπορούμε να πούμε ότι η διαδικασία και ο ρυθμός με τον οποίο το Amide II εισέρχεται σε μια κατάσταση χαλάρωσης, δεν επηρεάζονται από την αλλαγή του pH του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος. Όπως στα προηγούμενα pH, έτσι και στο pH9, παρατηρείται ένα σύμπλεγμα δονήσεων αποτελούμενο μια διπλή αρνητική κορυφή στους 1529 και 1535 cm^{-1} συνοδευόμενες από μια θετική κορυφή στους 1522 cm^{-1} . Το σύμπλεγμα αυτό έχει την ίδια μορφή και τις ίδιες συχνότητες με το αντίστοιχο σύμπλεγμα στα άλλα δυο pH. Σε $t_d=1-120\text{ ms}$, οι δύο αρνητικές κορυφές έχουν τον ίδιο ρυθμό χαλάρωσης και η αναλογία τους παραμένει αναλλοίωτη. Αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο ρυθμός με τον οποίο η αποπρωτονιωμένη μορφή της προπιονική ομάδας A της αίμης a_3 εισέρχεται από την τεταμένη στη χαλαρή κατάσταση δεν επηρεάζεται από την αλλαγή του pH από ουδέτερο σε βασικό. Τέλος, όπως και στο pH7 και pH5.6, έτσι και στο pH9, παρατηρείται ένα σήμα διαφοράς (peak/trough) αποτελούμενο από τις κορυφές στους $1506/1513\text{ cm}^{-1}$ και χαλαρώνει με παρόμοιο ρυθμό σε $t_d = 1-120\text{ ms}$. Αυτό σημαίνει ότι η ισορροπία που έχουν οι δονήσεις της τυροσίνης, $\text{Tyr-OH} \leftrightarrow \text{Tyr-O}^-$, δεν επηρεάζεται από την αλλαγή του pH από όξινο σε βασικό.

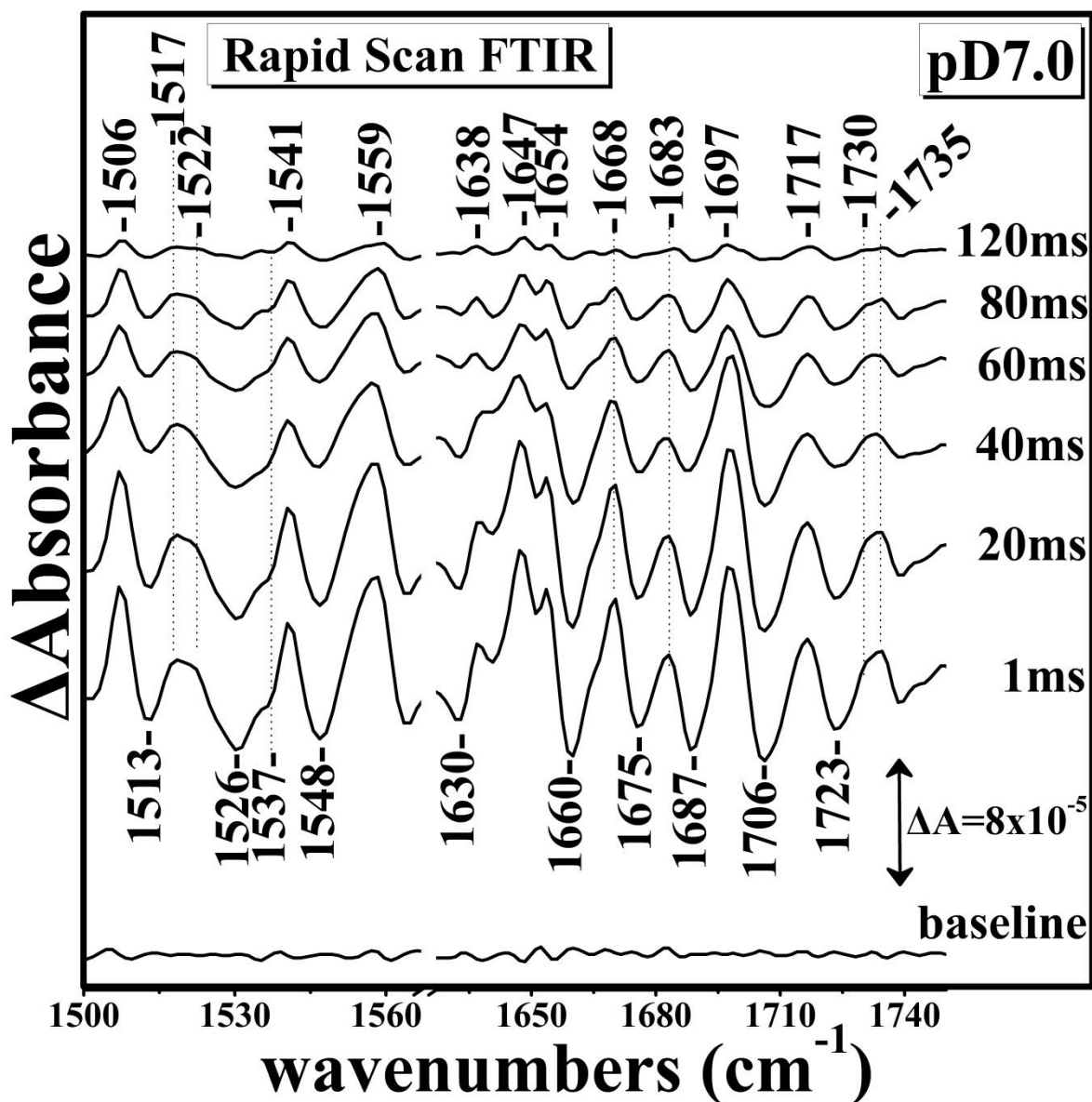


Εικόνα 54. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) στην περιοχή $1500\text{-}1760\text{ cm}^{-1}$ ($t_d = 1\text{-}120\text{ ms}$, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου $ba_3\text{-CO}$ σε $\text{pH}9.0$ που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm.

Η εικόνα 55 απεικονίζει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) στην περιοχή $1500\text{-}1760\text{ cm}^{-1}$ ($t_d = 1\text{-}120\text{ ms}$, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου $ba_3\text{-CO}$ σε $\text{pD}7.0$ που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 ns από ένα παλμικό laser μήκους κύματος 532 nm. Για να

εξετάσουμε τη διαδικασία χαλάρωσης της πρωτεΐνης έγινε ανταλλαγή διαλύτη H₂O/D₂O. Με αυτό τον τρόπο επιτράπηκε η μελέτη της δευτερεύουσας δομής της πρωτεΐνης που αποτελείται από τις α-έλικες (α-helical), τις β-πτυχωτές (β-sheet) και περιστρεφόμενες δομές (turns).¹⁰⁻¹⁶ Στα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) παρατηρείται ένα σύμπλεγμα κορυφών παρόμοιο με αυτό που παρατηρήθηκε στο pH7 και αποτελείται από τις 1717 (+), 1723 (-) 1730 (+) και 1735 (+) cm⁻¹. Ολόκληρο το σύμπλεγμα χάνει την ένταση του σε t_d=1-120 ms κατά τον ίδιο τρόπο όπως και στο pH7. Η διαφορά με το pH7 είναι ότι η θετική κορυφή στους 1733 cm⁻¹ (pH7) γίνεται διπλή και αποτελείται από τις θετικές κορυφές στους 1730 και 1735 cm⁻¹. Ένα σήμα διαφοράς (peak/trough) στους 1697/1706 cm⁻¹ παρουσιάζεται στα φάσματα διαφοράς στο pD7. Συγκρινόμενο με το αντίστοιχο στα φάσματα διαφοράς στο pH7, παρατηρείται ότι η αρνητική κορυφή στους 1710 cm⁻¹ είναι απύσα. Επίσης ο ρυθμός χαλάρωσης είναι γρηγορότερος στο pD7 παρά στο pH7, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο ρυθμός χαλάρωσης της πρωτονιωμένης μορφής της προπιονικής ομάδας A της αίμης α₃ επηρεάζεται από την ανταλλαγή H₂O/D₂O. Το σύμπλεγμα των κορυφών που αποδίδεται στις δονήσεις β-sheet αποτελείται από τις 1630(-), 1638(+) και 1644(-) cm⁻¹. Οι κορυφές του β-sheet φαίνεται να έχουν ένα σταθερό ρυθμό χαλάρωσης (relaxing rate) και μέχρι τα 780 ms έχουν εξαφανιστεί. Οι δονήσεις που καταδεικνύουν κατά πόσο η πρωτεΐνη περιστρέφεται αντιστοιχούν στις κορυφές στους 1675 (-), 1683 (+) και 1687 (-) cm⁻¹. Οι κορυφές αυτές παραμένουν στις ίδιες συχνότητες που σημαίνει ότι η πρωτεΐνη δεν περιστρέφεται κατά τη διάρκεια του φαινομένου της φωτόλυσης, εντούτοις η πρωτεΐνη βρίσκεται σε μια πολύ τεταμένη κατάσταση και προσπαθεί να επέλθει στη φυσιολογική της κατάσταση με ένα πολύ γρήγορο ρυθμό. Κρίνοντας από το ρυθμό χαλάρωσης των αυτών των κορυφών, παρατηρείται ότι η πρωτεΐνη επανέρχεται στη φυσιολογική της κατάσταση σε 560 ms. Ένα σύμπλεγμα κορυφών αντιστοιχεί στις δονήσεις α-helical της πρωτεΐνης. Αυτές είναι οι 1647 (+), 1654 (+), 1660 (-) και 1668 (+) cm⁻¹. Παρακολουθώντας το ρυθμό χαλάρωσης του συμπλέγματος αυτού, παρατηρείται ότι το σύμπλεγμα επέρχεται σε κατάσταση πλήρους χαλάρωσης σε 120 ms, ρυθμός παρόμοιος με αυτόν που παρατηρήθηκε στις δονήσεις β-sheet. Το συμπέρασμα που απορρέει παρατηρώντας της δευτερεύουσα πρωτεϊνική δομή είναι ότι με την έναρξη του φαινομένου της φωτόλυσης προσδίδεται ένα τεράστιο ποσό ενέργειας στην πρωτεΐνη μέσω του παλμού, ενέργεια η οποία επηρεάζει τη δευτερεύουσα πρωτεϊνική δομή και που τελικά εξέρχεται από την πρωτεΐνη στο διάλυμα εντός 120 ms επιτρέποντας έτσι στην πρωτεΐνη να

επέλθει στη φυσιολογική της κατάσταση. Μια θετική κορυφή στους 1559 cm^{-1} παρατηρείται στα φάσματα διαφοράς με διαλύτη D_2O , η οποία απαντάται και στα φάσματα διαφοράς με διαλύτη H_2O . Η διαφορά τους είναι στο ρυθμό χαλάρωσης τους. Στα φάσματα διαφοράς με διαλύτη H_2O ο ρυθμός αυτός είναι πιο αργός από ότι σε αυτά με διαλύτη D_2O . Στο pD7 η κορυφή αυτή χάνεται στο θόρυβο σε 120 ms, ενώ στο pH7 εξακολουθεί να υπάρχει. Άλλη μια αρνητική κορυφή κοινή σε pH7 και pD7 είναι η κορυφή στους 1548 cm^{-1} , η οποία παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά και στους δυο διαλύτες. Σε 120 ms εξακολουθεί να υπάρχει ένα μικρό ποσοστό, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αλλαγή του διαλύτη, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, δεν επηρεάζει τη συμπεριφορά της κορυφής αλλά ούτε και το ρυθμό χαλάρωσης της. Την ίδια συμπεριφορά με το pH7 φαίνεται να έχει η θετική κορυφή στους 1541 cm^{-1} . Με αυτή την παρατήρηση είναι ασφαλές να πούμε ότι η δόνηση του Amide II δεν επηρεάζεται από την αλλαγή του διαλύτη $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$. Το σύμπλεγμα κορυφών που φαίνεται να επηρεάζεται από την ανταλλαγή $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ αποτελείται από τις $1522 (+)$, $1529 (-)$ και $1535 (-)\text{ cm}^{-1}$ (pH7) και στο pD7 δημιουργείται μια ακόμα θετική κορυφή και οι υπόλοιπες μετατοπίζονται και το σύμπλεγμα στο pD7 αποτελείται από τις $1517 (+)$, $1522 (+)$, $1526 (-)$ και $1537 (-)\text{ cm}^{-1}$. Αυτές οι μετατοπίσεις όμως δεν επηρεάζουν το ρυθμό χαλάρωσης του συμπλέγματος που φαίνεται να φτάνει σε πλήρη χαλάρωση στα 120 ms όπως και στο pH7. Τέλος ένα σήμα διαφοράς που δεν επηρεάζεται από την ανταλλαγή pH/pD είναι αυτό στους $1506/1513\text{ cm}^{-1}$ που σε pD7 δεν φτάνει σε κατάσταση πλήρους χαλάρωσης σε χρόνο $t_d = 120\text{ ms}$, φαινόμενο παρόμοιο με το αντίστοιχο σήμα στο pH7. Το συμπέρασμα που απορρέει από αυτή την παρατήρηση είναι ότι η ισορροπία $\text{Tyr-OH} \leftrightarrow \text{Tyr-O}^-$ δεν επηρεάζεται από την ανταλλαγή H/D.



Εικόνα 55. Η εικόνα δείχνει τα φάσματα διαφοράς χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερέθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) στην περιοχή 1500-1760 cm^{-1} ($t_d = 1\text{-}120$ ms, 4 cm^{-1} φασματοσκοπική ανάλυση) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου $ba_3\text{-CO}$ σε pD7.0 που υπόκειται σε φωτόλυση του CO από ένα παλμό 7 nanosecond από laser 532 nm.

Πίνακας 5. Πιθανές αποδόσεις των κορυφών που ανιχνεύτηκαν στα φάσματα χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερόθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR).

Συχνότητα (cm ⁻¹)	Πιθανή απόδοση κορυφής	Συχνότητα (cm ⁻¹)	Πιθανή απόδοση κορυφής
1733 (+)	D372 ν(COOH)	1668 (+)	α-helical
1728 (-)		1660 (-)	
1721 (-)		1654 (+)	
1717 (+)		1647 (+)	
1710 (-)	Prop.A ν(COOH)	1644 (-)	β-sheet
1706 (-)		1638 (+)	
1697 (+)		1630 (-)	
1559 (+)	ν _{asym} (COO ⁻) D372	1687 (-)	Turns
1548 (-)	His-Tyr	1683 (+)	
1541 (+)	Amide II	1675 (-)	
1535 (-)	Prop.A ν _{asym} (COO ⁻)		
1529 (-)			
1522 (+)			
1513 (-)	Tyr-O ⁻		
1506 (+)	Tyr-OH		

7.4 Συμπεράσματα

Χρησιμοποιώντας την τεχνική χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR) στη μελέτη της συμπεριφοράς του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου ba_3 -CO μετά τη φωτόλυση του CO από ένα παλμό από laser 532 nm έγινε δυνατή η παρατήρηση και μελέτη του τρόπου με τον οποίο σημαντικά αμινοξικά κατάλοιπα και πρωτεϊνικές δομές αλλάζουν διαμόρφωση από τεταμένη σε μια πιο φυσιολογική.

Μελετώντας τις πρωτονιωμένες/αποπρωτονιωμένες διαμορφώσεις του ασπαραγινικού οξέως D372, ενός από τα αμινοξικά κατάλοιπα κλειδί για τη λειτουργία του ενζύμου, παρατηρείται μια ισορροπία $\text{COO}^- \leftrightarrow \text{COOH}$. Ο τρόπος και ο ρυθμός με τον οποίο το D372 επέρχεται σε μια χαλαρή διαμόρφωση είναι διαφορετικός στην πρωτονιωμένη από την αποπρωτονιωμένη μορφή του. Επίσης σε όξινο pH επηρεάζεται η πρωτονική συνδεσιμότητα του D372 με αποτέλεσμα να επηρεάζει το ρυθμό χαλάρωσης μόνο της πρωτονιωμένης του μορφής, ενώ σε βασικό pH όπως και σε διαλύτη D_2O ο ρυθμός χαλάρωσης του παραμένει αναλλοίωτος.

Ισορροπία $\text{COO}^- \leftrightarrow \text{COOH}$ υπάρχει και μεταξύ των πρωτονιωμένων/αποπρωτονιωμένων διαμορφώσεων της προπιονικής ομάδας A της αίμης α_3 . Αυτή η ισορροπία διαταράσσεται με την αλλαγή στην τιμή του pH αλλά και με την ανταλλαγή H/D. Επίσης επηρεάζεται και ο ρυθμός χαλάρωσης των διαμορφώσεων αυτών. Σε όξινο pH το ένζυμο τείνει να λάβει μια πιο φυσιολογική διαμόρφωση με ρυθμό πιο γρήγορο από τα άλλα pH. Μια εξίσου σημαντική παρατήρηση είναι ότι με την ανταλλαγή H/D πιθανότατα επηρεάζεται η πρωτονική συνδεσιμότητα της προπιονικής ομάδας A της αίμης α_3 εντούτοις ο ρυθμός χαλάρωσης της δεν επηρεάζεται.

Με τη φωτόλυση του συμπλόκου ba_3 -CO προσδίδεται ένα πολύ μεγάλο ποσό ενέργειας υπό μορφή θερμότητας στο ένζυμο. Η ενέργεια αυτή επηρεάζει ολόκληρο το ένζυμο και με το πέρασ του χρόνου αυτή η ενέργεια αποβάλλεται στο περιβάλλον. Από τα αποτελέσματα μας παρατηρείται ότι ένα μέρος της ενέργειας αυτής παραμένει κοντά στο διπυρηνικό κέντρο και κοντά στον Cu_B . Το συμπέρασμα αυτό βγήκε μελετώντας τη δόνηση που αντιστοιχεί στο δεσμό His-Tyr που πιθανότητα είναι η His233 ένας εκ των υποκαταστατών του Cu_B και η ομοιοπολικά δεσμευμένη με την His233, Tyr237. Ο ρυθμός με τον οποίο χαλαρώνει ο

δεσμός αυτός δεν επηρεάζεται από την ανταλλαγή H/D αλλά επηρεάζεται από την αλλαγή ουδέτερο σε όξινο pH.

Παρακολουθώντας τον τρόπο με τον οποίο συμπεριφέρεται η τυροσίνη καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι δεν επηρεάζεται ο ρυθμός χαλάρωσης της τυροσίνης με την αλλαγή στην τιμή του pH αλλά ούτε και με την ανταλλαγή H/D, όπως επίσης δεν επηρεάζεται ούτε η ισορροπία των δυο διαμορφώσεων της, $\text{Tyr-OH} \leftrightarrow \text{Tyr-O}^-$, από την αλλαγή του διαλύτη.

Σχετικά με το Amide II παρατηρείται ότι δεν υπάρχει κάποια μεταβολή στη δόνηση του με την αλλαγή στην τιμή του pH ή την ανταλλαγή H/D όπως επίσης παραμένει αμετάβλητος και ο ρυθμός χαλάρωσης του. Μελετώντας το ρυθμό χαλάρωσης της δευτερεύουσας πρωτεϊνικής δομής του Amide I, παρατηρείται ότι η διάταξη της πρωτεΐνης παραμένει αναλλοίωτη και με το πέρας των 120 ms επέρχεται σε πλήρη χαλάρωση.

7.5 Παραπομπές

1. K. Gerwert, B. Hess, J. Soppa and D. Oesterhelt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **86**, 4943-4947.
2. Nicolaidis, T. Soulimane and C. Varotsis, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, **17**, 8113-8119.
3. P. Rich and A. Maréchal, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, **1777**, 912-918.
4. J. Heberle, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1458**, 135-147.
5. A. Barth, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, **1767**, 1073-1101.
6. D. Heitbrink, H. Sigurdson, C. Bolwien, P. Brzezinski and J. Heberle, *Biophysical Journal*, 2002, **82**, 1-10.
7. Barth, *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 2000, **74**, 141-173.
8. Koutsoupakis, T. Soulimane and C. Varotsis, *Biophysical Journal*, 2004, **86**, 2438-2444
9. P. Hellwig, T. Soulimane, G. Buse and W. Mantele, *Biochemistry*, 1999, **38**, 9648-9658
10. S. Krimm and J. Bandekar, *Adv. Prot. Chem.*, 1986, **38**, 181-364.
11. J. Kong and YU Shaoning, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2007, **39**, 549-559.
12. M. Jackson and H. H. Mantsch, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, **30**, 95-120.

13. S. Susi and D. M. Byler, *Methods Enzymol*, 1986, **130**, 290-311.
14. F. Dousseau and M. Pezolet, *Biochemistry*, 1990, **29**, 8771–8779.
15. Iwaki *et al.*, *Biochemistry*, 2005, **44**, 4230-4237.
16. H. Kandori, H. Nakamura, Y. Yamazaki and T. Mogi, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 32821-32826.
17. F. Tomson *et al.*, *Biochemistry*, 2002, **41**, 14383-14390.
18. Schmidt *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, **1655**, 248-255.
19. C. Koutsoupakis, T. Soulimane and C. Varotsis, *J. Biol. Chem.*, 2012, **287**, 37495-37507.
20. A. Nicolaides, T. Soulimane & C. Varotsis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 2016, **1857**, 1534–1540.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράμετροι πειράματος χρονικής ανάλυσης νανοδευτερολέπτων με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ns TRS²-FTIR)

Παράμετροι της παλμογεννήτριας:

Channel A	Width: +0.000015000
(Flashlamps)	Delay: +0.000000000
Channel B	Width: +0.000015000
(Q-Switch)	Delay: +0.000150000
Channel C	Width: +0.000000025
(IR trigger)	Delay: +0.000150000

$T_o = 0.125 \text{ sec (8 Hz)}$

Παράμετροι πειράματος χρονικής ανάλυσης ταχείας σάρωσης με σταθερή ταχύτητα φασματοσκοπίας υπερέθρου με μετασχηματισμό Fourier (Time-Resolved Rapid Scan FTIR)

Μέθοδος:

Start loop 20
Set buffer 1
Wait input 6
Start loop 40
Measure 2
End loop
Wait 100
End loop

Παράμετροι της παλμογεννήτριας:

Channel A (Flashlamps)	Width: +0.000015000
	Delay: +0.000000000
Channel B (Q-Switch)	Width: +0.000015000
	Delay: +0.000150000
Channel C (IR trigger)	Width: +0.000010000
	Delay: +0.000150000

$T_0 = 4 \text{ sec (0.25 Hz)}$