



Τεχνολογικό
Πανεπιστήμιο
Κύπρου

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Πτυχιακή Εργασία

UV/Vis ΚΑΙ FTIR ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ
ΜΕΛΕΤΗΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟΥ
ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ (CO₂) ΣΤΗΝ
ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗΟΞΕΙΔΑΣΗ *ba₃* ΑΠΟ ΤΟ *Thermus*
thermophilus

Ιάκωβη Αγαθοκλέους

Λεμεσός, Μάιος 2018

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

Πτυχιακή Εργασία

**UV/Vis ΚΑΙ FTIR ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΑΚΑ (CO₂) ΣΤΗΝ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗ
ΟΞΕΙΔΑΣΗ *ba₃* ΑΠΟ ΤΟ *Thermus thermophilus***

Ιάκωβη Αγαθοκλέους

Επιβλέπων Καθηγητής
Δρ. Κωνσταντίνος Κουτσουπάκης

Λεμεσός, Μάιος 2018

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Όνομα επίθετο φοιτητή, έτος ολοκλήρωσης πτυχιακής

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής εργασίας από το Τμήμα Επιστήμη και Τεχνολογία Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πτυχιακή αυτή εργασία είναι αφιερωμένη στον αγαπημένο μου πατέρα που δεν βρίσκεται πλέον στην ζωή.

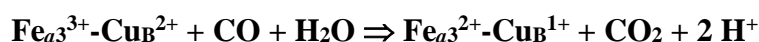
Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Δρ. Κωνσταντίνο Κουτσουπάκη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε για την περάτωση της παρούσας εργασίας. Τον ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση, την υποστήριξη, τις γνώσεις που μου παρείχε καθ'όλη την διάρκεια διεκπεραίωσης της πτυχιακής μελέτης.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Κωνσταντίνο Βαρώτση για την παροχή των εργαστηρίων Περιβαλλοντικής Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, όπου εκπονήθηκε η πτυχιακή μου εργασία και τα δείγματα του κυτοχρώματος ba_3 .

Αισθάνομαι την ανάγκη να επισημάνω την απέραντη ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου για όλα όσα μου έχουν προσφέρει τόσο στη διάρκεια των μαθητικών όσο και κατά την διάρκεια των φοιτητικών μου χρόνων και την αμέριστη υποστήριξη τους σε κάθε μου επιλογή. Πέραν όμως από την πολύτιμη αυτή υποστήριξη, μου έδωσαν όλα τα εφόδια ώστε να γίνω ένας σωστός Άνθρωπος και αυτό είναι κάτι που δεν μαθαίνεται, αλλά μεταδίδεται.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κυτοχρωμική οξειδάση *ba₃* είναι το τελικό σύμπλεγμα της αναπνευστικής αλυσίδας και καταλύει την τεσσάρων ηλεκτρονίων αναγωγή του O₂ σε H₂O. Η ελεύθερη ενέργεια αυτής της αντίδρασης διατηρείται σαν μία διαμεμβρανική βαθμίδωση πρωτονίων η οποία οδηγεί στην σύνθεση της κύριας βιολογικής πηγής ενέργειας ATP. Η κυτοχρωμική οξειδοαναγωγή *ba₃* είναι οξειδάση τύπου B από το εξαιρετικά θερμόφιλο βακτήριο *Thermus thermophilus*, που εκφράζεται υπό υψηλές θερμοκρασίες, περιορίζοντας έτσι την παροχή οξυγόνου και υποβάλλεται σε διακριτές ιδιότητες πρόσδεσης και μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η *ba₃* αναγωγή οξυγόνου από το *Thermus thermophilus* είναι η μόνη οξειδάση τύπου B της οποίας η κρυσταλλογραφική δομή έχει προσδιοριστεί. Αποτελείται από τρεις υπομονάδες με συνολικά 764 υπολείμματα αμινοξέων, ομο-διπυρηνικό σύμπλοκο χαλκού, Cu_A στην υπομονάδα II, μια χαμηλού spin αίμη *b* και ένα διπυρηνικό κέντρο που αποτελείται από ένα άτομο χαλκού Cu_B και μια υψηλού spin αίμη *a₃* που βρίσκονται στην υπομονάδα I και το ομοδιπυρηνικό σύμπλοκο χαλκού (Cu_A^{1.5+}-Cu_A^{1.5+}) στην υπομονάδα II. Η κυτοχρωμική οξειδάση *ba₃* καταλύει την ενεργειακή απόδοση της αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου (NO) σε μονοξείδιο του διαζώτου (N₂O) και της οξείδωση του μονοξειδίου του άνθρακα (CO) σε διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), με το τελευταίο να έχει μία γενική αντίδραση:



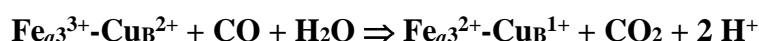
Επομένως, δεδομένου ότι το διοξείδιο του άνθρακα είναι προϊόν μίας από τις καταλυτικές αντιδράσεις της *ba₃*, ο χαρακτηρισμός της δέσμευσης του στο δινοκυκλικό κέντρο γίνεται σημαντικό ζήτημα.

Ο στόχος αυτής της μελέτης είναι να αποκαλυφθεί ο τρόπος δέσμευσης του CO₂ με την οξειδάση *ba₃*-κυτοχρώματος *c*. Οι φασματοσκοπίες ορατού - υπεριώδους (UV/Vis) και υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) είναι εργαλεία ευαίσθητα στη δομή και στην οξειδοαναγωγή, ικανά να παρακολουθούν τη δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα, ενός καταλυτικά δραστικού συνδέτη. Το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), μέσω του ασύμμετρου τρόπου δόνησης, φέρει μια σαφή και ισχυρή υπέρυθη απορρόφηση, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ευαίσθητος ιχνηλάτης των αλληλεπιδράσεών του στο δινοκυκλικό κέντρο.

Τα ληφθέντα φάσματα UV/Vis και FTIR είναι συμβατά με μία ασθενή, μη δεσμευτική σύνδεση διοξειδίου του άνθρακα σε μια δευτερεύουσα θέση πρόσδεσης του ενζύμου. Αυτή η δέσμευση ρυθμίζεται από ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, που αποδεικνύεται από τη μικρή μετατόπιση του ασύμμετρου τρόπου δόνησης του CO₂. Τα συνδυασμένα αποτελέσματα υποδηλώνουν ως θέση πρόσδεσης την κοιλότητα που βρίσκεται δίπλα στην αίμη α₃, η οποία έχει αποδειχθεί ως ένας προσωρινός ξενιστής και οδηγεί σε συμπεράσματα σχετικά με τις δυναμικές, θερμοδυναμικές και κινητικές, δραστικές διαδρομές που μπορούν να ακολουθήσουν και άλλα καταλυτικά σημαντικά μόρια. Αυτές οι διαδρομές είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την διάρκεια της κατάλυσης, κυρίως μέσω της αναγνώρισης και της διάκρισης του συνδέτη (υποστρώματος) και χρησιμεύουν ως κανάλια εισόδου και/ή εξόδου προς και/ή από το ενεργό κέντρο.

ABSTRACT

Cytochrome *c* oxidase is the final complex of the respiratory chain and catalyzes the exergonic four-electron reduction of molecular oxygen (O₂) to water (H₂O). This redox-driven enzyme conserves part of the released free energy generating a proton motive force that leads to the synthesis of the main biological energy source ATP. *Ba₃*-cytochrome *c* oxidase is a B-type oxidase from the extremely thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*, expressed under elevated temperatures, thus limited oxygen supply, and subjected to discrete ligand binding and electron transfer properties. The *ba₃* oxygen reductase from *Thermus thermophilus* is the only B-type oxidase whose crystallographic structure has been determined. It consists of three subunits with a total of 764 amino acid residues. The low-spin heme *b* and the binuclear heme *a₃*-Cu_B active center are contained in subunit I and the mixed valence homodinuclear (Cu_A^{1.5+}-Cu_A^{1.5+}) copper complex in subunit II. In addition to the 4 e⁻ reduction of O₂, cytochrome *ba₃* also catalyzes the 2 e⁻ reduction of nitric oxide (NO) to nitrous oxide (N₂O), and the 2 e⁻ oxidation of carbon monoxide (CO) to carbon dioxide (CO₂), with the latter having an overall scheme:



Therefore, since carbon dioxide is the product of a catalytically active path of cytochrome *ba₃*, the characterization of its binding to the binuclear center becomes an important issue.

The objective of this study is to reveal the CO₂ mode of binding to *ba₃*-cytochrome *c* oxidase. Ultraviolet/visible (UV/Vis) and Fourier transform Infrared (FTIR)spectroscopies are structure- and redox-sensitive tools able to monitor the binding, of carbon dioxide, a catalytically active ligand. Carbon dioxide (CO₂), through its antisymmetric stretching mode, carries a clear and strong infrared signature, that can be used as a sensitive probe of its interactions into the binuclear center.

The obtained UV/Vis and FTIR spectra are compatible with a weak, non-bonding binding of carbon dioxide into a secondary binding site of the enzyme. This binding is governed by electrostatic interactions, evidenced by the small downshift of the antisymmetric stretching vibration of CO₂. The combined results suggest as the binding site the previously revealed cavity next to heme *a₃*, which has been proven as a

temporary host of ligands and lead to mechanistic conclusions about the possible, thermodynamically and kinetically, active paths that other catalytically important molecules also may follow. These paths are known to play significant role during catalysis, mainly through ligand (substrate) recognition and discrimination and serve as entrance (input) and/or exit (output) channels to and/or from the active center.