



Τεχνολογικό
Πανεπιστήμιο
Κύπρου

Σχολή Γεωτεχνικών
Επιστημών Διαχείρισης
Περιβάλλοντος

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**FTIR ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ
ΤΟΥ ΜΕΘΑΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΛΙΘΑΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΗΝ
ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗ ΟΞΕΙΔΑΣΗ ba_3 ΑΠΟ ΤΟ
*Thermus thermophilus***

ΡΑΦΑΗΛΙΑ ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ

ΛΕΜΕΣΟΣ 2017

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

Πτυχιακή εργασία

**FTIR ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ
ΤΟΥ ΜΕΘΑΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΑΙΘΑΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΗΝ
ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗ ΟΞΕΙΔΑΣΗ ba_3 ΑΠΟ ΤΟ
*Thermus thermophilus***

Ραφαηλία Δημητρίου

Επιβλέπων Καθηγητής
Κος Κωνσταντίνος Κουτσουπάκης

Λεμεσός 2017

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Ραφαηλία Δημητρίου, 2017

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε έρευνα με θέμα «FTIR φασματοσκοπική μελέτη της δέσμευσης του οξικού οξέος (CH_3COOH) στην κυτοχρωμική οξειδάση ba_3 από το *Thermus thermophilus*», του τμήματος Επιστήμη και Τεχνολογία Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου. Η υπόδειξη του θέματος έγινε από τον καθηγητή κύριο Κουτσοπάκη Κωνσταντίνο. Πρώτα από όλα, θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον καθηγητή μου κ. Κουτσοπάκη Κωνσταντίνο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ανάθεση της παρούσας πτυχιακής εργασίας, όπως επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση του τόσο στο εργαστηριακό μέρος της μελέτης όσο και στο θεωρητικό μέρος. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Βαρώτση Κωνσταντίνο για την παραχώρηση του εργαστηρίου αλλά και του απαραίτητου εξοπλισμού για την διεκπεραίωση των πειραμάτων.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές/τριες του τμήματος για τις πολύτιμες γνώσεις αλλά και συμβουλές που μου πρόσφεραν ο κάθε ένας ξεχωριστά όλα αυτά τα χρόνια.

Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους/ες αλλά και συμφοιτητές/τριες μου για την πολύτιμη βοήθεια τους τα τέσσερα αυτά φοιτητικά μας χρόνια αλλά και για την στήριξη τους στην όλη διαδικασία της πτυχιακής μου εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους γονείς μου Ανδρέα και Μαρία αλλά και στα αδέρφια μου για όλα όσα μου πρόσφεραν κατά την διάρκεια των φοιτητικών μου χρόνων.

Τέλος, οφείλω ένα εγκάρδιο ευχαριστώ σε ένα ξεχωριστό άνθρωπο στην ζωή μου, τον αρραβωνιαστικό μου Αναστάση Λάμπρου, στον οποίο και αφιερώνω την πτυχιακή μου εργασία, για όλη την υπομονή που έδειξε τα τέσσερα αυτά χρόνια αλλά και την στήριξη του σε κάθε δυσκολία που παρουσιάστηκε μέχρι την ολοκλήρωση των σπουδών μου. Επίσης, θέλω να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην επιλογή μου αυτή να φοιτήσω στον κλάδο Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος αλλά και στην επιλογή του θέματος της πτυχιακής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ba_3 -κυτοχρωμική οξειδάση είναι ένα αναπνευστικό ένζυμο το οποίο καταλύει την ενεργειακή απόδοση της αναγωγής του μοριακού οξυγόνου στο νερό και η κρυσταλλική δομή της προέρχεται από ένα εξαιρετικά θερμοφίλο βακτήριο, το *Thermus thermophilus*. Επίσης, το συγκεκριμένο ένζυμο κατηγοριοποιείται στην υπεροικογένεια των οξειδασών της αίμης και επιπλέον έχει μοριακή μάζα 85 kDa. Απαρτίζεται από 764 κατάλοιπα, μια αίμη b , μια αίμη a_3 , τρία άτομα χαλκού (2-Cu_A και 1-Cu_B), κανάλια μεταφοράς ηλεκτρονίων, πρωτονίων και οξυγόνου, τα οποία οδηγούν απευθείας στη δραστική θέση (ενεργό κέντρο), μια δέσμη από 15 έλικες (διαμεμβρανικές) και ένα μικρό περιπλασματικό τομέα. Αποτελεί το τελικό σύμπλεγμα από την σύσταση της αναπνευστικής μεμβράνης της πρωτεΐνης σε πολλούς ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς αερόβιους οργανισμούς. Το ένζυμο καταλύει την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου στο νερό ταυτόχρονα με την οξείδωση του ανηγμένου κυτοχρώματος c . Η ελεύθερη ενέργεια αυτής της αντίδρασης διατηρείται ως διαμεμβρανική βαθμίδα πρωτονίων και χρησιμοποιείται ως η κινητήριος δύναμη για την σύνθεση της ATP.

Ο κύριος στόχος της συγκεκριμένης FTIR φασματοσκοπικής μελέτης είναι η εύρεση εάν δεσμεύεται το μεθανικό (HCOOH) και αιθανικό (CH₃COOH) οξύ στο διπυρηνικό κέντρο του κυτοχρώματος- ba_3 και το πώς δεσμεύεται στην συγκεκριμένη περιοχή του ενζύμου. Έγινε χρήση της μεθόδου φασματοσκοπίας υπερύθρου λόγω του ότι με αυτήν την μέθοδο μπορούμε να μελετήσουμε την πιθανότητα συναρμογής των υποκαταστατών, εάν γίνεται κατευθείαν στο ενεργό κέντρο ή σε κάποια δευτεροταγή περιοχή ασθενούς δέσμευσης. Αυτές οι δευτεροταγείς περιοχές ή αλλιώς κοιλότητες είναι σημαντικοί παράγοντες για την καταλυτική δράση του ενζύμου, αφού κάνουν εφικτό τον έλεγχο της κινητικής και θερμοδυναμικής εξέλιξης της αντίδρασης. Σε αυτή την μελέτη γίνεται χρήση δύο υποκαταστατών και σκοπός είναι η εύρεση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που γίνονται στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης.

Η φασματοσκοπική μέθοδος στο υπέρυθρο είναι μια από τις καλύτερες και αξιόπιστες τεχνικές ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης δονητικών μεταβάσεων, όπου με την απορρόφηση της κατάλληλης ακτινοβολίας στα δείγματα προκαλείται διέγερση των μορίων σε υψηλότερες δονητικές στάθμες. Με αυτή την μέθοδο είναι εφικτή η

παρατήρηση χαρακτηριστικών ομάδων που βρίσκονται σε μόρια αλλά και ο προσανατολισμός τους στο χώρο.

Με βάση τα αποτελέσματα που πάρθηκαν από μια σειρά συγκεκριμένων πειραμάτων είναι εμφανής η αλληλεπίδραση του αιθανικού (CH_3COO^-), αλλά και του μεθανικού (HCOO^-) ανιόντος με το διπυρηνικό κέντρο του ενζύμου. Με την FTIR μελέτη έγινε ανίχνευση συγκεκριμένων δονήσεων οι οποίες είναι συμβατές με την αποπρωτονιωμένη μορφή των δύο υποκαταστατών, οι οποίοι προκαλούν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με ομάδες και αμινοξέα που βρίσκονται εξωτερικά συγκεκριμένης κοιλότητας πλησίον του ενεργού κέντρου. Μέσω της παρατήρησης των μετατοπίσεων των δονήσεων έκτασης, οι δύο υποκαταστάτες λειτουργούν ως ανιχνευτές των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στο περιμετρικό περιβάλλον του ενεργού κέντρου του ενζύμου.

Λέξεις κλειδιά: ba_3 -κυτοχρωμική οξειδάση, αιθανικό ανιόν, μεθανικό ανιόν, φασματοσκοπία υπερύθρου, υποκαταστάτης, ενεργό κέντρο, ένζυμο.

ABSTRACT

Ba₃-cytochrome oxidase is a respiratory enzyme which catalyzes the energy efficiency of reducing the molecular oxygen in the water. Its crystalline structure is derived from an extremely thermophilic bacterium, called *Thermus thermophilus*. In addition, this enzyme belongs to the superfamily of haem oxidases and its molecular weight is 85 kDa. It is composed of 764 residues, one *b* haem, one α_3 haem, three copper atoms (2- Cu_A and 1-Cu_B), channels for electron transport, protons, and oxygen, a bunch of 15 transmembrane helices and a small periplasmic domain. All the channels lead directly to the active site. The enzyme is the final complex of the respiratory membrane of the protein in many eukaryotic and prokaryotic aerobic organisms. The catalysis of the reduction of the molecular oxygen in the water occurs simultaneously with the oxidation of the reduced cytochrome *c*. The free energy of this reaction is maintained as a transmembrane proton gradient and is used as the driving force for the ATP synthesis.

The main purpose of the current FTIR spectroscopic study is to observe whether the methanic and ethanic acid bind to the binuclear center of cytochrome *ba₃* and how it binds to the specific region of the enzyme. The infrared spectroscopy method has been used because with this method we can study the likelihood of shuffling the ligands if they bind directly to the active site or to a secondary binding site. These secondary regions, or otherwise cavities, are important factors for the catalytic activity of the enzyme, since they make it possible to control the kinetic and thermodynamic evolution of the reaction. In this study, two substituents are used which act as detectors of the electrostatic and dynamic interactions made at the active site of the protein.

The infrared spectroscopic method is one of the best and most reliable techniques for qualitative and quantitative analysis of vibrational transitions, whereby the appropriate irradiation in the samples induces the stimulation of molecules at higher vibrational voltages. With this method, it is possible to observe characteristic groups in molecules, as well as their location in space. Additionally, an advantage of the method is the analysis of samples with wide range of concentrations or even traces of concentration.

Based on the results obtained from a series of specific experiments, it is evident that an interaction of both the ethanic and the methanic anions occur within the binuclear center of the enzyme. With the FTIR study, vibrational features were detected that are compatible with the deprotonated forms of the two substituents, which cause electrostatic interactions with groups and amino acids located outside the specific cavity. By observing the shifts of stretching vibrations, it is evident that the two ligands function as detectors of electrostatic interactions and give information about the perimeter environment of the active site of the enzyme.

Keywords: *ba*₃-cytochrome oxidase, ethane anion, methane anion, infrared spectroscopy, ligand, active center, enzyme