

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με τίτλο "φασματοφωτομετρικός χαρακτηρισμός UV/Vis και FTIR μελέτη της μυοσφαιρίνης (Mb) και της υπεροξειδάσης του χρένου (HRP)" εκπονήθηκε στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου. Είχε συνολική διάρκεια ενός έτους και διεξήχθη υπό την επίβλεψη των Δρ. Κωνσταντίνου Βαρώτση και Δρ. Κωνσταντίνου Κουτσουπάκη.

Αρχικά διεξάχθηκαν πειράματα με την χρήση της φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV/Vis) με την μυοσφαιρίνη (Mb) και στην συνέχεια με την χρήση της υπέρυθρης φασματοσκοπίας (FTIR). Η μυοσφαιρίνη είναι η πρωτεΐνη, η οποία έχει την ικανότητα να δεσμεύει το μοριακό οξυγόνο (O_2) και να το μεταφέρει στους μύες. Ο σκοπός των συγκεκριμένων πειραμάτων είναι η μελέτη του συμπλόκου Mb- N_3 , και ο προσδιορισμός των ιδιοτήτων του ενεργού κέντρου. Η επιλογή του συγκεκριμένου υποκαταστάτη έγινε λόγω του ότι δημιουργεί ένα σταθερό σύμπλοκο με την οξειδωμένη Fe^{3+} μορφή της μυοσφαιρίνης. Στην συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση του παράγοντα της θερμοκρασίας, όπου παρατηρήθηκε ότι η δέσμευση του υποκαταστάτη στην αίμη είναι μεγαλύτερη όσο η θερμοκρασία μειώνεται. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στους θερμοδυναμικούς παράγοντες σχηματισμού του συμπλόκου Mb- N_3 (εντροπία (ΔS) και ενθαλπία (ΔH)).

Κύριο αντικείμενο της πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη της υπεροξειδάσης του χρένου (HRP) με την χρήση φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV/Vis) και FTIR φασματοσκοπίας. Η υπεροξειδάση του χρένου χρησιμοποιεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) για να οξειδώσει μια ευρεία ποικιλία οργανικών και ανόργανων ενώσεων, μέσω μιας σειράς αντιδράσεων οξείδωσης που οφείλεται στο σχηματισμό ριζικών ενδιάμεσων. Η υπεροξειδάση του χρένου οξειδώνεται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 και η ενδιάμεση οξειδωμένη μορφή της επανέρχεται στην αρχική της κατάσταση προσλαμβάνοντας τα δύο ηλεκτρόνια που της λείπουν από τον αρωματικό δακτύλιο του υποστρώματος, μέσω δύο οξειδωτικών αντιδράσεων. Για την αρχική μελέτη της HRP πραγματοποιήθηκε οπτικός χαρακτηρισμός των συμπλόκων που

δημιουργεί τόσο σε οξειδωμένη, όσο και σε ανηγμένη μορφή με διάφορους υποκαταστάτες όπως το μονοξείδιο του άνθρακα (CO), το κυάνιο (CN) και το αζίδιο (N_3). Σε όλες τις περιπτώσεις πλην του αζιδίου υπήρξε δημιουργία σταθερών συμπλόκων και σε ένα εύρος pH 5.0-9.0. Ο προσδιορισμός των ιδιοτήτων του ενεργού κέντρου της υπεροξειδάσης του χρένου, τόσο σε κατάσταση ισορροπίας, όσο και σε μεταβατική κατάσταση (φωτόλυση CO) μελετήθηκε και με την χρήση της FTIR φασματοσκοπίας σε εύρος pH 3.4-7.0, με στόχο την παρατήρηση φαινομένων πρωτονίωσης και αποπρωτονίωσης αμινοξέων του αιμικού περιβάλλοντος και ειδικότερα της ιστιδίνης και αργινίνης. Χρησιμοποιώντας ως υποκαταστάτη «ανιχνευτή» το αέριο μονοξείδιο του άνθρακα CO αποκτήσαμε πληροφορίες για τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Σε αυτό το εύρος τιμών pH αναμένουμε φαινόμενα πρωτονίωσης των distal αμινοξέων της αίμης His42 και Arg38, τα οποία πιθανότατα συμμετέχουν και στην καταλυτική λειτουργία του ενζύμου. Με την χρήση συνεχούς c.w. laser ορατού πραγματοποιήθηκε φωτόλυση του δεσμού Fe-CO. Αυτός ο δεσμός είναι φωτοευαίσθητος το δε CO αρχικά απελευθερώνεται και μετέπειτα επαναδεσμεύεται στην αίμη. Τα αποτελέσματα έδειξαν μεταβολές τόσο στην περιοχή απορρόφησης του δεσμού του CO ($1900-2200\text{ cm}^{-1}$), όσο και στην περιοχή απορρόφησης των αμινοξικών καταλοίπων ($1200-1700\text{ cm}^{-1}$). Αυτές οι μεταβολές είναι συμβατές με φαινόμενα πρωτονίωσης-αποπρωτονίωσης αμινοξέων. Περαιτέρω μελέτη είναι απαραίτητη με την τεχνική step-scan FTIR για την κινητική μελέτη των ιδιοτήτων του ενεργού κέντρου της HRP υπεροξειδάσης.